Synthese und biologische Evaluation inverser α -Aryl-substituierter Fosmidomycin-Analoga

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Christoph Timon Behrendt

aus Hamburg

Düsseldorf 2011

aus dem Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Referent: Prof. Dr. Thomas Kurz

Koreferent: Prof. Dr. Holger Gohlke

Tag der mündlichen Prüfung: 9.12.2011

" Ich habe keine besondere Begabung, sondern bin nur leidenschaftlich neugierig"

(Albert Einstein)

Die vorliegende Arbeit wurde im Oktober 2007 am Institut für Pharmazie in Hamburg begonnen und am Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie in Düsseldorf im März 2011 vollendet. Mein allergrößter Dank gilt meinem Doktorvater und Mentor, Herrn Prof. Dr. Thomas Kurz. Einerseits bedanke ich mich für das entgegengebrachte Vertrauen und die Überlassung des Promotionsthemas, andererseits bin ich ihm für die vorbildliche Betreuung und Anleitung während der gesamten Promotionszeit sehr verbunden. Seine unermüdliche Motivation und Begeisterung für die Forschung auf dem Gebiet der Tropenkrankheiten waren mir stets ein besonderes Vorbild, von dem ich viel gelernt habe.

Das Koreferat wurde freundlicherweise von **Herrn Prof. Dr. Holger Gohlke** übernommen, dem ich dafür ganz herzlich danke.

Auf den Weg der Forschung und der Begeisterung für die Pharmazeutische und Medizinische Chemie brachte mich ursprünglich Herr Prof. Dr. Detlef Geffken, dem ich an dieser Stelle für die besondere Förderung und die Aufnahme in seinen Arbeitskreis in Hamburg danken möchte.

Ohne die Durchführung der biologischen Untersuchungen im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Markus Fischer im Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hamburg sowie den Arbeitskreisen von Herrn Dr. Wolfgang Eisenreich und Herrn Prof. Dr. Michael Groll im Center for Integrated Protein Science der Technischen Universität München, als auch im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Louis Maes am LMPH der Universität von Antwerpen wäre die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen. In diesem Zusammenhang gehört einerseits mein besonderer Dank den Arbeitsguppenleitern für die tolle und fruchtbare Zusammenarbeit. Andererseits möchte ich mich bei Frau Andrea Kunfermann dafür bedanken, dass sie sich mit viel Engagement und Begeisterung der Aktivitätsbestimmung aller von mir synthetisierten Verbindungen gg. EcDxr widmete und maßgeblich zur Aufklärung des Bindungsmodus einer Zielverbindung an diesem Enzym beitrug. Für die anspruchsvollen Messungen am PfDxr-Enzym bedanke ich mich herzlich bei Herrn Dr. Boris Illarionov und seiner Frau, Dr. Viktoriya Illarionova, die leider vor Kurzem plötzlich und unerwartet verstarb. Bei Frau An Matheeussen möchte ich mich für ihre Kooperation bei der antiplasmodialen und zytotoxischen Bestimmung aller Endverbindungen im Zellkulturassay bedanken.

Dem gesamten **Arbeitskreis Kurz** danke ich für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima sowie den respektvollen Umgang miteinander. Insbesondere möchte ich mich bei **Karin Brücher** für den gemeinsamen Austausch auf dem Gebiet der Phosphonohydroxamsäurechemie sowie ihr fleißiges Korrekturlesen bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gebührt **Frau Dr. Miriam Pein**, die mich während der gesamten Promotionszeit motiviert und beraten hat. Ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft und tatkräftige redaktionelle Unterstützung geben ihr einen großen Anteil an dem Gelingen der vorliegenden Arbeit.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich immer wieder mit wichtigen Worten in schwierigen Zeiten aufgebaut haben. Insbesondere ohne die bedingungslose Unterstützung meiner Mutter wäre ich nicht zu dem geworden, was ich heute bin. Außerdem hat mich meine Lebenspartnerin Daniela Grimme mental sehr unterstützt und mit ihrer aufrichtigen Liebe außerordentlich gestärkt.

Abkürzungsverzeichnis

Å Angström

AAV Allgemeine Arbeitsvorschrift

ACE Angiotensin Converting Enzyme

ACT artemisinine combination therapy

AIDS aquired immune deficiency syndrome

aliph. aliphatisch

APAD 3-Acetylpyridin Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid

Ar aromatischer Rest

aromat. aromatisch

Bn Benzyl

Boc *tert*-Butyloxycarbonyl

¹³C-NMR carbon nuclear magnetic resonance

CDC Center for Disease Control and Prevention

CDCl₃ Chloroform, deuteriert

CDI 1,1´-Carbonyldiimidazol

CoA Coenzym A

Cy Cyclohexan

CYP 450 Cytochrom P450

δ chemische Verschiebung

d Dublett

dA/dt zeitliche Veränderung der gemessenen Absorption

DC Dünnschichtchromatographie

DMAPP Dimethylallyldiphosphat

DMF N,N-Dimethylformamid

DMSO-*d*₆ Dimethylsulfoxid, deuteriert

DNA Desoxyribonukleinsäure

DOXP 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat

Dxr 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase

Dxs DOXP-Synthase

E. coli Escherichia coli

EDC 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid

eq Äquivalentmenge

Et Ethyl

et al. et alii

E. tenella Eimeria tenella

EtOAc Ethylacetat

FCS fetal calf serum

gem. geminal

gfp Grün fluoreszierendes Protein

gg. gegenüber

h hours = Stunden

HCI Salzsäure

HDAC Histon-Desacetylase

HIV-IN HIV-Integrase

HIV-Reverse Transkriptase

HPLC Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Hz Hertz

IC₅₀ Konzentration, die zu einer 50 %igen Inhibition führt

i.p. intraperitoneal

IPP Isopentenyldiphosphat

*i*Pr Isopropylrest

IR Infrarot

J Kopplungskonstante

kDa Kilodalton

KGW Körpergewicht

K_i Dissoziationskonstante eines Inhibitors (Enzymkinetik)

λ Wellenlänge

LC liquid chromatography

LDH Lactatdehydrogenase

LMPH laboratory for microbiology, parasitology and hygiene

logP dekadischer Logarithmus des Oktanol-Wasser-

Verteilungskoeffizienten

m Multiplett

M Mol pro Liter

Me Methyl

MEM minimum essential medium

MEP 2-*C*-Methyl-D-erythritol-4-phosphat

MHK Minimale Hemm-Konzentration

MMP Matrixmetalloprotease

MMV Medicines for Malaria Venture

MO Molekülorbital

MRC-5 humane, fetale Lungenfibroblastenzelllinie

MW relatives Molekulargewicht

MST mean survival time

v Wellenzahl in cm⁻¹

NaCl Natriumchlorid

NADH Nikotinamidadenindinukleotid, reduziert

NADPH Nikotinamidadenindinucleotidphosphat, reduziert

n.b. nicht bestimmt

NBT Nitroblautetrazoliumchlorid

n-BuLi *n*-Butyllithium

n.d. nicht determiniert

NOE Nuklear Overhauser Effekt

P. Plasmodium

PBS phosphate buffered saline = phosphatgepufferte Salzlösung

PCR polymerase chain reaction = Polymerasekettenreaktion

PDF Peptiddeformylase

PES Phenazin-Ethosulfat

p.o. per os, perorale Gabe

POM Pivaloyloxymethyl

ppm parts per million

Pyr Pyridin

q Quartett

RBC red blood cells (deutsch = Erythrozyten)

rel. Std. relative Standardabweichung (in %)

RPMI Roswell Park Memorial Institute

RT Raumtemperatur

s Singulett

s.a. siehe auch

SAR structure activity relationship = Struktur-Wirkungs-Beziehung

SC Säulenchromatographie

S_N2t nukleophile Substitutionsreaktion mit tetraedrischer

Zwischenstufe

spp. species pluralis

t Triplett

t-Bu tertiär-Butyl-Rest

TEA Triethylamin

TEP Triethylphosphit

THF Tetrahydrofuran

TMS Trimethylsilan

TMSBr Trimethylsilylbromid

TRIS-HCI Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid-Puffersalz

v.a. vor allem

vgl. verglichen

WHO World Health Organization

1,2,3,... mit arabischen Ziffern bezeichnete Verbindungen werden

erstmalig im Rahmen dieser Arbeit beschrieben

I,II,III,... mit römischen Ziffern bezeichnete Verbindungen wurden bereits

von anderen Autoren beschrieben oder vom Autor dieser Arbeit

nicht in ausreichender Reinheit gewonnen

Vorwort

Malaria gehört derzeit neben AIDS und Tuberkulose zu den schwerwiegendsten Infektionskrankheiten der Bevölkerung tropischer und subtropischer Regionen in Afrika, Asien und Südamerika.

Aufgrund der weitverbreiteten Resistenz der krankheitsverursachenden Plasmodien gg. etablierten Chemotherapeutika wie z.B. Chloroquin ist das Spektrum an wirksamen Arzneistoffen inzwischen sehr eingeschränkt. Berichte aus der Grenzregion von Kambodscha über eine verminderte Empfindlichkeit von Plasmodien-Stämmen gg. Artemisininderivaten deuten sogar an, dass mittelfristig kaum noch wirksame Therapieoptionen für Malariainfektionen vorhanden sein könnten.

Da überwiegend arme Menschen an Malaria erkranken, ist auch der finanzielle Anreiz für die Entwicklung neuer Wirkstoffe gegen Malaria für profitorientierte pharmazeutische Konzerne kaum gegeben. Deshalb kommt es besonders auf die Forschungsanstrengungen von universitären Einrichtungen an, damit neuartige Wirkstoffe gegen Malaria gefunden werden. Verschiedene Arbeitskreise befassen sich seit circa 15 Jahren mit der Strukturmodifikation und dem antiparasitären Wirkprinzip Fosmidomycins. Mit der vorliegenden Arbeit soll basierend auf bisherigen Erkenntnissen ein Beitrag zur Strukturoptimierung Fosmidomycins geleistet werden.

Inhaltsverzeichnis

1	Einl	<i>Einleitung15-64</i>				
	1.1	Malari	a	15		
		1.1.1	Epidemiologie	15-17		
		1.1.2	Aktuelle Chemotherapie	17-19		
		1.1.3	Wirkstoffe in klinischer Entwicklung	19-22		
		1.1.4	Der Apikoplast als Zielstruktur für altbewährte und r Wirkstoffe			
		1.1.5	Die mevalonatunabhängige Isoprenoid-Biosynthese Zielstruktur für antiinfektive Wirkstoffe			
		1.1.6	Die 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomer (Dxr, IspC) als neues Malaria-Target			
		1.1.7	Der Arzneistoff Fosmidomycin als Antibiotikum und Antimalariamittel	42-47		
		1.1.8	Fosmidomycin als Leitstruktur für neue Antimalaria- Wirkstoffe			
			1.1.8.1 Molekülregion A: Die Phosphonsäurefunktion	on48-51		
			1.1.8.2 Molekülregion B: Die Propylkette	51-59		
			1.1.8.3 Molekülregion C: Die Hydroxamsäurefunktion	on59-60		
			1.1.8.4 Entwicklung inverser Fosmidomycinanaloga	a60-63		
	1.2	Aufga	benstellung	64-65		
2	α-Pl	henyl-l	Fosmidomycin-Analoga mit	inverser		
	Hyd	lroxam	säurefunktion	66-89		
	2.1	Synth	eseidee	66-68		
	2.2	•	eseplanung			
		•				
	2.3		synthese			
	2.4	-	ese der Zielverbindungen			
	2.5		spektroskopische Besonderheiten			
	2.6		nisse der biologischen Untersuchungen			
	2.7	Interp	retation der biologischen Untersuchungen	88-89		

3	lpha-Aryl-Fosmidomycin-Analoga mit unterschiedlichen inve			
	chela	atisierenden Gruppen	90-106	
	3.1	Theoretischer Hintergrund	90-91	
	3.2	Austausch der inversen Hydroxamsäure- gegen eine Thioesterfunktion	92-94	
		3.2.1 Syntheseidee	92-93	
		3.2.2 Syntheseplanung	93	
		3.2.3 Eduktsynthese	94	
		3.2.4 Produktsynthese	95	
	3.3	Austausch der inversen Hydroxamsäure- gegen eine Phosphonsäurefunktion	95-99	
		3.3.1 Syntheseplanung	95-96	
		3.3.2 Synthese	96-97	
		3.3.3 NMR-spektroskopische Eigenschaften	97-99	
	3.4	Austausch der inversen Hydroxamsäure- gegen eine N-Hydroxy -Methylcarbamatfunktion	99-103	
		3.4.1 Syntheseidee	99-100	
		3.4.2 Syntheseplanung	100	
		3.4.3 Synthese	101-102	
		3.4.4 Spektroskopische Eigenschaften	103	
	3.5	Austausch der inversen Hydroxamsäure- gegen eine Carbonsäurefunktion	103-104	
	3.6	Ergebnisse der biologischen Untersuchungen	104-106	
4	Inve	rse Hydroxamsäureanaloga Fosmidomycins mit		
	unterschiedlichen aromatischen Substituenten in $lpha$ -Position106			
	4.1	Synthese	107-109	
	4.2	NMR-spektroskopische Eigenschaften	110-111	
	4.3	Ergebnisse der biologischen Untersuchungen	111-112	

	4.4	Interpretation der biologischen Daten113-114				
	4.5	Antiplasmodiale In vivo Aktivität der Analoga 62 und 70114-119				
	4.6	Kristallstrukturanalyse des Ternärkomplexes aus EcDxr, Mn²+ und des Analogons 62119-121				
5	Der	Derivatisierung der inversen Hydroxamsäure- zur				
	N-H	ydroxyimidfunktion121-126				
	5.1	Syntheseidee121-123				
	5.2	Syntheseplanung123-124				
	5.3	Synthese124-125				
	5.4	IR-spektroskopische Eigenschaften125-126				
	5.5	Biologische Eigenschaften126-127				
6	Phosphonsäureesterprodrugs ausgewählter inverser					
	Hydroxamsäureanaloga Fosmidomycins127-131					
	6.1	Rationale127-128				
	6.2	Synthese129-130				
	6.3	Ergebnisse und Diskussion der biologischen Untersuchungen130-131				
7	Experimenteller Teil132-232					
	7.1	Verzeichnis der Geräte und Analysemethoden132-133				
	7.2	Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)134-140				
	7.3	Analytische Daten zu Kapitel 2141-164				
	7.4	Analytische Daten zu Kapitel 3165-176				
	7.5	Analytische Daten zu Kapitel 4177-211				
	7.6	Analytische Daten zu Kapitel 5212-214				
	7.7	Analytische Daten zu Kapitel 6215-224				
	7.8	Untersuchung der Dxr-Enzymhemmung225-227				
		7.8.1 Material und Methoden225				

	7.8.1	1.1	Rekombinante Gewinnung der orthologen Dxr-Enzyme	.225-226
	7.8.1	1.2	IC ₅₀ -Bestimmung im photometrischen Assay	.226-227
			der antiplasmodialen <i>In vitro</i> und <i>In vivo l</i> toxizität	
	7.9.1		Material und Methoden der <i>in vitro</i> Bestimmungen	.227-230
	7.9.1	1.1	Herstellung der Testplatten	227
	7.9.1	1.2	Methodik	227
	7.9.1	1.3	In vitro P. falciparum-Kultur und Wirkstoffassays	.227-229
	7.9.7	1.4	Zytotoxizitäts-Tests an MRC-5-Zellen	.229-230
	7.9.2		rial und Methoden der <i>In vivo</i> mmungen	.230-232
	7.9.2	2.1	Beschreibung der Versuchstiere und deren künstliche Infektion	
	7.9.2	2.2	Testsubstanz-Formulierungen	230
	7.9.2	2.3	Behandlungsschema	231
	7.9.2	2.4	Evaluationsparameter	.231-232
8	Zusammenfas	sung		232-237
9	Summary		2	237-241
10	Literaturverze	ichnis.		24 2- 263
11	Anhang		2	264-266
	11.1 Gefahrenm	nerkmal	le und	
				264-265
	11.2 Lebenslau	f		266

1 Einleitung

1.1 Malaria

1.1.1 Epidemiologie

Malaria ist eine der am weitest verbreiteten Infektionskrankheiten weltweit. Nach jüngsten Zahlen der WHO gab es im Jahr 2008 eine Inzidenz von schätzungsweise 243 Millionen klinisch registrierten Fällen, wobei 863 000 Menschen der Krankheit erlagen. Häufig sind schwangere Frauen sowie Kinder unter 5 Jahren betroffen. Hingegen sind Individuen, die mehrere Infektionen überstehen, durch vor Immunsystem teilweise weiteren schwerwiegenden Infektionen im Erwachsenenalter geschützt. Ungefähr 40 % der Weltbevölkerung lebt in tropischen und subtropischen Regionen, in denen Malaria endemisch ist. 1,2 Milliarden Menschen leben in Hochrisikogebieten mit mindestens einem Erkrankungsfall pro 1000 Einwohnern pro Jahr. Zum größten Teil liegen die Endemiegebiete in Afrika (49 %) und Süd-Ost-Asien (37 %).1 Aufgrund des malariabedingten Anstiegs der Kindersterblichkeitsrate wird die demographische Entwicklung der überwiegend armen Bevölkerung in den betroffenen Ländern empfindlich gestört. Malaria ist somit eine bedeutende Ursache und Konseguenz von Armut.* Die wichtigsten humanpathogenen Malariaerreger sind Plasmodium malariae (P. malariae), Plasmodium ovale (P. ovale), Plasmodium vivax (P. vivax) und v.a. Plasmodium falciparum (P. falciparum). Für die meisten schweren Erkrankungen und Todesfälle im subsaharischen Afrika ist *P. falciparum* verantwortlich, wohingegen außerhalb Afrikas P. vivax die größte Prävalenz aufweist. 4 P. falciparum löst das Krankheitsbild Malaria tropica aus, welches sich durch hohe Parasitämie, teils ausgeprägte Anämie und bei der komplizierten Form durch häufige neurologische Komplikationen auszeichnet. P. vivax und P. ovale sind Erreger der Malaria tertiana, P. malariae verursacht Malaria quartana, welche im Gegensatz zur Malaria tertiana häufig zwei fieberfreie Tage beinhaltet. Bei P. vivax und P. malariae kommt erschwerend hinzu, dass sie in ihren Lebenszyklen Ruheformen ausbilden, welche selbst nach Monaten bis Jahren

^{*} Schätzungen zufolge wird das Wirtschaftswachstum der Entwicklungsländer durch Malaria pro Jahr um 1,3 % verlangsamt. Umgerechnet auf das Bruttosozialprodukt der südlich der Sahara liegenden Länder entspricht das einer Einbuße von circa 12 Milliarden US\$ pro Jahr.^{2, 3}

durch Reaktivierung zu Rezidiven der Krankheit führen können. [†] Alle humanpathogenen Plasmodien werden durch weibliche *Anopheles*-Stechmücken
übertragen. Durch Verbesserung der Parasitendiagnostik konnte gezeigt werden,
dass neben *P. falciparum* auch *P. vivax* Verursacher von Malariaerkrankungen mit
Todesfolge sein kann, so dass diese Spezies zur Gesamtmorbidität beiträgt.⁵
Darüber hinaus wurde mithilfe von PCR-Detektionsmethoden gezeigt, dass bis zu
30 % aller klinischen Fälle von Malaria Mischinfektionen mit *P. falciparum* und *P. vivax* darstellen.⁶

Seit einigen Jahren geht die Anzahl der Malariaerkrankungen zurück. Eine Ursache für diese Entwicklung ist die stärkere Aufmerksamkeit, die private sowie öffentliche Stiftungen und Institutionen der Drosselung der Malariaausbreitung widmen. Die Bill & Melinda Gates Foundation, die US National Institutes of Health und die Europäische Kommission widmen sich seit Kurzem verstärkt dieser bislang von der westlichen Welt vernachlässigten Tropenkrankheit. Im Speziellen die Bill & Melinda Gates Foundation hat sich seit November 2007 mit dem dafür geschaffenen "Global Fund to Fight AIDS, Tuberculosis and Malaria" das sehr ehrgeizige Ziel der weltweiten Eradikation der Malaria gesteckt.⁷ Die WHO unterstützt dieses Ziel mit ihrem Roll Back Malaria (RBM)-Projekt. Darin werden sowohl wissenschaftliche Projekte zur Entwicklung neuer Medikamente gegen Malaria als auch die Verbesserung der Infrastruktur in Endemiegebieten verstärkt finanziell unterstützt. Der rationale Einsatz von wirksamen Insektiziden und von Insektizid-imprägnierten Moskitonetzen ist die derzeit beste Malaria-Prophylaxe der gefährdeten Bevölkerung.⁸ Eine effektivere Langzeitprophylaxe könnte eine Impfung vermitteln, die sich direkt gegen die Malariaerreger richtet. Die Entwicklung eines Impfstoffes ist anderem dadurch erschwert. dass der Parasit Vermehrungszyklus verschiedene Lebensformen unterschiedlicher Morphologie durchläuft und eine hohe Variabilität der Antigene aufweist. Des Weiteren entwickelten die Parasiten im Laufe ihrer Evolution ausgefeilte Mechanismen, um dem Angriff des menschlichen Immunsystems zu entgehen.9 RTS,S/AS02A befindet sich gegenwärtig als effektivster prä-erythrozytärer Impfstoff in Klinischer Phase III seiner Entwicklung.[‡] Dieses Vakzin verringert die Anzahl schwerwiegender Malaria

[†] Im Gegensatz zu *P. vivax* bildet *P. malariae* keine Rezidive, die aus Hypnozoiten in der Leber entstehen. Vielmehr ist das Auftreten von Rekrudeszenzen auf persistierende erythrozytäre Formen zurückzuführen.

[‡] RTS,S/AS02A der Firma GlaxoSmithKline ist ein rekombinantes Protein bestehend aus Teilen des Circumsporozoit-Proteins(CSP) von *P. falciparum* und einem Hepatitis B-Oberflächenantigen. Die induzierte Immunantwort soll sich gegen plasmodiale Sporozoiten richten.

tropica-Erkrankungen nach der ersten Gabe bei Kindern im Alter von 6-12 Wochen und 5-17 Monaten (n = 15.460) insgesamt um 34,8 % (16,2 - 49,2 %) im Vergleich zur Gabe eines Nicht-Malaria-Impfstoffs (follow-up = 11 Monate). Ein absoluter Schutz vor Neuinfektionen und jahrelange Immunität sind mit diesem Impfstoff nicht erreichbar. Vielmehr sollen die insbesondere für Kinder lebensbedrohlichen Komplikationen wie Blutarmut und der Parasitenbefall des Gehirns verhindert werden. Eine durch *P. falciparum* ausgelöste zerebrale Malaria führt medikamentös unbehandelt zu schweren Dauerschäden oder zum Tod des Patienten.

1.1.2 Aktuelle Chemotherapie

Eine effektive Chemotherapie der Malaria bleibt unverzichtbar. Arzneistoffe, die sich gegen Blutschizonten richten, sind in diesem Zusammenhang besonders wichtig. In der asexuellen Entwicklungsphase finden sich pro Vermehrungszyklus des Parasiten zwischen 109-1013 Merozoiten im Blut der infizierten Patienten wieder. Die damit verbundene parasitäre Belastung des Wirtsorganismus wird hauptsächlich für die klinischen Symptome der Malariaerkrankung verantwortlich gemacht. Alarmierend ist die Tatsache, dass Plasmodien im Laufe der Zeit gegen alle etablierten Wirkstoffe Resistenzen oder Toleranzen ausgebildet haben. 12 Aufgrund ihrer hohen Vermehrungsrate gilt es als unvermeidbar, dass sich im Laufe des wiederholten Einsatzes effektiver Antimalariamittel unweigerlich Wirkstoffresistenzen der Erreger ausbilden.²⁷ Insbesondere die fortwährende Exposition gg. monotherapeutisch eingesetzten Arzneistoffen führte rasch Selektion zur Plasmodienstämme. 13 Inzwischen sind zum Beispiel mehr als 80 % der Feldisolate von P. falciparum Chloroquin-resistent,14 in einigen Gebieten Afrikas erreicht die Quote sogar schon 100 %.15 Hinzu kommt, dass durch die chemische Verwandtschaft zwischen den etablierten Wirkstoffen häufig Kreuzresistenzen auftreten. Von der WHO sind daher 2006 neue Richtlinien zur Behandlung der unkomplizierten Malaria entwickelt worden. Diese sehen vor, dass zukünftig nur Kombinationen Arzneistoffen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen aus therapeutisch eingesetzt werden sollen.¹ Idealerweise besitzen die kombinierten Wirkstoffe auch ähnliche pharmakokinetische Eigenschaften, damit über die gesamte Therapiedauer der Wirksynergismus aufrecht erhalten bleibt. Als Goldstandard für eine effektive Behandlung einer unkomplizierten Malariainfektion werden Artemisinin-

Kombinationstherapien (ACT) in einer fixen Dosierung angesehen. Mit einem geschätzten Marktanteil von 75 % bezogen auf alle bisher zugelassenen ACTs hat dabei die Kombination aus Artemether und Lumefantrin (Coartem®) einen besonderen Status erreicht. 16,§ Durchgesetzt hat sich das Arzneimittel vor allem aufgrund des günstigen Umstands, dass Lumefantrin nie als Monotherapeutikum eingesetzt und noch nicht über Lumefantrin-resistente Stämme berichtet wurde. Dagegen sind ACTs gg. Hypnozoitstadien von P. vivax wirkungslos und aufgrund der kurzen Halbwertszeit der Artemisininkomponente für eine Chemoprophylaxe unbrauchbar. Zudem erreicht die Artemisininkomponente rasch subtherapeutische Konzentrationen, während der Wirkstoffpartner häufig eine längere Halbwertszeit aufweist. Gegen alle ACTs können sich deshalb zum Ende der Therapie resistente Plasmodienstämme selektieren. Ein besonders problematischer Umstand der ACTs ist ihre aufwendige Produktion, so dass die Therapiekosten für die Behandlung eines erwachsenen Patienten trotz großer Anstrengungen seitens des Herstellers nicht auf weniger als 1 US\$ pro Tag gesenkt werden konnten. Auch die Kosten zur Behandlung eines Kindes mit ACTs liegen bei mindestens 0,35 US\$. Da gerade in den Malaria-Endemiegebieten große Armut herrscht, sind ACTs für die Mehrzahl der Patienten nicht bezahlbar. Nur durch die kürzlich geschaffene Initiative "Affordable Medicines Facility for malaria" (AMFm), die finanzielle Unterstützung durch die WHO und den "Global Fund to Fight AIDS, Tuberculosis and Malaria" erhält, wurden in den letzten Jahren mehr als 300 Millionen ACT-Behandlungen in Afrika finanziert und durchgeführt. 17 Erste Anzeichen für eine potenzielle Resistenzentwicklung gg. Artemisininen bieten Berichte aus der Thailand-Kambodscha-Grenzregion über verlängerte Behandlungszeiträume¹⁸ sowie eine erhöhte Toleranz¹⁹ von klinischen Isolaten. Bisher konnte aber noch kein Artemisinin-resistenter Plasmodium-Stamm isoliert werden. Für eine Chemoprophylaxe hat sich die Wirkstoffkombination aus Atovaquon und Proguanil (Malarone®) als derzeitiger Goldstandard etabliert. Das Arzneimittel kann - wie Mefloquin (Lariam®) - auch nach einer Infektion und bei Eintreten der ersten Symptome angewendet werden. Darüber hinaus ist das Mittel auch bei Kindern ab einem Körpergewicht (KGW) von 11 kg (Malarone junior®) zugelassen. Die sehr gute Wirksamkeit des Arzneimittels ist auch darin begründet, dass die Wirkstoffpartner einen Wirksynergismus aufweisen und sowohl gg. Blut- als

[§] Darüber hinaus sind die pädiatrische Arzneiform Coartem® Dispersible (entwickelt von Novartis und der MMV) und Coarsucam® (Amodiaquin/Artesunat-Kombination entwickelt von *Drugs for Neglected Disease initiative* und Sanofi-Aventis) als wichtige und von der WHO genehmigte ACTs zu nennen.

auch Leberstadien des Parasiten wirksam sind. Bereits in den Fünfziger Jahren des letzten Jahrhunderts scheiterte der letzte Eradikationsversuch der Malaria zum größten Teil an dem vermehrten Auftreten von plasmodialer Resistenz gegen den damals wichtigsten Arzneistoff Chloroquin.²⁰ Für die endgültige Verwirklichung dieses überaus ehrgeizigen Ziels muss deshalb die Entwicklung von Wirkstoffen, die neue Wirkmechanismen aufweisen, im Vordergrund stehen.

1.1.3 Wirkstoffe in therapeutischem Gebrauch und in klinischer Entwicklung

Gemessen an der humanitären Bedeutung der Malaria ist die Anzahl neuentwickelter und therapeutisch eingesetzter Wirkstoffklassen relativ gering. Überdies ist bisher nur für wenige Substanzen der genaue Wirkmechanismus aufgeklärt.²² Atovaquon war 1996 der bisher letzte zugelassene Arzneistoff mit neuartiger chemischer Struktur und Wirkungsmechanismus. Antibiotika wie z.B. Doxycyclin und Clindamycin finden im off-label-use** zur Chemoprophylaxe oder bei akuten Fällen in Kombination mit Chinin Einsatz. Neben der Resistenzproblematik bestehen teilweise therapielimitierende Nebenwirkungen der etablierten Medikamente (Tabelle 1).

Das globale Portfolio aus der Datenbank der *Medicine for Malaria Venture (MMV)* bietet einen Überblick über die gegenwärtigen Entwicklungen neuer Antimalariamittel (Tabelle 2).²³ Aufgrund der zunehmenden Resistenz des Parasiten gg. modernen Therapeutika haben sich die Forschungsanstrengungen in letzter Zeit intensiviert und sogar historische Wirkstoffe wie Methylenblau rücken wieder in das Blickfeld der Forschung.^{24, 25} Zurzeit konzentrieren sich die Entwicklungsaktivitäten verstärkt auf die neuen ACTs. In Phase III der Klinischen Entwicklung befindet sich als einziges Arzneimittel ohne Artemisininanteil eine Wirkstoffkombination aus Azithromycin und Chloroquin der Firma Pfizer. Bei Einsatz dieses Arzneimittels beobachtet man aus noch ungeklärten Gründen einen Wirksynergismus, so dass eine effektivere Malariatherapie als bei jeweiliger Monotherapie resultiert. Überraschenderweise gilt das auch für die Behandlung von Malaria-Patienten aus Endemiegebieten, in denen parasitäre Chloroquinresistenz weit verbreitet ist.

_

^{**} Unter off-label-use versteht man die Anwendung eines zugelassenen Fertigarzneimittels außerhalb der von der Zulassungsbehörde genehmigten Indikation oder in einer anderen Dosierung beziehungsweise Behandlungsdauer.

Wirkstoff	Klasse	Zielstruktur	Problematik
Chloroquin	4-Aminochinolin	Hämozoinbildung	Resistenz
Amodiaquin	4-Aminochinolin	Hämozoinbildung	Toxizität/
			Resistenz
Chinin	Arylaminoalkohol	Unbekannt	Resistenz/
			Nebenwirkungen
Halofantrin	Arylaminoalkohol	Unbekannt	Toxizität
Mefloquin	Arylaminoalkohol	Unbekannt	Resistenz/
			Nebenwirkungen
Lumefantrin	Arylaminoalkohol	Unbekannt	Resistenzentwicklung?
Sulfadoxin/ Pyrimethamin	Antifolate	Folsäurebio- synthese	Resistenz
Artemether	Artemisinin	Unbekannt	Abzeichnende
			Resistenzentwicklung
Artesunat	Artemisinin	Unbekannt	Abzeichnende
			Resistenzentwicklung/
			Pharmazeutische
			Qualität
Atovaquon/	Naphthochinon/Biguanid	Cytochrom bc ₁ -	Cytochrom bc ₁ -
Proguanil		Komplex	Mutationen
Doxycyclin	Antibiotikum	Ribosom	Kontraindiziert bei
			Kindern und
			Schwangeren/nur in
			Wirkstoff-Kombination
Clindamycin	Antibiotikum	Ribosom	nur in Wirkstoff-
			Kombination
Primaquin	8-Aminochinolin	Unbekannt	Hämolyse bei
			Glucose-6-phosphat-
			Dehydrogenase
			(G6PD)-Mangel des
			Patienten

Tabelle 1. Zurzeit eingesetzte Antimalariamittel mit Klassifizierung, Zielstruktur und Wirkstoffproblematik (übersetzt und modifiziert aus Schlitzer, M.; Ortmann, R. ChemMedChem **2010**, 5, 1837-1840).²¹

In Phase II der Klinischen Entwicklung befinden sich überwiegend Wirkstoffe, die Weiterentwicklungen bereits etablierter Arzneistoffe darstellen. Kandidaten mit einer neuartigen chemischen Struktur und einem in der Malariatherapie noch unerschlossenen Wirkmechanismus sind derzeit nur in zwei Projekten zu finden. Zum einen existiert mit SAR97276 eine Studie zur Sicherheit und Verträglichkeit von T3 (Abbildung 1). Dahinter verbirgt sich eine biskationische Verbindung, die strukturell vom Cholin abgeleitet wurde und die selektiv die parasitäre Cholinaufnahme und den Cholinmetabolismus hemmt.²⁶

Abbildung 1. T3 und Cholin.

Wirkstoff	Klasse	Target	Bemerkungen
Piperaquin	4-Aminochinolin	Hämozoinbildung	alte Substanz/
			Resistenz in
			Asien
Pyronaridin	4-Aminochinolin ^a	Hämozoinbildung	alte Substanz/
			Resistenz in
			Asien
Methylenblau	Pleiotrope	Hämozoinbildung	alte Substanz
	Mechanismen ^b		
AQ-13	4-Aminochinolin	Hämozoinbildung	Kreuzresistenz zu
			Chloroquin?
tert-Butylisoquin	4-Aminochinolin	Hämozoinbildung	
Ferroquin	4-Aminochinolin	Hämozoinbildung	
Artemison	Artimisinin 2.Generation	Unbekannt	
Arterolan	Synthetisches Peroxid	Unbekannt	geringe
(OZ277)			Bioverfügbarkeit
OZ439	Synthetisches Peroxid	Unbekannt	
CDRI97/78	Synthetisches Peroxid	Unbekannt	
Fosmidomycin	Phosphonohydroxam-	Deoxyxylulose-	neuer
	säure	Reduktoisomerase	Wirkmechanismus
SAR97267 (T3)	Bis-kationische	Cholinaufnahme/	geringe
	Verbindung	-metabolismus	Bioverfügbarkeit
GSK 932121	4-Pyridon	Cytochrom bc ₁ -	
		Komplex	
Azithromycin	Makrolid-Antibiotikum	Ribosom	
Tafenoquin	8-Aminochinolin	Unbekannt	Hämolyse bei
			G6PD-Mangel

^aAufgrund des wahrscheinlich analogen Wirkmechanismus wird Pyronaridin unter 4-Aminochinolinen eingeordnet; ^bMethylenblau interferiert mit der Hämozoinbildung und ist ein selektiver Hemmstoff der plasmodialen Glutathionreduktase; darüber hinaus zeigt die kombinierte Gabe mit Chloroquin synergistische Effekte. siehe R. Schirmer *et al.*, *Redox Report* **2003**, *8*, 272-275.

Tabelle 2. Übersicht über laufende Arbeiten zur Entwicklung neuer Arzneimittel gegen Malaria (übersetzt und modifiziert aus Schlitzer, M.; Ortmann, R. ChemMedChem **2010**, 5, 1837-1840). ^{23, 19}

Zum anderen wird derzeit eine vielversprechende Klinische Studie zur Wirkstoffkombination aus Fosmidomycin und Clindamycin durchgeführt, die in Kapitel 1.1.7 noch detaillierter beschrieben wird.

Über kurz oder lang wird sich eine plasmodiale Resistenz gg. Artemisininderivaten entwickeln. Parch die Aufklärung der Genome von P. falciparum und vivax eröffnen sich mehr Chancen für eine strukturbasierte Wirkstoffentwicklung. Hinzu kommt, dass P. falciparum im erythrozytären Stadium inzwischen routinemäßig in vitro kultiviert werden kann. So kann ein automatisiertes Wirkstoffscreening im größeren Maßstab auf 384- und 1.536-well-assay-Platten gg. Blutstadien durchgeführt werden. Eine vergleichbare In vitro Kultivierung von P. vivax, P. ovale und P. malariae ist für ein breites Wirkstoffscreening noch nicht möglich. Aus demselben Grund ist auch die Wirksamkeitsuntersuchung von neuen Wirkstoffkandidaten gg. Hypnozoiten- oder Gametozytenstadien erschwert. P. 26, 28

Ein breites "High-throughput-screening" von Molekülbibliotheken der Firma GlaxoSmithKline (GSK) führte jüngst zur Identifizierung von weit über 20.000 Molekülen mit vielversprechenden antiplasmodialen Eigenschaften.²⁹ Allerdings sind knapp 2.000 Moleküle daraus als nennenswert zytotoxisch aufgefallen und ein Großteil weist eine hohe Molekularmasse und ausgepräge Lipophilie auf. In einem weiteren Kollaborationsprojekt zwischen GSK und vielen akademischen Instituten wurden 172 neue Leitstrukturen gefunden, die für die weitere Wirkstoffentwicklung in kommen.³⁰ Letztendlich wird aufgrund der zurückhaltenden Investitionsbereitschaft der pharmazeutischen Industrie auch das Engagement von akademischen Institutionen erforderlich sein, damit aus der großen Anzahl an Wirkstoffleitstrukturen in ferner Zukunft ein neues Antimalariamittel entwickelt werden kann.21

1.1.4 Der Apikoplast als Zielstruktur für altbewährte und neue Wirkstoffe³²

Plasmodium spp. gehören der Klasse der Sporozoa an, welche dem Unterreich der Protozoa zugeordnet werden. Protozoen sind einzellige obligate Endoparasiten und besitzen als morphologisches Charakteristikum in bestimmten Abschnitten ihres Entwicklungszyklus einen Polringkomplex am apikalen Ende. Aufgrund dieser Besonderheit werden die eukaryotischen Sporentierchen auch Apicomplexa genannt. In den Stamm Apicomplexa werden viele medizinisch und ökonomisch relevante Parasiten eingeordnet. Neben Plasmodien sind Toxoplasma gondii, Cryptosporidium parvum und hominis, Isospora belli, Babesia bovis, Cyclospora cayetanensis und Eimeria tenella besonders hervorzuheben. Kryptosporidiosen, Babesiosen und

Kokzidiosen (*E. tenella*) sind sehr problematische Erkrankungen für Zucht- und Haustiere, während Isosporiosen und Cyclosporiosen bevorzugt Menschen und andere Primaten betreffen. Im Gegensatz zu Malariainfektionen sind letztgenannte Erkrankungen in der Regel nur für immunsupprimierte Individuen pathogen. Allerdings treten solche Begleiterkrankungen in Entwicklungsländern unter anderem durch die hohe Prävalenz von AIDS häufiger auf.

23

Mit Ausnahme von *Cryptosporidium spp.*³¹ besitzen die zuvor genannten Sporentierchen einen spezialisierten Plastid prokaryotischen Ursprungs, der als Apikoplast bezeichnet wird. Im Gegensatz zu Plastiden höherer Pflanzen und Grünalgen besitzt dieses Organell zwei zusätzliche Membranen, womit sich insgesamt vier Hüllmembranen ergeben.^{††,32} Im Einklang mit der prokaryotischen Ursprungstheorie finden im Inneren des Organells biochemische Reaktionen statt, die zum Teil auch bei Gram-negativen Bakterien und in den Plastiden höherer Pflanzen anzutreffen sind (Abbildung 2).³²

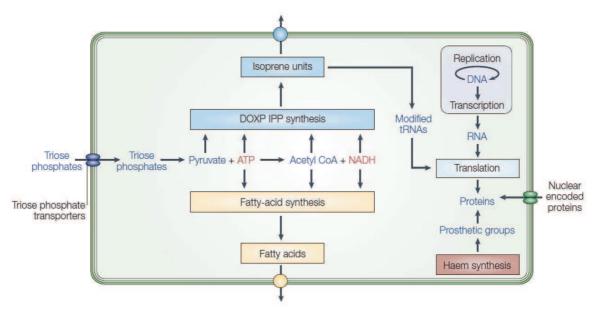


Abbildung 2. Im Apikoplast lokalisierte und bisher identifizierte Metabolismen (übernommen aus Ralph, S. A.; Nature Rev. Microbiol. **2004**, 2, 203-216).³⁹

Ein intakter Apikoplast ist für das Überleben von *P. falciparum* sowohl in der erythrozytären³³ als auch in der hepatischen³⁴ Entwicklungsphase unentbehrlich. Bereits vor der Entdeckung des Apikoplasten beobachtete man die antiparasitäre Wirkung bestimmter Antibiotika, die sich gegen prokaryotische DNA-Topoisomerasen

_

Wahrscheinlich gab es einen gemeinsamen eukaryotischen Vorläufer der Dinoflagellaten und Apicomplexa, der in sekundärer Endosymbiose eine Rotalge aufgenommen hat. In der weiteren evulotionären Entwicklung wurden Teile des cyanobakteriellen Genoms in die eukaryotische DNA integriert und die Rotalge verlor ihre zytoplasmatische Kompartimentierung vollständig. Das Resultat war ein Chloroplast, der im Laufe der Zeit seine Fähigkeit zur Photosynthese verlor.

oder Transkriptions- bzw. Translationsenzyme richten. Inzwischen wurden homologe Enzyme im plasmodialen Apikoplasten als Zielstrukturen identifiziert, was die ausgeprägte antiparasitäre Wirkung spezieller Antibiotikagruppen wie z.B. der Fluorchinolone und prokaryotischer Proteinbiosynthesehemmstoffe wie Clindamycin, Azithromycin oder Tetrazykline erklärt. 35 Ein Charakteristikum der antiplasmodialen Wirkung ist das zeitlich verzögerte Eintreten. Während des ersten intrazellulären Vermehrungszyklus wird bei keiner pharmakologisch relevanten Konzentration des entsprechenden Antibiotikums ein unmittelbar hemmender Effekt auf das Parasitenwachstum beobachtet. Erst circa 48 Stunden nach Gabe und auch unter Abwesenheit der genannten Antibiotika sterben die Parasiten ab. Dieser Befund deutet darauf hin, dass Antibiotika zwar einen unmittelbaren, irreversiblen Effekt auf die Parasiten während des ersten Vermehrungszyklus ausüben, dieser sich aber erst zweiten Vermehrungszyklus parasitenabtötend auswirkt. Offensichtlich beeinträchtigt die Hemmung der essenziellen Enzyme der Genom-Replikation des Apikoplasten nicht unmittelbar die Lebensfähigkeit der Plasmodien. Nachfolgenden Tochtergenerationen fehlt allerdings durch die Wirkung des Antibiotikums ein funktionierender Apikoplast, was auf noch ungeklärtem Weg auch den erneuten Befall von Wirtserythrozyten unmöglich macht.³⁵ Aufgrund der zeitlich verzögerten antiplasmodialen Wirkung erlaubt sich der Einsatz der meisten Antibiotika nur zur Malariaprophylaxe. Bei komplizierten Infektionen mit P. falciparum wird Doxycyclin nur in Kombination mit einem rasch wirksamen Arzneistoff wie Chinin eingesetzt. 35 Im Gegensatz zu antiplasmodial aktiven Antibiotika wirken Inhibitoren von Enzymen, metabolische Umsetzungen im Apikoplasten katalysieren, parasitenabtötend.³⁶ Zu diesen metabolischen Stoffwechselwegen gehören die Fettsäure-Biosynthese vom Typ II, die de novo Häm-Biosynthese, die Eisen-Schwefel-Cluster-Biosynthese und die Isopentenyl-diphosphat (IPP)-Biosynthese (Abbildung 2).³⁷ Letztgenannte verläuft nach dem mevalonatunabhängigen Weg und dient den Plasmodien als einzige Quelle für Isoprenoid-Vorläufer.^{26, 38} Im August 2011 berichteten Yeh und DeRisi über Studien, in denen sie das durch Fosmidomycin inhibierte erythrozytäre Wachstum von P. falciparum durch Zugabe von IPP - nicht jedoch DMAPP - wiederherstellen konnten. Darüber hinaus werden Plasmodien, denen ein funktioneller Apikoplast aufgrund der Antibiotikabehandlung vorhergegangener Parasitengenerationen fehlt, durch Supplementierung mit IPP revitalisiert. Bei Anwesenheit des exogen zugeführten Isoprenoids konnten sich die

künstlich erzeugten Apikoplast-defizienten *P. falciparum*-Stämme über mehrere Generationen *in vitro* vermehren. Scheinbar ist die Isoprenoid-Biosynthese die einzige essenzielle metabolische Funktion des Apikoplasten während der erythrozytären Lebensphase des Plasmodiums.²²⁸

1.1.5 Die mevalonatunabhängige Isoprenoid-Biosynthese als Zielstruktur für antiinfektive Wirkstoffe

Isoprenoide stellen eine chemisch und funktionell sehr variable Gruppe von Naturstoffen dar und sind in wichtige biologische Funktionen wie beispielsweise Proteinabbau, Meiose, Apoptose, Elektronentransport, Transkriptionskontrolle und posttranslationale Modifizierungen eingebunden. Der biosynthetische Aufbau von Isoprenoiden erfolgt ausgehend von IPP oder dessen Isomer Dimethylallyldiphosphat (DMAPP). Bis vor Kurzem wurde für alle Organismen exklusiv mevalonatabhängige Biosyntheseweg mit Acetyl-CoA als erstem Baustein zur Bereitstellung von IPP und DMAPP angenommen. 40 Rohmer und Mitarbeiter beschrieben jedoch Anfang der 90er Jahre des letzten Jahrhunderts die Existenz eines alternativen Biosynthesewegs, der als mevalonatunabhängiger oder nach den darin auftretenden Intermediaten DOXP (1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat)beziehungsweise MEP (2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat)-Weg bezeichnet wird. Zu Ehren des Entdeckers ist die Bezeichnung Rohmer-Weg ebenso gebräuchlich. 41, 42 Interessanterweise gibt es eine klare Aufteilung der zwei Biosynthesewege unter Organismen. Einerseits wurde der mevalonatabhängige Weg in Eukaryoten, Archaebakterien, Algen, Pilzen und bei Gram-positiven Kokken wie bspw. Staphylococcus, Streptococcus und Borrelia gefunden. 43-45 Andererseits nutzen Cyanobakterien, Gram-negative und einige Gram-positive Bakterien den mevalonatunabhängigen Weg zur Generierung von IPP und/oder DMAPP. Dazu gehören viele pathogene und opportunistische Erreger, die teilweise schwerwiegende Infektionskrankheiten des Menschen verursachen können (siehe Tabelle 3).⁴⁶

Organismus	Klasse	Klinische Relevanz
Bacillus anthracis	Bacilli (Gram-positiv)	Anthraxerreger, CDC Klasse A
Bordetella pertussis	Betaproteobacteria (Gram-negativ)	Keuchhustenerreger
Brucella melitensis/suis	Alphaproteobacteria (Gram-negativ)	Brucellosen (unter anderem Maltafieber), CDC Klasse B
Burkholderia mallei	Betaproteobacteria (Gram-negativ)	Rotzerreger, CDC Klasse B
Chlamydia trachomatis	Chlamydiae (Gram-negativ)	Häufigster sexuell übertragener Erreger (unter anderem Erkrankungen im Urogenitaltrakt)
Clostridium spp.	Clostridia (Gram-positiv)	Erreger von Botulismus (<i>C. botulinum</i>), nosokomiale Erreger (<i>C. difficile</i>), Tetanus (<i>C. tetani</i>) und Gasbrand (<i>C. perfringens</i>)
Corynebacterium diphteriae	Actinobacteria (Gram- positiv)	Diphterieerreger
Escherichia coli	Gammaproteobacteria (Gram-negativ)	Enterohämorrhagische Colitis, CDC Klasse B
Francisella tularensis	Gammaproteobacteria (Gram-negativ)	Erreger von Tularämie (Hasenpest), CDC Klasse A
Haemophilus influenzae	Gammaproteobacteria (Gram-negativ)	Häufiger Verursacher von Bakteriämien und akuter bakterieller Meningitis
Helicobacter pylori	Epsilonproteobacteria (Gram-negativ)	Erreger vieler entzündlicher Magen- Darm-Erkrankungen sowie in Gruppe I der definierten Kanzerogene
Mycobacterium spp.	Actinobacteria (Gram- positiv)	Erreger von Tuberkulose (<i>M. tuberculosis</i>), Lepra (<i>M. leprae</i>)
Neisseria spp.	Betaproteobacteria (Gram-negativ)	Gonorrhoeerreger (<i>N. gonorrhoeae</i>) und Meningitis (<i>N. meningitidis</i>)
Pseudomonas spp.	Gammaproteobacteria (Gram-negativ)	Häufiger nosokomialer Erreger (<i>P. aeruginosa</i>)
Salmonella spp.	Gammaproteobacteria (Gram-negativ)	Typhöse Salmonellosen (<i>S. typhi</i>) und enteritische Salmonellosen (z.B. <i>S. enteritidis</i>), CDC Klasse B
Shigella dysenteriae	Gammaproteobacteria (Gram-negativ)	Erreger der Bakteriellen Ruhr unter anderem schweren Infektionen
Vibrio cholerae	Gammaproteobacteria (Gram-negativ)	Erreger der Cholera, CDC Klasse B
Yersinia pestis	Gammaproteobacteria (Gram-negativ)	Beulen- und Lungenpesterreger, CDC Klasse A

Tabelle 3. Pathologisch relevante Bakterien mit MEP-Biosynthese-Genen/Enzymen (Auszug aus Testa, C. A.; Brown, M. J. Curr Pharm Biotechnol **2003**, 4, 248-59). 47

Aufgrund des exklusiven Vorkommens des mevalonatunabhängigen Biosynthesewegs in weit verbreiteten Mikroorganismen, die sogar als Biowaffen eingesetzt werden könnten,^{‡‡} eröffnen Hemmstoffe des MEP-Wegs zudem eine neue Antibiotikaklasse mit aktueller politischer Bedeutung (Tabelle 3).^{47, 48}

Jomaa und Mitarbeiter identifizierten 1999 durch Gensequenzvergleich zwischen P. falciparum und einigen Gram-negativen Bakterien plasmodiale Gene, die für Enzyme des mevalonatunabhängigen Wegs kodieren. Sie konnten zeigen, dass P. falciparum analog zu Gram-negativen Bakterien IPP und DMAPP exklusiv über diesen Biosyntheseweg gewinnt und darauf angewiesen ist. Darüber hinaus konnte die Arbeitsgruppe die ersten beiden Enzyme des DOXP-Wegs aus P. falciparum exprimieren und zeigen, dass die kodierende DNA im Zellkern des Plasmodiums lokalisiert ist, die Proteinprodukte aber in den Apikoplasten transportiert werden.§§ Bei höheren Pflanzen wurden beide Biosynthesewege, allerdings kompartimentiert, nachgewiesen: der Rohmer-Weg ist nur in Chloroplasten, der mevalonatabhängige Weg im Zytosol und in Mitochondrien zu finden. Die phylogenetische Aufteilung und orthogonale Natur der beiden Isoprenoid-Biosynthesewege machen den MEP-Weg zu einem attraktiven Angriffspunkt für neue Wirkstoffe mit herbizider, antibakterieller und antiprotozoischer Wirkung. 51. 52 Darüber hinaus liegen die Enzyme des mevalonatunabhängigen Wegs vieler Spezies hochkonserviert vor und zeigen keinerlei Homologie zu menschlichen Enzymen. Daraus ergibt sich für Inhibitoren dieses Biosynthesewegs eine hohe selektive Toxizität und ein potenziell breites Wirkungsspektrum.⁵²

Der MEP-Weg beginnt mit der Kondensation von Pyruvat und D-Glycerinaldehyd-3-phosphat zu DOXP unter Abspaltung von Kohlendioxid. Katalysiert wird dieser Schritt durch die DOXP-Synthase (Dxs), Kofaktor der Reaktion ist Thiaminpyrophosphat (TPP) (Schema 1). Das gebildete DOXP kann in weiteren Schritten in die Isoprenoidbiosynthese eingehen, aber auch über einen alternativen Weg für die Generierung der Kofaktoren TPP und Pyridoxalphosphat (PLP) verwendet werden. Stetoclomazon ist ein bekannter Inhibitor der Dxs. Als aktiver Metabolit der zyklischen Hydroxamsäure Clomazon hemmt es die Dxs von *Chlamydomonas* mit

^{‡‡} Die *CDC* (Centers for Disease Control and Prevention) listet in drei Kategorien (A-C) Organismen auf, die potenziell als Biowaffen von Terroristen eingesetzt werden können und in unterschiedlichem Ausmaß die nationale Sicherheit der USA beeinträchtigen können. Quelle: http://www.bt.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp

Im Gegensatz zu den Proteinsequenzen homologer bakterieller Enzyme weisen die plasmodialen Proteine nach Proteinbiosynthese einen zusätzlichen aminoterminalen Aminosäurerest auf. Während die ersten 30 Aminosäuren dieser Proteinerweiterung einer endoplasmatisch-retikulären Signalpeptidsequenz ähneln, sorgen die nachfolgenden 44 Aminosäuren höchstwahrscheinlich dafür, dass das Protein in den Apikoplasten aufgenommen wird. 49,50

einem IC_{50} -Wert von 0,1 mM. 54 Das Prodrug Clomazon wird als Herbizid im Pflanzenschutz eingesetzt. $^{48,\,55}$

Das zweite Enzym des MEP-Wegs ist die 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase (auch 2-*C*-Methyl-D-erythritol-4-phosphat-Synthase, Dxr oder lspC genannt). Die Dxr katalysiert die sukzessive Umlagerung und Reduktion von DOXP zu MEP. Fosmidomycin und FR900098 - aus *Streptomyces*-Kulturen isolierte Phosphonohydroxamsäuren - waren die ersten bekannten Dxr-Inhibitoren. Beide Verbindungen hemmen die rekombinante *E. coli* Dxr (*Ec*Dxr) mit IC₅₀-Werten im zweistelligen nanomolaren Bereich (20-32 nM) ungefähr gleich stark. ^{56, 57}

Schema 1. Mevalonatunabhängiger Biosyntheseweg.

29

Gegenüber der rekombinanten P. falciparum Dxr (PfDxr) ist FR900098 $(IC_{50} = 17 \text{ nM})$ dagegen ein potenterer Inhibitor als Fosmidomycin $(IC_{50} = 35 \text{ nM})$. 50 In fünf weiteren enzymatischen Reaktionen wird MEP anschließend zu IPP und DMAPP umgesetzt (Schema 1). Die relevanten Enzyme werden in alphabetischer Reihenfolge als IspD, IspE, IspF, IspG und IspH bezeichnet. *** Neue Studien zeigen, dass der DOXP-Weg von P. falciparum unter anderem zur Biosynthese von prenylierten Proteinen, RNA, Ubichinon (Coenzym Q) und Dolicholen in allen intraerythrozytären Stadien benötigt wird. $^{62, 63}$

1.1.6 Die 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase (Dxr, IspC)

Auf rekombinantem Weg konnte durch Klonierung der entsprechenden IspC-Gene die Dxr verschiedener Organismen gewonnen werden. Insbesondere prokaryotische (Escherichia coli, 64 Francisella tularensis, 65 Mycobacterium tuberculosis, 66 Pseudomonas aeruginosa, 67 Streptomyces coelicolor, 68 Synechococcus leopoliensis, 69 Synechocystis sp. PCC6803, 70 Thermotoga maritima, 71 Zymomonas mobilis 72) und pflanzliche Varianten (Arabidopsis thaliana, 73 Catharanthus roseus, 74 Lycopersicon esculentum, 75 Mentha piperita, 76 Zea mays 77) wurden auf diesem Weg erhalten. Auch das labile Enzym aus *P. falciparum* kann erfolgreich exprimiert und für Inhibitionsstudien verwendet werden. 50

Strukturelle und biochemische Studien zeigen, dass Dxr-Proteine ein funktionelles Homodimer mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 42-45 kDa und einem katalytisch aktiven Zentrum pro Monomer ausbilden. Als Kofaktoren werden NADPH und ein zweiwertiges Metallkation benötigt. Mn²+- und Co²+- weisen zur *Ec*Dxr höhere Affinität als Mg²+-lonen auf. 66, 70 Aufgrund der höheren Konzentration unter *in vivo* Bedingungen ist aber anzunehmen, dass Mg²+ größere physiologische Relevanz in der Dxr-katalysierten Umsetzung besitzt. In diesem Zusammenhang wird auch darüber berichtet, dass die kinetischen Parameter für die Substratbindung je nach verwendetem Metallion variieren. Die Umsetzung von DOXP (= DXP in Schema 2) zu MEP verläuft über eine intramolekulare Umlagerung des Kohlenstoffgerüsts zu dem Übergangszustand 2-*C*-Methyl-D-erythrose-4-phosphat,

_

Darüber hinaus wurden Inhibitoren entwickelt, die die 4-Diphosphocytidyl-2-*C*-methyl-D-erythritol-Kinase (IspE) von *E. coli* im nanomolaren Konzentrationsbereich hemmen. Auch für die 2-*C*-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat-Synthase (IspF) verschiedener Spezies wurden Inhibitoren mit relevanter Aktivitätshemmung bei mikromolaren Konzentrationen identfiziert. SpG und IspH stellen oxidationsempfindliche Eisen-Schwefel-Proteine dar, welche [4Fe-4S]-Cluster enthalten. Auch für diese auf (bio)organometallischen Mechanismen basierenden Biokatalysatoren wurden inzwischen Inhibitoren beschrieben.

welcher anschließend zu MEP reduziert wird (Schema 2). Weder konnte das vorgeschlagene Intermediat aus einem mit Dxr inkubierten Reaktionsansatz isoliert werden,⁸⁰ noch konnte in NMR-Studien bei Zusatz von Dihydro-NADPH als unreaktives NADPH-Analogon die Existenz des Übergangszustands nachgewiesen werden.^{64, 78} Allerdings reduziert das Dxr-Enzym von außen zugegebenes, synthetisches 2-*C*-Methyl-D-erythrose-4-phosphat zu MEP.

Eingehend wurde die Stereochemie der enzymatischen Umsetzung untersucht. *Proteau und Mitarbeiter* konnten an *Synechocystis* Dxr zeigen, dass das an C-1 eingeführte pro-*S*-Wasserstoffatom von C-4 des Kofaktors NADPH über die *Re*-Seite des intermediären Aldehyds eingeführt wird (Schema 2).⁸¹ Entsprechende Untersuchungen an orthologen *Ec*Dxr⁸²- und *M. tuberculosis* Dxr⁶⁶-Enzymen (*Mt*Dxr) bestätigen diesen Reaktionsmechanismus.

Der vorgeschaltete stereoselektive Umlagerungsschritt ist trotz vieler Ansätze noch nicht eindeutig aufgeklärt. Vorgeschlagen werden entweder eine α -Ketol-Umlagerung oder ein Retroaldol-Aldol-Reaktionsmechanismus (Schema 3). Jüngste Untersuchungen favorisieren den letztgenannten Mechanismus, ausgeschlossen werden kann der alternative α -Ketol-Mechanismus aber noch nicht. Bas ausgeschlossen Untersuchungen zur Enzymkinetik wurden an EcDxr und MtDxr durchgeführt. Detaillierte Untersuchungen zur Enzymkinetik wurden an EcDxr und EcDx

Schema 2. Stereochemischer Ablauf der Dxr-katalysierten Reaktion (übernommen aus Proteau, P.; J. Bioorg. Chem. **2004**, 32, 483-93).⁸¹

Daraus ging hervor, dass die enzymatische Umsetzung von DOXP zu MEP reversibel ist, das Gleichgewicht unter physiologischen Bedingungen aber überwiegend auf Seiten des Produkts MEP liegt. Für die durch *Ec*Dxr katalysierte Umsetzung wird ein geordneter, sequenzieller Mechanismus vorgeschlagen, bei dem es primär zu einer Anlagerung von NADPH und anschließend zur Bindung des Substrats an das Enzym kommt.

Schema 3. Postulierte Mechanismen der Dxr-katalysierten Reaktion.32

Kristallstrukturanalysen des Dxr-Enzyms der Gram-negativen Bakterien *E. coli*^{71, 85-89} und *Zymomonas mobilis*⁹⁰ unterstützen die These, dass ein sequenzieller Bindungsmechanismus für die meisten Dxr-Enzyme zutrifft. *Koppisch und Mitarbeiter* schlagen für die *Mt*Dxr^{91, 92} zwar einen Random-Mechanismus mit Steady-State-Kinetik vor,⁶⁴ ausgeschlossen werden kann der geordnete Mechanismus aber auch für dieses Enzym noch nicht.⁶⁶

Aus der Strukturanalyse des EcDxr-Apoenzyms wurde ermittelt, dass das Enzym in Form eines gestreckten Homodimers vorliegt. Bedes Monomer ist aus drei Domänen aufgebaut und weist eine V-artige Form auf (Abbildung 3A). Die N-terminale Domäne beinhaltet die NADPH-Bindestelle (blau in Abbildung 3A und 3B), welche strukturell ein Rossmannmotiv darstellt. Sie besteht aus einer β -Faltblatt-Struktur, die aus sieben parallelen Strängen aufgebaut ist, welche wiederum durch sechs α -Helices teilweise miteinander verbunden sind (Abbildung 3B oben). Der Carboxyterminus bildet den anderen Arm der V-Form aus (grün in Abbildung 3), weist hohe Flexibilität auf und besteht aus vier α -Helices (Abbildung 3B unten). Durch die schraubenförmige Sekundärstruktur bewirkt dieser Bereich eine Strukturstabilisierung für die katalytische Domäne (rot). Diese zentrale, auch konnektive Domäne genannt, enthält wiederum vier β -Faltblattstrukturen, die ihrerseits über fünf α -Helices miteinander verbunden sind (Abbildung 3A). In diesem Proteinbereich binden sowohl das Substrat als auch das bivalente Metallkation. Überdies ist dieser Enzymbereich für die Dimerisierung verantwortlich.

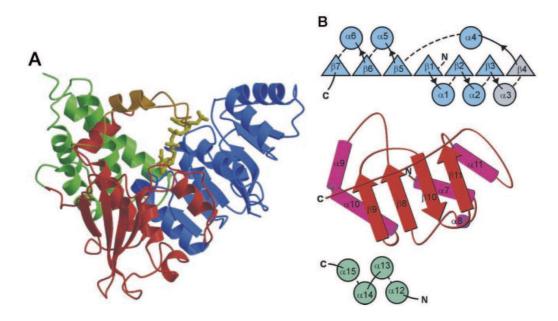


Abbildung 3 A: Schematische Darstellung des EcDxr-Monomers mit in silico nachträglich angedocktem NADPH (gelbe Stabfigur). Die drei Domänen des Enzyms werden in blau (NADPH-bindende Domäne), rot (konnektive Domäne) und grün (Carboxyterminus) dargestellt; ockerfarben ist die flexible Schleifenregion (Aminosäuren 186-216) als Teil der konnektiven Domäne hervorgehoben. **B**: Topologiediagramm der drei Domänen, Farbgebung wie in A; α-Helices werden als Kreise, β-Faltblätter als Dreiecke beziehungsweise dicke Pfeile dargestellt (modifiziert nach Reuter, K. et al.; J. Biol. Chem. **2002**, 277, 5378-84). 85

Nach Vergleich der bisher analysierten EcDxr-Kristallstrukturen wurde die höchste Flexibilität für den Aminosäurenabschnitt 186-216 innerhalb der konnektiven Domäne festgestellt. In der Kristallstruktur des Apoenzyms scheint diese flexible Schleifenregion über der katalytischen Tasche des Enzyms zu liegen und die NADPH-bindende Region [Abbildung 3A (ockerfarben) und Abbildung 4 (rot)] zu bedecken. Sowohl die Kristallstruktur des Selenomethionin-markierten Enzyms im Komplex mit NADPH und Sulfat-Ion in der Phosphatbindenden Region⁹⁴ (Abbildung 4B), als auch die Kristallstruktur des Enzyms im Komplex mit Fosmidomycin und Mn²⁺-lon (Abbildung 4C)⁸⁸ zeigen, dass die flexible Schleife in weiteren, geordneteren Konformationen vorliegen kann. Deshalb wird für Aminosäurenabschnitt, der im Folgenden als flexible Schleife bezeichnet wird, eine zentrale Rolle für die Bindung von Substrat oder Inhibitor an das Enzym und/oder die nachfolgende induzierte Anpassung des *Ec*Dxr-Enzyms diskutiert.

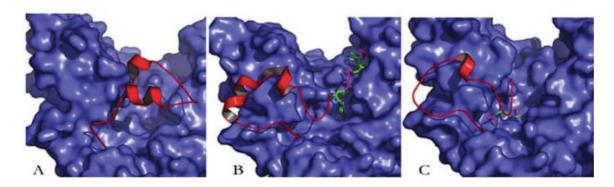


Abbildung 4. Drei verschiedene Kristallstrukturen der EcDxr. A: Apoenzym (pdb code: 1K5H), B: Komplex mit NADPH und einem Sulfat-Ion (pdb code: 1JRS), C: Komplex mit Fosmidomycin und Mn²⁺ (pdb code: 1ONP); die flexible Schleife ist in rot hervorgehoben (modifiziert nach Wiesner, J.; Jomaa, H.; Current Drug Targets **2007**, 8, 3-13).⁹³

Verschiedene Kristallstrukturen der *Z. mobilis* Dxr bestätigen die Erkenntnisse aus den *Ec*Dxr-Enzymstrukturen.⁹⁰ Studien an punktmutierter *Ec*Dxr (z.B. His209Gln) offenbarten zudem, dass ein Teil der flexiblen Schleife das Substrat direkt bindet und neben der Funktion als konnektive Domäne an der Ausbildung des aktiven Zentrums beteiligt zu sein scheint.⁹⁵

Steinbacher und Mitarbeiter gelang es, durch "ligand-soaking"-Experimente des kristallinen EcDxr-Apoenzyms in einer wässrigen Lösung mit Fosmidomycin, Mn²⁺-Ionen und anschließender Röntgenkristallstrukturanalyse erstmalig die Bindung des Inhibitors zu untersuchen (Abbildung 5a). 96 Aufgrund der Blockade der NADPH-Bindestelle durch den C-Terminus des benachbarten Monomers blieb die Bindung Kofaktors unter diesen Bedingungen aus. Trotzdem konnte durch computerunterstützten Vergleich mit der Kristallstruktur von Yajima⁹⁴ NADPH in silico ohne deutliche Veränderungen der gefundenen Proteinstruktur eingebunden werden (Abbildung 5b). Darüber hinaus passt sich auch der angenommene Übergangszustand der enzymatischen Umsetzung 2-C-Methyl-D-erythrose-4phosphat in silico optimal ein (Abbildung 5b). Überdies ist in der berechneten Stereochemie des Intermediats allein die experimentell gefundene Hydridionenübertragung aus NADPH über die Re-Seite denkbar (vgl. Schema 2). aus der Übereinstimmung der Steinbacher leitete ermittelten Bindung Fosmidomycins mit der passgenauen virtuellen Einlagerung von DOXP in die Fosmidomycin nicht Kristallstruktur ab. dass ein verstoffwechselbares Substratanalogon darstellt (Abbildung 5a). später veröffentlichten ln Kristallstrukturanalysen von Dxr-Enzymkomplexen mit Fosmidomycin wurde dieser Bindungsmodus des Inhibitors bestätigt. 86, 87, 97

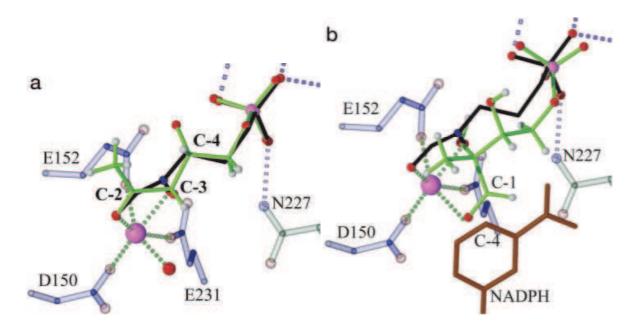


Abbildung 5. a: Computerunterstützte Darstellung des Bindungsmodus von Fosmidomycin (schwarz) an EcDxr, DOXP (grün) ist überlagernd dargestellt; Mn²⁺ wird als pinkfarbene Kugel gezeigt; **b**: Die Dihydropyridinteilstruktur des NADPH-Kofaktors ist in braun ohne signifikante Abweichung zu Referenz 94 dargestellt. Darüber hinaus ist der putative Übergangszustand der EcDxr-Reaktion (grün) eingelagert (modifiziert nach Steinbacher, S. et al.; J. Biol. Chem. **2003**, 278, 18401-7). ⁹⁶

Trotz seiner strukturellen Ähnlichkeit zum postulierten intermediären Aldehyd 2-*C*-Methyl-D-erythrose-4-phosphat blockiert Fosmidomycin den initialen Umlagerungsschritt, was die Substratanalogie des Inhibitors untermauert. Die Hydroxamsäuregruppe Fosmidomycins nimmt in allen *Ec*Dxr-Kristallstrukturen als zweizähniger Ligand über beide Sauerstoff-Atome an der oktaedrischen Komplexierung des zweiwertigen Metallions teil (Abbildung 6).

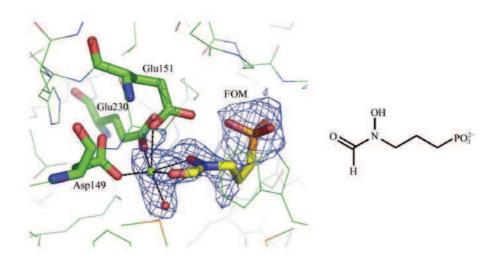


Abbildung 6. Oktaedrische Koordinierung des Mg²⁺-lons durch Fosmidomycin, Aminosäureseitenketten (Nummerierung abweichend von anderen Publikationen) und ein Wassermolekül im aktiven Zentrum der EcDxr (modifiziert nach Yajima, S. et al.; Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun. **2007**, 63, (Pt 6), 466-70).⁸⁷

Durch die Bindung der Hydroxamatfunktion werden zwei Wassermoleküle verdrängt. Weitere Ligandenplätze werden durch ein Wassermolekül sowie Carboxylatfunktionen der Aminosäureseitenketten von Asp150, Glu152 und Glu231 eingenommen. Mac Sweeney und Mitarbeitern gelang es, eine mit Selenomethionin markierte Wildtyp-EcDxr als Kokristallisat mit NADPH, Inhibitor beziehungsweise Substrat zu erhalten und kristallographisch auszuwerten. 97 Das Fehlen des katalytisch relevanten Metallions in diesen Komplexen wurde mit der schlechten Metallionen-Affinität des Enzyms bei den für die Kristallisation notwendigen sauren Bedingungen (pH 5) begründet. Sowohl die von Steinbacher postulierte substratanaloge Bindung des Inhibitors^{†††} als auch hydrophobe Wechselwirkungen des Inhibitors zu Trp212 traten in diesem Ternärkomplex auf. Abweichend von Steinbacher beschrieb Mac Sweeney hydrophobe Wechselwirkungen Fosmidomycins zu Met214 und Met276, welche der flexiblen Schleife zugeordnet werden. Diese Wechselwirkungen werden erst nach Enzymkonformationsänderung und Ausbildung einer hydrophoberen Bindetasche bei Anlagerung des Inhibitors und unter Beteiligung von NADPH und Met276 möglich. Eine vergleichbare langsame Enzymanpassung der Dxr von Thermotoga maritima unter Anwesenheit Fosmidomycins beschrieben jüngst *Takenoya und Mitarbeiter*. 71 Unterstützt werden die Theorien der induzierten Proteinanpassung durch enzymkinetische Analysen der Substratumsetzung bei gleichzeitiger Anwesenheit Fosmidomycins. Für die EcDxr wurden $K_i = 215$ nM der initialen Geschwindigkeit (v_0) und $K_i = 21$ nM der finalen Bindungsgeschwindigkeit (v_s) gemessen. Daher ist Fosmidomycin an *Ec*Dxr ein gemischt kompetitiv-unkompetitiver Inhibitor, wie es für langsame, stark bindende Inhibitoren schon häufig beschrieben wurde. 64 An Zymomonas mobilis Dxr zeigt Fosmidomycin hingegen nach den Untersuchungen von Grolle und Mitarbeitern eine kompetitive Hemmung.⁷²

Übereinstimmend ist in allen *Ec*Dxr-Kristallstrukturanalysen zu erkennen, dass die Phosphonatgruppe Fosmidomycins analog zur Phosphatgruppe von DOXP im vollständig deprotonierten, dianionischen Zustand polare Wechselwirkungen zu Ser186, Ser222, Asn227 und Lys228 des Enzyms ausbildet (Abbildung 7a und b).⁵⁰ Die Phosphatgruppe DOXPs weist darüber hinaus noch Wechselwirkungen zum

^{†††} Interessanterweise ist Fosmidomycin auch als Inhibitor der 3-Deoxy-D-Arabinose-Heptulosonat-7-Phosphat-Synthase (DAHPS) identifiziert worden ($IC_{50} = 35 \mu M$). Aufgrund der starken strukturellen Ähnlichkeit zwischen DAHPS und DOXP liegt ein substratanaloger, kompetitiver Mechanismus auch hier nahe. Wie sich jedoch herausstellte, verdrängt Fosmidomycin das zweite Substrat der katalytischen Umsetzung Phosphoenolpyruvat (PEP) kompetitiv bei Mn²⁺-Anwesenheit. siehe *Walker, S. R. et al.; J. Org. Biomol. Chem.* **2009,** *7,* (15), 3031-3035

Imidazolring der katalytisch essenziellen, zur flexiblen Schleife gehörenden Aminosäure His209 und einem Wassermolekül auf (eingerahmt in Abbildung 7b).

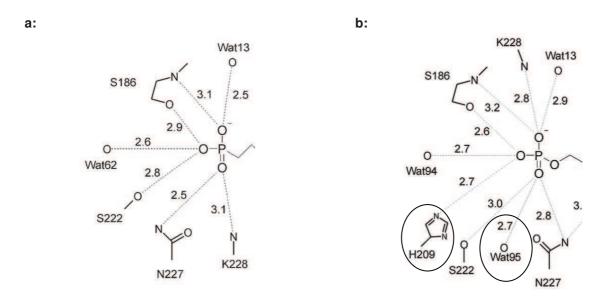


Abbildung 7. a: Wechselwirkungen der Phosphonatgruppe Fosmidomycins mit Aminosäureresten und Wassermolekülen (Wat13 beziehungsweise Wat62) in EcDxr; **b**: Bindung der DOXP-Phosphatgruppe in EcDxr (modifiziert aus Mac Sweeney, A. et al.; J. Mol. Biol. **2005**, 345, 115-27). 89

Yajima und Mitarbeiter zeigten abweichend von Mac Sweeneys Modell in einem Quarternärkomplex aus EcDxr, Mg²⁺, NADPH und Fosmidomycin hydrophobe Wechselwirkungen der Propylkette Fosmidomycins zu den Aminosäuren Met214 und His209 sowie Trp212 und Pro274 des Enzyms (Abbildung 8, Nummerierung abweichend). Diese Aminosäuren gehören zur hochflexiblen Schleife, was die direkte Beteiligung der flexiblen Schleifenregion an der Bindung Fosmidomycins erneut unterstreicht.

Nach Vergleich mit den verfügbaren *Ec*Dxr-Kristallstrukturen erkannten *Yajima und Mitarbeiter* relevante Unterschiede in den relativen Orientierungen der Domänen.⁹⁸ Erstmalig konnten sie die katalytisch aktive, hochflexible Schleifenregion aufgrund der beschriebenen direkten Wechselwirkungen zu Fosmidomycin in geordnetem Zustand mit hoher Elektronendichte erkennen.⁹⁸ Insofern kommt *Yajimas* Modell wahrscheinlich Fosmidomycins Bindungszustand an die *Ec*Dxr am nächsten (Abbildung 8).⁹⁸

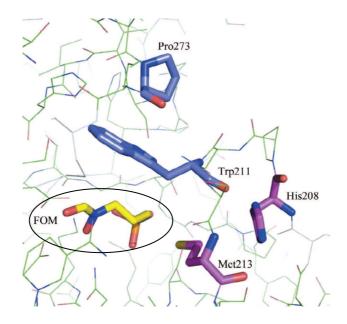


Abbildung 8. Hydrophobe Wechselwirkungen der Propylkette Fosmidomycins (FOM, eingerahmt) zu lipophilen Aminosäureseitenketten der flexiblen Schleife von EcDxr (Nummerierung in der Abbildung abweichend von anderen Publikationen und modifiziert nach Yajima, S. et al.; Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun. **2007**, 63, (Pt 6), 466-70).⁸⁷

Analog zu E. coli ist der DOXP-Weg für M. tuberculosis der einzige Biosyntheseweg zur Gewinnung der Isoprenoidvorläufer IPP und DMAPP. 99-101 Die Primärstruktur von MtDxr stimmt zu circa 40 % mit der von der orthologen EcDxr überein. An der Ausbildung der katalytischen Bindetasche beteiligte Aminosäuren liegen in beiden Enzymen mit einer Sequenzidentität von 45-50 % etwas höher konserviert vor. 102, 103 Der Vergleich von MtDxr-Fosmidomycin- mit EcDxr-Fosmidomycin-Komplexen zeigt. dass die relative Position des Inhibitors in den jeweiligen Enzymen übereinstimmt. Wie in Abbildung 9 zu sehen ist, geht Fosmidomycins Phosphonatgruppe im katalytischen Zentrum der MtDxr Wechselwirkungen mit Seitenkettenfunktionen von Asn218 (Asn227 in EcDxr), Ser177 (Ser186 in EcDxr), Lys219 (Lys228 in EcDxr) und zwei Wassermolekülen ein. Ein zusätzlicher Bindungspartner ist der Imidazolring von His200 (eingerahmt in Abbildung 9). Stattdessen ist im EcDxr-Fosmidomycin-Komplex die primäre Alkoholfunktion von Ser222 an der Bindung beteiligt. Fosmidomycins Hydroxamsäuregruppe ist gemeinsam mit Carboxylatgruppen von Glu153, Glu222 und Asp151 (Glu152, Glu231 und Asp150 in EcDxr) an der Chelatisierung des katalytisch relevanten zweiwertigen Metallkations eingebunden. Als sechster Ligand dient auch im mykobakteriellen Enzym ein Wassermolekül, welches in Abbildung 10 allerdings nicht dargestellt ist. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen ist die Doppelmutante (D151N/E222Q) der MtDxr nicht mehr in der Lage, das bivalente Metallkation zu binden und katalytisch

inaktiv. Nach genauerer Betrachtung des mykobakteriellen Quarternärkomplexes wird ersichtlich, dass sich analog zum *Ec*Dxr-Fosmidomycin-Komplex hydrophobe Aminosäureseitenketten aus der flexiblen Schleifenregion des mykobakteriellen Enzyms über das enzymatische Zentrum mit gebundenem Fosmidomycin legen. Sowohl Trp203 als auch Met205 erzeugen dadurch eine hydrophobere Bindetasche, wobei der Indolrest von Trp203 analog zu Trp212 in *Ec*Dxr direkte Wechselwirkungen mit der Propylkette Fosmidomycins eingeht. 92

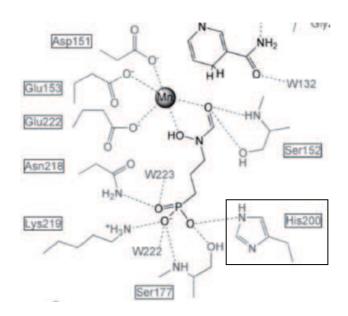


Abbildung 9. Wechselwirkungen zwischen MtDxr, Fosmidomycin und Mn²⁺; zu erkennen ist weiterhin der reduzierte Nicotinamidring des Kofaktors NADPH in unmittelbarer Nähe zum Inhibitor (modifiziert nach Henriksson, L. M. et al.; J. Biol. Chem. **2007**, 282, 19905-19916). 102

Williams und Mitarbeiter untersuchten vor Kurzem mithilfe von molekulardynamischen Berechnungen die konformative Flexibilität der katalytischen Schleifenregion bei An- und Abwesenheit Fosmidomycins. 104 Dabei wurde nach "Reversible Digitally Filtered Molecular Dynamics Simulations" (RDFMD) ebenfalls die direkte Beteiligung der Aminosäuren Trp203 His200 und an der Fosmidomycinbindung abgeleitet.

Auch wenn eine hohe Übereinstimmung der katalytisch essenziellen Aminosäuren durch Sequenzanalyse zwischen *Ec*Dxr und *Pf*Dxr gefunden wurde, unterscheiden sich die Enzyme naturgemäß in zahlreichen Aminosäuren (weiß unterlegt in Abbildung 10). *Singh und Mitarbeiter* führten eine multiple Aminosäuresequenzanalyse mit dem Programm ClustalW an den Primärstrukturen des bakteriellen und plasmodialen Dxr-Enzyms durch.¹⁰⁷ Demnach wurde zwischen den Aminosäuren, welche höchstwahrscheinlich für den Aufbau der aktiven Regionen beider Enzyme relevant sind, eine 74 %ige Sequenzidentität gefunden.

Insbesondere chelatisieren höchstwahrscheinlich die gleichen Aminosäureseitenketten in *Ec*Dxr und in *Pf*Dxr (Unterlegung durch schwarze Dreiecke in Abbildung 10) das katalytisch relevante bivalente Metallion. Aufgrund des Fehlens einer Kristallstrukturanalyse des plasmodialen Enzyms im Jahr 2006 wurde von *Singh und Mitarbeitern* ein computergestütztes Homologiemodell des plasmodialen Enzyms entwickelt. Durch virtuelles Docking bekannter Inhibitoren in die Modelle sowie Vergleich der erhaltenen Ergebnisse mit den experimentell bestimmten IC overten wurde das Modell validiert. Zur Erklärung der stärkeren Bindung von FR900098 an das plasmodiale Enzym wurde eine Van der Waals-Wechselwirkung der Acetylgruppe des Inhibitors mit dem Indolrest von Trp222 in der aktiven Region des plasmodialen Enzyms vorgeschlagen.

Erst Mitte 2011 erschien eine Publikation, die sowohl die erfolgreich gewonnene Proteinkristallstrukturanalyse des plasmodialen Apoenzym-Ternärkomplexes (PfDxr:Mn²⁺:NADPH) als auch die Struktur der Quarternärkomplexe mit sowohl dem (*Pf*Dxr:Mg²⁺:NADPH:Inhibitor) Inhibitor Fosmidomycin als auch FR900098 beschreibt.²²⁷ Das *Pf*Dxr-Enzym bildet im aktiven Zustand analog zu den bakteriellen Homologen ein funktionelles Homodimer aus, das in jeder Untereinheit ein NADPH-Molekül und ein bivalentes Metallion als Kofaktoren bindet. Daraus ergibt sich für das Apoenzym ein Molekulargewicht von ungefähr 47 kDa. Auch die Tertiärstruktur des plasmodialen Enzyms ähnelt der von bereits angesprochenen bakteriellen Dxr-Homologa: die Untereinheiten des Homodimers sind aus zwei großen Domänen aufgebaut, wobei die NADPH-bindende mit 154 Aminosäuren etwas größer als die katalytische Domäne, die aus 139 Aminosäuren besteht, aufgebaut ist. Eine "Linkeraus den Aminosäuren 370 bis 395 besteht C-terminale Domäne, die die Aminosäuren 396 bis 486 umfasst, sind dagegen relativ kurze Proteinabschnitte. Die "Linker-Region" verbindet die katalytische Domäne mit der C-terminalen Region und eröffnet eine relativ gut zugängliche "Furche" in der katalytischen Region. Außerdem vermittelt sie über Ser387 bis Phe391 wichtige Wechselwirkungen zwischen den asymmetrisch miteinander verbundenen Untereinheiten des funktionellen Homodimer-Enzymkomplex. Der Vergleich zwischen der Kristallstruktur des Inhibitorfreien PfDxr-Ternärkomplexes mit den Quarternärstrukturen, in denen Fosmidomycin beziehungsweise FR900098 gebunden vorliegen, zeigt, dass die angesprochene große "Furche" in der katalytischen Region bei Bindung der Inhibitoren durch eine Konformationsänderung des Proteins geschlossen vorliegt. Nakamura und Mitarbeiter leiten daraus ab, dass das plasmodiale Enzym analog zu EcDxr aufgrund der intrinsischen Flexibilität eine induzierte Anpassung bei Bindung der Inhibitoren durchführt. Dabei bewegt sich die NADPH-bindende Domäne (Aminosäuren 77 bis 230) auf die katalytische Domäne zu. Insbesondere liegt die hochflexible "Loop"-Region, die bei PfDxr aus den Aminosäuren 291 bis 299 besteht, bei Bindung der Inhibitoren geordnet vor, so dass eine hydrophobe, von Wassermolekülen weitgehend abgeschirmte Bindetasche entsteht. Fosmidomycin und FR900098 besetzen diese Bindetasche durch direkte Wechselwirkungen der Phosphonat- und Hydroxamatfunktion zur *Pf*Dxr. In Abbildung 10 ist durch Symbole gekennzeichnet, dass die Hydroxamatfunktion Fosmidomycins analog zur Bindungssituation an EcDxr mit Carboxylatresten der Aminosäuren Asp231, Glu233 und Glu315 und einem Wassermolekül das katalytisch essenzielle bivalente Metallkation in PfDxr komplexiert. Dabei wurde von Nakamura und Mitarbeitern gefunden, dass dafür eine cis-konfigurierte Hydroxamsäurefunktion unverzichtbar ist. Der Metallionenkomplex bildet eine verzerrt trigonal-bipyramidale Geometrie aus. Die vollständig deprotonierte Phosphonatgruppe bildet polare Wechselwirkungen zu den funktionellen Gruppen von Ser270, Asn311, His293 und zwei Wassermolekülen aus. Damit weicht die Bindungssituation für diese funktionelle Gruppe von der an EcDxr ab (Abbildung 10) und weist mehr Analogie zu der desselben Inhibitors an MtDxr auf. Durch die hydrophobe Umgebung der Bindetasche bildet die Propylkette Fosmidomycins Wechselwirkungen zu den lipophilen Resten der Aminosäuren Trp296 und Met298 aus (blaue Ellipsen in Abbildung 10). Interessanterweise sind diese Aminosäuren wie His293 Teil der flexiblen Schleifenregion und in den bisher bekannt gewordenen Proteinstrukturen der Dxr-Enzyme anderer Organismen liegen diese Aminosäuren in vergleichbarer Position hochkonserviert vor, was deren Bedeutung für die Substratbindung andeutet.

Durch Vergleich des Quarternärkomplexes Fosmidomycins mit dem von FR900098 konnten *Nakamura und Mitarbeiter* ferner aufklären, dass die bereits angesprochene stärkere Bindung von FR900098 durch die zusätzliche direkte Interaktion der Methylgruppe - die strukturell äquivalent zum C1-Kohlenstoffatom des natürlichen Substrats DOXP ist - zu Trp296 zustande kommt.

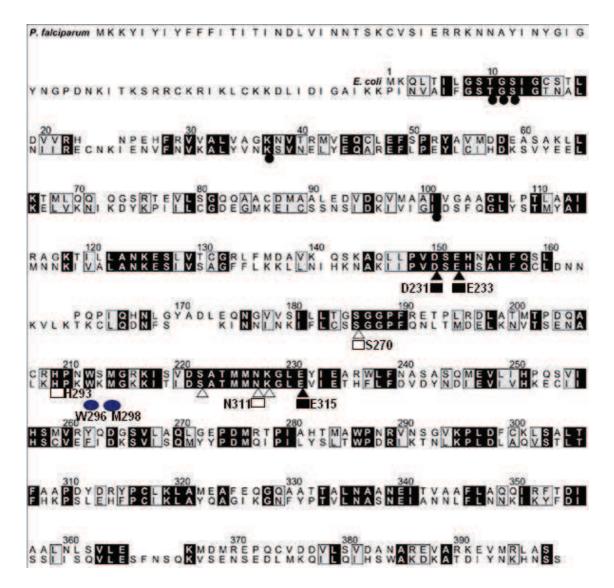


Abbildung 10. Aminosäuresequenzvergleich der Dxr-Proteinprimärstrukturen von E. coli und P. falciparum. Symbole: schwarze Dreiecke (EcDxr), schwarze Rechtecke (PfDxr) = Koordinationsstellen für das zweiwertige Metallkation; weiße Dreiecke (EcDxr), weiße Rechtecke (PfDxr): Bindestellen für die Phosphatgruppe des Substrats (EcDxr), Phosphonatgruppe von Fosmidomycin (PfDxr); schwarze Kreise: Bindestellen für die Pyrophosphatstruktur NADPHs (EcDxr); blaue Ellipsen: hydrophobe Wechselwirkungen zu Fosmidomycin beziehungsweise FR900098 (PfDxr) (übernommen aus Kaiser, J. et al.; Phytomedicine **2007**, 14, (4), 242-249 und Umeda, T. et al.; Nature Scientific Reports **2011**, 1, article number 9, doi:10.1038/srep00009).

Hierfür wird wiederum eine induzierte Anpassung des plasmodialen Enzyms während des Bindungsvorgangs verantwortlich gemacht, so dass die Seitenkette von Trp296 Van der Waals-Wechselwirkungen ausbilden kann (Abbildung 11). Wahrscheinlich wird über diese Wechselwirkung auch die essenzielle *cis*-Anordnung der Hydroxamatfunktion eingestellt.²²⁷

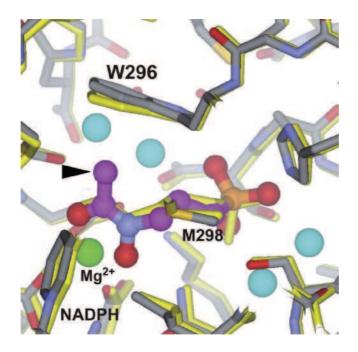


Abbildung 11. FR900098 im Quarternärkomplex mit PfDxr, Mg²⁺ und NADPH; die Kohlenstoffatome des Inhibitors sind in Magenta gezeigt. Um die induzierte Anpassung des Enzyms bei Bindung von FR900098 im Vergleich zu Fosmidomycin zu verdeutlichen, wurde ein "LSQ fitting" durchgeführt, das verdeutlicht, dass die zusätzliche Methylgruppe von FR900098 (schwarzes Dreieck zur Kennzeichnung) nach Annäherung der Seitenkette von Trp296 Van der Waals-Wechselwirkungen ausbildet (RMSD = 0,5 Å).

1.1.7 Der Arzneistoff Fosmidomycin als Antibiotikum und Antimalariamittel

Bereits in den Siebziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts wurde Fosmidomycin neben anderen Phosphonohydroxamsäuren aus *Streptomyces lavendulae* von Mitarbeitern der *Fujisawa Pharmaceuticals Company* isoliert.¹¹¹ Physikochemische Eigenschaften, Synthese und antibakterielle Aktivität Fosmidomycins sowie von FR900098, das aus *Streptomyces rubellomurinus* isoliert werden konnte, wurden intensiv untersucht.¹¹² Aufgrund der Menachinon- und Carotenoidbiosynthesehemmung in *Micrococcus luteus* nach Fosmidomycingabe wurde bereits vor der Entdeckung des Rohmer-Wegs die Isoprenoidbiosynthese als mögliches Ziel des Wirkstoffes angenommen.¹¹³ Ebenso wurde auch die herbizide Aktivität Fosmidomycins frühzeitig erkannt. 1998 konnten von *Kuzuyama und Mitarbeitern* Fosmidomycins Wirkung auf die *Ec*Dxr nachgewiesen und die zuvor beobachteten

43

biologischen Wirkungen erklärt werden. 57, 114 Fosmidomycin unterdrückt in vitro das Wachstum der meisten Gram-negativen Bakterien. Keine Hemmwirkung hat Fosmidomycin auf Serratia marcescens, Proteus mirabilis und Stämme, die Glucose nicht fermentieren. 115 Der Problemkeim Pseudomonas aeruginosa wird durch Fosmidomycin in vitro besser im Wachstum gehemmt (Minimale Hemmkonzentration (MHK) = 6.25 μg/ml) als durch Fosfomycin (MHK = 12.5 μg/ml) oder Gentamicin (MHK = 12,5 μg/ml) (Tabelle 4). Gegenüber E. coli (MHK = 1,56 μg/ml), Klebsiella pneumoniae, Proteus vulgaris, Enterobacter cloaceae, Enterobacter aerogenes und Citrobacter ist Fosmidomycin stärker wirksam als die parallel untersuchten Antibiotika Fosfomycin, Cephalexin, Carbenicillin oder die Kombination aus Trimethoprim und Sulfamethoxazol. 115 Aufgrund des neuartigen Wirkmechanismus erweist sich Fosmidomycin auch gg. Gram-negativen Bakterien, die beispielsweise β-Laktam-Antibiotika resistent sind, als bakteriostatisch wirksam. ‡‡‡ gut Fosmidomycin zeigt darüber hinaus mit allen genannten Antibiotika Wirksynergismus. 116

Organismus	MHK in μg/mL (50 % Wachstumshemmung)	
E. coli	1,56	
Klebsiella pneumoniae	1,56	
Pseudomonas aeruginosa	6,25	
Proteus vulgaris	0,78	
Enterobacter cloaceae	0,20	
Enterobacter aerogenes	0,78	
Citrobacter	3,13	
Serratia marcescens	12,5	
Salmonella	6,25	
Shigella	6,25	

Tabelle 4. Antimikrobielle in vitro Aktivität Fosmidomycins; Auszug aus Referenz 115.

Allerdings ist Fosmidomycin gg. Gram-positiven Kokken und vielen Anaerobiern unwirksam, was sich aber mit dem Fehlen des MEP-Wegs in diesen Bakterien erklären lässt. An Mäusen, die mit Gram-negativen Bakterien infiziert wurden, ist der therapeutische Effekt Fosmidomycins dem von Fosfomycin überlegen. Fosmidomycin weist gg. *P. aeruginosa* auch *in vivo* hervorragende Aktivität auf. So schützt Fosmidomycin weitaus besser vor Infektionen (ED₅₀ = 1,85 mg/kg) als

Nach neuesten Berichten der *Infectious Diseases Society of America* häufen sich v.a. in Krankenhäusern Infektionen, die von teilweise multiresistenten Gram-negativen Bakterien wie *E. coli, K. pneumoniae, P. aeruginosa* und *Acinetobacter*-Stämmen ausgelöst werden (sogenannte ESKAPE-Bakterien). Insbesondere zur Bekämpfung dieser Mikroorganismen werden Antibiotika mit neuen Wirkmechanismen dringend benötigt. siehe Boucher, H. W. *et al.; Clin. Infect. Dis.* **2009**, *48*, 1-12.

Fosfomycin (ED₅₀ = 92,5 mg/kg), Gentamicin (ED₅₀ = 10,2 mg/kg) oder Piperacillin (ED₅₀ = 75,0 mg/kg). 117 Fosmidomycin wurde erfolgreich bis in die frühe Klinische Phase Ш als oral verabreichbares Antibiotikum zur Behandlung Harnwegsinfektionen entwickelt. 118 Fujisawa Pharmaceutical Company stellte Fosmidomycins Entwicklung als Antibiotikum allerdings ein. Wahrscheinlich begründet sich dieses Vorgehen durch die parallele Entwicklung von anderen Antibiotika, welche zum damaligen Zeitpunkt ein breiteres Wirkungsspektrum und antibakterielle Aktivität aufwiesen. bessere In pharmakokinetischen Untersuchungen stellte sich heraus, dass Fosmidomycin bei peroraler Applikation von 500 mg zu 20-40 % bioverfügbar ist und eine sehr kurze Plasmakonzentrations-Halbwertszeit von 1,87 h bei peroraler beziehungsweise 1,65 h bei intravenöser Gabe aufweist. Die Gabe von hohen Dosen in kurzen Zeitabständen zur Aufrechterhaltung eines ausreichend hohen Wirkstoffspiegels ist daher notwendig. 119 Fosmidomycin ist sehr gut verträglich. Die LD₅₀-Werte zur akuten Toxizität liegen bei Mäusen und Ratten nach peroraler Gabe bei 12 g/kg Körpergewicht. Nach Einnahme therapeutischen Fosmidomycin-Dosen treten beim Menschen neben von vereinzelten Fällen von Übelkeit, Erbrechen und Diarrhoe keine gravierenden unerwünschten Arzneimittelwirkungen auf. Höchstwahrscheinlich können diese Nebenwirkungen auf die bekannte Veränderung der Intestinalflora zurückgeführt werden, die nach Behandlung mit einem Antibiotikum auftreten können. 120 Fosmidomycin wird zu 90 % unverändert und innerhalb von 72 h ausschließlich renal eliminiert. Ein enterohepatischer Kreislauf wird ausgeschlossen. Aufgrund der hohen Hydrophilie der Verbindung verteilt sich der Wirkstoff rasch und überwiegend in das Blutkompartiment. In Mäusen, Ratten und Hunden wird die Verbindung zu maximal 4 % an Plasmaproteine gebunden. 121

Fosmidomycin hemmt die isolierte MtDxr mit IC50-Werten zwischen 80 und nM. 102, 300 Allerdings ist Fosmidomycin im Zellkultur-Assay M. tuberculosis unwirksam. Wahrscheinlich permeiert Fosmidomycin aufgrund seiner hohen Hydrophilie nicht durch die vorwiegend aus Mykolsäuren Arabinogalaktanen aufgebaute, sehr lipophile Zellwand der Mykobakterien. 103 Im Gegensatz dazu besitzt E. coli einen Glycerol-3-phosphat-Transporter (GlpT), der Fosmidomycin in Analogie zu dem strukturverwandten Fosfomycin aktiv in das Zellinnere aufnimmt. Mutationen des glpT-Gens werden mit Resistenzen des Bakteriums gg. diesen Antibiotika in Zusammenhang gebracht. Darüber hinaus ist die

Aktivierung des *glpT*-Operons stark von cAMP abhängig, so dass Adenylylcyclasedefiziente *E. coli*-Bakterien ebenfalls Fosmidomycin-resistent sind. 123 §§§ Neueste Untersuchungen haben ergeben, dass Brucella abortus und andere Bakterien unterschiedlicher Taxonomie das Dxr-Enzym nicht aufweisen und stattdessen ein Protein exprimieren, dass die katalytische Funktion anstelle der Dxr im DOXP-Weg übernimmt. Dieses "Dxr-like" (DRL) Protein gehört zu einer bisher nicht charakterisierten Enzymfamilie und weist Ähnlichkeit zu Homoserin-Dehydrogenasen auf. Analog zur Dxr wird dieses Enzym aber auch effektiv durch Fosmidomycin gehemmt. 125 Fosmidomycin ist nur schwach gegen das Wachstum von Toxoplasma gondii und Eimeria tenella wirksam, obwohl erwiesenermaßen alle Gene für die Enzyme des mevalonatunabhängigen Isoprenoidbiosynthesewegs Apikoplasten übersetzt werden. 126 Ungeklärt ist, ob die Fosmidomycin-Toleranz der genannten Apicomplexa durch mangelhafte intrazelluläre Anreicherung des Wirkstoffs oder verminderte Sensitivität der orthologen Dxr-Enzyme zu erklären ist. 127 Kürzlich wurde gezeigt, dass auch Theileria sp. unempfindlich gg. Fosmidomycin ist. 128 Die Autoren der Veröffentlichung vermuten, dass die fehlende Wirksamkeit Fosmidomycins auf eine ausbleibende intrazelluläre Anreicherung zurückzuführen ist. lm Gegensatz dazu sind Fosmidomycin und FR900098 gg. P. falciparum in vitro sehr gut wirksam und werden ausreichend im plasmodialen Apikoplast angereichert. Kürzlich wurde gezeigt, dass die polaren Phosphonohydroxamsäuren intrazellulär von mit P. falciparum und Babesia divergens infizierte Erythrozyten durch spezielle transmembranäre Permeationswege (englisch: "new permeability pathways" = NPP) angereichert werden. 129, 130 Diese NPPs bilden sich erst nach der parasitären Infektion von Erythrozyten aus und begünstigen danach die passive Aufnahme der polaren, anionisch geladenen Wirkstoffmoleküle. 130

Die antiplasmodiale Wirksamkeit Fosmidomycins und von FR900098 *in vitro* wurde zuerst an *P. falciparum*-Stämmen aus unterschiedlichen Regionen getestet und mit der von Chloroquin verglichen (siehe Tabelle 5).⁵⁰ Daraus ermittelte IC₅₀-Werte zeigen, dass FR900098 übereinstimmend mit den Enzymwerten auch stärker antiplasmodial wirksam als Fosmidomycin ist. Im Speziellen wird aus Tabelle 5 deutlich, dass FR900098 gg. dem Chloroquin-resistenten Stamm Dd2 circa um den Faktor 3 aktiver als Fosmidomycin ist.

Zuletzt wurde auch von einem Fosmidomycin-Resistenzmechanismus bei *E. coli* berichtet, der sich auf die Amplifikation eines Effluxproteins (*Fsr*) zurückführen lässt und die MHK Fosmidomycins von 6 µg/ml auf bis zu 400 µg/ml ansteigen lässt.¹²⁴

P. falciparum	IC ₅₀ (nM)		
Stamm	Fosmidomycin	FR900098	Chloroquin
HB3	350 +/- 170	170 +/- 100	20 +/- 5
A2	370 +/- 45	171 +/- 45	37 +/- 7
Dd2	290 +/- 130	90 +/- 20	200 +/- 30

Tabelle 5. In vitro Aktivität von Fosmidomycin und FR900098 gg. drei P. falciparum-Stämmen (modifiziert nach Jomaa, H. et al.; Science **1999**, 285, 1573-6.).⁵⁰

Die In vivo Antimalariaaktivität Fosmidomycins und von FR900098 wurde zuerst im Tierversuch an mit *P. vinckei* infizierten Mäusen untersucht. Dabei bestätigte sich die zuvor in der *In vitro* Untersuchung gezeigte antiplasmodiale Potenz der Wirkstoffe.⁵⁰ Halbwertszeit der Wirkstoffe kurzen wurde Therapieschema entwickelt, in dem die Wirkstoffe dreimal täglich über insgesamt vier Tage verabreicht wurden. So wurden für Fosmidomycin ED₉₀-Werte von circa 5 mg/kg (i.p.) beziehungsweise 20 mg/kg (p.o.) erreicht. Die Parasitämie lag in dieser Studie nach einer viertägigen Behandlung mit Fosmidomycin an Tag 5 nach Infektion %. bei unter Allerdings traten wenige Tage nach Absetzen Fosmidomycinbehandlung Rezidive auf. Nur nach einer Behandlungsdauer über insgesamt acht Tage überlebten die Mäuse für einen längeren Zeitraum. Studien zur Effektivität und Sicherheit einer Monotherapie mit Fosmidomycin bei unkomplizierter Malaria tropica wurden in Gabun und Thailand durchgeführt. 131 Insgesamt wurde der Wirkstoff sieben Tage lang verabreicht, erwies sich als sehr gut verträglich und war auch gegen multiresistente Stämme wirksam. Die mittlere Zeit bis zur Parasiten- und Fieberfreiheit betrug ungefähr 2 Tage und entspricht somit dem Intervall gebräuchlicher Antimalariamittel. Allerdings wurde 28 Tage nach Therapiebeginn festgestellt, dass ein Großteil der behandelten Patienten Rezidive entwickelte. In vitro Studien zeigen, dass Kombinationen aus Fosmidomycin mit dem Lincosamid-Clindamycin¹³² Artesunat¹³³ Antibiotikum oder dem Artemisininderivat Wirksynergismus aufweisen. Entsprechende Therapieergebnisse erhielt man auch bei der Behandlung von gabunesischen Kindern, die ein Mindestalter von 3 Jahren hatten und an asymptomatischer Malaria tropica erkrankt waren. Fosmidomycin (30 mg/kg KGW) und Clindamycin (5 mg/kg KGW) wurden über fünf Tage in Zeitintervallen von zwölf Stunden peroral eingenommen. Im Vergleich zur Monotherapie war mit zwölf Stunden sowohl die Zeit bis zur Parasiten- und Fieberfreiheit kürzer als auch die resultierende Kurierungsrate höher, die bei 100 %

an Tag 28 lag.¹³⁴ Eine weitere Studie wurde an gabunesischen Kindern, die an akuter unkomplizierter *Malaria tropica* erkrankt waren, durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass ein Therapieschema mit einer zweimal täglichen Gabe der fixen Dosierung bestehend aus Fosmidomycin (30 mg/kg KGW) und Clindamycin (10 mg/kg KGW) nach nur drei Behandlungstagen die Zeit bis zur Parasitenfreiheit auf 35 h ansteigen ließ. Dafür waren aber an Tag 28 nach Behandlungsbeginn 90 % der Patienten kuriert und wiesen vor allem keine Rezidiven auf. Zusätzlich ist dieses Therapieregime gg. den Standardtherapien mit Chloroquin oder Sulfadoxin-Pyrimethamin bezogen auf die Heilungsrate überlegen.¹³⁴⁻¹³⁶ Bei Anwendung der Wirkstoffkombination aus Fosmidomycin und Artesunat ergaben sich für die dreitägige Therapie von Kindern im Alter von 7-14 Jahren, die an unkomplizierter *Malaria tropica* erkrankt waren, Heilungsraten von 100 % an Tag 28. In allen Kombinationstherapiestudien traten keine unerwünschten Arzneimittelwirkungen auf, die zu Therapieabbruch führen würden.¹³⁷

1.1.8 Fosmidomycin als Leitstruktur neuer Antimalaria-Wirkstoffe

Die Verbesserung der pharmakodynamischen, physikochemischen und damit verbunden auch pharmakokinetischen Eigenschaften ist seit der Entdeckung Fosmidomycins als Antimalariamittel Ziel vieler Arbeitsgruppen. Im Folgenden wird zum Verständnis dieser Arbeit ein zusammenfassender Überblick der wichtigsten bekannten Struktur-Aktivitäts-Beziehungen gegeben.

Abbildung 12. Leitstruktur Fosmidomycin unterteilt in drei Molekülregionen.

Zur besseren Übersicht wird Fosmidomycin in drei Molekülregionen (Abbildung 12) unterteilt und ausgewählte Strukturmodifikationen nacheinander vorgestellt. Abschließend wird zur Einordnung der vorliegenden Arbeit ein detaillierter Überblick über aktuelle und relevante inverse Fosmidomycinanaloga gegeben.

Aufgrund der Labilität des *Pf*Dxr-Enzyms wurden in den meisten Studien bevorzugt *In vitro* Aktivitätsbestimmungen der Analoga gg. dem einfacher zu handhabenden *Ec*Dxr-Enzym durchgeführt. Ein quantitativer Vergleich von IC₅₀-Werten zwischen

Dxr-Enzymen verschiedener Spezies und Assays unterschiedlicher Arbeitsgruppen ist nicht möglich. In den meisten Fällen wurde Fosmidomycin und/oder FR900098 als interne Referenz mit vermessen. Der gleiche Umstand gilt auch für die Vergleichbarkeit von IC_{50} -Werten, die im Zellkulturassay gg. unterschiedlichen Plasmodien-Spezies ermittelt wurden.

1.1.8.1 Molekülregion A: Die Phosphonsäurefunktion

Den größten Beitrag zur Polarität und ausgeprägten Wasserlöslichkeit der Wirkstoffe Fosmidomycin und FR900098 leistet die Phosphonsäurefunktion. Für FR900098 sind beide pK_s-Werte bekannt; sie betragen 2,0 (pKs₁) und 7,2 (pKs₂). Fosmidomycin und FR900098 liegen nur im sauren Milieu des Magens in ungeladener Form vor und werden nach peroraler Einnahme zum größten Teil aus diesem Verdauungsorgan durch passive Diffusion resorbiert. In der Blutbahn wie in zellulären Kompartimenten (pH 7,35-7,45) liegen die Wirkstoffe mindestens einfach deprotoniert in einer monoanionischen Form vor, die aufgrund ihrer ausgeprägten Polarität nicht mehr passiv durch Zellmembranen permeieren kann.

Abbildung 13. Fosmidomycin-Analoga mit einfach ionisierbaren und/oder isosteren Funktionalitäten anstelle der Phosphonatgruppe (zum Vergleich: IC_{50} (EcDxr) / (Dd2) von Fosmidomycin = 35 nM / 0.57 μ M).

Um diese nachteilige Eigenschaft der Phosphonsäurefunktion zu umgehen, wurde unter anderem ein Austausch gegen eine isostere **** Sulfon- beziehungsweise

"Verbindungen oder Molekülgruppen mit fast identischer Molekülform und Volumen, sowie ungefähr gleicher Verteilung der Elektronen, die ähnliche physikalische Eigenschaften aufweisen." (Alfred Burger, 1970)

_

Sulfonamidstruktur durchgeführt, was aber zum Inhibitionsverlust gg. *Ec*Dxr führte (Abbildung 13).

Sogar der Ersatz der Phosphonsäuregruppe durch eine chemisch verwandte Methylphosphinsäure führte zu antibakteriell inaktiven Verbindungen, während die antiplasmodiale Wirkung bislang nicht untersucht wurde. 138 Nach Derivatisierung der freien Phosphonsäurefunktion zu einem Monoalkylester resultierte ein vollständiger antiplasmodialer Aktivitätsverlust. Mono-Arylethylester zeigen eine mindestens um eine Zehnerpotenz verminderte inhibitorische Aktivität gg. EcDxr und dem P. falciparum Dd2-Stamm (Abbildung 13). 139 Ebenso ist der Ersatz der Phosphonatgruppe gegen ein Carbon- oder Sulfonsäuremotif für die Aktivität nachteilig, da die inhibitorische Aktivität gg. EcDxr nach Einführung dieser Funktionalitäten fast vollständig aufgehoben wird (Abbildung 13). 140, 141 Rohmer postulierte nach diesen im Jahre 2010 durchgeführten Untersuchungen, dass der Grund für die schwache Bindung von Carbon- und Sulfonsäureanaloga in einer abweichenden Bindungsgeometrie liegen kann. Durch die veränderte Gesamtkonformation der Fosmidomycinanaloga wird demnach der Hydroxamsäurerest in eine energetisch nachteilige Bindungsgeometrie gezwungen. Im Einklang mit diesen Erkenntnissen stehen auch die Studienergebnisse entsprechender Fosmidomycinanaloga, die gg. rekombinanter Synechocystis sp. PCC6803 Dxr im Jahre 2006 untersucht wurden und keine inhibitorische Aktivität zeigten. 142 Woo und Mitarbeiter demonstrierten in ihren Studien, dass Fosfoxacin ungefähr um den Faktor 3 stärker als Fosmidomycin an die Synechocystis Dxr bindet. Mit einem Ki-Wert von 2 nM ist das FR900098-analoge Monophosphat I der zurzeit potenteste Inhibitor dieses Enzyms (Abbildung 14). 143, 64, ††††

Fosmidomycin: K_i = 58 nM

Fosfoxacin (R = H): K_i = 19 nM I (R = Me): K_i = 2 nM

Abbildung 14. Fosmidomycin und Phosphatanaloga mit Hemmkonstanten an Synechocystis Dxr.

titt Woo und Mitarbeiter stellten nach Auswertung von Lineweaver-Burk Plots fest, dass alle untersuchten Inhibitoren analog zu den Referenzsubstanzen die Dxr von Synechocystis mit einer gemischt reversibel-irreversiblen Enzymkinetik hemmen. Das steht in Analogie zu den Ergebnissen von Koppisch und Mitarbeitern, die dieses Phänomen der langsamen und starken Bindungscharakteristik mit zwei K_i-Werten bereits für Fosmidomycin an EcDxr beschrieben.⁴⁷

Weil organische Phosphate im physiologischen Milieu Substrate von ubiquitär vorkommenden Phosphatasen darstellen und deshalb instabil sind, wurden diese hochaffinen Verbindungen nicht mehr auf ihre Antimalariaaktivität untersucht oder als gezogen. 144 Die beschriebenen Wirkstoffe Betracht Ergebnisse computergestützte Auswertungen von Klebe und Mitarbeitern 139, 162 lassen die Schlussfolgerung zu, dass für eine optimale Wechselwirkung an der entsprechenden Dxr-Bindestelle in Molekülregion A eine zweifach negativ geladene Funktionalität vorliegen muss.¹³⁹ Eine Phosphonsäuregruppe erfüllt dieses Kriterium besonders gut und ist durch seine stabile C-P-Bindung hydrolysestabil. Für die schwankende orale Bioverfügbarkeit Fosmidomycins und seiner Analoga wird v.a. die polare Phosphonsäuregruppe verantwortlich gemacht. Deshalb wurden von mehreren Arbeitsgruppen verschiedene Prodrugs in Form Phosphonsäuredoppelestern entwickelt (Abbildung 15). 145 Die beste In vivo Aktivität zeigen im Mausmodell gg. P. vinckei bislang Doppelesterprodrugs von FR900098. ‡‡‡‡ Über ein Formaldehyd- oder Acetaldehydmolekül kann die Phosphonsäurefunktion mit einem Carbonsäure- oder Kohlensäurederivat acylalisch verknüpft werden (Abbildung 15).^{146, 147}

Beispielsweise wird mit einer peroral applizierten Dosis von 0,054 mmol/kg KGW der Verbindung IIa eine stärkere prozentuale Reduktion der *P. vinckei-*Parasitämie erreicht als mit einer FR900098-Dosis von 0,18 mmol/kg Körpergewicht (KGW). Grundsätzlich kann es unter einer Dauertherapie mit POM (Pivaloyloxymethyl)-Prodrugs aufgrund der fortwährenden Freisetzung von Pivalinsäure und Formaldehyd im physiologischen Milieu zu relevanten Belastungen des Organismus kommen. §§§§§ Kohlensäureesterprodrugs von Phosphonsäuren sind toxikologisch weniger bedenklich und werden für eine längerfristige Einnahme empfohlen. Die in Abbildung 15 gezeigten Kohlensäureesterprodrugs IVa und IVb erwiesen sich *in vivo* als antiplasmodial aktiver als beispielsweise das korrespondierende POM-Prodrug III.

-

Bekannt ist dieses Doppelesterprodrug-Konzept z.B. aus der klinisch verifizierten Verbesserung der Bioverfügbarkeit der Phosphonsäure-Virustatika Adefovir und Tenofovir. Beispielsweise weist Adefovir-Dipivoxil eine lipophile Pivaloyloxymethylfunktion (= POM) auf. Unspezifische Esterasen hydrolysieren die POM-Gruppe nach Resorption im Blutkreislauf in Pivalinsäure und ein Halbacetal. Anschließend wird durch spontanen Zerfall des instabilen Intermediats in Formaldehyd und Phosphonsäure die Wirkform frei. Darüber hinaus ist die Verbesserung der pharmakokinetischen Eigenschaften von verschiedenen Cephalosporinantibiotika (z.B. Cefditorenpivoxil oder Cefetametpivoxil) durch analoge POM-Veresterung der Carbonsäurefunktion klinisch belegt worden.

^{\$§§§} Pivalinsäure wird im menschlichen Organismus mit L-Carnitin verestert, um anschließend vollständig eliminiert zu werden. Dadurch sinkt der L-Carnitinspiegel im Blut auf weniger als die Hälfte des Normwertes.¹⁴⁸

Darüber hinaus wurde in verschiedenen Testsystemen unabhängig voneinander gefunden, dass Doppelesterprodrugs verschiedener Fosmidomycin-Analoga auch eine verbesserte Aktivität im Zellkultur-Assay besitzen.^{149, 166, 170}

Abbildung 15. Phosphonsäuredoppelesterprodrugs von FR900098 mit nachgewiesener verbesserter In vitro/In vivo Antimalariaaktivität.

Die höhere Lipophilie der Prodrugs scheint die Aufnahme in den Erythrozyten und/oder in den Parasiten zu begünstigen. Höchstwahrscheinlich führt die intraerythrozytäre Hydrolyse der Doppelesterfunktion zu höheren Wirkstoffspiegeln der Wirkform im Apikoplasten als bei direkter Gabe von FR900098. Gegenüber der isolierten *Ec*Dxr zeigen entsprechende Phosphonsäuredoppelesterprodrugs von FR900098 erwartungsgemäß keine Hemmwirkung.¹⁴⁹

1.1.8.2 Molekülregion B: Die Propylkette

Die Entwicklung starker Enzyminhibitoren orientiert sich in der Wirkstoffentwicklung häufig an Molekülabwandlungen des natürlichen Substrats. Durch diesen Ansatz wurden viele Wirkstoffe entwickelt, die kompetitiv das natürliche Substrat aus der Enzymbindung verdrängen und den anvisierten biochemischen Stoffwechselweg hemmen. Steinbacher und Mitarbeiter zeigten für Fosmidomycin an der EcDxr, dass der Inhibitor strukturell einem nicht verstoffwechselbarem Substratanalogon mit höherer Enzymaffinität entspricht. Ein struktureller Unterschied Fosmidomycins zu DOXP stellt das Fehlen der Hydroxylgruppen an C₃ und C₄ dar. ⁹⁶ Rohmer und

Poulter wiesen unabhängig voneinander nach, dass beide Hydroxylfunktionen für die **DOXP** zu **MEP** katalytische Umsetzung von wichtia sind. Für metallionkomplexierende Hydroxyketonstruktur und die molekulare Erkennung ist die Hydroxylfunktion an C₃ wichtig, jedoch imitieren FR900098 und Fosmidomycin diese Funktion durch ihre Hydroxamsäuregruppe (Schema 5). 150-153 Insbesondere für den initialen Isomerisierungsschritt des Substrats ist die Hydroxylgruppe an C₄ DOXPs essenziell, für die Bindung am EcDxr-Apoenzym ist sie aber verzichtbar. 154 In der Tat sind DOXP-Analoga, denen die Hydroxylgruppen an C3 und/oder C4 fehlen, Inhibitoren der *Ec*Dxr und werden nicht verstoffwechselt.⁷⁹ schwache Hydrolysestabile Phosphonatanaloga von DOXP und MEP hemmen die *Ec*Dxr nicht. Das DOXP-Phosphonsäure-Analogon wird sogar als alternatives Substrat umgesetzt, wenn auch mit veränderten kinetischen Parametern.****** Rohmer und Mitarbeiter erkannten bereits 2003, dass die Methylgruppe des Übergangszustands 2-C-Methyl-D-erythrose-4-phosphat die Affinität zum Dxr-Enzym verbessert. Außerdem wird die tertiäre Hydroxylgruppe des Intermediats für die Komplexierung des zweiwertigen Metallions benötigt. 79, 155 Stärker als das natürliche Substrat binden Enzyme häufig den intermediär entstehenden Überrgangszustand der katalysierten Reaktion. Häufig sind nicht verstoffwechselbare Übergangszustandsanaloga Enzymhemmer mit hervorragender Affinität. †††††156 Link und Mitarbeiter synthetisierten und untersuchten 2008 das hydrolysestabile Übergangszustandsanalogon V (Schema 4).

****** DOXP zeigt eine Michaelis-Menten-Konstante von $K_m = 30$ μM und ein $k_{cat} = 740$ min⁻¹, wohingegen das Phosphonat-Analogon DOXPs schwächer erkannt ($K_m = 120$ μM) und langsamer umgesetzt wird ($k_{cat} = 74$ min⁻¹).

^{******} siehe z.B. HIV-Protease-Hemmstoffe, den Renin-Inhibitor Aliskiren oder HMG-CoA-Hemmstoffe.

Schema 4. Dxr-katalysierte Umsetzung von DOXP zu MEP und Ableitung eines Übergangszustandsanalogons (modifiziert nach Kaula). ¹⁵⁷

Jedoch konnte auch bei Konzentrationen von mehr als 30 μ M V keine EcDxr-Hemmung beobachtet werden. Ob die Verbindung durch das Enzym umgesetzt wird, wurde durch die Studie nicht beantwortet und ist noch Gegenstand von Untersuchungen. 106

Die Kettenlänge von drei sp^3 -hybridisierten Kohlenstoffatomen zwischen Phosphonund Hydroxamsäurefunktion hat sich für eine ausgeprägte EcDxr-Inhibition von in α -Position (bezogen auf die Phosphonsäurefunktion) unsubstituierter Analoga als optimal erwiesen. So zeigen sowohl kettenverkürzte Derivate¹³⁸ als auch Analoga, die in der Propylkette durch Einführung einer Doppelbindung stereochemisch verändert wurden, keine beziehungsweise reduzierte inhibitorische Aktivität (Abbildung 16). $^{157-159}$

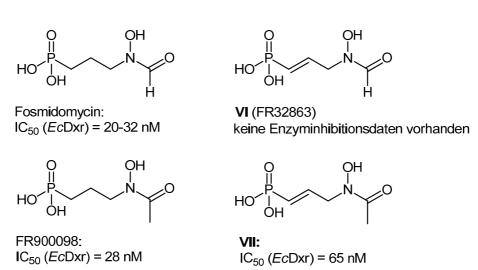


Abbildung 16. Fosmidomycin, FR900098, FR-32863 und VII mit deren Hemmung gg. EcDxr.

Die Verbindung **VII** wurde auf synthetischem Wege gewonnen und stellt das entsprechende Acetylanalogon des Naturstoffs FR32863 (**VI**) dar. Das Analogon zeigt im Vergleich zu FR900098 nur noch eine 50 %ige Hemmung der *Ec*Dxr (Abbildung 16).¹³⁸ **VIII** ist ein (1*R*, 2*S*)-trans-Cyclopropyl-Analogon von FR900098 und weist eine mit Fosmidomycin vgl. antiplasmodiale Aktivität auf (Abbildung 17). Die antiplasmodiale Wirkung der entsprechenden Fosmidomycinanalogen trans-Cyclopropyl-Verbindung **IX** nimmt um den Faktor 6 ab.¹⁶⁰

54

VIII (R = Me): IC_{50} (*P.f.* 3D7) = 0,32 μ M **IX** (R = H): IC_{50} (*P.f.* 3D7) = 2,1 μ M

zum Vergleich:

Fosmidomycin: IC_{50} (*P.f.* 3D7) = 0,40 μ M FR900098: IC_{50} (*P.f.* 3D7) = 0,24 μ M

Abbildung 17. Cyclopropylanaloga mit antiplasmodialer In vitro Aktivität.

Die Substitution der Propylkette in $β^{-161}$ und in γ-Position^{159, 162} bezogen auf die Phosphonsäuregruppe führt zur Wirkungsverminderung *in vitro*. Substituenten in α-Position verbessern dagegen zum Teil die antiplasmodiale Aktivität *in vitro*. Mit dem Ziel, die Azidität der Phosphorsäuremonoestergruppe DOXPs, die bei pK_{S2}~6,4 liegt (pK_{S2}~7,6 bei Phosphonsäuren), zu imitieren und die Bindung am Enzym analog zu Fosfoxacin zu verbessern, untersuchten *Van Calenbergh und Mitarbeiter* im Jahre 2010 mono-α-halogenierte Phosphonsäure-Analoga von FR900098 (**X** und **XI** in Abbildung 18). 164

X (R = CI): IC_{50} (*P.f.* K1) = 0,30 µM **XI** (R = F): IC_{50} (*P.f.* K1) = 0,29 µM

zum Vergleich:

Fosmidomycin: IC_{50} (*P.f.* K1) = 1,73 µM FR900098: IC_{50} (*P.f.* K1) = 0,42 µM

Abbildung 18. α-Halogenierte FR900098-Analoga mit antiplasmodialer Aktivität.

Mit einem pK_{S2}~6 besitzen die Analoga die gewünschte Azidität und hemmen das Wachstum des chloroquinresistenten P. falciparum K1-Stammes in vitro stärker als FR900098 (Abbildung 18). Für die In vitro Aktivität ist nicht entscheidend, ob eine mono-Fluor- oder mono-Chlor-Substitution vorliegt. Verbindung XI ist aber in vivo gg. P. berghei deutlich wirksamer als X, Fosmidomycin oder FR900098. $^{\ddagger \ddagger \ddagger \ddagger \ddagger \ddagger}$ Gleichwohl wurden keine Daten zur Zytotoxizität von X oder XI veröffentlicht. 164

Analoga mit Phenylsubstituenten in α -Position zeigen ebenfalls deutlich verbesserte antiplasmodiale Aktivität *in vitro* (Abbildung 19). Die lipophile und

_

Bei einer Dosis von 50 mg/kg KGW von **XI**, welche 5 Tage lang intraperitoneal verabreicht wurde, überlebten die infizierten Mäuse durchschnittlich 15,8 Tage. Damit ist **XI** gg. Fosmidomycin (mittlere Überlebenszeit (MST) = 11,5 Tage) bei vergleichbarer Dosis im Mausmodell überlegen. Trotz höherer Potenz gg. dem Wachstum von *P. falciparum* K1 im Zellkulturassay um den Faktor 4 zeigte FR900098 gg. *P. berghei* eine schwächere Aktivität als Fosmidomycin, was sich in einem MST-Wert von 10,8 Tagen äußert.

elektronenziehende 3,4-Dihalogen-Substitution des Phenylkerns (**XIII** und **XIV**) erwies sich in den bisherigen Studien als optimal für die antiplasmodiale Aktivität gg. dem 3D7-Stamm von *P. falciparum*. Im Gegensatz zur höheren antiplasmodialen Aktivität der Acetohydroxamsäure FR900098 im Vergleich zur Formylhydroxamsäure Fosmidomycin sind unter allen bisher untersuchten α -Aryl-substituierten Analoga die *N*-Formyl-Hydroxamsäuren antiplasmodial wirksamer als die entsprechenden *N*-Acetyl-Hydroxamsäuren (siehe z.B. **XIII** vgl. mit **XIV**).

$$R_2$$

XII (R₁ = Me; R₂ = H): IC₅₀ (*P.f.* 3D7) = 0,55 μM **XIII** (R₁ = H; R₂ = CI): IC₅₀ (*P.f.* 3D7) = 0,09 μM **XIV** (R₁ = Me; R₂ = CI): IC₅₀ (*P.f.* 3D7) = 0,25 μM zum Vergleich:

Fosmidomycin: IC_{50} (*P.f.* 3D7) = 1,1 μ M FR900098: IC_{50} (*P.f.* 3D7) = 0,32 μ M

Abbildung 19. Ausgewählte α -Phenyl-Fosmidomycin-Analoga mit antiplasmodialer Aktivität.

Sehr interessant ist in diesem Zusammenhang, dass diese Gesetzmäßigkeit auch für die Hemmung der rekombinanten EcDxr gilt. Allerdings hemmt keines der bisher veröffentlichten α -Aryl-Fosmidomycinanaloga das bakterielle Enzym stärker als Fosmidomycin, welches der bislang potenteste Hemmstoff der EcDxr ist. 165

von Kurz und Mitarbeiter berichteten 2006 über die Synthese POM-Phosphonsäuredoppelesterprodrugs α-substituierter Fosmidomycinanaloga und ihrer 20).166, antiplasmodialen In vitro Aktivität (Abbildung Dabei konnte übereinstimmend mit den von Van Calenbergh zeitlich parallel veröffentlichten Ergebnissen gezeigt werden, dass elektronenziehende Substituenten am Aromaten (XVII vgl. mit XV) die inhibitorische Aktivität erhöhen.

XV (R₁ = H; R₂ = H): IC_{50} (*P.f.* 3D7) = 0,6 μ M **XVI** (R₁ = Me; R₂ = H): IC_{50} (*P.f.* 3D7) = 0,7 μ M **XVII** (R₁ = H; R₂ = F): IC_{50} (*P.f.* 3D7) = 0,4 μ M zum Vergleich: **XVIII** (Fosmidomycin-Prodrug): IC_{50} (*P.f.* 3D7) = 2,1 μ M **XIX** (FR900098-Prodrug): IC_{50} (*P.f.* 3D7) = 0,4 μ M

Abbildung 20. POM-Prodrugs von α -Phenyl-Analoga mit antiplasmodialer Aktivität.

Abgesehen von einer Ausnahme §§§§§§ scheint die EcDxr-Hemmung von α -Phenyl-Fosmidomycin-Analoga mit para-Substituenten, die Hammett- σ^+ -Effekt aufweisen, verbessert zu sein. Schlüter und Kurz zeigten darüber hinaus, dass auch eine nichtaromatische, elektronenschiebende α -Methyl-Substitution - wie in den POM-Prodrugs XX und XXI verwirklicht - zu einer ausgeprägteren Hemmung des Parasitenwachstums als beim entsprechenden Fosmidomycin-Prodrug XVIII führt (vgl. Abbildung 20 mit 21).

Abbildung 21. POM-Prodrugs von α-Methyl-Analoga und deren antiplasmodiale Aktivität.

Anders als bei α -Aryl-substituierten Analoga ist für die antiplasmodiale Aktivität von α -methylsubstituierten Verbindungen unerheblich, ob gleichzeitig in Molekülregion C eine Formyl- oder Acetohydroxamsäure vorliegt. Längerkettige und verzweigte Alkylreste sowie ein Hydroxymethylrest in α -Position erniedrigen die antiplasmodiale Aktivität *in vitro* signifikant. Die Einführung eines sterisch anspruchsvolleren Benzylsubstituenten wird als Strukturmodifikation hinsichtlich der antiplasmodialen Aktivität toleriert (**XXII**), führt aber verglichen mit Fosmidomycin zu keiner Aktivitätsverbesserung (Abbildung 22). Auch bei diesem aromatischen Substituenten zeigt sich, dass die 3,4-Dihalogen-Substitution (**XXIII**) die antiplasmodiale Aktivität verbessert (Abbildung 22).

_

^{§§§§§§ 4-}Carboxamid-Substitution führt zur Aktivitätsabschwächung im Vergleich zu H.

XXII (R¹ = H; R² = H): Wachstumshemmung von P.f. 3D7 bei 1 μ M = 38 % **XXIII** (R¹ = H; R² = CI): Wachstumshemmung von P.f. 3D7 bei 1 μ M = 59 % zum Vergleich:

XVIII (Fosmidomycin-Prodrug): Wachstumshemmung von P.f. 3D7 bei 1 μ M = 32 % **XIX** (FR900098-Prodrug): Wachstumshemmung von P.f. 3D7 bei 1 μ M = 71 %

Abbildung 22. Ausgewählte α -Arylmethyl-Fosmidomycinanaloga mit antiplasmodialer Aktivität.

Um die Bedeutung des vorteilhaften Arylsubstituenten für die EcDxr-Inhibition besser zu verstehen, berichteten Deng und Kooperationspartner 2010 und 2011 von strukturell vereinfachten Analoga, denen im Vergleich zu α-Aryl-Fosmidomycin-Derivaten entweder die Hydroxamsäure- oder die Phosphonsäuregruppe fehlt (Abbildung 23).¹⁶⁹ Interessanterweise inhibieren nur Analoga mit fehlender Hydroxamatgruppe wie XXVIII-XXX die EcDxr im mikromolaren Bereich. Dabei bleibt allerdings unbeantwortet, warum für XXVII keine Enzymhemmung beobachtet werden konnte. Andererseits berichtete dieselbe Arbeitsgruppe 2009 über einen koordinationschemischen Arbeitsansatz, aus dem das N-Hydroxypyridon XXIV resultierte. Mit einem IC₅₀-Wert von 1,4 μM hemmt diese Verbindung *Ec*Dxr weitaus potenter als XXV-XXX. 169 Die Untersuchung der antibakteriellen Eigenschaften im Zellkulturassay zeigte jedoch keine Wachstumshemmung gg. E. coli. Im Vergleich mit Ampicillin ist XXIV stärker bakteriostatisch wirksam gg. P. aeruginosa (Abbildung 23). Deng und Mitarbeiter kristallisierten einige Inhibitoren wie beispielsweise XXXII im Komplex mit EcDxr und NADPH aus und klärten durch Röntgendiffraktometrie die Kristallstruktur auf. Tatsächlich nimmt die Phosphonsäuregruppe der Analoga eine mit Fosmidomycins Phosphonatgruppe vergleichbare Bindung ein.

Abbildung 23. Aryl-substituierte Fosmidomycin-Analoga-Fragmente. 169

Darüber hinaus erkannte die Arbeitsgruppe vorteilhafte hydrophobe Wechselwirkungen der elektronenarmen Aromaten der Inhibitoren mit dem Indolrest von Trp211 (abweichende Nummerierung der Autoren) des *Ec*Dxr-Enzyms. *Yajima und Mitarbeiter* berichteten bereits 2004 über die in einem Wirkstoffscreening entdeckten nicht-hydrolisierbaren Bisphosphonatverbindungen **XXXI** und **XXXII**, welche die *Ec*Dxr im einstellig mikromolaren Bereich hemmen (Abbildung 24).⁸⁶

Abbildung 24. Bisphosphonatverbindungen mit EcDxr-Hemmung.

Anschließende Kristallstrukturanalysen ergaben allerdings, dass diese Bisphosphonatanaloga einen abweichenden Bindungsmodus zu denen der in Abbildung 23 dargestellten Analoga aufweisen. Wie sich herausstellte, lagert sich die Bisphosphonatgruppe von XXXI und XXXII in den EcDxr-Enzymbereich ein, in dem Hydroxamsäuregruppe Fosmidomycins bindet. Besonders analog hervorzuheben, dass eine Phosphonsäuregruppe das katalytisch relevante Metallion bindet. An der Phosphat(DOXP)- beziehungsweise Phosphonat(Fosmidomycin)-Bindestelle des Enzyms wurde in diesen Kristallstrukturen ein Sulfat-Ion wiedergefunden. Außerdem nimmt die flexible Schleife eine im Vergleich zu früheren Strukturanalysen andersartige Konformation ein.86

Eine weitere Strukturmodifikation in Molekülregion B wurde von *Van Calenbergh und Mitarbeitern* durch einen isosteren Ersatz der Methyleneinheit in β-Stellung der Propylkette gegen ein bivalentes, isosteres Sauerstoffatom durchgeführt. 2008 wurde unter anderem über die Fosmidomycin-Analoga **XXXIII** und **XXXIV** berichtet (Abbildung 25). Verbindung **XXXIII** ist gg. chloroquinsensitiven *P. falciparum*-Stämmen *in vitro* wirksamer als FR900098. β-Oxa-Fosmidomycin (**XXXIV**) ist jedoch um den Faktor 4 schwächer antiplasmodial wirksam als Fosmidomycin.

XXXIII (R = H): IC_{50} (*P.f.* 3D7) = 4,9 μ M **XXXIV** (R = Me) IC_{50} (*P.f.* 3D7) = 0,36 μ M

zum Vergleich:

Fosmidomycin: IC_{50} (*P.f.* 3D7) = 1,20 μ M FR900098: IC_{50} (*P.f.* 3D7) = 0,43 μ M

Abbildung 25. β-Oxa-Fosmidomycinanaloga und ihre antiplasmodiale Aktivität. 170

1.1.8.3 Molekülregion C: Die Hydroxamsäurefunktion

Wie verschiedene Arbeitsgruppen unabhängig voneinander zeigen konnten, führt der Austausch der Hydroxamatgruppe Fosmidomycins gegen andere, darunter auch erfahrungsgemäß gut komplexierende, chemische Funktionalitäten zur Reduktion beziehungsweise Verlust der Dxr-Enzyminhibition. So erbrachte der Ersatz gegen eine Methansulfonsäure-,¹⁵⁹ Hydroxyharnstoff-,¹⁷¹ Benzoxazolon-, Oxazolopyridinon-,¹⁷² Acetamid-, Amin-^{106, 110} oder Brenzcatechinfunktion¹⁷³ Analoga ohne relevante

inhibitorische Aktivität gg. dem *Ec*Dxr-Enzym. Der Versuch. die Hydroxamsäurefunktion Fosmidomycins durch einen in 2oder 3-Position substituierten N-Hydroxy-oxazolidin-2-on-Ring konformativ einzuschränken, führte ebenfalls zum Verlust der inhibitorischen Aktivität. 110 Schlitzer und Klebe zeigten, Analoga mit längerkettigen, lipophileren Säureresten dass an der Hydroxamsäurefunktion ebenfalls reduzierte inhibitorische Potenz gg. EcDxr aufweisen. 174, 106 Kaula bestätigte unabhängig davon die verringerte antiplasmodiale Wirksamkeit von Fosmidomycinanaloga mit unterschiedlich abgewandelten N-Acyl-Resten.¹⁵⁷

Entwicklung inverser Fosmidomycinanaloga

Die Inversion einer funktionellen Gruppe zur Verbesserung der pharmakologischen Eigenschaften gehört zu einer Strukturmodifikation der nicht-klassischen Bioisosterie. Im englischen Sprachgebrauch wird dafür der Begriff "retroisosterism" verwendet. Die inversen Hydroxamsäureanaloga Fosmidomycins (XXXV) und von FR900098 (XXXVI) wurden erstmalig im Jahre 2005 von *Rohmer* beschrieben. Die inversen Hydroxamsäureanaloga Fosmidomycins (XXXVI) und von FR900098 (XXXVII) wurden erstmalig im Jahre 2005 von *Rohmer* beschrieben.

Abbildung 26. Bindungsmodus von DOXP (a), Fosmidomycin (b) und hypothetischer Bindungsmodus inversen Hydroxamsäure-Analoga (c) am Metallkation (Mn²⁺) im enzymatischen Zentrum der EcDxr (modifiziert nach Kuntz, L. et al.; M. Biochem. J. **2005**, 386, 127-35).¹⁷⁵

Rohmer postulierte, dass die inverse Hydroxamsäurefunktion der synthetisierten Analoga (Abbildung 26c) vgl. mit der Hydroxamsäuregruppe Fosmidomycins (Abbildung 26b) beziehungsweise der Hydroxyketonfunktion DOXPs (Abbildung 26a) an das zweiwertige Metallkation binden könnte. Tatsächlich resultierten aus dieser strukturellen Modifikation Verbindungen mit relevanter *Ec*Dxr-Inhibition. Während XXXV die *Ec*Dxr schwächer als Fosmidomycin hemmt, ist die *N*-Methyl-Hydroxamsäure XXXVI annähernd äquipotent (Abbildung 27). Darüber hinaus zeigen XXXV und XXXVI wie Fosmidomycin eine zeit-abhängige, gemischt kompetitivunkompetitive Hemmung der *Ec*Dxr. 175

XXXV (R = H): IC_{50} (EcDxr) = 170 nM **XXXVI** (R = Me): IC_{50} (EcDxr) = 48 nM

zum Vergleich:

Fosmidomycin: IC_{50} (EcDxr) = 32 nM

Abbildung 27. Erste inverse Hydroxamsäure-Analoga Fosmidomycins und deren EcDxr-Hemmkonstante.¹⁷⁵

In weiterführenden Studien derselben Arbeitsgruppe wurden Hydroxamsäureanaloga mit *N*-Ethyl-Substitution sowie mit unterschiedlicher Kettenlänge zwischen der Hydroxam- und Phosphonsäurefunktion untersucht (Abbildung 28). Im Jahr 2010 wurde von *Rohmers* Arbeitsgruppe darüber berichtet, dass analog zu Fosmidomycin auch der Abstand der inversen Hydroxamsäuregruppe zur Phosphonsäurefunktion drei sp³-hybridisierten Kohlenstoffeinheiten entsprechen muss. Im Vier Methyleneinheiten werden zwar toleriert, es resultieren aber in unterschiedlichem Maße schwächere Enzyminhibitoren (XXXIX vs. XXXV beziehungsweise XL vs. XXXVI). Das inverse Hydroxamsäure-Analogon XXXVIII mit *N*-Ethyl-Substitution ist im Vergleich zu XXXIX und XL ein deutlich schwächerer *Ec*Dxr-Inhibitor.

XXXVII (n = 0; R = Me): IC_{50} (EcDxr) = 19000 nM **XXXVIII** (n = 1; R = Et): IC_{50} (EcDxr) = 6500 nM **XXXIX** (n = 2, R = H): IC_{50} (EcDxr) = 270 nM **XL** (n = 2, R = Me): IC_{50} (EcDxr) = 110 nM

zum Vergleich:

Fosmidomycin: IC_{50} (EcDxr) = 32 nM FR900098: IC_{50} (EcDxr) = 32 nM

Abbildung 28. EcDxr-Hemmkonstanten inverser Hydroxamsäureanaloga Fosmidomycins mit unterschiedlichen Kettenlängen und Hydroxamsäuresubstituenten.

Aus diesen Ergebnissen kann abgeleitet werden, dass der Alkylsubstituent am inversen Hydroxamsäure-Stickstoffatom einen sehr starken Einfluss auf die EcDxr-Hemmung hat. Bisher veröffentlichte *Rohmer* jedoch weder Daten zur inhibitorischen *Pf*Dxr, antiplasmodialer Wirkung, noch Potenz gg. zur beziehungsweise *In vivo* Antimalariaaktivität dieser inversen Hydroxamsäureanaloga. Die Arbeitsgruppe von Van Calenbergh berichtete 2010 in der bereits angesprochenen Veröffentlichung über α-halogenierte FR900098-Analoga (siehe Kapitel 1.1.8.2) von den antiplasmodialen Eigenschaften der Hydroxamsäure XLI. 163 Die Autoren zeigten eine im Vergleich zu XI äquipotente Wachstumshemmung gg. dem P. falciparum K1-Stamm (Abbildung 29). In der anschließenden *In vivo* Studie an *P. berghei*-infizierten Mäusen zeigte **XLI** mit einen MST-Wert von 11,7 Tagen zusätzlich eine mit Fosmidomycin (MST = 11,5 Tage) vergleichbare Antimalaria-Aktivität.¹⁶³

XI: IC_{50} (*P.f.* K1) = 0,29 μ M

XLI: IC_{50} (*P.f.* K1) = 0,31 µM

zum Vergleich:

FR900098: IC_{50} (*P.f.* K1) = 0,42 μ M

Abbildung 29. α -Fluorierte FR900098-Analoga mit antiplasmodialer In vitro Aktivität.

Wie bereits in Kapitel 1.1.7.2 dargestellt, veröffentlichten Haemers und Mitarbeiter 2008 biologische Daten von Hydroxamsäureanaloga Fosmidomycins, bei denen in Molekülregion B ein isosterer Austausch der Methylengruppe gegen bivalenten Sauerstoff vorgenommen wurde. XLIII stellt darunter den potentesten Inhibitor der EcDxr dar. Erstmalig wies damit ein Fosmidomycinanalogon mit inverser Hydroxamsäure in antiplasmodiale Aktivität vitro stärkere als Referenzverbindungen Fosmidomycin und FR900098 auf (Abbildung 30). Im Gegensatz zu XLIII hat die unsubstituierte Hydroxamsäure XLII keine inhibitorische Aktivität gg. EcDxr. Die γ-Oxa-Analoga XLIV und XLV stellen chemisch gesehen N-Hydroxycarbamate dar und üben keine EcDxr-Hemmung aus (Abbildung 30). 170

XLII (R = H): IC_{50} (EcDxr) > 3 μ M **XLIII** (R = Me): IC_{50} (EcDxr) = 72 nM IC_{50} (P.f.3D7) = 0,24 +/- 0,09 μ M

zum Vergleich:

Fosmidomycin: IC_{50} (*P.f.*3D7) = 1,20 +/- 0,18 μ M FR900098: IC_{50} (*P.f.*3D7) = 0,43 +/- 0,06 μ M

XLIV (R = H): IC_{50} (*Ec*Dxr) > 3 μ M **XLV** (R = Me): IC_{50} (*Ec*Dxr) > 3 μ M

Abbildung 30. β- und γ-Oxa-Fosmidomycinanaloga mit EcDxr-Hemmkonstanten. 170

Wie sich in den biologischen Studien mit inversen Fosmidomycinanaloga vor und während der Anfertigung dieser Dissertation zeigte, stellt die Inversion der

Hydroxamsäuregruppe Fosmidomycins eine vielversprechende neue Strukturmodifikation dar. Zum besseren Verständnis der Rolle der inversen Hydroxamsäuregruppe für die Dxr-Inhibition fehlen noch Kristallstrukturanalysen von Dxr-Inhibitor-Komplexen. Darüber hinaus deutet die gute $In\ vivo$ Aktivität des α -Aryl-substituierten, inversen FR900098-Analogons **XLI** am murinen $P.\ berghei$ -Stamm an, dass inverse Analoga Fosmidomycins Entwicklungskandidaten für ein neues Antimalariamittel werden könnten.

1.2 Aufgabenstellung / Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zur Aufklärung weiterer Struktur-Aktivitäts-Beziehungen inverser Fosmidomycin-Analoga leisten. Zum Zeitpunkt des Arbeitsbeginns waren nur die inversen Analoga XXXV und XXXVI bekannt (siehe Abbildung 27 beziehungsweise Schema 5). 175 Orientierend am antiplasmodial vorteilhaften α -Phenyl-Phosphonsäure-Strukturmotif (z.B. **XII** in Schema 5) sollte als Schwerpunkt dieser Arbeit die Erschließung einer Gruppe neuartiger, inverser Hydroxamatanaloga Fosmidomycins mit aromatischer Substitution in α -Position erreicht werden. Darüber hinaus sollten kettenverkürzte und am Stickstoff unterschiedlich substituierte Hydroxamsäureanaloga des neuen Typs gewonnen werden. (Zielverbindungen 1, Schema 5). Durch Variation der Substituenten am aromatischen Phenylkern soll der elektronische und sterische Einfluss dieser Molekülregion auf die biologische Aktivität untersucht werden (Zielverbindungen 2). Außerdem sollte die inverse Hydroxamatgruppe des neuen Strukturtyps nach dem Konzept der Bioisosterie gegen andere, erfahrungsgemäß gut komplexbildende chemische Funktionalitäten ausgetauscht werden (Zielverbindungen Abschließend sollten von den antiplasmodial aktivsten Fosmidomycinanaloga Phosphonsäureesterprodrugs synthetisiert und biologisch untersucht werden (Zielverbindungen 4, Schema 5). Ein zentraler Ansatz dieser Arbeit ist die interdisziplinäre Aufgabenstellung. Durch Kooperation mit anderen Arbeitsgruppen sollte erstmalig der Einfluss der Hydroxamsäureinversion Fosmidomycins auf die inhibitorische Aktivitätssteigerung gg. PfDxr (Arbeitsgruppe Fischer in Hamburg), insbesondere im Vergleich zu EcDxr (Arbeitsgruppe Eisenreich in München), erforscht werden. Eine multizentrische Projektstruktur unter Einbeziehung anderer Arbeitsgruppen sollte ermöglichen, dass die vom Autor dieser Arbeit synthetisierten Zielverbindungen umfassenden biologischen Untersuchungen in verschiedenen Enzymassays und in *P. falciparum*-Zellkulturen (Arbeitsgruppe Maes, Antwerpen) zugeführt werden können. Weiterhin sollten ausgewählte Endverbindungen im LMPH in Antwerpen in vivo untersucht werden. Für den interdisziplinären Ansatz ist die Darstellung freier Phosphonohydroxamsäuren unverzichtbar.

$$IC_{50} (EcDxr) = 32 \text{ nM}$$

$$IC_{50} (P.I. 3D7) = 1200 \text{ nM}$$

$$IC_{50} (P.I. 3D7) = 1200 \text{ nM}$$

$$II: IC_{50} (P.I. 3D7) = 550 \text{ nM}$$

$$II: IC$$

Schema 5. Darstellung des Forschungsstands zu Dissertationsbeginn und Ableitung der Zielverbindungen (fett unterlegt sind die variierten Reste).

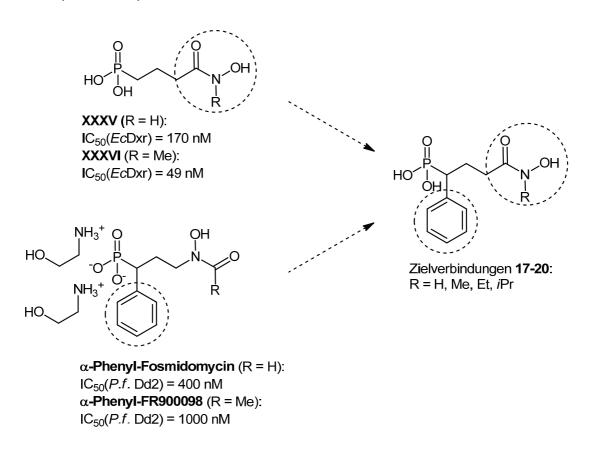
Phosphonsäureesterprodrugs

der antiplasmodial potentesten Analoga

2 α-Phenyl-Fosmidomycin-Analoga mit inverser Hydroxamsäurefunktion

2.1 Syntheseidee

Wie bereits in der Aufgabenstellung vorgestellt, war das erste Ziel dieser Arbeit die Synthese und biologische Untersuchung der Zielverbindungen 17-20, welche die Strukturmodifikationen von XXXV, XXXVI und von α -Phenyl-Fosmidomycin vereinen (Schema 6). 175, 220



Schema 6. Angestrebte Zielverbindungen 17-20. 175, 220

Schon *Smith und Mitarbeiter* wandten das Prinzip der Inversion einer Hydroxamsäurefunktion¹⁹⁰ an dem potenten PDF ******-Inhibitor **BB-3497** an. Der bioisostere Austausch erbrachte den um den Faktor sieben potenteren PDF-Inhibitor **XLVI**. Als Erklärung für die gesteigerte Enzyminhibition durch **XLVI** postulieren die

Peptiddeformylasen (=PDFs) sind (meist) eisenhaltige (Fe²⁺) Hydrolasen, die die Deformylierung von in Mitochondrien, Plastiden oder Bakterien synthetisierten Proteinen katalysieren. Aufgrund der vitalen Funktion dieses Enzyms für Bakterien und einige Parasiten, werden entsprechende Enzyminhibitoren als potenziell antibakteriell, antiparasitär und herbizid wirksame Stoffe entwickelt.

Autoren zusätzliche Interaktionen der deprotonierten inversen Hydroxamsäurefunktion bei Bindung im aktiven Zentrum des bakteriellen Enzyms (Abbildung 31).¹⁹¹

Abbildung 31. Retroisostere (= inverse) Abwandlung der Hydroxamsäuregruppe des Peptiddeformylase-Inhibitors **BB-3497** sowie Bindungsmodus der Leitstruktur abgeleitet aus der Kristallstrukturanalyse (links unten); daraus postulierter Bindungsmodus des potenteren Inhibitors **XLVI** (rechts unten).

Wechselwirkungen Analog ist ein Gewinn an zwischen einer Hydroxamsäuregruppe der angestrebten Fosmidomycinanaloga und dem Dxr-Enzym vorstellbar. Schlitzer und Klebe berichteten in einer früheren Arbeit über Molecular-Modeling-Studien, die auf unbesetzte Areale des *Ec*Dxr-Enzyms in der Hydroxamsäure-Binderegion welche Fosmidomycin unbesetzt deuten, von bleiben. 174

Kettenverkürzte inverse Hydroxamsäureanaloga Fosmidomycins mit α -Phenyl-Substituenten sollten überdies gewonnen und biologisch untersucht werden (Schema 7).

68

$$A$$
-Phenyl-Fosmidomycin (R = H): IC₅₀(P.f. Dd2) = 0,4 μ M α -Phenyl-FR900098 (R = Me): IC₅₀(P.f. Dd2) = 1,0 μ M

Schema 7. Angestrebte kettenverkürzte inverse Hydroxamsäureanaloga Fosmidomycins.²²⁰

2.2 Syntheseplanung

Für die Synthese von Hydroxamsäuren sind in der Literatur viele Verfahren beschrieben, die sich auf Umsetzungen in Lösung oder an Festphase orientieren.¹⁹² Ausgehend von einer Carbonsäure ist aufgrund der Reaktivitätsreihe der Carbonsäurederivate vor der Umsetzung mit einem *N*-Nukleophil wie z.B. Hydroxylamin die Derivatisierung zu einer Verbindung mit höherer Carbonylreaktivität notwendig.^{†††††††}

Hydroxamsäuren, die auch N-Hydroxyamide genannt werden, sind in Bezug auf ihre Carbonylreaktivität mit Carbonsäureamiden vergleichbar. Daher kommen theoretisch für die Hydroxamsäuresynthese über eine S_N2t-Reaktion mit unsubstituierten Hydroxylaminen Carbonsäureester, -anhydride oder -halogenide (Schema 8).197, 198 In der Praxis hat sich insbesondere der Einsatz von "Kupplungsreagenzien" aus der Reihe der Carbodiimide wie z.B. 1-Ethyl-3-(3dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) oder Phosgenanaloga wie z.B. 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI) bewährt. 193 In dieser Arbeit werden alle in Schema 8 gezeigten Synthesewege zur Gewinnung von Hydroxamsäuren in Betracht gezogen und die jeweils optimale Methode für das eingesetzte Edukt experimentell ermittelt. hinaus ist zu beachten. dass auch die Beschaffenheit Hydroxylaminkomponente die Umsetzung beeinflussen kann. Um O-Acylierungen am Hydroxylaminedukt zu vermeiden, sollten *O*-geschützte Derivate eingesetzt werden. Aufgrund der literaturbekannten guantitativen Abspaltung durch Hydrogenolyse wurde bevorzugt auf O-benzylgeschützte Hydroxylaminedukte zurückgegriffen.

_

Abgesehen davon reagieren Carbonsäuren mit Hydroxylaminen in Säure-Base-Reaktionen zu einem Salz.

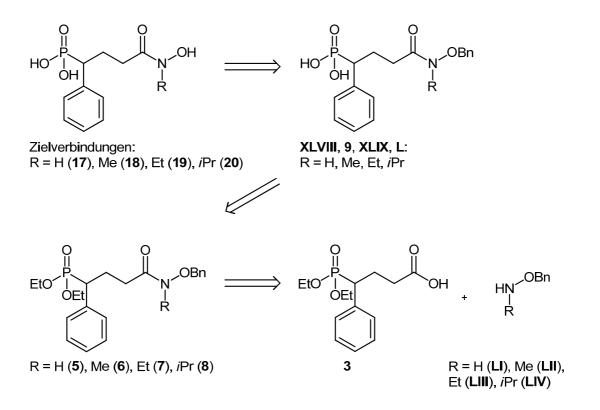
a)
$$R$$
 CI $+ NH_2OH$ $- HCI$

b) R $- R'-COOH$ $+ NH_2OH$ $- R'-OH$

c) R $- R'-OH$

Schema 8. Synthese einer unsubstituierten Hydroxamsäure ausgehend von Carbonsäurechlorid a), -anhydrid b) oder -ester c) (R, R' = Alkyl oder Aryl); z. T. nur unter Anwesenheit einer Hilfsbase.

Nach retrosynthetischer Überlegung könnten die Zielverbindungen 17-20 durch Hydrogenolyse der *O*-benzylgeschützten [3-(Hydroxycarbamoyl)-1-phenyl-propyl]-phosphonsäuren **XLVIII**, **9**, **XLIX** und **L** nach vorangegangener Phosphonsäureesterhydrolyse von **5-8** gewonnen werden (Schema 9).



Schema 9. Retrosynthetische Überlegung zur Gewinnung der α -Phenyl-Analoga mit inverser Hydroxamsäurefunktion.

Für die Erzeugung der benötigten Hydroxamsäuren könnten die O-benzylgeschützten Hydroxylamine **LI-LIV** mit **3** beispielsweise unter Einsatz der vorher genannten Aktivierungsreagenzien umgesetzt werden (Schema 9).

Um zum gewünschten Carbonsäureedukt 3 zu gelangen, wurde der Syntheseweg direkt über Oxidation des Aldehyds 2 gewählt (Schema 10). Ausgehend vom gut zugänglichen Benzylphosphonat LV wurde die Umsetzung mit Alkylanzien, die die Aldehydfunktion in geschützter Form bereits enthalten, ausgewählt. Da für die Alkylierung von Benzylphosphonat lithiumorganische Reaktionsbedingungen benötigt werden, fiel die Wahl auf das Dioxolanreagenz LVI, das erfahrungsgemäß basenstabil ist.

Schema 10. Retrosynthetische Überlegung zur Gewinnung von Verbindung 3.

Die Umsetzung der kettenverkürzten Carbonsäureverbindung 4 zu den Zielverbindungen XLVII und 24 sollte analog zu den Überlegungen aus den Schemata 8 und 9 gelingen (Schema 11). Die Synthese des Aldehyds LVII ist literaturbekannt und kommt ohne Verwendung von lithiumorganischen Reagenzien aus. 187

Schema 11. Retrosynthetische Überlegung zur Gewinnung der Analoga XLVII und 24.

2.3 Eduktsynthese

Die Synthese der gewünschten Carbonsäurevorstufe 3 gelang entsprechend der vorangestellten Überlegung in sehr guten Ausbeuten (Schema 12).

LV konnte in wasserfreiem Toluen mit 1,1 Äquivalenten *n*-Buthyllithium bei -78 °C in Inertgasatmosphäre deprotoniert und anschließend mit LVI umgesetzt werden. Bereits nach zwei Stunden Rühren bei Raumtemperatur war LV dünschichtchromatographisch nicht mehr nachweisbar. 1 wurde in 92 %iger Ausbeute nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel als farbloses Öl isoliert. Durch sauer katalysierte Hydrolyse in einem Gemisch aus Aceton und wässriger 2N Salzsäure konnte der Aldehyd 2 erhalten werden. Danach wurde 2 mithilfe eines Gemisches aus Selendioxid und 30 %iger Wasserstoffperoxidlösung quantitativ zu 3 oxidiert. Danach wurde 2 mithilfe eines

Schema 12. Synthese des Carbonsäureedukts 3.

Nach Anlösen in Diethylether wurde **3** als farbloser Feststoff in einer Ausbeute von 92 % auskristallisiert. Das kettenverkürzte Carbonsäureedukt **4** wurde wie in Schema 13 gezeigt als farbloser Feststoff mittels Selendioxid/H₂O₂-vermittelter Oxidation von **LVII** gewonnen.

Schema 13. Synthese von Verbindung 4.

Für die selektive Einführung der Benzylschutzgruppe an die Hydroxylamin-Sauerstofffunktion wurde *N*-Hydroxyphthalimid (**LVIII**) in Acetonitril gelöst, mit Triethylamin (TEA) deprotoniert und in einer Gabriel-analogen Syntheseführung mit Benzylbromid umgesetzt. Auf diese Weise entstand **LIX** in einer Ausbeute von 80 %.¹⁹⁴ Die Phthaloylschutzgruppe konnte anschließend durch Ethanolaminolyse entfernt werden.¹⁹⁵

Das resultierende *O*-benzylgeschützte Hydroxylamin **LI** konnte durch fraktionierende Vakuumdestillation abgetrennt und in 90 %iger Ausbeute gewonnen werden (Schema 14). Um *N*-alkylierte *O*-benzylgeschützte Hydroxylamine zu erhalten, wurde gemäß einer literaturbekannten Methode zunächst die Stickstofffunktion von **LI** mit einer Boc-Gruppe geschützt, um das *O*-benzylgeschützte Carbamat **LX** darzustellen. Dafür wurde das Hydroxylamin bei Raumtemperatur in THF gelöst und mit einer äquivalenten Menge Boc-Anhydrid versetzt (Schema 14). Anschließend konnte **LX** in DMF mit Natriumhydrid deprotoniert und mit Methyl- beziehungsweise Ethyliodid selektiv am Stickstoff alkyliert werden.

Die Alkylierungsprodukte **LXI** und **LXII** entstanden in einer Ausbeute von circa 95 % und ließen sich als farblose Öle durch Säulenchromatographie an Kieselgel gewinnen. Abschließend wurde die Boc-Schutzgruppe durch Zugabe von überschüssiger Trifluoressigsäure in Dichlormethan wieder abgespalten. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel konnten *N*-Methyl- (**LII**) und *N*-Ethyl-*O*-benzylhydroxylamin (**LIII**) als farblose Öle in guter Ausbeute erhalten werden. ¹⁹⁶

Schema 14. Synthese der O-benzylgeschützten Hydroxylamine LI, LII und LIII.

Schema 15. Synthese von N-Isopropyl-O-benzylhydroxylamin (LIV).

Für die Synthese von *N*-Isopropyl-*O*-benzylhydroxylamin (**LIV**) erwies sich dieser Syntheseweg als nicht praktikabel. Alternativ wurde deshalb die Kondensation von **LI**

mit überschüssigem Aceton in Methanol durchgeführt. Anschließende Reduktion des Oximproduktes **LXIII** mit Natriumcyanborhydrid (NaCNBH₃) im salzsauren Milieu erbrachte **LIV** in 97 %iger Ausbeute (Schema 15).¹⁷¹

2.4 Synthese der Zielverbindungen

Die besten Ausbeuten vermittelte die CDI-Aktivierung der Carbonsäure 3 und anschließende Umsetzung mit den Hydroxylaminen LI, LII und LIII zur Gewinnung der *O*-benzylgeschützten Hydroxamsäuren 5-7 (Schema 16). 5 konnte mit dieser Reaktionsdurchführung in 80 % Ausbeute, 6 und 7 sogar in Ausbeuten von 95 und 98 % nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel erhalten werden.

Schema 16. Synthese der O-benzylgeschützten Hydroxamsäuren 5-8.

Allerdings unterblieb die Umsetzung von 3 mit dem Hydroxylamin LIV. Deshalb wurde für die Gewinnung des Intermediats 8 zunächst aus 3 das reaktivere Säurechlorid erzeugt. Nach Zugabe von LIV zum Reaktionsansatz wurde 8 nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel mit 81 % Ausbeute erhalten (Schema 16). Nach heutigem Stand der Synthesetechnik werden Phosphonsäurealkylesterhydrolysen unter Zuhilfenahme von überschüssigem Trimethylsilylbromid (TMSBr) aufgrund der dabei erreichten hohen Produktausbeuten durchgeführt. 184 Nach TMSBr-Zugabe konnte allerdings nach Umesterung in den entsprechenden labilen Silylester nur 9 durch schonende Hydrolyse mit wenigen Tropfen Wasser als reines Produkt gewonnen werden (Schema 17). Die Hydrolyseprodukte LXIV-LXVI fielen als gefärbte Öle an, die laut HPLC-Analyse eine Reinheit von 76-89 % aufwiesen und damit für aussagekräftige biologische Untersuchungen nicht verwendet werden konnten.

Schema 17. TMSBr-unterstützte Hydrolysen von 6-8.

Um auf alternativem Weg zu den Endverbindungen 17-20 zu gelangen, wurde die Syntheseführung modifiziert und die Hydrogenolyse der Benzyl-Schutzgruppe vor der TMSBr-unterstützten Phosphonsäureesterhydrolyse durchgeführt (Schema 18). Die Palladium-katalysierte Hydrogenolyse von 5-8 erbrachte durch Lösen des öligen Produktes in Diethylether und anschließender Umkristallisation die freien Hydroxamsäuren 10-13 in hoher Ausbeute (>90 %) als farblose Kristalle. Jedoch konnten die gewünschten Zielverbindungen nach TMSBr-vermittelter Esterhydrolyse

von **10-13** abermals nicht in ausreichender Reinheit erhalten werden. Eine Literaturrecherche ergab, dass die Deprotonierung von Phosphonsäuren mit bestimmten Aminbasen schwerlösliche, kristalline Phosphonatsalze erzeugt. Entsprechende kristalline Diethanolamin-Salze der Verbindungen **17-20** konnten aus dem TMSBr-Ansatz jedoch nicht gewonnen werden.

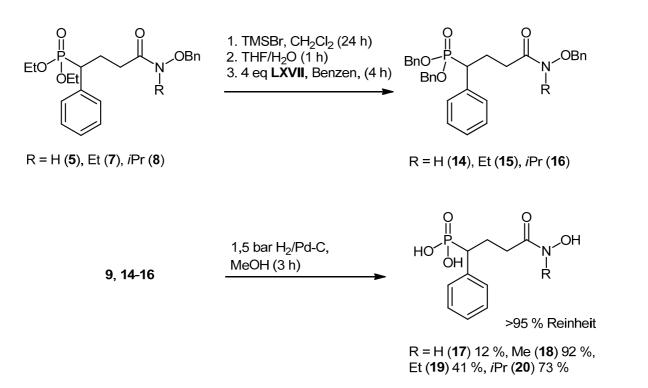
Schema 18. Alternativer, erfolgloser Syntheseweg zu den Endprodukten 17-20.

Weitergehende Studien erbrachten die Erkenntnis, dass Phosphonsäuren auf schonende Art durch Behandlung mit *O*-Benzylisoharnstoffderivaten wie **LXVII** in lipophile Benzylester überführt werden können (Schema 19). ^{185, 186}

Ein lipophiles Benzylester-Intermediat könnte zunächst durch Säulenchromatographie von störenden Verunreinigungen abgetrennt werden. Die abschließende hydrogenolytische Abspaltung der Benzyl-Schutzgruppen sollte die Zielverbindung annähernd quantitativ zugänglich machen (Schema 19).

Schema 19. Allgemeiner Syntheseplan zur Gewinnung von Phosphonsäuren durch Umesterung zu Dibenzylphosphonsäureesterverbindungen und abschließender Hydrogenolyse.

Letztendlich wurden die Zielverbindungen 17, 19 und 20 auf genau diesem Syntheseweg nach Überführen in die korrespondierenden Dibenzylester 14-16 und anschließender Hydrogenolyse analysenrein erhalten (Schema 20). 15 und 16 fielen als farblose Öle an, während 14 nach Umkristallisation in Ethanol/Ethylacetat als farbloser Feststoff erhalten wurde. 18 konnte nach einstündiger Hydrogenolyse der Phosphonsäure 9 ebenfalls durch langsame Umkristallisation als farbloser Feststoff gewonnen werden (Schema 20).



Schema 20. Gewinnung der Zielverbindungen 17-20.

Zur Gewinnung der kettenverkürzten Hydroxamsäureanaloga wurden zunächst durch CDI-vermittelte Kupplung der Carbonsäure 4 mit LI und LII die *O*-benzylgeschützten Hydroxamsäuren 21 und 22 synthetisiert (Schema 21).

Nach TMSBr-vermittelter Esterhydrolyse konnte jedoch nur die Phosphonsäure 23 rein gewonnen werden, aus der abschließend nach katalytischer Hydrierung die Hydroxamsäure 24 als Testverbindung erhalten wurde (Schema 21).

Schema 21. Synthese des kettenverkürzten, inversen Hydroxamsäureanalogons 24.

2.5 NMR-spektroskopische Eigenschaften

Im ¹H-NMR-Spektrum von **17** fällt eine Aufspaltung der Resonanzsignale a und b der an der Hydroxamsäure gebundenen Wasserstoffatome auf (Abbildung 32). Das an Hydroxamsäurefunktion der gebundene Wasserstoffatom werden die 10.33 Resonanzsignale bei und 9.80 ppm zugeordnet. Durch die elektronenziehende, unmittelbar benachbarte Carbonylgruppe erscheinen Signale im Verhältnis zu den analog aufgespaltenen Resonanzsignalen b der Hydroxamsäure-Hydroxylgruppe tieffeldverschobener.

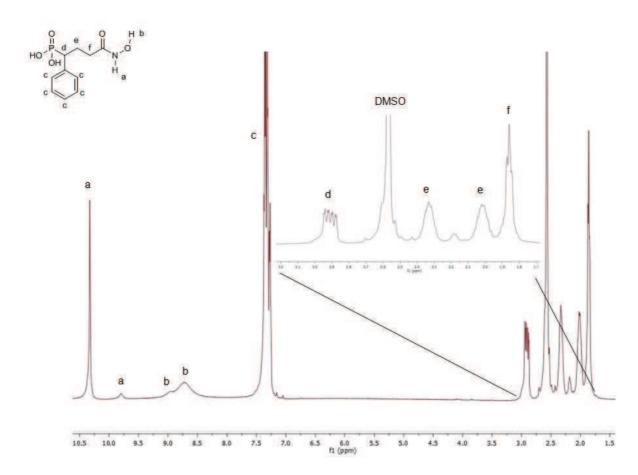


Abbildung 32. ¹H-NMR-Spektrum von Verbindung **17** in DMSO-d₆.

Die Resonanzsignale der aromatischen Wasserstoffatome liegen zwischen 7.75 und 7.0 ppm (c im Spektrum). Das Signal d - erzeugt durch das Wasserstoffatom am asymmetrischen Methinkohlenstoffatom - zeigt das Aufspaltungsmuster eines dreifachen Dupletts (ddd). Die benachbarten Methylen-Wasserstoffatome erzeugen durch Fernkopplungen mit ³¹P die Multiplettsignale e und f. Darunter erwirkt die diastereotope Gruppe benachbart zum asymmetrischen Zentrum zwei

Multiplettsignale e mit gleichgroßem Integral. Für die Absicherung der Signal-Zuordnung wurde ein ¹H, ¹H-COSY-Experiment durchgeführt, dessen Ergebnis in Abbildung 33 wiedergegeben ist. Aufgrund der gegenseitigen magnetischen Kopplung der benachbarten Protonen, welche die Resonanzsignale d und e erzeugen, erweist sich die vorgenommene Zuordnung als korrekt. Zwischen den Protonen, die für die Resonanzsignale d und f verantwortlich gemacht werden, kann aufgrund der weiten Entfernung zueinander keine ausgeprägte Kopplung stattfinden, was sich ebenfalls im COSY-Spektrum bestätigt (Abbildung 33).

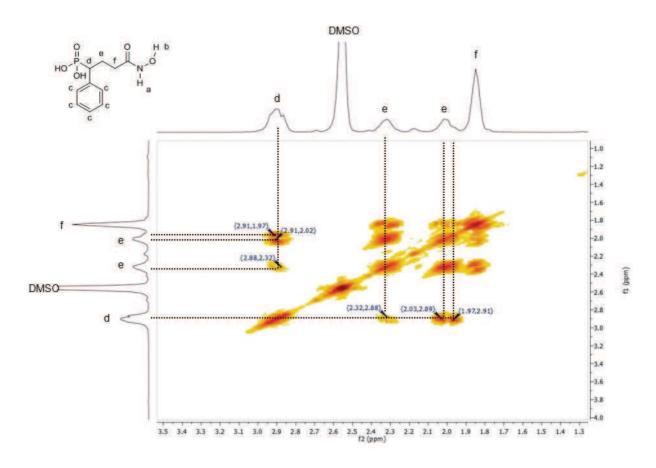


Abbildung 33. Ausschnitt aus ¹H, ¹H-COSY-Spektrum der Verbindung **17** in DMSO-d₆.

Das Vorliegen von Hydroxamsäure-Rotameren könnte die Ursache der Aufspaltung der Resonanzsignale a und b sein (Schema 22). So ist für die Hydroxyamid-Funktion der Acetohydroxamsäure bekannt, dass sie analog zu einer Carboxamidgruppe einen partiellen Doppelbindungscharakter zwischen dem sp²-hybridisierten Kohlenstoffatom der Carbonylfunktion und dem Hydroxylaminstickstoffatom aufweist (Schema 22). Aufgrund der daraus resultierenden eingeschränkten Drehbarkeit der C-N-Bindung liegen *Z*- und *E*-Isomere vor. Abhängig vom Lösungsmittel, des Substituenten am Stickstoffatom, der Konzentration und insbesondere der

Temperatur treten diese Isomere in unterschiedlichem Verhältnis zueinander auf. Das Verhältnis der Isomere ist mittels NMR-Spektroskopie analysierbar. 199 Acetohydroxamsäure, DMSO-d₆ Beispielsweise wurde für in und Raumtemperatur gelöst, ein Verhältnis von 1:9 zugunsten des Z-Isomers nachgewiesen.²⁰⁰ Erklärbar wird die Z-Isomer-Begünstigung in DMSO-d₆ durch ab initio SCF (self-consistent field) Molekülorbital(MO)-Berechnungen.²⁰¹ Das MO-Gesamtenergie-Verhältnis beträgt nach dieser Berechnung | Z-Isomer (in H₂O solvatisiert) | > | E-Isomer (in H₂O solvatisiert) |, we shalb das Z-Isomer in wasserhaltigen^{‡‡‡‡‡‡} Lösungsmitteln wie DMSO-d₆ begünstigt vorliegt. Andererseits nach denselben Berechnungen | Z-Isomer (unsolvatisiert) | < | E-Isomer (unsolvatisiert), weshalb das *E*-Isomer in unpolarer, nicht-solvatisierender Umgebung begünstigt ist.

in DMSO-d6 bei 20 °C

Schema 22. E-/Z-Isomerie bei Acetohydroxamsäure mit literaturbekannter Zuordnung der 1 H-NMR-Signale sowie deren prozentuale Anteile in DMSO- d_6 bei 20 $^{\circ}$ C. 200

Nach Vergleich der relativen Lage und Intensitäten der Resonanzsignale im Spektrum von 17 mit denen der Acetohydroxamsäure in DMSO- d_{δ} -Lösung wird eine vergleichbare Isomerenverteilung postuliert (Schema 23).

†#### Der Wassergehalt von kommerziell erwerblichem deuteriertem DMSO liegt laut Prüfzertifikat bei circa 0,8 %. Dieser Anteil reicht bei Einsatz von circa 0,8 mL (entsprechend 6,4 μL) für die Solvatisierung von circa 20 mg Analysensubstanz bereits für relevante Wechselwirkungen aus.²⁰⁰

_

in DMSO-d6 bei 20 °C

Schema 23. E-/Z-Isomer-Grenzstrukturen von **17** mit der Zuordnung der chemischen Verschiebungen und prozentualer Isomerenverteilung in DMSO- d_6 bei 20 °C.

Zur Bestätigung dieser Annahme wurde ein NOESY-Spektrum von **17** in DMSO- d_6 aufgenommen (Abbildung 34).

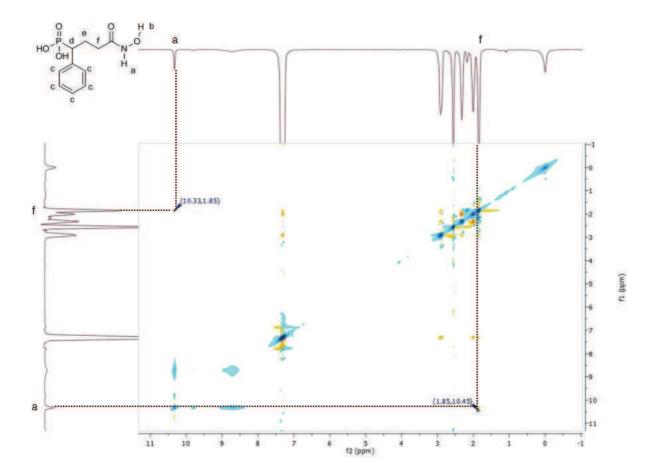


Abbildung 34. NOESY-Spektrum von Verbindung 17 in DMSO-d₆.

Ein NOE zwischen den räumlich nah beieinander liegenden Wasserstoffatomen der Methylengruppe in α -Position zur Hydroxamsäurefunktion und dem am Hydroxamsäurestickstoffatom gebundenen Wasserstoffatom ist nur für das entsprechende Z-Isomer möglich (Schema 23 links). Tatsächlich ist zwischen dem Signal a bei 10.33 ppm und dem Resonanzsignal f der Methylengruppe bei

1.76...1.85 ppm ein NOE vorhanden. Das Signal b bei 9.80 ppm weist wiederum keinen entsprechenden NOE zu f auf (Abbildung 34). Damit ist eindeutig gezeigt, dass die Zuordnung der Resonanzsignale in Schema 23 zutreffend war.

In Abbildung 35 ist das 1 H-NMR-Spektrum der N-Methylhydroxamsäureverbindung 18 gezeigt. Im Gegensatz zu 17 ist das Resonanzsignal a des Hydroxamsäure-Wasserstoffatoms nicht in zwei Signale aufgespalten: bei 9.68 ppm erscheint ein einzelnes Singulettsignal. Des Weiteren resultiert bei 3.02 ppm das Singulettsignal c der Methyl-Gruppe (Abbildung 35). Offensichtlich tritt von Verbindung 18 in DMSO- d_6 bei RT nur ein Hydroxamsäurerotamer auf. Übereinstimmend wurde schon in früheren spektroskopischen Untersuchungen an verschiedenen N-Methylhydroxamsäuren gefunden, dass das Z-Isomer im polaren Lösungsmittel DMSO- d_6 bevorzugt auftritt. 199

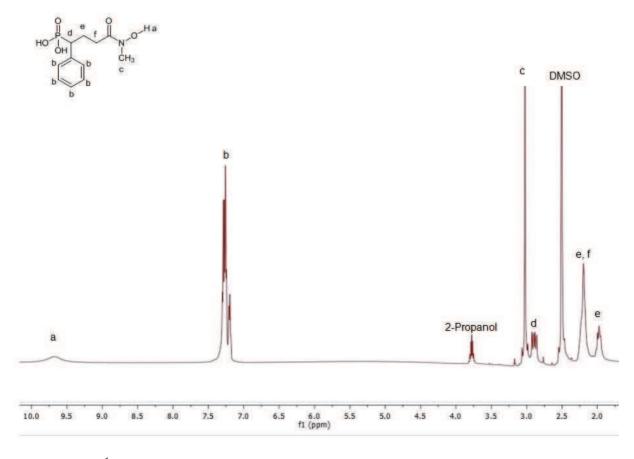


Abbildung 35. 1H-NMR-Spektrum von Verbindung 18 in DMSO-d₆.

Um die literaturangelehnte Zuordnung des Resonanzsignals a zum *Z*-Isomer (Schema 24) zu belegen, wurde auch von **18** ein NOESY-Spektrum aufgenommen (Abbildung 36).

in DMSO-d6 bei 20 °C

Schema 24. E-/Z-Isomerie-Strukturen von Verbindung 18.

Bei Vorliegen der *Z*-isomeren Struktur sollte ein NOE zwischen dem Resonanzsignal der Methylen- und der räumlich nahegelegenen Methylgruppe auftreten (Schema 24). Tatsächlich ist der NOE zwischen den Resonanzsignalen c und f im Spektrum der Verbindung 18 (Abbildung 36) vorhanden. Insofern wird die Annahme des exklusiven Vorliegens der *Z*-Form bestätigt.

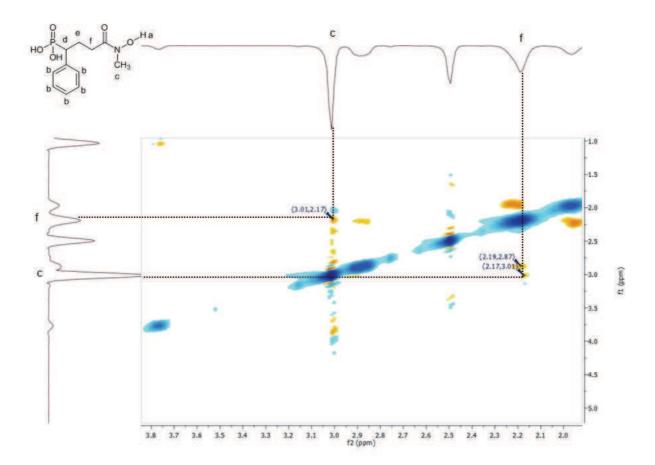


Abbildung 36. Ausschnitt aus dem NOESY-Spektrum von Verbindung 18.

Analog zur *N*-methylsubstituierten Hydroxamsäure **18** weisen auch die ¹H-NMR-Spektren der *N*-ethyl- und *N*-isopropylsubstituierten Hydroxamsäuren **19** und **20**

(DMSO- d_6 bei Raumtemperatur) nur ein Singulett-Signal für die Hydroxamsäure-Hydroxylgruppe auf.

in DMSO-d6 bei 20 °C

Schema 25. Z-Isomere der Verbindungen 19 und 20.

Aufgrund der ähnlichen chemischen Verschiebungen wird davon ausgegangen, dass beschriebenen Messbedingungen ebenfalls diese Verbindungen unter den ausschließlich als Z-Isomere vorliegen (Schema 25). Abbildung 37 zeigt das IR-Spektrum eines KBr-Presslings von 17. Die Absorptionsbanden der P-O- und P=O-Valenzschwingungen bei 1037 und 1227 cm⁻¹ sind stark ausgeprägt, ebenso ist die Valenzschwingungsbande der Carbonylfunktion bei 1652 cm⁻¹ hervorgehoben. Die 3230 cm⁻¹ resultieren Absorptionsbanden bei 3733 und v.a. Valenzschwingungen der freien O-H- und N-H-Gruppen der Hydroxamsäuregruppe. Bei 2980 cm⁻¹ erscheint eine Absorptionsbande, die aus der C-H-Valenzschwingung aliphatischer Gruppen stammt.

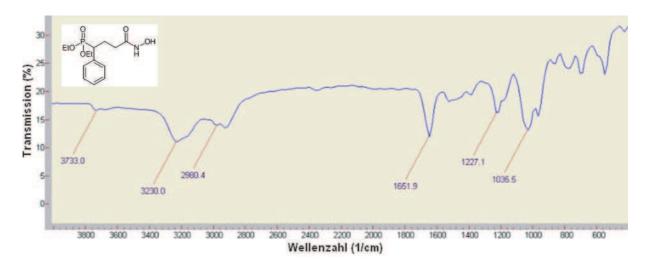


Abbildung 37. IR-Spektrum von 17 (KBr-Pressling).

Ergebnisse der biologischen Untersuchungen 2.6

Die Testverbindungen 17-20 und 24 wurden durch kooperierende Arbeitsgruppen auf ihre Enzymhemmung gg. EcDxr und PfDxr untersucht (Spalte 2 und 4, Tabelle 6). Für alle untersuchten Testverbindungen wurden IC50-Werte ermittelt, für 17 und 18 wurden darüber hinaus experimentell Ki-Werte bestimmt (Tabelle 6). Zum Vergleich sind IC₅₀- und K_i-Werte für die Mononatriumsalze der Referenzen Fosmidomycin (Fos-Na) und FR900098 (FR900098-Na) gg. PfDxr ermittelt worden.

Verbindung	Enzymassay				Zellkulturassay	
	<i>Pf</i> Dxr		<i>Ec</i> Dxr		<i>P.f.</i> K1	MRC-5
	IC ₅₀ [nM]	K _i [nM]	IC ₅₀ [nM]	K _i [nM] ^{§§§§§§}	IC ₅₀ [μM]	IC ₅₀ [μM]
17	12 +/-3	2,1 +/- 0,1 (kompetitiv)	592 +/- 25	56,7	2,7 +/- 2,3 (n = 10)	57 +/- 12 (n = 8)
18	3,1 +/- 0,3	0,42 +/- 0,03 (kompetitiv)	243 +/- 30	23,3	0,48 +/- 0,29 (n = 8)	59 +/- 13 (n = 6)
19	15 +/- 2	n.d.	>14000	1420	1,3 +/- 1,5 (n = 5)	>64 (n = 5)
20	inaktiv	n.d.	inaktiv	inaktiv	>64 (n = 3)	>64 (n = 3)
24	inaktiv	n.d.	inaktiv	n.d.	>64 (n = 1)	>64 (n = 1)
Zum Vergleich:						

Fos-Na	144 +/- 16	8,4 +/- 0,6 (kompetitiv)	221 +/- 14	21,2	3,0 +/- 2,6 (n = 7)	58 +/- 13 (n = 6)
FR90098- Na	15 +/- 1	2,6 +/- 0,2 (kompetitiv)	131 +/- 3	12,6	1,2 +/- 1,0 (n = 8)	59 +/- 13 (n = 6)

Tabelle 6. In vitro-Aktivitäten der inversen Hydroxamsäuren 17-20 und 24. (n.d. = nicht determiniert, n = Anzahl der voneinander unabhängigen Messungen)

^{\$} Berechnung nach der Cheng-Prusoff-Gleichung: Ki = $IC_{50}/(1+([S]/Km))^{187}$

Gegenüber *Ec*Dxr sind IC₅₀-Werte für alle Testverbindungen experimentell bestimmt, die K_i-Werte allerdings aus diesen Werten rechnerisch ermittelt worden (Tabelle 6; detaillierte Beschreibung in Kapitel 7.8). Anschließend wurden die Testsubstanzen im Zellkulturassay auf ihre antiplasmodiale Aktivität gg. dem multiresistenten *P. falciparum* K1-Stamm (*P.f.* K1) und ihre Zytotoxizität gg. MRC-5-SV2-Zellen untersucht (Spalten 6 und 7, Tabelle 6; Beschreibung der Durchführung in Kapitel 7.9.1). Die enzymkinetische Analyse ergab, dass sowohl Fosmidomycin (Abbildung 38a) und FR900098 (Abbildung 38b), als auch **17** (Abbildung 39a) und **18** (Abbildung 39b) kompetitive Inhibitoren der *Pf*Dxr sind.^{202,219}

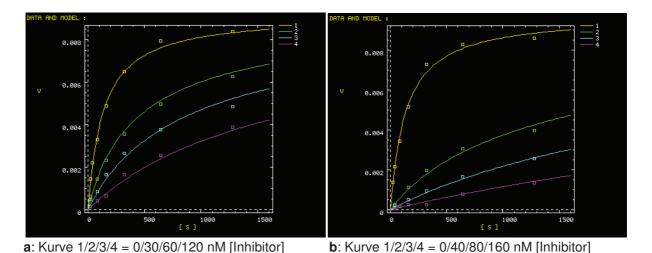


Abbildung 38. Inhibitionskurven für Fosmidomycin (a) und FR900098 (b). Die enzymkinetische Bestimmung der K_i -Werte erfolgte durch spektroskopische Messung des NADPH-Umsatzes: aus dem Kurvenverlauf berechnete das Programm Dynafit die K_i -Werte der Inhibitoren [Ordinate = dA/dt(min); Abzisse: $\mu mol/l$ (DOXP)-Konzentrationen].

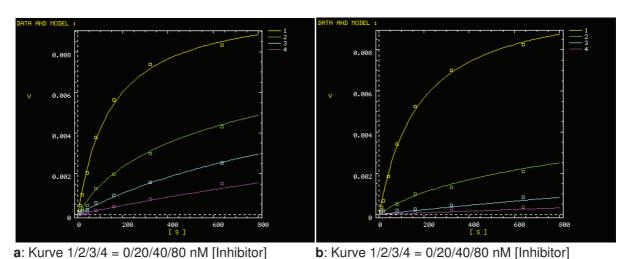


Abbildung 39. Inhibitionskurven für **17** (a) und **18** (b). Nach Zugabe abgestufter Inhibitor-Konzentrationen und spektroskopischer Messung der NADPH-Absorption konnten direkt-lineare Inhibitionskurven erstellt werden, aus denen die K_i -Werte abgeleitet wurden [Ordinate = dA/dt(min); Abzisse: $\mu mol/l$ (DOXP)-Konzentrationen].

2.7 Interpretation der biologischen Daten

Die in Kapitel 2.1.5 vorgestellten biologischen Daten zeigen, dass die inversen Hydroxamsäureanaloga 17 und 18 besonders potente PfDxr-Inhibitoren sind. Dabei weisen beide Fosmidomycinanaloga stärkere inhibitorische Aktivität gg. dem plasmodialen Enzym als die Referenzen Fosmidomycin und FR900098 auf. Mit einem IC₅₀-Wert von circa 3,1 nM ist die *N*-Methylhydroxamsäure **18** der potenteste PfDxr-Inhibitor, der bis zu diesem Zeitpunkt beschrieben wurde. Die unsubstituierte Hydroxamsäureverbindung 17 ist im Vergleich zu den Referenzen und 18 deutlich schwächer inhibitorisch aktiv. Scheinbar hat die Methylgruppe an der inversen Hydroxamatfunktion von 18 analog zur Methylgruppe der Referenz FR900098 gg. beiden Dxr-Enzymen einen bislang ungeklärten aktivitätsbestimmenden Einfluss. Die experimentell ermittelten K_i-Werte unterstützen diese Ergebnisse zusätzlich. Darüber hinaus konnte sowohl für die Referenzsubstanzen als auch 17 und 18 enzymkinetisch eine kompetitive Inhibition am plasmodialen Enzym nachgewiesen werden. Zur abschließenden Aufklärung des Bindungsmodus würde z.B. eine Kristallstrukturanalyse der am PfDxr-Enzym gebundenen Inhibitoren Aufschluss geben.

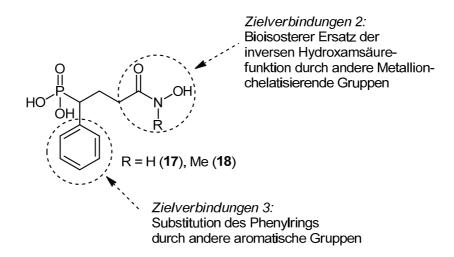
Übereinstimmend mit dem von *Rohmer*¹⁴⁰ veröffentlichtem Ergebnis zum kettenverkürzten inversen Analogon **XXXVII** gg. *Ec*Dxr (Kapitel 1.1.8.3) führte auch die Kettenverkürzung auf zwei Methyleneinheiten zwischen α-phenylsubstituierter Phosphonat- und Hydroxamsäuregruppe in Analogon **24** zum vollständigen Aktivitätsverlust sowohl gg. *Ec*Dxr als auch *Pf*Dxr. Die *N*-ethylsubstituierte Hydroxamsäure **19** zeigt gg. *Ec*Dxr keine inhibitorische Aktivität, weist mit einem IC_{50} -Wert von (15 +/- 2) nM gg. *Pf*Dxr aber vergleichbare inhibitorische Potenz wie FR900098 (IC_{50} = (15 +/- 1) nM) auf. Die *N*-isopropylsubstituierte Hydroxamsäure **20** zeigt weder gg. *Ec*Dxr noch gg. *Pf*Dxr oder im plasmodialen Zellkulturassay inhibitorische Aktivität.

Weitergehende *In vitro* Studien im *P.f.* K1-Zellkulturassay bestätigen die am isolierten *Pf*Dxr-Enzym erhaltenen Aktivitätsabstufungen aller untersuchten Analoga, wobei die Hemmkonstanten im Vergleich zum Enzymassay um mehrere Zehnerpotenzen abnehmen und nur noch im einstelligen mikromolaren Bereich liegen. Wahrscheinlich erreicht nur ein kleiner Anteil der Phosphonohydroxamsäureverbindungen das intraplasmodial vorkommende Zielenzym, so dass entsprechend höhere

Konzentrationen für eine halbmaximale Wachstumshemmung der Parasiten benötigt werden. Sowohl die Referenzsubstanzen Fosmidomycin und FR900098 als auch die untersuchten Testverbindungen zeigten im MRC-5-Zellkulturassay keine Zytotoxizität bei Konzentrationen von $>64~\mu M$.

Zusammenfassend führt die Kombination aus dem Strukturmotif der unsubstituierten oder N-methylsubstituierten inversen Hydroxamsäure in einem Abstand von drei Methyleneinheiten zur Phosphonatgruppe und einem aromatischen Kern in α -Position zu den potentesten Inhibitoren gg. PfDxr, die bisher beschrieben wurden. Die synthetisierten Analoga üben zudem eine ausgeprägte Wachstumshemmung gg. einem multiresistenten P.f.-Stamm $in\ vitro\ aus$.

Nachdem mit den inversen, α-phenylsubstituierten Fosmidomycinanaloga 17 und 18 zwei Inhibitoren des PfDxr-Enzyms gefunden wurden, die die bisherige Referenzsubstanz FR900098 hinsichtlich ihrer inhibitorischer Potenz übertreffen, diese Verbindungen als neue Leitstrukturen dieser Dissertation herangezogen. Insbesondere sollte aufgeklärt werden, wie stark eine Variation der Hydroxamsäuregruppe Metallion-chelatisierenden gegen andere bioisostere Funktionen die biologische Aktivität beeinflusst (Schema 26). Darüber hinaus wurde bereits an anderer Stelle darüber berichtet, dass die Modifikation des aromatischen Substituenten nicht-inverser Fosmidomycinanaloga deren antiplasmodiale Aktivität in vitro erheblich beeinflusst (siehe Kapitel 1.1.8.2). In der vorliegenden Dissertation sollte aufgeklärt werden, wie sich eine analoge Substitution des aromatischen Systems auf die inhibitorische Aktivität sowohl gg. Ec/PfDxr als auch gg. P.f.K1 in vitro auswirkt (Schema 26).



Schema 26. Strukturmodifikationsideen ausgehend von den Leitstrukturen 17 und 18.

α -Aryl-Fosmidomycin-Analoga mit unterschiedlichen chelatisierenden Gruppen

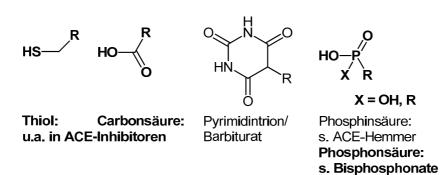
3.1 Theoretischer Hintergrund

Bisher wurden nur wenige isostere Austausche der Hydroxamsäurefunktion Fosmidomycins beschrieben (siehe Kapitel 1.1.8.3). In vielen systematischen Struktur-Aktivitäts-Studien an Inhibitoren anderer Enzyme wurden allerdings auf empirischen Weg Metallion-Chelatoren als funktionelle Gruppen gefunden, die in einem bioisosteren Verhältnis zu Hydroxamsäuren stehen. Zu den untersuchten Zielstrukturen zählen medizinisch relevante Enzyme, die v.a. der Gruppe der Metalloenzyme zugeordnet werden. Für deren katalytische Funktion ist - analog zur Dxr - ein zweiwertiges Metallkation (häufig Zn²⁺ als Lewis-Säure) essenziell. 156 Kompetitiv bindende Inhibitoren benötigen in der Regel eine funktionelle Gruppe, die das Metallion komplexiert. In dieser Funktion ist die Hydroxamsäurefunktion unter der PDF, des Botulinum-Neurotoxins A, anderem Hemmstoffen Matrixmetalloproteasen (MMP), des Angiotensin-Konversionsenzyms (ACE) oder der Histondeacetylasen (HDAC) wiederzufinden. 178 In den letzten Jahren entwickelte sich mit dem ersten zugelassenen HDAC-Inhibitor Vorinostat (Abbildung 40) sowie Entwicklungs-kandidaten in Klinischen Studien eine vielversprechende Arzneistoffgruppe, die

Abbildung 40. Ausgewählte Hydroxamat-basierte HDAC-Inhibitoren mit Zulassung (Vorinostat als Fertigarzneimittel Zolinza[®] in den USA) und in fortgeschrittener klinischer Entwicklung.

therapeutisch vielfältig eingesetzt werden könnte. 153 In den meisten Fällen erwiesen sich Hydroxamsäuregruppen als optimales Strukturmotif für die In vitro Hemmung des gewünschten Metalloenzyms. In einigen Fällen, wie z.B. bei MMP-Inhibitoren, zeigten die Hydroxamsäureverbindungen in anschließenden In vivo Untersuchungen der Klinischen Phase Ш jedoch auch schlechte pharmakokinetische Eigenschaften. 179-181 Abbildung 41 gibt einen Überblick einiger gg. anderen Zielenzymen erfolgreich erprobten mono- oder bidentat komplexierenden **Funktionen** wieder. chemischen Die in dieser Arbeit untersuchten Strukturmodifikationen sind fett hervorgehobenen. 156

Monodentate Komplexbildner



Bidentate Komplexbildner

Inhibitoren

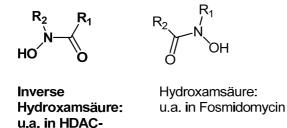


Abbildung 41. Beispiele für Metallion-komplexierende Gruppen, klassifiziert nach ihrem Bindungsmodus (modifiziert nach Jacobsen, F. E.et al. ChemMedChem **2007**, 2, 152-171);¹⁷⁸ fett hervorgehoben sind die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten funktionellen Gruppen.

3.2 Austausch der inversen Hydroxamsäure- gegen eine Thioesterfunktion

3.2.1 Syntheseidee

Thiolgruppen sind als Metallion-bindende Funktionen mit hoher Affinität zu Zn²⁺-, Mg²⁺- oder Mn²⁺-Ionen bereits in einigen bedeutenden Arzneistoffen wie z.B. Captopril finden. Allerdings weist die Thiolfunktion zu mit ihrer Oxidationsempfindlichkeit und ausgeprägten Nukleophilie nachteilige Stoffeigenschaften auf, die in der Regel zur Desaktivierung des Wirkstoffs oder zu führen. unerwünschten Arzneimittelwirkungen Dadurch bedinat Bioverfügbarkeit von Wirkstoffen mit freier Thiolgruppe herabgesetzt. Inzwischen finden sich vermehrt lipophile Ester-Prodrugs für Thiole wie das Beispiel des Prodrugs Racecadotril im Arzneistoffschatz wieder. Die Bioaktivierung derartiger Prodrugs in die Wirkform erfolgt durch unspezifische Esterasen nach Resorption in den Blutkreislauf (Schema 27).

Schema 27. Bioaktivierung von Racecadotril zum Enkephalinasehemmer Thiorphan.

Aufgrund dieser Erkenntnisse sollten in dieser Arbeit direkt Thioester-Prodrugs Fosmidomycins dargestellt werden (Schema 28). Nach den Erfahrungen unserer Arbeitsgruppe und in Analogie zu Phosphonsäure-POM-Ester-Prodrugs müssten Thioester-Prodrugs im *In vitro* Zellkulturassay durch anwesende Hydrolasen in die Wirkform des freien Thiols gespalten werden.¹⁴⁹

17 (R = H) und **18** (R = Me)

 α -Phenyl-Thioester-Analogon 27

Schema 28. α-Aryl-Fosmidomycin-Analoga mit Thiolesterprodrugfunktion abgeleitet von 17 und 18.

3.2.2 Syntheseplanung

Als Zielverbindungen sollten lipophile Fosmidomycin-Analoga mit α -Phenyl-Substituenten und Thioesterfunktion dargestellt werden. Als Esterprodrugfunktion wurde ein Acetylthioester ausgewählt (Schema 29).

Für die Einführung der Schwefelfunktion könnte das Kaliumsalz der Thioessigsäure mit **25** alkyliert werden. Die Darstellung von **25** aus **LV** ist literaturbekannt, jedoch wurde die Verbindung bislang nicht analytisch charakterisiert (Schema 29). ¹⁶⁶

Schema 29. Retrosynthetische Überlegung zur Gewinnung des Thioanalogons **27** in Form eines Thioesterprodrugs.

******** Das Diethanolammonium-Salz von α-Phenyl-Fosmidomycin ($IC_{50} = 0.4 \mu M$) zeigt *in vitro* eine doppelt so hohe Aktivität wie der bis dahin antiplasmodial potenteste Wirkstoff FR900098 ($IC_{50} = 0.8 \mu M$).

3.2.3 Eduktsynthese

Die bereits in Kapitel 2.1.2 eingesetzte Vorstufe **LV** wurde in einer Michaelis-Arbusow-Reaktion nach mehrstündigem Erhitzen in einer Ausbeute von über 90 % erhalten (Schema 30).¹⁸² Das als Nebenprodukt entstehende Ethylbromid konnte durch fraktionierende Destillation einfach abgetrennt werden.

Schema 30. Michaelis-Arbusow-Reaktion von Triethylphosphit (TEP) mit Benzylbromid oder -chlorid.

Die stark elektronenziehende Eigenschaft der Diethylphosphonsäureesterfunktion und ihre Fähigkeit zur Stabilisierung einer anionischen Ladung wurde bei der anschließenden spezifischen Alkylierung ausgenutzt. Durch Einwirkung von n-Butyllithium (n-BuLi) bei -78 °C unter Stickstoffatmosphäre wurde LV mit 1,2-Dibromethan überwiegend an benzylischer Position alkyliert (Schema 31). Um Mehrfachalkylierungen weitestgehend zu vermeiden, wurde 1,2-Dibromethan in Überschuss zum Reaktionsansatz gegeben. Das resultierende Bromid 25 konnte säulenchromatographisch gereinigt und in moderater Ausbeute von 52 % erhalten werden (Schema 31). 183

Schema 31. Alkylierung von LV mit 1,2-Dibromethan. 183

3.2.4 Produktsynthese

Die nukleophile Substitution des primären Halogenids **25** mit Kaliumthioacetat erfolgte rasch in DMF bei Raumtemperatur (Schema 32). Höchstwahrscheinlich steht der gute Reaktionsverlauf im engen Zusammenhang mit der schlechten Löslichkeit des entstehenden Kaliumbromids in DMF sowie der ausgeprägten Nukleophilie des Schwefels im Thioacetat-Anions.

Schema 32. Synthese des Intermediats 26.

Als letzter Syntheseschritt wurde die Zielverbindung 27 aus dem Phosphonsäurediethylester **TMSBr** freigesetzt 26 Anwesenheit in von (Schema 33).

Schema 33. Synthese der Zielverbindung 27.

3.3 Austausch der inversen Hydroxamsäure- gegen eine Phosphonsäurefunktion

3.3.1 Syntheseplanung

Unveröffentlichte Ergebnisse von *Kaula und Kurz* zeigen, dass **LXIX** eine mit α -Phenylfosmidomycin vergleichbare antiplasmodiale Aktivität *in vitro* aufweist (Schema 34). Aufgrund dessen wurde das 1-Naphthylderivat **31** als Edukt für die

Synthese eines Bisphosphonsäurediethylesters ausgewählt. Das Intermediat **29** könnte über eine Michaelis-Arbuzow-Reaktion von **28** mit Triethylphosphit entstehen. Abschließend würde die bekannte TMSBr-unterstützte Phosphonsäurediethyl-Umesterung zum entsprechenden Trimethylsilyldiester mit anschließender Hydrolyse die Bisphosphonsäure **31** in wenigen Syntheseschritten erbringen (Schema 34).

$$\alpha$$
-Phenylfosmidomycin LXIX IC₅₀ (*P.f.* Dd2) = 400 nM Eto OEt OEt OEt α

Schema 34. Retrosynthetische Überlegung zur Gewinnung des Bisphosphonsäureanalogons 31.

3.3.2 Synthese

Die Michaelis-Arbuzow-Reaktion von **28** mit überschüssigem Triethylphosphit (TEP) erbrachte das Diethylesterprodukt **29**, das nach säulenchromatographischer Reinigung als dunkelgelbes Öl in einer Ausbeute von 97 % erhalten wurde (Schema 35). **31** konnte nur mithilfe des bereits in Kapitel 2.1.4 beschriebenen Einsatzes von **XLVII** zur Erzeugung des entsprechenden Benzylesterintermediats **30** und anschließender Hydrogenolyse dieser Zwischenstufe in einer Reinheit von 97 % erhalten werden.

Schema 35. Synthese der Bisphosphonsäureverbindung 31.

3.3.3 NMR-spektroskopische Eigenschaften

Durch zweite Phosphonsäureesterfunktion kommt es komplexen heteronuklearen Kopplungen zwischen ¹H- und ³¹P-Kernen, was sich in dem als ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung Beispiel dienenden 29 in komplexen Aufspaltungsmustern der Resonanzsignale widerspiegelt (Abbildung 42). Für die Zuordnung der Resonanzsignale zu den entsprechenden Wasserstoffatomen wurde zusätzlich ein ¹H, ¹H-COSY-Experiment durchgeführt (Abbildung 43). Im Bereich von 8.48-7.28 ppm erscheinen die Resonanzsignale a-d der aromatischen Wasserstoffatome. Das Signal e bei 4.29 ppm wird dem Methin-Wasserstoffatom zugeordnet. Von 4.17 bis 3.48 ppm sind die vier Multiplett-Signale f beziehungsweise f', die verschiedene Muster und Integrale aufweisen, wiederzufinden. Sowohl die Resonanzsignale einer einzelnen Methylen- als auch der dazu räumlich benachbarten Methylgruppe (f' und i') zeigen eine im Vergleich zu den restlichen Signalen deutliche Tieffeldverschiebung.

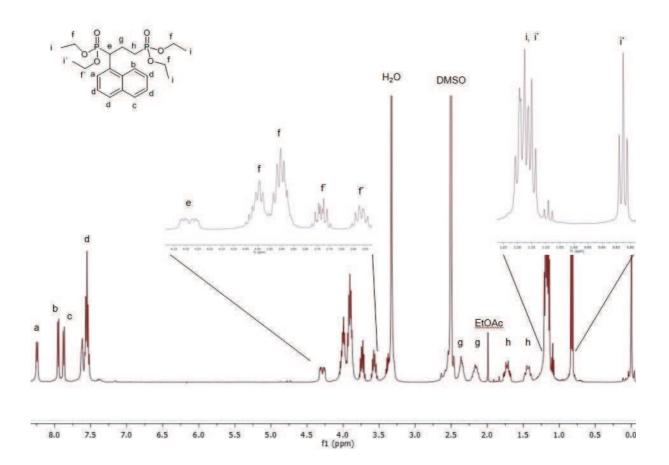


Abbildung 42. ¹H-NMR-Spektrum von Verbindung **29** in DMSO-d₆ (EtOAc = Ethylacetat).

Offensichtlich ist eine Ethylesterfunktion der α -Aryl-Phosphonatgruppe in **29** durch den Einfluss des aromatischen Kerns anisotrop und das Resonanzsignal erscheint deshalb entsprechend magnetisch verschoben. Übereinstimmend dazu ist die Phosphonsäureestergruppe in Position 3 weit genug von der chemischen Umgebung des Aromaten entfernt und ihre Resonanzsignale f und i weisen keine derartige Aufspaltung in mehrere Multiplettsignale auf. Die Zuordnung des isolierten Triplettsignals zu einer Methylgruppe der Phosphonsäureestergruppe in Position 1 wurde nach Auswertung des 1 H, 1 H-COSY-Experiments bestätigt (Abbildung 43).

Da lediglich die Protonen der Resonanzsignale h und f eine Kopplung zueinander aufweisen, kann das Signal f' nur von einer Ethoxygruppe, die Bestandteil der Phosphonsäureestergruppe in Position 1 ist, stammen.

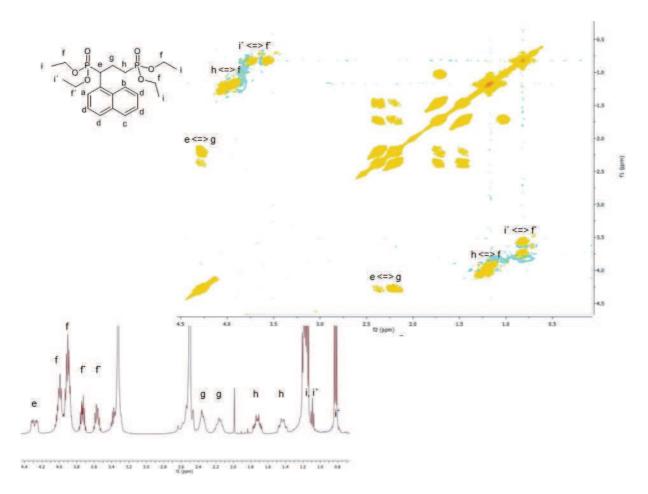


Abbildung 43. Ausschnitt aus dem ¹H, ¹H-COSY-Spektrum von Verbindung 29 in DMSO-d₆

3.4 Austausch der inversen Hydroxamsäure- gegen eine *N*-Hydroxy-Methylcarbamatfunktion

3.4.1 Syntheseidee

Nach formaler Insertion eines Sauerstoffatoms in die Acetylgruppe von α -Phenyl-FR900098 220 entsteht als weitere bioisostere Modifikation eine *N*-Hydroxy-Methylcarbamatfunktion, die in **LXX** verwirklicht werden sollte (Schema 36).

$$\alpha$$
-Phenyl-FR900098: IC₅₀ (*P.f.* Dd2) = 0,35 μM
Fosmidomycin: IC₅₀ (*P.f.* Dd2) = 0,36 μM
 α -Phenyl-FR900098: IC₅₀ (*P.f.* Dd2) = 0,36 μM

Schema 36. Entwicklung der Syntheseidee eines N-Hydroxy-Methylcarbamat-Analogons.

3.4.2 Syntheseplanung

Für die Gewinnung der gewünschten Endverbindung **LXX** bot sich die Verwendung des literaturbekannten *O*-benzylgeschützten Hydroxylamins **LXXI** als Edukt an (Schema 37). Das gewünschte Kohlensäurederivat **32** könnte durch Acylierung von **LXXI** mit Methylchloroformiat gewonnen werden. Anschließende Abspaltungen der Ethyl- und Benzylschutzgruppen sollte über die Phosphonsäure **XLIX** die Zielverbindung **LXX** liefern.

Schema 37. Retrosynthetische Überlegung zur Darstellung der Zielverbindung LXX.

3.4.3 Synthese

Die Estervorstufe **32** wurde durch Umsetzung von **LXXI** mit Methylchloroformiat in Anwesenheit von Pyridin (= Pyr) in einer Ausbeute von 96 % erhalten. Nach TMSBr-Zugabe und anschließender Hydrolyse konnte die Phosphonsäure **LXXII** jedoch nicht als analysenreine Verbindung isoliert werden. Nachteilige Stoffeigenschaften der Phosphonsäure erlaubten keine Reinigung nach konventionellen Methoden wie Umkristallisierung oder Säulenchromatographie.

So wurde auch in diesem Fall, wie in Weg a) des Schemas 38 gezeigt, zunächst der bereits an anderer Stelle erfolgreich erprobte Umesterungsansatz gewählt (siehe Kapitel 3.3.2). Der entsprechende Dibenzylester 33 konnte nach Chromatographie an Kieselgel in mäßiger Ausbeute von 25 % gewonnen werden. Da LXX durch katalytische Hydrierung von 33 nicht in ausreichender Reinheit gewonnen werden konnte, wurde die Darstellung des Bis-POM-Phosphonsäureesterprodrugs 35 gewählt (Weg b) in Schema 38). Der entscheidende Vorteil des lipophilen Doppelesterprodrugs ist die Möglichkeit zur säulenchromatographischen Reinigung des Produkts an Kieselgel.

Darüber hinaus gilt die Bioaktivierung im Zellkulturassay als gesichert, 149 so dass die Untersuchung der Endverbindung 35 eine zuverlässige Aussage zur antiplasmodialen Potenz eines N-Hydroxy-Methylcarbamat-Analogons zulässt. Die Vorstufe 34 konnte nach literaturbekannter Methode im Anschluss an die Phosphonsäureesterhydrolyse des Rohprodukts durch Umsetzung mit überschüssigem Chlormethylpivalat und Triethylamin dargestellt werden. 166 35 wurde nach katalytischer Hydrierung mittels säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel mit 98 % Ausbeute und als Öl elementaranalysenrein gewonnen.

LXXII Rohprodukt

Schema 38. Untersuchte Synthesewege zur Darstellung des inversen Hydroxymethylcarbamat-Analogons Fosmidomycins (Reinheitsbestimmung mittels HPLC-Analyse); POMCI = Pivaloyloxymethylchlorid.

3.4.4 Spektroskopische Eigenschaften

Das IR-Spektrum des Bis-POM-Esterprodrugs 35 ist in Abbildung 44 dargestellt. die Carbonyl-Valenzschwingungsbande Darin ist charakteristische Pivalinsäureestergruppe bei 1754 cm⁻¹ gezeigt. Darüber hinaus erscheint die Carbonyl-Valenzschwingung Absorptionsbande der der N-Hvdroxv-Methylcarbamatfunktion bei 1703 cm⁻¹. Die entsprechende Schwingungsbande lag für die O-benzyl-geschützte Methylcarbamat-Vorstufe 34 noch hypsochrom verschoben bei 1712 cm⁻¹. Das gleichzeitige Auftreten der breiten Hydroxyl-Valenzschwingungsbande bei 3254 cm⁻¹ deutet auf die erfolgreiche Ablösung der Benzylgruppe hin. Bei 1279 und 1259 cm⁻¹ erscheinen P=O-Valenzschwingungen und bei 1025 und 1000 cm⁻¹ liegen die Maxima für die P-O-Valenzschwingung.

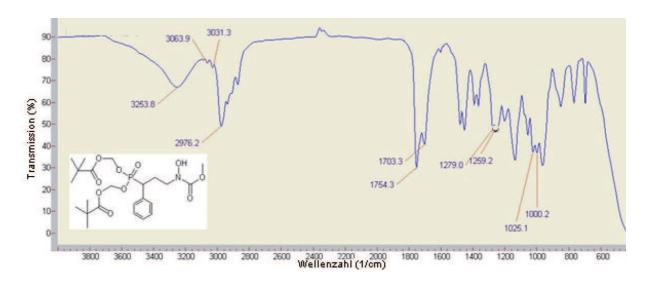


Abbildung 44. IR-Spektrum (NaCl-Film) von Verbindung 35.

3.5 Austausch der inversen Hydroxamsäure- gegen eine Carbonsäurefunktion

Aus der Entwicklungsgeschichte verschiedener Metalloenzym-Inhibitoren ist bekannt, dass Carbonsäurefunktionen das katalytisch relevante Metallion im enzymatischen Zentrum komplexieren können (siehe z.B. ACE-Hemmer). Zudem steht diese funktionelle Gruppe in einem engen bioisosteren Verhältnis zu Hydroxamsäuregruppen. Vor Beginn dieser Arbeit wurde über kein Analogon Fosmidomycins berichtet, in dem die Hydroxamsäuregruppe gegen eine

Carbonsäurefunktion ausgetauscht wurde. Deswegen soll in dieser Arbeit die Synthese und biologische Aktivität eines solchen Derivats beschrieben werden.

Synthese

Aus Kapitel 2.1.4 ist die Synthese der Carbonsäure **3** bekannt. Die TMSBrunterstützte Umesterung der Phosphonsäurediethylesterfunktion mit anschließender Hydrolyse erbrachte **36** in 98 %iger Reinheit und mit 50 % Ausbeute (Schema 39).

Schema 39. Synthese der Phosphoncarbonsäurezielverbindung 36.

3.6 Ergebnisse der biologischen Untersuchungen

Die Zielverbindungen **27** und **35**, die als Prodrugs aufgefasst werden, sind *in vitro* am multiresistenten K1-Stamm *P. falciparums* auf antiplasmodiale Eigenschaften und im MRC-5-Assay auf Zytotoxizität untersucht worden. Aufgrund des Fehlens von unspezifischen Esterasen, die für die Bioaktivierung zu den Wirkformen benötigt werden, wurden weder Untersuchungen im *Ec*Dxr- noch im *Pf*Dxr-Enzymassay

_

Durchführung siehe Kapitel 7.8

vorgenommen. Außerdem sind Enzymhemmkonstanten, antiplasmodiale Aktivität und Zytotoxizität des Bisphosphonats 31 und der Carbonsäure 36 in Tabelle 7 aufgelistet. ********. Zum Vergleich sind Daten zur biologischen Aktivität der Leitstruktur 18 angegeben.

Abbildung 45. Übersicht der in Kapitel 3 vorgestellten Zielverbindungen.

Wie aus den biologischen Daten ersichtlich wird, führt der Austausch der inversen Hydroxamsäurefunktion der Referenz 18 gegen andere erfahrungsgemäß gut chelatisierende Funktionen zum Verlust der antiplasmodialen Wirkung (Tabelle 7).

******** Alle Ergebnisse werden als Mittelwerte, errechnet aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführter Messungen, +/- relativer Standardabweichung angegeben.

Verbindung	<i>Pf</i> Dxr IC ₅₀ [μΜ]	<i>EcDxr</i> IC ₅₀ [μΜ]	<i>P.f.</i> K1 IC ₅₀ [μΜ]	MRC-5 CC ₅₀ [μM]
27	n.d.	n.d.	>64	>64
31	inaktiv	inaktiv	>64	>64
35	n.d.	n.d.	35 +/- 3 (n = 3)	60 +/- 6 (n = 3)
36	inaktiv	inaktiv	>64	>64
18	3,1 +/- 0,3	243 +/- 30	0,48 +/- 0,29 (n = 8)	59 +/- 13 (n = 6)

Tabelle 7. In vitro Aktivität der Fosmidomycin-Analoga aus Kapitel 3 (n.d. = nicht determiniert).

4 Inverse Hydroxamsäureanaloga Fosmidomycins mit unterschiedlichen aromatischen Substituenten in α -Position

Nachdem sich herausstellte, dass der bioisostere Austausch der Metallion-chelatisierenden Hydroxamsäurefunktion der Leitstrukturen 17 beziehungsweise 18 zu Aktivitätsverlust gg. Dxr-Isoenzymen und *in vitro* gg. *P.f.* K1 führt, wird im weiteren Verlauf die Variation des aromatischen Phenyl-Substituenten und deren Auswirkung auf die biologische Aktivität beschrieben.

Ausgehend von 17 und 18 sollten die Derivate, die in Schema 40 gezeigt sind, synthetisiert und biologisch untersucht werden. Insbesondere Wasserstoff- und Methylsubstituenten an der Stickstofffunktion der inversen Hydroxamsäure erwiesen sich als vorteilhaft, weshalb von jedem aromatisch variierten Strukturtyp beide Hydroxamsäurederivate eingehend untersucht werden sollten.

Basierend auf bekannten Struktur-Aktivitäts-Studien an α -Phenyl-Fosmidomycin-Analoga (Kapitel 1.1.8.2), ^{165, 183} fiel die Wahl unter anderem auf inverse Di-Halogenphenyl-Analoga (Schema 40). Überdies sollten Fosmidomycin-Analoga mit

einem elektronenliefernden p-Methyl-Substituenten untersucht werden. Mithilfe von Derivaten, die einen 1-Naphthyl-Substituenten tragen, könnte darüber hinaus die Toleranz gg. einer sterisch anspruchsvollen zweikernigen aromatischen Gruppe in α -Position ermittelt werden (Schema 40).

Schema 40. Angestrebte Zielverbindungen abgeleitet von 17 und 18.

4.1 Synthese

Die Gewinnung der Zielverbindungen erfolgte analog zu der in den Kapiteln 2.1.3 und 2.1.4 vorgestellten Methode (Schema 51). Die Synthese und die analytischen Eigenschaften der dafür benötigten Arylmethylphosphonate **LXXIV-LXXVII** sind literaturbekannt.²⁰³⁻²⁰⁵

Die *O*-benzylgeschützten Hydroxamsäuren **49-56** wurden durch CDI-vermittelte Aktivierung der Carbonsäuren **45-48** und Umsetzung mit **LI** beziehungsweise **LII** in Ausbeuten von 70 bis 97 % erhalten (Schema 41).

Schema 41. Synthese geschützter inverser Hydroxamsäureanaloga Fosmidomycins mit variierter aromatischer Substitution.

In Analogie zum Phenylderivat **9** (Kapitel 2.1.4) fielen nur die Phosphonsäuren mit *N*-methyl-*O*-benzylsubstituierten Hydroxamsäurefunktionen (**57-60**) nach TMSBrvermittelter Phosphonsäureesterspaltung als analysenreine Feststoffe aus (Schema 42). Die Zielverbindungen **61-64** wurden nach katalytischer Hydrierung als analysenreine Substanzen erhalten.

Schema 42. Gewinnung der Endverbindungen 61-64.

Die unsubstituierten *O*-benzylsubstituierten Hydroxamsäuren **49**, **51**, **53** und **55** konnten erfolgreich in die Dibenzylester **65-68** überführt werden (Schema 43). Obwohl die Ausbeuten stark variierten, konnten alle Verbindungen aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften durch mehrmalige Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt werden. Die anschließende Hydrogenolyse der Benzylschutzgruppen erbrachte die Zielverbindungen **69-71**. Nach Palladium-katalysierter Reduktion von **67** kam es allerdings zur unerwünschten hydrogenolytischen Abspaltung der Chlorsubstituenten. Die Auswertung der analytischen Daten bestätigte, dass das Produkt **LXXIII** der phenylsubstituierten Verbindung **17** entspricht (Schema 43).

Schema 43. Gewinnung der unsubstituierten Hydroxamsäuren 69, 70 und 71.

Bereits *Schlüter* berichtete über eine analoge Hydrodehalogenierung von Fosmidomycin-Analoga mit 3,4-Dichlorphenylgruppe.²⁰⁶ Durch Verringerung des Wasserstoffgasüberdrucks auf Atmosphärendruck und Verwendung eines katalytisch schwächer aktiven Palladium-Kohle-Katalysators, der 5 anstelle von 10 % Palladiumanteil besitzt, konnte die Nebenreaktion jedoch auch nicht vollständig unterbunden werden. Deshalb wurde die Synthese des gewünschten Endprodukts **LXXIII** an diesem Punkt eingestellt.

4.2 NMR-spektroskopische Eigenschaften

Aufgrund heteronuklearer Kopplungen zwischen ¹⁹F beziehungsweise ³¹P zu ¹³C weisen die

¹³C-NMR-Spektren der 3,4-Difluorphenyl-Analoga in dieser Arbeit besondere Signalaufspaltungen auf. Das ¹³C-NMR-Spektrum der Verbindung **52** in Abbildung 46 dient dafür als Beispiel. Die Resonanzsignale b und c stammen von den mit Fluor verbundenen ¹³C-Atomen in Position 3 und 4 des Aromaten. Aufgrund des entschirmenden Effekts der elektronegativen Halogene liegen deren Signale zwischen 145 und 150 ppm tieffeldverschobener. Darüber hinaus weisen sie durch die heteronuklearen Kopplungen zu beiden ¹⁹F-Atomen jeweils doppelte Duplettaufspaltungen auf. Die quartären aromatischen Kohlenstoffatome erzeugen die Resonanzsignale d und e, den Signalen f bis h können die aromatischen Kohlenstoffatome der Benzylgruppe zugeordnet werden (Abbildung 46).

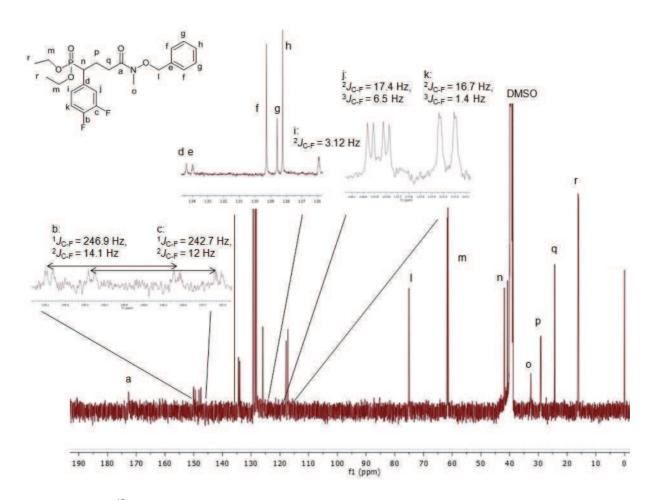


Abbildung 46. ¹³C-NMR-Spektrum von Verbindung **52** in DMSO-d₆.

Hochfeldverschoben zu den Signalen der anderen aromatischen Kohlenstoffatome folgen bei 117.87 (Signal j) und 117.26 (Signal k) ppm zwei Resonanzsignale, die in doppelte Dubletts aufspalten. Die Multiplizität unterscheidet sich insbesondere durch die stärkere Kopplung zwischen dem Kohlenstoffatom in Position 2 des Aromaten und dem Fluoratom in Position 4 (${}^{3}J_{C-F} = 6.5$ Hz). Die Kopplung zwischen dem Kohlenstoffatom in Position 5 und dem Fluoratom in Position 3 weist hingegen eine Kopplungskonstante von ${}^{3}J_{C-F} = 1.4$ Hz auf. Die übrigen, hochfeldverschobeneren Resonanzsignale I (75.08 ppm), m (61.73 und 61.45 ppm), n (41.28 ppm), p (29.17 ppm), q (24.31 ppm) und r (16.14 beziehungsweise 15.99 ppm) unterscheiden sich hinsichtlich der Lage und Aufspaltung nicht besonders von Resonanzsignalen nicht-fluorierter Verbindungen, die in dieser Arbeit bereits an anderer Stelle besprochen wurden. Ein Beleg für das Vorliegen einer N-methylierten Hydroxamsäureverbindung ist das Resonanzsignal o bei 32.63 ppm, welches durch die Methylgruppe der Hydroxamatgruppe verursacht wird (Abbildung 46).

4.3 Ergebnisse der biologischen Untersuchungen

Tabelle 8 stellt die biologischen Aktivitäten der in Abbildung 47 gezeigten Testverbindungen des Kapitels 4 gg. der *Ec*Dxr und *Pf*Dxr sowie dem K1-Stamm von *P.falciparum* dar. Außerdem sind die IC₅₀-Werte aus der Zytotoxizitätsbestimmung im MRC-5-Assay wiedergegeben.

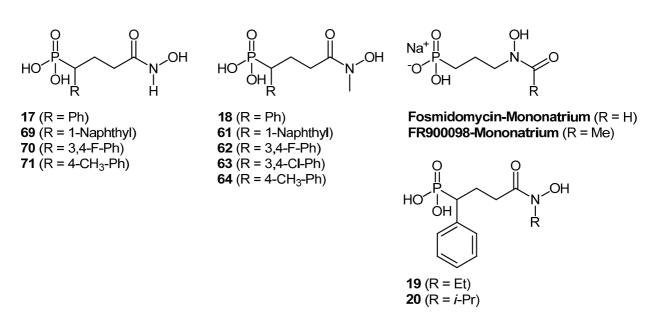


Abbildung 47. Testverbindungen des vierten Kapitels und Referenzen.

Verbindung	<i>Pf</i> Dxr	<i>Ec</i> Dxr	<i>P.f.</i> K1	MRC-5
	IC ₅₀ [nM]	IC ₅₀ [nM]	IC ₅₀ [μΜ]	CC ₅₀ [μΜ]
61	9,4 +/- 1,3	3833 +/- 170	0,97 +/- 0,79	58 +/- 13
	(n = 3)	(n = 3)	(n = 8)	(n = 8)
69	37 +/- 3	7380 +/- 180	2,4 +/- 1,1	>64
	(n = 3)	(n = 3)	(n = 6)	(n = 4)
62	3,4 +/- 0,4	117 +/- 7	0,30 +/- 0,20	60 +/- 11
	(n = 3)	(n = 3)	(n = 10)	(n = 8)
70	3,9 +/- 0,4	178 +/- 20	0,40 +/- 0,31	>64
	(n = 3)	(n = 3)	(n = 5)	(n = 7)
64	14 +/- 2	286 +/- 19	0,14 +/- 0,07	>64
	(n = 3)	(n = 3)	(n = 7)	(n = 4)
71	187 +/- 14	695 +/- 96	5,7 +/- 0,8	>64
	(n = 3)	(n = 3)	(n = 3)	(n = 3)
63	2,8 +/- 0,4	208 +/- 16	0,38 +/- 0,17	>60
	(n = 3)	(n = 3)	(n = 8)	(n = 6)
19	15 +/- 2	>14000	1,3 +/- 1,5 (n = 5)	>64 (n = 5)
20	inaktiv	inaktiv	>64 (n = 3)	>64 (n = 3)
18	3,1 +/- 0,3	243 +/- 30	0,48 +/- 0,29	59 +/- 13
	(n = 3)	(n = 3)	(n = 8)	(n = 6)
17	12 +/- 3,1	592 +/- 25	2,7 +/- 2,3	57 +/- 12
	(n = 3)	(n = 3)	(n = 10)	(n = 8)
Fosmidomycin-	144 +/- 16	221 +/- 14	3,0 +/- 2,6	58 +/- 13
Mononatrium	(n = 3)	(n = 3)	(n = 7)	(n = 6)
FR900098-	15 +/- 1	131,0 +/- 2,9	1,2 +/- 1,0	59 +/- 13
Mononatrium	(n = 3)	(n = 3)	(n = 8)	(n = 6)

Tabelle 8. In vitro Aktivität der inversen Hydroxamsäureanaloga Fosmidomycins mit unterschiedlichen aromatischen Gruppen in α -Position. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte, errechnet aus der Gesamtheit (n) voneinander unabhängig durchgeführter Messungen, +/- Standardabweichung angegeben. Zum Vergleich sind die Werte der Referenzsubstanzen Fosmidomycin, FR900098 und der Leitstrukturen **17-20** mit angegeben.

Orientierend an den Leitstrukturen 17 und 18 wurden durch Variation des

4.4 Interpretation der biologischen Aktivitäten

aromatischen Kerns beziehungsweise Veränderung der Substitution Analoga mit deutlich veränderter biologischer Aktivität erhalten. So weisen 62, 63, 70 gg. PfDxr mit 18 vergleichbare IC₅₀-Werte auf und gehören zu den bisher potentesten Inhibitoren gg. diesem Enzym. Abgesehen von dem Aktivitätsverhältnis zwischen 62 70 und sind N-Methylhydroxamsäuren innerhalb der vorgestellten Derivate deutlich aktivere PfDxr-Inhibitoren. In Kapitel 2 wurde bereits gezeigt, dass die Methylgruppe für die inhibitorische Aktivität besser ist als eine Ethyl- oder Isopropylsubstitution am Hydroxamsäurestickstoffatom. Die Einführung eines elektronenschiebenden (p-Methyl) oder voluminöser aromatischen Substituenten verringerte inhibitorische Aktivität von 64 und 71 beziehungsweise 61 und 69 gg. dem plasmodialen Enzym. Die freie Hydroxamsäure 70 mit einem Difluorphenylsubstituenten ist unter den freien Hydroxamsäurederivaten der potenteste PfDxr-Inhibitor. Die Aktivitätsabfolge ist gg. EcDxr vergleichbar, wobei die Inhibitionskonstanten um mehrere Zehnerpotenzen höher im submikromolaren bis mikromolaren Bereich liegen. Daraus lässt sich eine ausgeprägte Präferenz der vorgestellten Inhibitoren gg. dem plasmodialen Enzym ablesen. Besonders deutlich wird die größere Toleranz PfDxrs gg. inversen Analoga mit voluminöseren aromatischen Substituenten in α -Position an Verbindung **61**. Einerseits vermag die 1naphthylsubstituierte Verbindung das plasmodiale Enzym noch im einstellig nanomolaren Bereich zu hemmen, gg. der bakteriellen EcDxr ist dieses Analogon dagegen ein Inhibitor mit hoher mikromolarer Hemmkonstante. Damit ist eindeutig gezeigt, dass die vielfach angeführte hohe Übereinstimmung der Aminosäuren, die das katalytische Zentrum der PfDxr und EcDxr ausmachen, nicht ausreicht, um aus Inhibitionsstudien von Fosmidomycinanaloga gg. EcDxr direkt deren potenzielle antiplasmodiale Aktivität abzuleiten. 106

Aus den *In vitro* Studien an *P.f.* K1 ergab sich für die Fosmidomycinanaloga eine ähnliche Aktivitätsabfolge wie zuvor gg. dem *Pf*Dxr-Enzym, wobei die IC₅₀-Werte im mikromolaren Bereich liegen. Wahrscheinlich liegt dieser Aktivitätsabfall in der hohen Hydrophilie der Endverbindungen begründet. Durch diese Stoffeigenschaft werden die Verbindungen verhältnismäßig gering am Wirkort angereichert. In Bezug auf ihre

inhibitorische Aktivität gg. PfDxr erstaunt es, dass die 4-methylphenylsubstituierte N-Methylhydroxamsäure **64** das Wachstum des P.f.-Stamms K1 mit einem IC₅₀-Wert von 0,14 +/- 0,07 μ M bei noch niedrigeren Konzentrationen zu hemmen vermag als die anderen Analoga. In Übereinstimmung mit den Enzymassays sind auch im Zellkulturassay die N-Methylhydroxamsäuren aktiver als die unsubstituierten Hydroxamsäuren.

Aufgrund ihrer gleichermaßen herausragenden Potenz gg. *Pf*Dxr und ebenso ausgeprägten antiplasmodialen Eigenschaften *in vitro* wurden die fluorierten Analoga 62 und 70 für weitergehende *In vivo* Studien gg. *P. berghei* im akuten Malaria-Mausmodell untersucht. Dieses Vorgehen begründet sich v.a. aus der Tatsache, dass 64 erst zu einem sehr späten Zeitpunkt vorlag. Die Untersuchungen am lebenden Organismus mussten aufgrund der aufwendigen Vorbereitungen schon zu einem relativ frühen Zeitpunkt angemeldet werden, als 62 und 70 noch die antiplasmodial aktivsten Verbindungen innerhalb der Zielverbindungen darstellten.

4.5 Antiplasmodiale *In vivo* Aktivität von 62 und 70

Abbildung 48. Ausgewählte Fosmidomycin-Analoga für die weitergehende In vivo Bestimmung.

Einleitung

Die praktische Durchführung der antiplasmodialen *In vivo* Testung von **62** und **70** erfolgte im LMPH (*L*aboratory for *M*icrobiology, *P*arasitology and *H*ygiene, Belgien) in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Louis Maes.

Fosmidomycins ungünstige Pharmakokinetik¹¹⁹ wurde in einer früheren *In vivo* Studie gg. *P. vinckei*-infizierten Mäusen in einem Behandlungsregimen mit dreimal täglicher Gabe (alle 8 Stunden) berücksichtigt.⁵⁰ Aufgrund der Vermutung, dass die in dieser

Fosmidomycin-Analoga Arbeit vorgestellten durch ihre Phosphonund Hydroxamsäurefunktionen ähnliche pharmakokinetische Eigenschaften aufweisen könnten, wurde das *In vivo* Experiment derart modifiziert, dass die Testsubstanzen zweimal täglich in zueinander gleichgroßen zeitlichen Intervallen verabreicht wurden. Zum Vergleich wurde jeweils eine Behandlungsgruppe parallel mit Chloroquin und dem Mononatriumsalz von Fosmidomycin behandelt. Auf ausdrücklichen Wunsch und basierend auf den positiven Erfahrungen der Kooperationspartner wurden Fosmidomycin, 62 und 70 in Kombination mit dem CYP3A4-Hemmer Ritonavir verabreicht. Dadurch sollte ein eventuell auftretender enzymatisch katalysierter, oxidativer Abbau der Testverbindungen unter physiologischen Bedingungen vermieden werden. Fosmidomycin wurde in dieser Studie wie Untersuchungssubstanzen im selben Zeitintervall gegeben. Chloroguin wurde nur einmal täglich verabreicht (Material und Methoden im Experimentellen Teil, Kapitel 7.9.2).

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 9 gibt Körpergewicht und Überlebensrate der Mäuse in den jeweiligen Behandlungsgruppen im Verlauf des Experiments wieder. Außerdem gibt die Tabelle die prozentual infizierten Erythrozyten der Tiere an den jeweiligen Behandlungstagen wieder.

Die mit dem Vehikel behandelte Kontrollgruppe G-1 entwickelte schwerwiegende Symptome einer Malaria (krankhafte Erscheinung, Tremor, Somnolenz) und einen starken Körpergewichtsverlust. Damit verbunden wurden bereits an Tag 4 nach Infektion (= p.l.) ein hohes Maß an Parasitämie mit 31,9 +/- 7,0 % infizierten RBC (Tabelle 10) und eine mittlere Überlebenszeit nach Infektion (= MST) von 7,2 Tagen p.l. festgestellt. Eine Maus lebte mehr als sieben Tage p.l., starb aber an Tag 10 mit einer hohen intraerythrozytären Parasitenlast.

Die Behandlungsgruppe G-2 bestätigte die hohe Effizienz der Gabe von Chloroquin (98 %ige Unterdrückung der Parasitämie, Tabelle 10). Zwei Mäuse starben an Tag 10 und Tag 11 p.l. und damit kurz vor Abschluss des Experiments. Die verbliebenen Mäuse wiesen Parasitämien von 0,4, 6,9 und 32 % auf. Insgesamt ergibt sich daraus eine MST von 10,6 Tagen.

	Körpergewicht (Gramm)						
	Anzahl Mäuse/ Gruppe	Maus- nummer	Tag 0	Tag 4	Tag 7	Tag 11	Überlebenszeit in Tagen
G-1: Vehikel-	5	1	24,0	21,6	†	†	6,0
behandelte,		2	25,0	21,1	17,6	t	8,0
infizierte		3	24,0	22,2	18,6	t	10,0
Kontrollgruppe:		4	25,0	23,2	†	†	6,0
50 μL DMSO +		5	26,0	22,3	†	†	6,0
10 mg/kg KG		MST	24,8	22,1	18,1		7,2
Ritonavir		rel. Std.	0,8	0,8	0,7		1,8
	5	1	26,0	25,1	25,2	26,0	>11,0
		2	26,0	25,8	27,4	†	10,0
G-2: Chloroquin:		3	24,0	24,5	24,0	21,8	>11,0
10 mg/kg KG, 50		4	25,0	26,4	27,6	t	10,0
μL Inokolum i.p.		5	26,0	25,5	25,9	27,4	>11,0
		MST	25,4	25,5	26,0	25,1	10,6
		rel. Std.	0,9	0,7	1,5	2,9	0,5
G-3:	4	1	25,0	25,2	24,2	21,1	>11,0
Fosmidomycin:		2	23,0	23,6	22,9	t	10,0
80 mg/kg KG, 50		3	25,0	26,5	25,4	24,8	>11,0
μL Inokolum i.p. +		4	26,0	24,7	24,8	25,4	>11,0
10 mg/kg KG		MST	24,8	25,0	24,3	23,8	10,8
Ritonavir p.o.		rel. Std.	1,3	1,2	1,1	2,3	0,5
	5	1	26,0	22,7	21,4	21,2	>11,0
G-4: 62 : 80		2	23,0	†	†	t	Dosierfehler
mg/kg KG, 50 μL		3	25,0	21,7	†	t	7,0
Inokolum i.p. + 10		4	23,0	22,2	†	t	7,0
mg/kg KG		5	24,0	21,4	†	t	6,0
Ritonavir p.o.		MST	24,2	22	21,4	21,2	7,8
		rel. Std.	1,3	0,6			2,2
	5	1	24,0	22,7	21,1	22,8	>11,0
G-4: 70 : 80		2	25,0	25,6	25,6	24	>11,0
mg/kg KG, 50 μL		3	25,0	20,6	20,3	20,7	12,0
Inokolum i.p. + 10		4	22,0	22,3	22,2	24,9	>11,0
mg/kg KG		5	26,0	17,4	†	t	6,0
Ritonavir p.o.		MST	24,4	21,7	22,3	23,1	10,2
		rel. Std.	1,5	3,0	2,3	1,8	2,4

Tabelle 9. Körpergewicht und Überlebensrate der Mäuse (rel. Std. = relative Standardabweichung, KG

= Körpergewicht, i.p. = intraperitoneal, p.o. = peroral).

Anzahl Mause/Gruppe Mausnummer Tag 4 Tag 7 Tag 11 Tag 4 Tag 7 Tag 11 An Tag 4 Tag 7 Tag 11 Tag 1				% infizierte RBC		Durchschnittliche	
Anzahl Mäuse/Gruppe					(Mittelwe	rt)	prozentuale
Mause/Gruppe Mause/Gruppe Tag 4 Tag 7 Tag 11 Tag 14 Tag 7 Tag 14 T		Anzahl					Unterdrückung der
G-1: Vehikel-behandelte, infizierte Kontrollgruppe: 50 μL DMSO + 10 mg/kg KG Ritonavir G-2: Chloroquin: 10 mg/kg KG, 50 μL lnokolum i.p. + 10 mg/kg KG, 50 μL lnokolum i.p. + 10 mg/kg KG Ritonavir G-3:			Mausnummer				<u>Parasitämie</u>
G-1: Vehikelbehandelte, infizierte 2 35,3 22,8 †		wadse/ druppe		Tag 4	Tag 7	Tag 11	an Tag 4 p.l.
Dehandelte, infizierte South Entire South En	C 1: Vabikal	5	1	25,9	†	†	
Section Sec			2	35,3	22,8	†	
Kontrollgruppe: 50 μL DMSO + 10 mg/kg KG Ritonavir rel. Std. 7,0 8,2			3	27,3	11,2	†	
Mittelwert 17,0			4	28,5	†	†	
Mittelwert rel. Std. 7,0 8,2 5 1 0,0 0 0,4 2 0,1 1,8 † 4 0,0 0,4 6,9			5	42,6	†	†	
rel. Std. 7,0 8,2 1			Mittelwert	31,9	17,0		0
G-2: Chloroquin: 10 mg/kg KG, 50 μL Inokolum i.p. G-3: G-3: Fosmidomycin: 80 mg/kg KG, 50 μL Inokolum i.p. + 10 mg/kg KG Ritonavir p.o. G-4: 62: 80 mg/kg KG, 50 μL Inokolum i.p. + 10 mg/kg KG Ritonavir p.0. G-4: 62: 80 mg/kg KG Ritonavir p.0. G-4: 62: 80 mg/kg KG Ritonavir p.0. G-4: 62: 80 mg/kg KG Ritonavir p.0. Mittelwert p.0. G-4: 62: 80 mg/kg KG Ritonavir p.0. Mittelwert G-4: 62: 80 mg/kg KG, 50 μL Inokolum i.p. + 10 mg/kg KG Ritonavir p.0. Mittelwert G-4: 62: 80 mg/kg AG, 50 μL Inokolum i.p. + 10 Mittelwert AG, 50 μL AG, 50	ilig/kg kG hilonavii		rel. Std.	7,0	8,2		
G-2: Chloroquin: 10 mg/kg KG, 50 μL Inokolum i.p. Mittelwert rel. Std. 1,0 3,1 16,9 G-3; Fosmidomycin: 80 mg/kg KG, 50 μL Inokolum i.p. + 10 mg/kg KG Ritonavir p.o. G-4: 62: 80 mg/kg KG, 50 μL Inokolum i.p. + 10 mg/kg KG Ritonavir p.o. G-4: 62: 80 mg/kg KG, 50 μL Inokolum i.p. + 10 mg/kg KG Ritonavir p.o. 5 1 7,7 5,4 39,9 G-4: 62: 80 mg/kg KG, 50 μL Inokolum i.p. + 10 mg/kg KG Ritonavir p.o. 5 1 7,7 5,4 39,9 G-4: 62: 80 mg/kg KG, 50 μL Inokolum i.p. + 10 mg/kg KG Ritonavir p.o. 5 1 7,7 5,4 39,9 78 Mittelwert 7,1 5,4 39,9 78 Mittelwert 7,1 5,4 39,9 78 G-4: 70: 80 mg/kg G-4: 70: 80 mg/kg G-4: 70: 80 mg/kg		5	1	0,0	0	0,4	
mg/kg KG, 50 μL Inokolum i.p. 4 0,0 0,4 † Mittelwert rel. Std. 0,5 2,0 13,2 98 Mittelwert rel. Std. 1,0 3,1 16,9 Fosmidomycin: 80 mg/kg KG, 50 μL lnokolum i.p. + 10 mg/kg KG Ritonavir p.o. 3 5,0 9,0 46,1 Mittelwert p.o. 2,6 6,3 40,4 92 Mittelwert rel. Std. 2,8 3,5 5,6 G-4: 62: 80 mg/kg KG, 50 μL lnokolum i.p. + 10 mg/kg KG Ritonavir p.o. 3 1,8 † † Mittelwert p.o. 4 7,0 † † † Mittelwert p.o. 5 11,9 † † Mittelwert p.o. 5 17,2 6,1 37,3 G-4: 70: 80 mg/kg 2 6,9 6,3 23,5			2	0,1	1,8	†	
Somewhat	G-2: Chloroquin: 10		3	2,4	7,3	32,4	
Mittelwert 0,5 2,0 13,2 98 rel. Std. 1,0 3,1 16,9 G-3: 4 1 5,1 5,5 34,9 Fosmidomycin: 80 mg/kg KG, 50 μL lnokolum i.p. + 10 mg/kg KG, 50 μL lnokolum i.p. + 10 mg/kg KG Ritonavir p.o. 3 5,0 9,0 46,1 Mittelwert p.o. 2,6 6,3 40,4 92 Mittelwert p.o. 5 1 7,7 5,4 39,9 G-4: 62: 80 mg/kg KG, 50 μL lnokolum i.p. + 10 mg/kg KG Ritonavir p.o. 4 7,0 † † Mittelwert p.o. 5 11,9 † † Mittelwert p.o. 7,1 5,4 39,9 78 G-4: 70: 80 mg/kg 5 1 7,2 6,1 37,3 G-4: 70: 80 mg/kg 2 6,9 6,3 23,5	mg/kg KG, 50 μL		4	0,0	0,4	†	
Tel. Std. 1,0 3,1 16,9	Inokolum i.p.		5	0,2	0,4	6,9	
G-3: 4 1 5,1 5,5 34,9 Fosmidomycin: 80			Mittelwert	0,5	2,0	13,2	98
Fosmidomycin: 80 mg/kg KG, 50 μL Inokolum i.p. + 10 3 5,0 9,0 46,1 Inokolum i.p. + 10 4 0,4 9 40,2 Mittelwert p.o. 2,6 6,3 40,4 92 Mittelwert p.o. 2,8 3,5 5,6 5 1 7,7 5,4 39,9 6-4: 62: 80 mg/kg KG, 50 μL lnokolum i.p. + 10 mg/kg KG Ritonavir p.o. 4 7,0 † † Mittelwert p.o. 5 11,9 † † Mittelwert p.o. 7,1 5,4 39,9 78 G-4: 70: 80 mg/kg 5 1 7,2 6,1 37,3 G-4: 70: 80 mg/kg 2 6,9 6,3 23,5			rel. Std.	1,0	3,1	16,9	
mg/kg KG, 50 μL 3 5,0 9,0 46,1 lnokolum i.p. + 10 4 0,4 9 40,2 Mittelwert p.o. 2,6 6,3 40,4 92 rel. Std. 2,8 3,5 5,6 3 1,7,7 5,4 39,9 G-4: 62: 80 mg/kg KG, 50 μL 3 1,8 † † lnokolum i.p. + 10 4 7,0 † † mg/kg KG Ritonavir p.o. 5 11,9 † † Mittelwert p.o. 7,1 5,4 39,9 78 Mittelwert p.o. 7,1 5,4 39,9 78 G-4: 70: 80 mg/kg 5 1 7,2 6,1 37,3 G-4: 70: 80 mg/kg 2 6,9 6,3 23,5	G-3:	4	1	5,1	5,5	34,9	
mg/kg KG, 50 μL 3 5,0 9,0 46,1 lnokolum i.p. + 10 4 0,4 9 40,2 mg/kg KG Ritonavir p.o. Mittelwert rel. Std. 2,6 6,3 40,4 92 Mittelwert rel. Std. 2,8 3,5 5,6 5,6 G-4: 62: 80 mg/kg KG, 50 μL lnokolum i.p. + 10 mg/kg KG Ritonavir p.o. 3 1,8 † † Mittelwert p.o. 5 11,9 † † Mittelwert rel. Std. 4,2 4,2 G-4: 70: 80 mg/kg 5 1 7,2 6,1 37,3 G-4: 70: 80 mg/kg 2 6,9 6,3 23,5			2	0,1	1,7	†	
Mittelwert 2,6 6,3 40,4 92 p.o. rel. Std. 2,8 3,5 5,6 G-4: 62: 80 mg/kg KG, 50 μL 2 † † † Inokolum i.p. + 10 mg/kg KG Ritonavir p.o. 4 7,0 † † Mittelwert p.o. 7,1 5,4 39,9 78 Mittelwert rel. Std. 4,2 4,2 4,2 G-4: 70: 80 mg/kg 2 6,9 6,3 23,5	mg/kg KG, 50 μL		3	5,0	9,0	46,1	
p.o. rel. Std. 2,8 3,5 5,6 G-4: 62: 80 mg/kg KG, 50 μL Inokolum i.p. + 10 mg/kg KG Ritonavir p.o. 3 1,8 † † Mittelwert rel. Std. 7,1 5,4 39,9 78 Mittelwert rel. Std. 4,2 4,2 G-4: 70: 80 mg/kg 5 1 7,2 6,1 37,3 G-4: 70: 80 mg/kg 2 6,9 6,3 23,5	Inokolum i.p. + 10		4	0,4	9	40,2	
G-4: 62 : 80 mg/kg KG, 50 μL Inokolum i.p. + 10 mg/kg KG Ritonavir p.o. G-4: 70 : 80 mg/kg 5 1 7,7 5,4 39,9 1,8 1 1 7,0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	mg/kg KG Ritonavir		Mittelwert	2,6	6,3	40,4	92
$ \begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	p.o.		rel. Std.	2,8	3,5	5,6	
KG, 50 μL Inokolum i.p. + 10 mg/kg KG Ritonavir p.o. Mittelwert rel. Std. 4, 2 1,8 † † † † 4, 7,0 † † † † Mittelwert 7,1 5,4 39,9 78 rel. Std. 4,2 5 1 7,2 6,1 37,3 G-4: 70: 80 mg/kg 2 6,9 6,3 23,5		5	1	7,7	5,4	39,9	
KG, 50 μL Inokolum i.p. + 10 mg/kg KG Ritonavir p.o. Mittelwert rel. Std. 4, 7, 0 † † † Mittelwert 7, 1 5, 4 39, 9 78 rel. Std. 4, 2 5 1 7, 2 6, 1 37, 3 G-4: 70: 80 mg/kg 6, 9 6, 3 23, 5	G-4: 62 : 80 mg/kg		2	†	†	†	
mg/kg KG Ritonavir p.o. 5	KG, 50 μL		3	1,8	†	†	
p.o. Mittelwert 7,1 5,4 39,9 78 rel. Std. 4,2 5 1 7,2 6,1 37,3 G-4: 70: 80 mg/kg 2 6,9 6,3 23,5	Inokolum i.p. + 10		4	7,0	†	†	
rel. Std. 4,2 5 1 7,2 6,1 37,3 G-4: 70 : 80 mg/kg 2 6,9 6,3 23,5	mg/kg KG Ritonavir		5	11,9	†	†	
G-4: 70 : 80 mg/kg	p.o.		Mittelwert	7,1	5,4	39,9	78
G-4: 70 : 80 mg/kg 2 6,9 6,3 23,5			rel. Std.	4,2			
		5	1	7,2	6,1	37,3	
	G-4: 70 : 80 mg/kg		2	6,9	6,3	23,5	
KG, 50 μL 3 2,3 5,8 50,3			3	2,3	5,8	50,3	
Inokolum i.p. + 10 4 0,5 4,0 24	•		4	0,5	4,0	24	
mg/kg KG Ritonavir 5 0,2 † †	•		5	0,2	†	†	
p.o. Mittelwert 3,4 5,5 33,8 89	p.o.		Mittelwert				89
rel. Std. 3,4 1,1 12,8			rel. Std.				

Tabelle 10. Parasitämie der Versuchstiere. (rel. Std. = relative Standardabweichung, KG = Körpergewicht, i.p. = intraperitoneal, p.o. = peroral)

Die Behandlung mit Fosmidomycin erbrachte mit 92 %iger Unterdrückung der Parasitämie an Tag 4 p.l. eine hohe antiplasmodiale Effizienz *in vivo*. Eine Maus verstarb an Tag 10 p.l., die restlichen Tiere wiesen zum selben Zeitpunkt Parasitämien von 34,9, 40,2 und 46,1 % auf. Daraus errechnet sich eine MST von 10,8 Tagen.

Verbindung 62 bewirkt eine 78 %ige Unterdrückung der Parasitämie an Tag 4 p.l.. Bis auf ein Individuum verstarben alle Versuchstiere vor Ende des Experiments, wobei eine Maus einer Überdosis Ritonavir erlag und deshalb aus der Ergebnisrechnung ausgeschlossen wurde. Die MST beträgt für diese Behandlungsgruppe 7,8 Tage.

Die Behandlung mit Verbindung **70** bewirkte eine 89 %ige Unterdrückung der Parasitämie an Tag 4 p.l.. Je eine Maus verstarb an Tag 6 und an Tag 12 p.l.. An Tag 7 p.l. betrug die durchschnittliche Parasitämie der überlebenden Mäuse 5,5 %, an Tag 11 p.l. 33,8 %. Zur besseren Veranschaulichung der Antimalaria-Effektivität der Untersuchungssubstanzen im Vergleich zu Chloroquin und Fosmidomycin wurde eine Kaplan-Meier-Analyse²¹⁸ der ermittelten *In vivo* Aktivität im akuten *P. berghei*-Mausmodell vorgenommen, deren graphische Veranschaulichung in Abbildung 49 vorgenommen wurde.²¹⁹

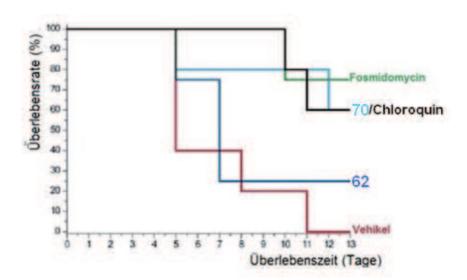


Abbildung 49. Kaplan-Meier-Analyse der In vivo Aktivität im P. berghei-Mausmodell von Fosmidomycin, **62** und **70** (übernommen und modifiziert aus Behrendt et al. J. Med. Chem. **2011**, 54(19), 6796-6802.).²¹⁹

Daraus ergibt sich, dass das Fosmidomycin-Analogon **70** aufgrund der bewirkten Reduktion der Parasitämie und der Überlebenszeit der Mäuse eine mit Chloroquin

und ansatzweise mit Fosmidomycin vergleichbare Effektivität gg. *P. berghei* aufweist. Andererseits ist die *N*-methylsubstituierte Verbindung **62** *in vivo* schwächer aktiv, auch wenn die Messergebnisse am *P. falciparum* K1-Stamm eine höhere *In vivo* Aktivität erwarten ließen. Dieses Ergebnis deutet auf eine Problematik in der Vergleichbarkeit der antiplasmodialen Aktivität innerhalb verschiedener Plasmodienspezies hin. Entsprechende vergleichende Messungen gg. dem Dxr-Enzym von *P. berghei* beziehungsweise im Zellkulturassay waren zum Zeitpunkt der Dissertationsanfertigung jedoch nicht möglich.

4.6 Kristallstrukturanalyse des Ternärkomplexes aus *Ec*Dxr, Mn²⁺ und 62

Aus den EcDxr-Hemmwerten der Fosmidomycin-Analoga aus Kapitel 2 und 4 ergibt sich, dass 62 zum jetzigen Zeitpunkt der potenteste EcDxr-Inhibitor ist (Tabelle 8). Der Arbeitsgruppe von Michael Groll gelang es mithilfe der crystal soaking -Methode⁸⁸, **62** im Komplex mit einem Mn²⁺-Ion an *Ec*Dxr zu binden und einen Beitrag zur Aufklärung des Bindungsmodus zu machen. Die Röntgenstrukturanalyse zeigt in einer Auflösung von 2.1 Å, dass die Gesamtstruktur des Proteins mit der von früher publizierten IspC-Strukturen zum größten Teil übereinstimmt (PDB-Eintrag: 3R0I).²¹⁹ Ein Strukturvergleich mit dem "offenen" Fosmidomycin-EcDxr-Komplex (PDB-Eintrag: 1ONP, Abbildung 50 links) von Steinbacher und Mitarbeitern⁸⁸ und dem "geschlossenen" Fosmidomycin-EcDxr-NADPH-Komplex von Mac Sweeney und Mitarbeitern⁸⁹ (PDB-Eintrag: 1Q0L, Abbildung 50 rechts) verdeutlicht, dass 62 an derselben Stelle wie Fosmidomycin bindet. Damit konkurriert der Inhibitor kompetitiv mit DOXP um dessen Bindestelle. Andererseits verdeutlicht Kristallstrukturvergleich auch, dass 62 anders als Fosmidomycin nur in die "offene" Form des Enzyms zu binden vermag (Abbildung 50 links). Bei virtueller Einlagerung des Inhibitors in die "geschlossene" Form des Enzyms und der damit verbundenen Abdeckung der Bindetasche durch die flexible Schleifenregion würde es zu Abstoßungen zwischen Aminosäuren der flexiblen Schleifenregion, vor allem Asn211, und dem fluorierten Aromaten von 62 kommen (Abbildung 50 rechts). Zwischen 62 und der flexiblen Schleifenregion finden keine erkennbaren direkten Wechselwirkungen statt. Trotzdem können aufgrund der geringen Elektronendichte flexiblen Schleife durchgeführten Röntgenstrukturanalyse der in der

Wechselwirkungen zwischen dem Fosmidomycin-Analogon und Aminosäuren dieser Region nicht ausgeschlossen werden.

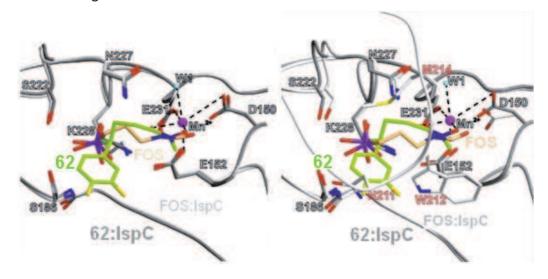


Abbildung 50. links: Überlagerung der Kristallstrukturen der Inhibitoren **62** und Fosmidomycin (**FOS** in den Abbildungen) gebunden an die aktive Region von EclspC in der "offenen" Enzymkonformation; rechts: Analoge Überlagerung in der "geschlossenen" Enzymkonformation (siehe PDB-Referenz: 3R0l; übernommen aus Behrendt et al. J. Med. Chem. **2011**, 54(19), 6796-6802.).²¹⁹

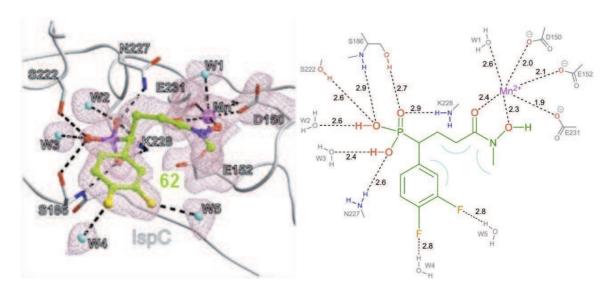


Abbildung 51. links: vergrößerte Ansicht der katalytisch aktiven EcDxr-Region mit gebundenem Inhibitor **62**; die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen EcDxr, Liganden und Wassermolekülen (W) werden als gestrichelte Linien gezeigt, die in lilafarbener Kontur gezeigten Elektronendichtewolken werden bei 0.9 σ mit 2F₀-F_c-Koffizienten dargestellt; rechts: schematische Darstellung der Interaktionen zwischen **62**, Mn²⁺ und EcDxr, außerdem sind intramolekulare van der Waals-Interaktionen zwischen der N-Methylgruppe, dem Difluorphenylring und den Methylengruppen skizziert (übernommen aus Behrendt et al. J. Med. Chem. **2011**, 54(19), 6796-6802.).²¹⁹

Die genaue kristallographische Analyse ergibt, dass **62** im Komplex mit *Ec*Dxr intramolekulare Van-der-Waals-Interaktionen seiner Hydroxamsäure-Methylgruppe

sowohl zum Difluorphenylring als auch zur Propylkette ausbildet. Bemerkenswerterweise bildet die *N*-Methylfunktion keine direkten Wechselwirkungen zum Enzym aus, so dass die stärkere Bindung von **62** an *Ec*Dxr im Vergleich zu Fosmidomycin oder dem Phenylderivat **18** nur aus den beschriebenen enthalpischen und entropischen Beiträgen abgeleitet werden kann.²¹⁹

Abbildung 51 zeigt schematisch die gefundenen Interaktionen zwischen **62** und *Ec*Dxr. Die Abbildung zeigt, dass die inverse Hydroxamsäurefunktion des Inhibitors, analog zur Hydroxamsäuregruppe Fosmidomycins, über die Sauerstoffatome am oktaedrischen Komplex zum zweiwertigen Mn²⁺-Ion teilnimmt. Außerdem bildet die Phosphonsäurefunktion identische Wasserstoffbrückenbindungen wie Fosmidomycin zur *Ec*Dxr aus. Darüber hinaus zeigen die Fluoratome des Inhibitors dipolare Wechselwirkungen zu Wassermolekülen (W4 und W5 in Abbildung 51).

5 Derivatisierung der inversen Hydroxamsäure- zur N-Hydroxyimidfunktion

5.1 Syntheseidee

Hydroxamsäuren und *N*-Hydroxyimide sind chemisch eng miteinander verwandt.²⁰⁸ Analog zu Hydroxamsäurefunktionen können auch *N*-Hydroxyimidgruppen sehr gut Metallionen chelatisieren. So ist beispielsweise das zyklische *N*-Hydroxyimid **LXXIV** ein in mikromolaren Konzentrationen wirksamer Inhibitor der isolierten HIV RNase H, der RNase H-Domäne der Reversen Transkriptase von HIV und der *E.coli* Ribonuclease III (Abbildung 52).^{209, 210} Den Enzymen ist gemein, dass sie zur Klasse der Hydrolasen gehören und dass für ihre Aktivität die Anwesenheit von jeweils zwei Mg²⁺-, Mn²⁺- oder Co²⁺-Ionen als Kofaktoren essenziell ist. *Martin und Mitarbeiter* stellten basierend auf SAR-Studien zur Erklärung des *N*-Hydroxyimid-Bindungsmodus ein Modell auf.

Me²⁺: zweiwertiges Metallion

LXXIV

IC $_{50}$ (HIV-RT DNA) = 40 μ M IC $_{50}$ (HIV-RNaseH) = 0,43 μ M IC $_{50}$ (EcRNase III) = 14/8 μ M (Mg $^{2+}$ /Mn $^{2+}$ als Kofaktor)

Abbildung 52. Inhibitionskonstanten von **LXXIV** an verschiedenen Hydrolasen und postulierter inhibitionsrelevanter Chelatmodus nach Martin und Mitarbeitern.²¹¹

Demnach vermag die *N*-Hydroxyimidfunktion beide katalytisch aktiven Metallionen zu chelatisieren (**LXXIV** in Abbildung 52). Von *Wang und Mitarbeitern* wurde jüngst gezeigt, dass **LXXV** als dualer Inhibitor der HIV Reversen Transkriptase und Integrase agiert. Basierend auf *Molecular Modelling* Studien klärten die Autoren den Bindungsmodus am Integraseenzym auf. Analog zu Raltegravir ist die Ausbildung einer "chelatisierenden Triade" für die Hemmwirkung essenziell (Abbildung 53).

LXXV: IC₅₀ (HIV-RT DNA) = 0,17
$$\mu$$
M IC₅₀ (HIV-IN strand transfer activity) = 3,5 μ M Raitegravir: IC₅₀ (HIV-IN strand transfer) = 2-7 nM

Abbildung 53. Inhibitionskonstanten von LXXV, Raltegravir und die "chelatisierende Triade". 213

Im Verlauf dieser Arbeit zeigte sich, dass die Hydroxamsäurefunktion Fosmidomycins nicht ohne gleichzeitigen Dxr-Hemmverlust gegen andere erfahrungsgemäß gut

chelatisierende Gruppen ausgetauscht werden kann (siehe Kapitel 3). Aufgrund der chemischen Verwandtschaft zu Hydroxamsäuren und der guten Chelatisierung von katalytisch aktiven Mg²⁺-Ionen, wird im Folgenden untersucht, ob sich die Hydroxamsäurefunktion der Leitstruktur **62** bioisoster gegen eine *N*-Hydroxyimidfunktion - wie in **73** - ersetzen lässt (Schema 44).

Schema 44. Ableitung der Zielverbindung 73 aus der Hydroxamsäure-Leitstruktur 62.

5.2 Syntheseplanung

Als Edukt zur Synthese von **73** bietet sich die bereits vorgestellte Verbindung **51** an. Aufgrund der NH-Azidität von *O*-benzylgeschützten Hydroxamsäuren (vgl. **LXXVI** in Schema 45) könnte eine basenkatalysierte Acetylierung an der Stickstofffunktion von **51** zum gewünschten Intermediat **72** führen. ^{214, 215} Wie in Schema 45 retrosynthetisch dargelegt, könnte eine TMSBr-unterstützte Phosphonsäureesterhydrolyse **LXXVII** sowie eine anschließende katalytische Hydrogenolyse die Zielverbindung **73** ergeben.

Schema 45. Retrosynthetische Planung zur Gewinnung der Zielverbindung 73.

5.3 Synthese

Die Acetylierung von **51** zur Gewinnung von **72** gelang in THF unter Zugabe von zwei Äquivalenten Acetanhydrid und gleichzeitiger Anwesenheit von einem Äquivalent Pyridin. Nach zweistündigem Erhitzen unter Rückflussbedingungen konnte **72** in 68 %iger Ausbeute als farbloser Feststoff durch mehrmaliges Umkristallisieren erhalten werden (Schema 46). Die anschließende Phosphonsäureesterhydrolyse erbrachte **LXXVII** nicht analysenrein, weshalb das Rohprodukt in bekannter Weise direkt weiter zum Benzylesterderivat **74** umgesetzt wurde. Die anschließende säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel erbrachte die Verbindung in 47 %iger Ausbeute als kristallinen Feststoff. Nach palladiumkatalysierter Hydrogenolyse in Methanol entstand jedoch ein Produktgemisch.

Schema 46. Syntheseweg zur Zielverbindung 73.

Wahrscheinlich führte die Anwesenheit des nukleophilen Methanols zur unerwünschten Desacetylierung von **73**, da durch Verwendung des aprotischen Lösungsmittel THF die Zielverbindung zum überwiegenden Teil rein erhalten werden konnte, wobei noch immer unerwünschte Nebenprodukte entstanden (Schema 46). Trotzdem ist die durch HPLC-Analyse bestimmte Reinheit von 92 % für eine vorläufige *In vitro* Bestimmung der antiplasmodialen Eigenschaften ausreichend.

5.4 IR-spektroskopische Eigenschaften

In Abbildung 54 sind die IR-Spektren von **51** und **72** gezeigt. Die *O*-benzylgeschützte Hydroxamsäure **51** weist als bedeutenden Unterschied eine N-H-Gruppe auf, was sich am Auftreten der Valenzschwingungsbande bei 3182 cm⁻¹ belegen

lässt. Vor allem wird durch die weitere Carbonylfunktion der Imidgruppe von **72** eine feine, hypsochrom verschobene Aufspaltung der Carbonyl-Valenzschwingung unterschiedlicher Intensität erzeugt (1724, 1708 cm⁻¹, Abbildung 54 unten). Die *O*-benzylgeschützte Hydroxamsäurefunktion von **51** weist dagegen eine schwächer und breiter ausgeprägte Absorptionsbande bei 1671 cm⁻¹ auf (Abbildung 54 oben).

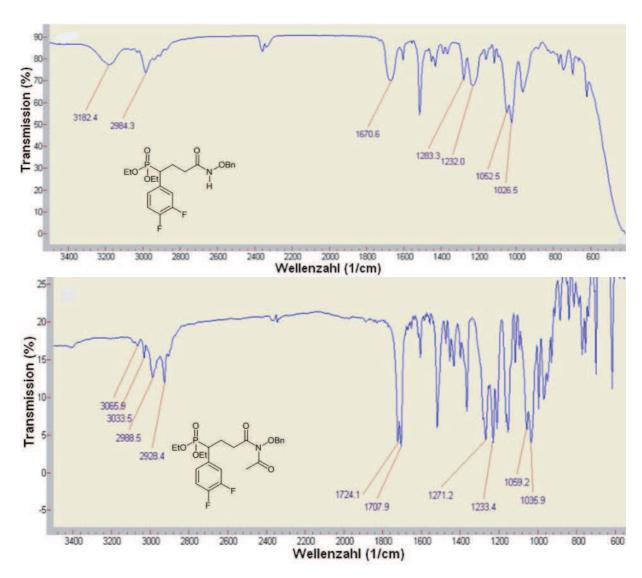


Abbildung 54. IR-Spektren von 51 (oben; NaCl-Film) und 72 (unten; KBr-Pressling).

5.5 Biologische Eigenschaften

Das *N*-Hydroxyimid-Analogon **73** wies weder gg. der *Pf*Dxr noch gg. dem *P.f.* K1-Stamm inhibitorische Aktivität auf. Damit ist gezeigt, dass auch die Modifikation der inversen Hydroxamsäuregruppe in eine chemisch verwandte Funktion zum Wirkverlust führt. Nach derzeitigem Wissensstand ist die Hydroxamsäurefunktion für

eine mit Fosmidomycin vergleichbare inhibitorische Aktivität gg. Dxr-Enzymen essenziell.

6 Phosphonsäureesterprodrugs ausgewählter inverser Hydroxamsäureanaloga Fosmidomycins

6.1 Rationale

In der Einleitung dieser Arbeit wurde bereits auf Phosphonsäureesterprodrugs von FR900098 und Fosmidomycin-Analoga hingewiesen. 146, 147, 149, 170, 217 Darüber hinaus hat Schlüter verschiedene Esterprodrugtypen Fosmidomycins untersucht. 206

R¹ =
$$\frac{O}{V_{R_1}}$$
 R² = Fosmidomycin-Analogon

$$R^1 = \frac{O}{V_{R_2}}$$

$$R^2 = \text{Fosmidomycin-Analogon}$$

$$R^1 = \frac{O}{V_{R_2}}$$

$$R^1 = \frac{O}{V_{R_2}}$$

$$Typ 1$$

$$Typ 2$$

$$R^1 = \frac{O}{V_{R_2}}$$

$$Typ 2$$

Schema 47. Literaturbekannte Phosphonsäuredoppelesterprodrugfunktionen mit verbesserter In vitro- und In vivo Aktivität von Fosmidomycinanaloga und FR900098.

Typ 3

Die lipophilen Phosphonsäureesterprodrugs zeigen sowohl im Zellkulturassay als auch in vivo eine verbesserte Aktivität. Zusammenfassend können bisher drei Prodrug-Typen mit aktivitätsverbessernder Eigenschaft ausgemacht werden. Gemeinsames Strukturelement aller Esterfunktionen ist die acylalische Verknüpfung Phosphonsäure- und Carbon- oder Kohlensäurederivat, weshalb zwischen korrekterweise die Bezeichnung Phosphonsäuredoppelesterprodrug gewählt wird. 3 beinhalten eine Acetaldehydstruktur, Typ und Typ eine Formaldehydverknüpfung (Schema 47). Ein wesentlicher Nachteil des Einbaus von Acetaldehyd in die acylalische Verknüpfung (Typ 1 und 3) ist die damit verbundene Einführung weiterer Stereozentren in die Prodrugfunktion (siehe Abbildung 55).

$$R^{1}$$
 R^{2} R^{1} R^{2} R^{3} R^{4} R^{2} R^{1} R^{2} R^{3} R^{4} R^{2} R^{4} R^{2} R^{4} R^{2} R^{4} R^{5} R^{2} R^{4} R^{5} R^{2} R^{4} R^{2} R^{4} R^{5} R^{5

Abbildung 55. Stereochemische Eigenschaften von Phosphonsäuredoppelesterprodrugs α -Aryl-substituierter Fosmidomycinanaloga.

Deshalb wurden im Folgenden POM-Doppelesterprodrugs vom Typ 2 ausgewählt, die eine Methylenfunktion als acylalische Verknüpfung enthalten (Abbildung 56). Darüber hinaus sind POM-Prodrugs synthetisch leicht zugänglich und das dafür benötigte Alkylanz kommerziell erwerblich.

POM-Prodrugs von 17, 18, 19:

$$Ar = Ph$$

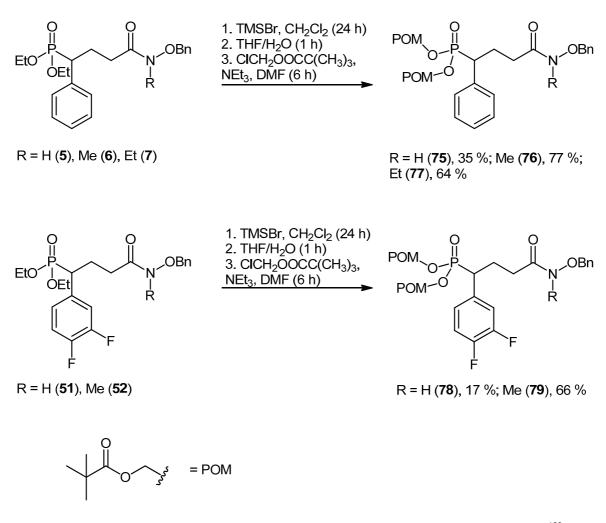
 $R^1 = t - C_4 H_9$
 $R^2 = H$ (80), Me (81), Et (82)
POM-Prodrugs von 70, 62:
 $Ar = 3,4$ -F-Ph
 $R^1 = t - C_4 H_9$
 $R^2 = H$ (83), Me (84)

Abbildung 56. Angestrebte Phosphonsäuredoppelesterprodrugs.

Im Folgenden wird die Synthese und biologische Aktivität von POM-Prodrugs ausgewählter hochaktiver inverser Hydroxamsäureanaloga Fosmidomycins aus dieser Arbeit beschrieben. Dafür wurden POM-Prodrugs der Phenylderivate 17, 18, 19, und der hochaktiven Derivate 62 und 70 synthetisiert und biologisch untersucht.

6.2 Synthese

Ausgehend von den *O*-benzylgeschützten Hydroxamsäure-Vorstufen **5-7** sowie **51** und **52** wurde zunächst eine TMSBr-unterstützte Hydrolyse der Phosphonsäurediethylesterfunktionen durchgeführt. Anschließend konnte nach der Methode von *Kurz und anderen Arbeitsgruppen* das resultierende Rohprodukt mit der acylalischen Esterfunktion alkyliert werden (Schema 48).¹⁸³ Die anschließende Säulenchromatographie erbrachte die Zwischenprodukte **75-79** in Ausbeuten von 35-77 % als Öle. Aus ungeklärten Gründen konnte **78** auf diesem Syntheseweg nur in 17 %iger Ausbeute erhalten werden.



Schema 48. Einführung der POM-Gruppe durch Alkylierung von Phosphonsäuren in DMF. 183

Um zu den gewünschten Endprodukten 80-84 zu gelangen, wurden die Hydroxamsäure-Benzylschutzgruppen durch katalytische Hydrierung reduktiv abgespalten und die gewünschten Endprodukte als hochviskose Öle erhalten (Schema 49).

Schema 49. Synthese der POM-Prodrugs 80-84.

6.3 Ergebnisse und Diskussion der biologischen Untersuchungen

Die wachstumshemmende Aktivität der POM-Prodrugs gg. *P. falciparum* wurde wiederum an *P.f.* K1 bestimmt. Zum Vergleich sind die IC₅₀-Werte der freien Wirkformen (Spalte 4) sowie der POM-Prodrugs der Referenzen Fosmidomycin und FR900098 aufgeführt (FOS- und FR900098-POM; Tabelle 11). Außerdem sind die Inhibitionskonstanten der POM-Prodrugs gg. dem Wachstum von MRC-5-Zellen gemessen worden, um eine Abschätzung der Zytotoxizität vornehmen zu können (Tabelle 11).

Mit Ausnahme der Verbindungen **82** und **83** weisen die Prodrugs in unterschiedlichem Maße verglichen mit den freien Phosphonsäure-Wirkformen noch einmal verbesserte antiplasmodiale Eigenschaften *in vitro* auf.

Verbindung	<i>P.f</i> .K1 IC ₅₀ [μΜ]	MRC-5 CC ₅₀ [μΜ]	<i>P.f.</i> K1 IC ₅₀ [μΜ] der Wirkform
80	2,0 +/- 0,67 (n = 4)	32 +/- 16 (n = 4)	17: 2,7 +/- 2,3 (n = 10)
81	0,17 +/- 0,06 (n = 6)	59 +/- 13 (n = 6)	18: 0,48 +/- 0,29 (n = 8)
82	1,6 +/- 0,89 (n = 4)	>64 (n = 5)	19: 1,3 +/- 1,5 (n = 5)
83	0,52 +/- 0,16 (n = 3)	38 +/- 13 (n =3)	70 : 0,38 +/- 0,17 (n = 8)
84	0,08 +/- 0,06 (n = 3)	38 +/- 4 (n = 3)	62: 0,29 +/- 0,20 (n = 10)
FR900098-POM	0,17 +/- 0,11 (n = 6)	59 +/- 13 (n = 6)	FR900098- Mononatrium: 1,24 +/- 1,01 (n = 8)
FOS-POM	1,7 +/- 0,75 (n = 4)	58 +/- 13 (n = 4)	Fosmidomycin- Monoatrium: 3,00 +/- 2,58 (n = 7)

Tabelle 11. In vitro Aktivität der POM-Prodrugs von ausgewählten Fosmidomycin-Analoga.

Derzeit ist geplant, weiterführende Studien im *In vivo* Mausmodell durchzuführen. Darin soll aufgeklärt werden, inwieweit die vorgestellten Phosphonsäuredoppelesterprodrugs in einem Organismus gg. Malaria-Infektionen - verglichen mit den freien Phosphonsäuren wie z.B. **62** und **70** - verbesserte Wirksamkeit erbringen.

7 Experimenteller Teil

7.1 Verzeichnis der Geräte und Analysemethoden

Schmelzpunkte

Mettler FP 62, Mettler FP 5

IR-Spektren

Varian 800 FT-IR Scimitar series

Die Aufnahme der IR-Spektren erfolgte für Feststoffe in Form von KBr-Presslingen und für flüssige Substanzen als Filme auf NaCl-Platte (im Text als *KBr* oder *NaCl* gekennzeichnet) vermessen.

¹H-NMR-Spektren

Universität Hamburg: Bruker AMX 400 (400 MHz),

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf: Bruker Avance DRX 200 (200 MHz), Bruker Avance DRX 500 (500 MHz)

Die Angabe der chemischen Verschiebung der δ -Werte erfolgt in ppm. Als interner Standard wurde TMS (Tetramethylsilan) verwendet. Die Ermittlung der Protononenverhältnisse erfolgte durch Integration. Die Abkürzung der durch Spin-Kopplung auftretenden Signalmultiplizitäten ist s für Singulett, d für Duplett, t für Triplett, q für Quartett, p für Pentett und m für Multiplett. Die Angabe der Kopplungskonstanten J erfolgt in Hz, für Spin-Spin-Systeme höherer Ordnung nur bei vollständig aufgelösten Signalsätzen.

¹³C-NMR-Spektren

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf: Bruker Avance DRX 500 (125 MHz)

Die Angabe der chemischen Verschiebung der δ -Werte erfolgt in ppm. Als interner Standard wurde TMS (Tetramethylsilan) eingesetzt. Die Abkürzung der durch Spin-Kopplung auftretenden Signalmultiplizitäten ist s für Singulett- und d für Duplettsignale. Die Angabe der Kopplungskonstanten J erfolgt in Hz, für Spin-Spin-Systeme höherer Ordnung nur für vollständig aufgelöste Signalsätze.

133

³¹P-NMR-Spektren

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf: Bruker Avance DRX 200 (200 MHz), Bruker

Avance DRX 500 (500 MHz)

<u>Elementaranalyse</u>

Universität Hamburg: Heraeus CHN-O-Rapid,

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf: Perkin Elmer PE 2400 CHN Elemental

Analyser (Zentrale Einrichtung der Chemie und Pharmazie)

<u>Massenspektrometrie</u>

Finnigan MAT 8200 System

Chromatographische Verfahren

Dünnschichtchromatographische Untersuchungen wurden an DC-Aluminiumplatten, beschichtet mit Kieselgel 60 und Fluoreszenzindikator (F_{254}), der Firma Merck durchgeführt. Die Chromatographie erfolgte über eine Laufstrecke von 5-7 cm unter Kammersättigung, detektiert wurde die Fluoreszenzlöschung bei einer Wellenlänge

von 254 nm.

Für säulenchromatographische Reinigungen wurde das Kieselgel der Firma Fluka

Silica 230-400, aktiv 60 Å, verwendet.

Analytische HPLC-Chromatographie erfolgte analog zu einem literaturbekannten Verfahren mithilfe des Elite LaChrom Systems [Hitachi L-2130 (Pumpe) und L-2400 (UV-Detektor)], Säule: Phenomenex Luna C-18(2), 1.8 μ m Partikelgröße (250 mm x 4,6 mm), Vorsäule: Phenomenex Security Guard Cartridge Kit C18 (4,0 mm x

3,0 mm).

Trockenmittel für organische Phasen

Wasserfreies Magnesium- oder Natriumsulfat

7.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)

Synthese von Diethyl (3-bromo-1-phenylpropyl)phosphonat **25** und Diethyl [3-bromo-1-(naphthalen-1-yl)propyl]phosphonat **28** in Anlehnung an Literatur 183 (**AAV1**).

40 mmol des entsprechenden Arylmethylphosphonsäurediethylesters werden mit 50 mL trockenem Toluen in einem 250 mL Zweihalskolben gelöst. Unter Schutzgasatmosphäre wird die Lösung auf circa -78 ℃ gekühlt und unter Rühren über eine Spritze mit 40 mmol *n*-Butyllithium (1.6M Lösung in *n*-Hexan) versetzt. §§§§§§§§§ Die resultierende Suspension wird bei -78 ℃ für eine Stunde gerührt und anschließend werden in einer Portion 160 mmol 1,2-Dibromethan ebenfalls per Spritze hinzugegeben. Das Gemisch wird auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Danach werden 100 mL gesättigte, wässrige Ammoniumchlorid-Lösung hinzugegeben und die wässrige Phase mit zweimal 50 mL Ethylacetat im Scheidetrichter extrahiert. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer im Vakuum eingeengt. Anschließend wird 25 mittels einer säulenchromatographischen Trennung an Kieselgel mit einem 1:1-Gemisch aus Ethylacetat und *n*-Hexan als Elutionsmittel in Form eines farblosen Öls rein erhalten. 28 fällt nach Aufnahme in wenige mL Diethylether und Zugabe von wenigen Tropfen *n*-Hexan im Eisfach des Kühlschranks als weißer Feststoff aus.

Synthese des S-[3-(diethoxyphosphoryl)-3-phenylpropyl]-thioacetats **26** (**AAV2**).

5 mmol von **25** werden in 20 mL DMF gelöst und bei RT mit einem 1,25-fachem Überschuss an Kaliumthioacetat versetzt. Nach einstündigem Rühren ist die Reaktion laut dünnschichtchromatographischer Kontrolle (Fließmittel: Ethylacetat/ *n*-Hexan 1:1) abgeschlossen, es fällt ein weißes Nebenprodukt aus. Der Ansatz wird mit 50 mL Ethylacetat versetzt und mit 2 x 30 mL demineralisiertem Wasser, 2 x 30 mL wässriger 5 %iger Natriumsulfit-Lösung und abschließend 30 mL Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum am Rotationsverdampfer entfernt. Die Säulenchromatographie an Kieselgel mit Ethylacetat als Elutionsmittel liefert **26** als farbloses Öl.

-

^{§§§§§§§§} Aufgrund der Entstehung des entsprechenden Lithiumsalzes kann es zur Bildung eines Feststoffes kommen, so dass die Suspension gefriert.

TMSBr- unterstützte Phosphonsäurediethylester-Spaltung mit anschließender Hydrolyse in Anlehnung an Literatur 183 zur Gewinnung der freien Phosphonsäuren 9, 23, 27, 36, 57-60 (AAV3).

1 mmol Phosphonsäureester wird in 10 mL Dichlormethan, welches durch Lagerung über Calciumhydrid getrocknet worden ist, gelöst. Dann werden unter Eiskühlung 6 mmol Trimethylsilylbromid (TMSBr) zugetropft. Der Ansatz wird unter langsamem Erwärmen auf RT für 24 Stunden gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wird in 10 mL trockenem Tetrahydrofuran gelöst. Nach Zugabe von wenigen Tropfen Wasser wird für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend alle flüchtigen Bestandteile am Rotationsverdampfer entfernt. Überschüssiges Wasser wird durch Trocknen unter stark vermindertem Druck entfernt.

Michaelis-Arbusov-Reaktion von Alkylhalogeniden mit Triethylphosphit (TEP) in Anlehnung an Literatur 182 zur Gewinnung von Tetraethyl [1-(naphthalen-1-yl)propan-1,3-diyl]bisphosphonat (29) (AAV4).

100 mmol TEP werden in einem 500 mL Einhalskolben auf 160 °C erwärmt, 15 mmol von 28 hinzugegeben und die Lösung eine Stunde bei 160 °C ohne Rückflusskühlung gerührt. Danach wird der Kolben auf 180 °C erwärmt und die aufsitzende Rückflusskühlung angestellt. Das Produktgemisch wird am Rotationsverdampfer bei 80 °C und vermindertem Druck von überschüssigem TEP getrennt. Der resultierende Rückstand wird an Kieselgel mit folgendem Elutionsmittelgradienten getrennt: Ethylacetat/n-Hexan (1:1) → Ethylacetat (100 %) → Ethylacetat/Methanol (5:1). 28 wird nach Entfernen aller Lösemittel unter vermindertem Druck als hellgelbes Öl erhalten.

Synthese der Phosphonsäuredibenzylester 14-16, 30, 33, 65-68 und 74 in Anlehnung an Literatur 185 (AAV5).

Das Rohprodukt aus der TMSBr-vermittelten Phosphonsäureesterspaltung (**AAV4**) wird für jede zu alkylierende Phosphonsäurefunktion mit der entsprechend zweifach äquivalenten Menge an **LXVII** versetzt. Durch Zugabe von 30 mL Benzen wird eine Lösung hergestellt, die für vier Stunden unter Rückfluss erhitzt wird.

^{***********}Der Fortschritt der Reaktion wird unter anderem durch das Ausfallen von schwerlöslichem *N,N'*-Dicyclohexylharnstoff visuell erkennbar.

Abkühlen der Suspension wird der Rückstand vorsichtig am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck reduziert und anschließend mit 20 mL Ethylacetat versetzt. Das entstandene Harnstoff-Nebenprodukt wird abfiltriert und die organische Phase mit 2 x 10 mL gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung ausgeschüttelt. Danach wird die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck eingeengt. Das Produkt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Ethylacetat/n-Hexan (1:1) → Ethylacetat (100 %) in Form eines Elutionsmittel-Gradienten isoliert.

Palladium/Kohle-katalysierte Hydrogenolyse zur Gewinnung von 10-13, 17-20, 24, 31, 35, 61-64, 69-71, 73 und 80-84 (AAV6).

1 mmol der benzylgeschützten Vorstufe wird in einem Druckgefäß in 20 mL Methanol (frisch destilliert) gelöst und mit einer Spatelspitze Aktivkohle-Palladium-Katalysator (10 %) versetzt. Nachdem das Gefäß evakuiert ist, wird Wasserstoff eingeleitet, bis im Gefäß ein Überdruck von 1,5 bar vorliegt. Unter diesem Druck wird für die Freisetzung von Hydroxamsäure- oder Hydroxycarbamatfunktion 1,5 Stunden und für die Freisetzung von Phosphonsäuregruppen drei Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Für die Hydrogenolyse von 19 muss anstelle von Methanol THF als Lösemittel verwendet und mit H₂ bei Atmosphärendruck geschüttelt werden. Anschließend wird belüftet, der Katalysator durch Filtration über eine SPE-Kartusche (Supelco SupercleanTM, LC-18, 6 mL) entfernt und das Filtrat Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck eingeengt.

Synthese des O-benzylgeschützten Hydroxycarbamats 32 aus LXXI (AAV7).

2 mmol (0,754 g) des Hydroxylamins **LXXI** werden in 5 mL frisch destilliertem Dichlormethan mit 2,2 mmol wasserfreiem Pyridin gelöst und unter Eiskühlung mit 2,2 mmol Chlorameisensäuremethylester (gelöst in 5 mL frisch destilliertem Dichlormethan) durch langsames Zutropfen versetzt. Sofort entsteht eine hellgelb gefärbte Suspension. Bei Raumtemperatur wird noch eine Stunde gerührt, die Suspension anschließend am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck von flüchtigen Bestandteilen getrennt, filtriert und der Rückstand in 50 mL Ethylacetat aufgenommen. Die Lösung wird mit 3 x 20 mL wässriger, 1M Salzsäure ausgeschüttelt und abschließend mit 30 mL Wasser ausgeschüttelt. Die resultierende organische Lösung wird über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und am

Rotationsverdampfer werden unter vermindertem Druck Lösemittelreste verdampft. Nach Lösen des Rückstandes in 10 mL Diethylether und Lagerung im Eisfach des Kühlschranks fällt **32** über Nacht als weißer Feststoff aus.

Synthese der Bis(pivaloyloxymethyl)-Phosphonsäureester **34**, **75-77** und **78-79** in Anlehnung an Literatur 183 (**AAV8**).

3 mmol des Produkts aus der TMSBr-vermittelten Hydrolyse der jeweiligen Diethylesteredukte werden in 30 mL trockenem DMF gelöst. Nach Zugabe von 9 mmol Triethylamin und 30 mmol Chloromethylpivalat wird der Ansatz unter Feuchtigkeitsausschluss für zwei Stunden bei 70 °C gerührt und zweimal nach jeweils zwei weiteren Stunden mit 3 mmol Triethylamin und 5 mmol Alkylanz versetzt. Anschließend wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wird in 50 ml Diethylether aufgenommen und einmal mit 25 mL demineralisiertem Wasser, zweimal mit je 25 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und einmal mit demineralisiertem Wasser gewaschen. Die Etherphase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer wird unter vermindertem Druck Lösemittel vorsichtig verdampft. Das erhaltene Produkt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt.

Synthese der Dioxolanverbindungen 1 und 37-40 durch Alkylierung der entsprechenden Arylmethylphosphonate in Anlehnung an Literatur 206 (AAV9).

40 mmol Arylmethylphosphonsäurediethylester werden in 50 mL trockenem Toluen gelöst. Die Lösung wird unter Inertgasatmosphäre auf -78 °C gekühlt. Nach Zugabe von 44 mmol n-Butyllithium (1,6M in n-Hexan) wird für eine Stunde bei -78 °C gerührt. Anschließend werden 40 mmol **LVI** dazu gegeben. Der Ansatz wird über Nacht gerührt und dabei langsam aufgetaut. Danach wird der Reaktionsansatz in 10 %ige wässrige Ammoniumchlorid-Lösung gegeben und mit Ethylacetat im Scheidetrichter extrahiert. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, Lösemittelreste werden am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck entfernt und das resultierende Öl säulenchromatographisch an Kieselgel mit Ethylacetat/n-Hexan (Gradient: $1:2 \rightarrow 1:1$) gereinigt.

Gewinnung der Aldehydverbindungen 2 und 41-44 aus den Dioxolanverbindungen 1 und 37-40 in Anlehnung an Literatur 206 (AAV10).

15 mmol des jeweiligen Dioxolans werden mit 50 mL wässriger 2M Salzsäure und 30 mL Aceton versetzt, für drei Stunden bei 50 °C zum Rückfluss erhitzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird überschüssiges Aceton am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck entfernt und die wässrige Phase mit 3 x 30 mL Dichlormethan extrahiert. Die Dichlormethan-Phasen werden vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und die organische Lösung am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck eingeengt. Anschließend wird das resultierende Öl an Kieselgel mit Ethylacetat/n-Hexan (1:1) säulenchromatographisch gesäubert.

Synthese der Carbonsäuren 3, 4 und 44-48 aus den entsprechenden Aldehydverbindungen 2, LVII und 41-44 durch Selendioxid-unterstützte Oxidation in Anlehnung an Literatur 188 (AAV11).

5 mmol des entsprechenden Aldehyds werden in 7,5 mL THF gelöst und mit 1,1 mL 30 %iger, wässriger Wasserstoffperoxid-Lösung und 0,28 g Selendioxid versetzt. Die Lösung wird für vier Stunden zum Rückfluss erhitzt, abgekühlt und abschließend das Produkt am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck von flüchtigen Bestandteilen abgetrennt. 50 mL Ethylacetat werden hinzugegeben und die resultierende Lösung mit 3 x 10 mL wässriger 1M Salzsäure ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck von Lösemittelrückständen abgetrennt. Das resultierende Öl wird in 20 mL Diethylether aufgenommen und bei 7 °C gelagert, so dass die Produkte als weiße Feststoffe ausfallen.

Synthese von *O*-benzylgeschützten Hydroxamsäuren **5-7**, **21**, **22**, **49-56** nach 1,1′-Carbonyldiimidazol-vermittelter Aktivierung der korrespondierenden Carbonsäuren **3**, **4** und **44-48** (**AAV12**).

Zu einer Lösung von 1 mmol der entsprechenden Carbonsäureverbindung in 10 mL destilliertem Dichlormethan werden unter Ausschluss von Feuchtigkeit 1,1 mmol 1,1´-Carbonyldiimidazol in kleinen Portionen zugegeben. Nach 45 Minuten Rühren bei Raumtemperatur wird 1 mmol des entsprechenden *O*-benzylgeschützten Hydroxylamins zum Ansatz hinzugefügt. Die Lösung wird über Nacht gerührt und

anschließend am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck eingeengt. Der Rückstand wird in 30 mL Ethylacetat aufgenommen, dreimal mit 10 mL wässriger 10 %iger Zitronensäurelösung und einmal mit 10 mL wässriger, gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Die flüssige organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck werden Lösemittelbestandteile abgetrennt. Anschließend wird der ölige Rückstand an Kieselgel mit Ethylacetat als Elutionsmittel säulenchromatographisch gereinigt.

Synthese der *O*-benzylgeschützten *N*-lsopropyl-Hydroxamsäure **8** aus der Carbonsäure **3** (**AAV13**).

4,66 mmol der Carbonsäure 3 werden in 10 mL trockenem Toluen gelöst und bei Raumtemperatur weitere 0,3 mL DMF hinzugegeben. Unter Eiskühlung werden 1,88 mL Oxalylchlorid (in 10 mL trockenem Toluen gelöst) durch einen Tropftrichter zugetropft und anschließend bei Raumtemperatur für zwei Stunden gerührt. Der Ansatz wird danach am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck von flüchtigen Bestandteilen getrennt. Der Rückstand wird vom unlöslichen Nebenprodukt abdekantiert, Toluen nachgespült und mit Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck von Lösemitteln abgetrennt. Der ölige Rückstand wird in 5 mL trockenem Dichlormethan gelöst und zu einer eisgekühlten Lösung von 4,66 mmol LIV und 9,32 mmol Pyridin - gelöst in 10 mL trockenem Dichlormethan - langsam über einen Tropftrichter zugetropft. Bei Raumtemperatur wird noch über Nacht gerührt. Anschließend wird nach mehrmaligem Waschen mit wässriger 10 %iger Zitronensäurelösung und wässriger, gesättigter Natiumhydrogencarbonat-Lösung die organische Phase Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck von flüchtigen Bestandteilen getrennt. Das resultierende Ol wird säulenchromatographisch Kieselgel Ethylacetat/*n*-Hexan mit an (1:1)als Elutionsmittel gereinigt, so dass 8 als hellgelbes Öl resultiert.

Synthese des *O*-benzylgeschützten Acetohydroxyimids **72** durch Acetylierung von **51** (AAV14).

1 mmol der *O*-benzylgeschützten Hydroxamsäure **51** wird in 10 mL THF gelöst und mit 1 mmol Pyridin sowie 2 mmol Acetanhydrid versetzt. Der Ansatz wird für zwei

Stunden zum Rückfluss erhitzt, danach bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Nach Zugabe von 30 mL Ethylacetat wird die Lösung mit 20 mL demineralisiertem Wasser und 3 x 20 mL gesättigter, wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck wird Lösemittel verdampft. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel mit Ethylacetat/ n-Hexan (1:1) als Elutionsmittel wird am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck die resultierende Lösung verdampft. Das Produkt 72 fällt daraufhin als weißer Feststoff an, welcher in Diethylether im Eisfach umkristallisiert wird.

7.3. Analytische Daten zu Kapitel 2

2-(3-Diethoxyphosphoryl-3-phenyl-propyl)-1,3-dioxolan 1

Hergestellt aus 9,13 g **LV** (40 mmol) und 7,24 g **LVI** (40 mmol) nach **AAV9** und anschließender fraktionierender Destillation über eine Vigreux-Kolonne im Hochvakuum.

Ausbeute: 92 %, farbloses Öl

Siedepunkt: 160 °C (8 x 10⁻¹ mbar)

IR \tilde{v} (NaCl): 1244 cm⁻¹ (P=O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 1.01 (t, 3H, J = 7 Hz, CH₃), 1.19 (t,

3H, J = 7 Hz, CH_2CH_3), 1.30-1.34 (m, 1H, $CHCH_2CH_2$), 1.44-1.49 (m, 1H, $CHCH_2CH_2$), 1.82-1.96 (m, 1H, $CHCH_2$), 1.99-2.12 (m, 1H, $CHCH_2$), 3.16-3.19 (m, 1H, CH), 3.66-3.89 (m, 6H, 2 x CH_3CH_2 , 1 x $HCOOCH_2$), 3.92-4.02 (m, 2H, $HCOOCH_2$), 4.73 (t,

J = 4.6 Hz, 1H, HCOO), 7.24-7.35 (m, 5H, aromat.)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 15.9 (d, ${}^3J_{C-P} = 5.6$ Hz, CH₃), 16.2

(d, ${}^3J_{\text{C-P}} = 5.3 \text{ Hz}$, CH₃), 23.8 (CH₂CH₂), 31.1 (d ${}^2J_{\text{C-P}} = 14.7 \text{ Hz}$, CHCH₂), 42.4 (d, ${}^1J_{\text{C-P}} = 136.5 \text{ Hz}$, PCH), 61.1 (d, ${}^2J_{\text{C-P}} = 7.3 \text{ Hz}$, CH₃CH₂), 61.5 (d, ${}^2J_{\text{C-P}} = 6.9 \text{ Hz}$, CH₃CH₂), 64.1 (HCOOCH₂), 64.2 (HCOOCH₂), 102.9, 126.8, 128.2, 128.9, 129.0, 136.2

(aromat.)

 $C_{16}H_{25}O_5P$ [328.34]

Ber.[%]: C 58.53 H 7.67 Gef.[%] C 58.26 H 7.89

4-Diethoxyphosphoryl-4-phenyl-butanal 2

Hergestellt aus 9,85 g **1** (30 mmol) nach **AAV10** und anschließende Säulenchromatographie über Kieselgel 60 (Elutionsmittel: EtOAc) oder fraktionierende Destillation über eine Vigreux-Kollone im Hochvakuum.

Ausbeute: 85 %, farbloses Öl

Siedepunkt: 136 °C (2 x 10⁻² mbar)

IR \tilde{v} (NaCl): 1731 cm⁻¹ (C=O), 1244 cm⁻¹ (P=O), 1027 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 1.02 (t, J = 6.9 Hz, 3H, CH₃), 1.21

(t, J = 6.9 Hz, 3H, CH₃), 1.99-2.09 (m, 1H, 1H, CHC H_2), 2.19-2.39 (m, 3H, CH₂C H_2 , CHC H_2), 3.18 (ddd, J = 22.2, 11.2, 3.5 Hz, 1H, PCH), 3.68-3.75 (m, 1H, CH₃C H_2), 3.78-3.86 (m, 1H, CH₃C H_2), 3.98 (dd, J = 6.8, 13.6 Hz, 2H, CH₃C H_2), 7.25-7.33 (m,

5H, aromat.), 9.56 (s. 1H, CHO)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 15.9 (d, ${}^3J_{G-P} = 5.7$ Hz, CH₃), 16.2

(d, ${}^3J_{\text{C-P}} = 5.7 \text{ Hz}$, CH₃), 22.1 (CH₂CH₂), 40.9 (d, ${}^2J_{\text{C-P}} = 14.3 \text{ Hz}$, CHCH₂), 42.4 (d, ${}^1J_{\text{C-P}} = 137 \text{ Hz}$, PCH), 61.2 (d, ${}^2J_{\text{C-P}} = 6.2 \text{ Hz}$, CH₃CH₂), 61.6 (d, ${}^2J_{\text{C-P}} = 6.5 \text{ Hz}$, CH₃CH₂), 126.9, 128.3, 129.1 (d, ${}^3J_{\text{C-P}} = 6.7 \text{ Hz}$), 135.8 (d, ${}^2J_{\text{C-P}} = 6.5 \text{ Hz}$, aromat.), 202.5 (C=O)

 $C_{14}H_{21}O_4P$ [284.29]

Ber.[%]: C 59.15 H 7.45 Gef.[%] C 59.12 H 7.70

4-Diethoxyphosphoryl-4-phenyl-butansäure 3

Hergestellt aus 1,42 g 2 (5 mmol) nach AAV11.

Ausbeute: 92 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 108 ℃

IR \tilde{v} (KBr): 1724 cm⁻¹ (C=O), 1217 cm⁻¹ (P=O), 1025 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 1.02 (t, J = 7.04 Hz, 3H, CH₃), 1.21

(t, J = 7.04 Hz, 3H, CH₃), 2.01-2.05 (m, 3H, CH₂C H_2 , CHC H_2), 2.16-2.19 (m, 1H, CHC H_2), 3.17-3.21 (m, 1H, PCH), 3.75-3.79 (m, 2H, C H_2 CH₃), 3.96-4.00 (m, 2H, C H_2 CH₃), 7.25-7.32 (m, 5H,

aromat.), 12.09 (s, 1H, OH)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 16.4 (d, ${}^3J_{\text{C-P}} = 5.5$ Hz, CH₃), 16.6

(d, ${}^3J_{\text{C-P}} = 5.5 \text{ Hz}$, CH₃), 25.3 (d, ${}^3J_{\text{C-P}} = 5.6 \text{ Hz}$, CH₂CH₂), 31.8 (d, ${}^2J_{\text{C-P}} = 15.2 \text{ Hz}$, CHCH₂), 41.8 (d, ${}^1J_{\text{C-P}} = 130 \text{ Hz}$, PCH), 61.7 (d, ${}^2J_{\text{C-P}} = 6.8 \text{ Hz}$, CH₃CH₂), 62.1 (d, ${}^2J_{\text{C-P}} = 6.8 \text{ Hz}$, CH₃CH₂), 127.4, 128.7, 129.4 (d, ${}^3J_{\text{C-P}} = 6.7 \text{ Hz}$), 136.2 (d, ${}^2J_{\text{C-P}} = 6.9 \text{ Hz}$,

aromat.), 174.1 (C=O)

 $C_{14}H_{21}O_5P$ [300.29]

Ber.[%]: C 56.00 H 7.05 Gef.[%] C 56.03 H 7.22

3-Diethoxyphosphoryl-3-phenyl-propansäure 4

Hergestellt aus 1,35 g LVII (5 mmol) nach AAV11.

Ausbeute: 94 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 122,3 ℃

IR \tilde{v} (KBr): 3414 cm⁻¹ (O-H), 1714 cm⁻¹ (C=O), 1215 cm⁻¹ (P=O),

1051, 1021 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 1.05 (t, J = 7 Hz, 3H, CH₃), 1.19 (t,

J = 7 Hz, 3H, CH₃), 2.84 (dddd, J = 26.6, 20.5, 13.3, 7.4 Hz, 2H, CHC H_2), 3.53 (ddd, J = 22.3, 10.5, 4.5 Hz, 1H, PCH), 3.69-3.90 (m, 2H, C H_2 CH₃), 3.90-4.03 (m, 2H, C H_2 CH₃), 7.10-7.52 (m, 5H,

aromat.), 12.30 (s, 1H, OH)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 15.9 (d, $^3J_{C-P} = 5.5$ Hz, CH₃), 16.1

(d, ${}^{3}J_{C-P} = 5.6$ Hz, CH₃), 34.5 (CH*C*H₂), 39.5 (d, ${}^{1}J_{C-P} = 154$ Hz, PCH), 61.6 (d, ${}^{2}J_{C-P} = 7.2$ Hz, CH₃*CH*₂), 61.9 (d, ${}^{2}J_{C-P} = 6.9$ Hz, CH₃*CH*₂), 126.9 (d, ${}^{5}J_{C-P} = 2.9$ Hz), 128.1 (d, ${}^{4}J_{C-P} = 2.3$ Hz), 128.9 (d, ${}^{3}J_{C-P} = 6.3$ Hz), 135.7 (d, ${}^{2}J_{C-P} = 6.7$ Hz, aromat.), 171.6

 $(d, {}^{3}J_{C-P} = 19.1 \text{ Hz}, C=O)$

 $C_{13}H_{19}O_5P$ [286.26]

Ber.[%]: C 54.54 H 6.69 Gef.[%] C 54.29 H 6.59

N-benzyloxy-4-diethoxyphosphoryl-4-phenyl-butansäureamid 5

Hergestellt aus 0,3 g 3 (1 mmol) und 0,12 g LI nach AAV12.

Ausbeute: 80 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 54 ℃

IR \tilde{v} (KBr): 1669 cm⁻¹ (C=O), 1235 cm⁻¹ (P=O), 1060, 1029 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (400 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 1.02 (t, J = 7 Hz, 3H, CH₃), 1.21 (t,

J = 7 Hz, 3H, CH₃), 1.82 (t, J = 7.5 Hz, 2H, CH₂C H_2), 1.97-2.01 (m, 1H, CHC H_2), 2.18-2.22 (m, 1H, CHC H_2), 3.14 (ddd, J = 22.0, 11.2, 3.7 Hz, 1H, PCH), 3.73-3.77 (m, 2H, CH₃C H_2), 3.98 (m, 2H, CH₃C H_2), 4.54 (s, 0.27H, *E*-isomer, PhCH₂), 4.74 (s, 1.73H, *Z*-isomer, PhCH₂), 7.14-7.30 (m, 10H, aromat.), 10.51 (s, 0.12H,

E-isomer, NH), 10.87 (s, 0.88H, Z-isomer, NH)

¹³C-NMR: (100 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 16.4 (d, ${}^3J_{\text{C-P}} = 5.6$ Hz, CH₃). 16.6

(d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 5.6 \text{ Hz}$, CH₃), 25.6 (CH₂CH₂), 30.3 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 16.2 \text{ Hz}$. CH*C*H₂), 42.7 (d, ${}^{1}J_{\text{C-P}} = 135.8 \text{ Hz}$, PCH), 61.7 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 6.9 \text{ Hz}$, CH₃CH₂), 62.1(d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 6.8 \text{ Hz}$, CH₃CH₂), 77.1 (PhCH₂), 127.1, 127.3, 128.5, 128.7 (d, ${}^{4}J_{\text{C-P}} = 1.97 \text{ Hz}$), 129.1, 129.5 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 6.8 \text{ Hz}$), 136.2 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 7.5 \text{ Hz}$), 136.5 (aromat.), 168.9 (C=O)

 $C_{21}H_{28}NO_5P$ [405.42]

Ber.[%]: C 62.21 H 6.96 N 3.45 Gef.[%] C 62.18 H 6.98 N 3.32

N-benzyloxy-4-diethoxyphosphoryl-N-methyl-4-phenyl-butansäureamid 6

Hergestellt aus 0,3 g 3 (1 mmol) und 0,14 g LII nach AAV12.

Ausbeute: 95 %, farbloses Öl

IR \tilde{v} (NaCl): 1662 cm⁻¹ (C=O), 1244 cm⁻¹ (P=O), 1056, 1028 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (400 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 1.02 (t, J = 7 Hz, 3H, CH₃), 1.20 (t,

J = 7 Hz, 3H, CH₃), 2.09-2.11 (m, 1H, CHC H_2), 2.11-2.30 (m, 3H, CHC H_2 , CH₂C H_2), 3.06 (s, 3H, NHC H_3), 3.19 (dd, J = 22.7, 8.6 Hz, 1H, PCH), 3.54-3.88 (m, 2H, CH₃C H_2), 3.90-4.14 (m, 2H, CH₃C H_2), 4.56-4.76 (dd, $J_{qem.H.H} = 10$ Hz, 2H, PhCH₂), 6.84-7.65

(m, 10H, aromat.)

¹³C-NMR: (100 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 16.4 (d, ${}^3J_{C-P} = 5.7$ Hz, CH_2CH_3).

16.6 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}}$ = 5.6 Hz, CH₂CH₃), 24.9 (CH₂CH₂), 29.7 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}}$ = 16.5 Hz. CH*C*H₂), 32.4 (NHCH₃), 42.7 (d, ${}^{1}J_{\text{C-P}}$ = 135.9 Hz, PCH), 61.6 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}}$ = 7 Hz, CH₃CH₂), 62.0 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}}$ = 6.7 Hz, CH₃CH₂), 75.6 (PhCH₂), 127.4 (d, ${}^{4}J_{\text{C-P}}$ = 2.7 Hz), 128.8, 129.0, 129.5 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}}$ = 6.5 Hz), 129.8, 138.4 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}}$ = 6.8 Hz, aromat.), 164.1

(C=O)

 $C_{22}H_{30}NO_5P$ [419.45]

Ber.[%]: C 63.00 H 7.21 N 3.34 Gef.[%] C 62.74 H 7.23 N 3.31

N-benzyloxy-4-diethoxyphosphoryl-N-ethyl-4-phenyl-butansäureamid 7

Hergestellt aus 0,3 g 3 (1 mmol) und 0,15 g LIII nach AAV12.

Ausbeute: 98,3 %, farbloses Öl

IR \tilde{v} (NaCl): 1659 cm⁻¹ (C=O), 1243 cm⁻¹ (P=O), 1054, 1027 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 1.01 (t, J = 7 Hz, 3H, CH₃), 1.02 (t,

J = 6.93 Hz, 3H, NCH₂C H_3), 1.20 (t, J = 7 Hz, 3H, CH₃), 1.84-2.11 (m, 1H, CHC H_2), 2.11-2.39 (m, 3H, CHC H_2 , CH₂C H_2), 3.13-3.27 (m, 1H, PCH), 3.48-3.66 (m, 2H, NCH₂), 3.66-3.90 (m, 2H, CH₃C H_2), 3.90-4.17 (m, 2H, CH₃C H_2), 4.46-4.83 (m, 2H, PhCH₂),

7.03-7.60 (m, 10H, aromat.)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 12.31 (NCH₂CH₃), 16.41 (d, $^3J_{C-P} =$

5.5 Hz, OCH_2CH_3), 16.63 (d, ${}^3J_{C-P} = 5.6$ Hz, OCH_2CH_3), 24.81 (CH_2CH_2), 30.03 (d, ${}^2J_{C-P} = 15.6$ Hz. $CHCH_2$), 40.64 (NCH_2), 42.60 (d, ${}^1J_{C-P} = 135.9$ Hz, PCH), 61.64 (d, ${}^2J_{C-P} = 7.1$ Hz, CH_3CH_2), 62.04 (d, ${}^2J_{C-P} = 7$ Hz, CH_3CH_2), 75.85 ($PhCH_2$), 127.38 (d, ${}^4J_{C-P} = 2.7$ Hz), 128.77, 129.01, 129.50, 129.56, 129.71, 136.38, 136.45 (d, ${}^3J_{C-P} = 2.4$ Hz, aromat.), 173.13

(C=O)

 $C_{23}H_{32}NO_5P$ [433.48]

Ber.[%]: C 63.73 H 7.44 N 3.23 Gef.[%] C 62.45 H 7.26 N 3.35

N-benzyloxy-4-diethoxyphosphoryl-N-propan-2-yl-4-phenyl-butansäureamid 8

Hergestellt nach AAV13.

Ausbeute: 81 %, gelbes Öl

IR \tilde{v} (NaCl): 1663 cm⁻¹ (C=O), 1244 cm⁻¹ (P=O), 1053, 1028 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 1.02 (t, J = 7 Hz, 3H, CH₂CH₃),

1.11-1.18 (m, 6H, NCH(C H_3)₂), 1.20 (t, J = 7 Hz, 3H, CH₂C H_3), 1.90-2.13 (m, 1H, CHC H_2), 2.16-2.42 (m, 3H, CHC H_2 , CH₂C H_2), 3.17-3.28 (ddd, J = 21.9, 11.3, 3.5 Hz, 1H, PCH), 3.66-3.77 (ddq, J = 14.2, 10.3, 7.1 Hz, 1H, CH₃C H_2), 3.77-3.88 (m, 1H, CH₃C H_2), 3.90-4.11 (m, 2H, CH₃C H_2), 4.40 (s, 1H, NCH), 4.57-4.84 (dd, $J_{qem.H,H} = 19.0$, 9.6 Hz, 2H, PhCH₂), 7.16 (s, 2H), 7.23-7.50 (m,

8H, aromat.)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 15.95 (d, $^3J_{C-P} = 5.5$ Hz, CH_2CH_3).

16.17 (d, ${}^{3}J_{C-P} = 5.6$ Hz, $CH_{2}CH_{3}$), 19.33 ($CHCH_{3}$), 19.43 ($CHCH_{3}$), 24.36 ($CH_{2}CH_{2}$), 30.23 (d, ${}^{2}J_{C-P} = 15.7$ Hz. $CHCH_{2}$), 42.20 (d, ${}^{1}J_{C-P} = 136.6$ Hz, PCH), 49.15 (NCH), 61.19 (d, ${}^{2}J_{C-P} = 7.3$ Hz, $CH_{3}CH_{2}$), 61.58 (d, ${}^{2}J_{C-P} = 6.9$ Hz, $CH_{3}CH_{2}$), 78.39 (PhCH₂), 126.93, 128.32, 128.35, 128.53, 128.95, 129.08 (d, ${}^{3}J_{C-P} = 6.9$ Hz), 136.0 (d, ${}^{2}J_{C-P} = 6.7$ Hz), 138.31 (aromat.), 173.3

(C=O)

 $C_{24}H_{34}NO_5P$ [447.50]

Ber.[%]: C 64.41 H 7.66 N 3.13 Gef.[%] C 64.13 H 7.80 N 3.03

{4-[Benzyloxy(methyl)amino]-4-oxo-1-phenyl-butyl}phosphonsäure 9

Hergestellt aus 1,26 g 6 (3 mmol) und 2,3 g Trimethylsilylbromid (15 mmol) nach AAV3.

Ausbeute: 74 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 164 ℃

IR \tilde{v} (KBr): 3300 cm⁻¹ (O-H), 1608 cm⁻¹ (C=O), 1190, 1154 cm⁻¹ (P=O),

1080 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆), (ppm): 1.92-1.99 (m, 1H, CHC*H*₂), 2.28-

3.00 (m, 3H, CHC H_2 , CH₂C H_2), 2.87 (ddd, J = 12.7, 12.3, 6.6 Hz, 1H, PCH), 3.08 (s, 3H, NCH₃), 4.61-4.67 (m, 2H, PhCH₂), 7.18-

7.34 (m, 10H, aromat.)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 24.8 (CH₂CH₂), 29.7 (d, $^2J_{C-P} = 15.1$

Hz, CH $^{\circ}$ C

129.3, 134.3, 138.0 (d, ${}^{2}J_{C-P} = 6.4$ Hz, aromat.), 173.2 (C=O)

 $C_{18}H_{22}NO_5P$ [363.34]

Ber.[%]: C 59.50 H 6.10 N 3.85 Gef.[%] C 59.40 H 6.30 N 3.63

4-Diethoxyphosphoryl-4-phenyl-butancarbohydroxamat 10

Hergestellt aus 0,41 g 5 (1 mmol) nach AAV6.

Ausbeute: 98 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 120 ℃

IR \tilde{v} (KBr): 1649 cm⁻¹ (C=O), 1228 cm⁻¹ (P=O)

¹H-NMR: (400 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 1.02 (t, J = 6.96 Hz, 3H, CH₃), 1.21

(t, J = 6.98 Hz, 3H, CH₃), 1.79-1.84 (m, 2H, CH₂C H_2), 1.96-2.00 (m, 1H, CHC H_2), 2.18-2.23 (m, 1H, CHC H_2), 3.16-3.20 (m, 1H, PCH), 3.74-3.79 (m, 2H, CH₃C H_2), 3.95-3.99 (m, 2H, CH₃C H_2), 7.18-7.33 (m, 5H, aromat.), 8.65 (s, 0.9H, Z-Isomer, NH), 8.9 (s, 0.1H, E-Isomer, NH), 9.77 (s, 0.1H, Z-Isomer, OH), 10.27 (s,

0.9H, *E*-Isomer, OH)

¹³C-NMR: (100 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 16.4 (d, $^3J_{C-P} = 5.4$ Hz, CH₃), 16.6

(d, ${}^3J_{\text{C-P}} = 5.6 \text{ Hz}$, CH₃), 25.9 (CH₂CH₂), 30.3 (d, ${}^2J_{\text{C-P}} = 15.8 \text{ Hz}$, CHCH₂), 42.8 (d, ${}^1J_{\text{C-P}} = 135.9 \text{ Hz}$, PCH), 61.7 (d, ${}^3J_{\text{C-P}} = 6.9 \text{ Hz}$, CH₃CH₂), 62.0 (d, ${}^3J_{\text{C-P}} = 6.8 \text{ Hz}$, CH₃CH₂), 127.3 (d, ${}^5J_{\text{C-P}} = 2.7 \text{ Hz}$), 128.7 (d, ${}^4J_{\text{C-P}} = 1.9 \text{ Hz}$), 129.5 (d, ${}^3J_{\text{C-P}} = 6.7 \text{ Hz}$), 136.3 (d,

 $^{2}J_{C-P} = 6.75 \text{ Hz}, \text{ aromat.}), 168.7 (C=O)$

 $C_{14}H_{22}NO_5P$ [315.30]

Ber.[%]: C 53.33 H 7.03 N 4.44 Gef.[%] C 53.50 H 7.20 N 4.33

4-Diethoxyphosphoryl-N-hydroxy-N-methyl-4-phenyl-butansäureamid 11

Hergestellt aus 0,42 g 6 (1 mmol) nach AAV6.

Ausbeute: 99 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 97 ℃

IR \tilde{v} (KBr): 1628 cm⁻¹ (C=O), 1223 cm⁻¹ (P=O)

¹H-NMR: (200 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 1.02 (t, J = 7.05 Hz, 3H, CH₂C H_3),

1.21 (t, J = 7.03 Hz, 3H, CH_2CH_3), 2.08-2.12 (m, 4H, CH_2CH_2 , $CHCH_2$), 3.19-3.24 (m, 1H, PCH), 3.34 (s, 3H, NCH₃), 3.80-3.93 (m, 4H, CH_3CH_2), 7.18-7.33 (m, 5H, aromat.), 9.66 (s, 1H, OH)

¹³C-NMR: (100 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 16.4 (d, ${}^3J_{C-P} = 5.6$ Hz, CH_2CH_3),

16.6 (d, ${}^3J_{\text{C-P}} = 5.6$ Hz, CH_2CH_3), 25.0 (CH_2CH_2), 29.8 (d, ${}^2J_{\text{C-P}} = 15.5$ Hz, CH_2CH_2), 36.0 (NCH_3), 42.7 (d, ${}^1J_{\text{C-P}} = 135.9$ Hz, PCH), 61.6 (d, ${}^3J_{\text{C-P}} = 7.1$ Hz, CH_3CH_2), 62.0 (d, ${}^3J_{\text{C-P}} = 6.7$ Hz, CH_3CH_2), 127.3 (d, ${}^5J_{\text{C-P}} = 2.6$ Hz), 128.7 (d, ${}^4J_{\text{C-P}} = 1.62$ Hz), 129.5 (d, ${}^3J_{\text{C-P}} = 6.6$ Hz), 136.5 (d, ${}^2J_{\text{C-P}} = 6.5$ Hz, aromat.), 172.5

(C=O)

 $C_{15}H_{24}NO_5P$ [329.33]

Ber.[%]: C 54.71 H 7.35 N 4.25 Gef.[%] C 54.75 H 7.27 N 4.13

4-Diethoxyphosphoryl-*N*-hydroxy-*N*-ethyl-4-phenyl-butansäureamid **12**

Hergestellt aus 0,43 g 7 (1 mmol) nach AAV6.

Ausbeute: 67 % (nach Umkristallisation in Diethylether), farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 76 ℃

IR \tilde{v} (KBr): 3135 cm⁻¹ (OH), 2988 cm⁻¹ (CH_{aliphat.}), 1642 cm⁻¹ (C=O),

1227 cm⁻¹ (P=O), 1054, 1028 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 0.91-1.21 (m, 6H, CH₂C H_3 ,

NCH₂C H_3), 1.21 (t, J = 7.03 Hz, 3H, CH₂C H_3), 1.89-2.10 (m, 1H, CHC H_2), 2.10-2.35 (m, 3H, CHC H_2 , CH₂C H_2), 3.14-3.29 (m, 1H, PCH), 3.46 (dd, J = 13.26, 6.41 Hz, 2H, NCH₂), 3.71 (qdd, J = 14.38, 10.24, 7.1 Hz, 1H, POCH₂), 3.76-3.86 (m, 1H, POCH₂), 3.92-4.04 (m, 2H, POCH₂), 7.11-7.52 (m, 5H, aromat.),

9.47 (s, 1H, OH)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 12.23 (NCH₂CH₃), 16.42 (d,

 ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 5.4 \text{ Hz}, \text{ CH}_{2}C\text{H}_{3}), 16.64 \text{ (d, } {}^{3}J_{\text{C-P}} = 5.52 \text{ Hz}, \text{ CH}_{2}C\text{H}_{3}), 24.96 \text{ (CH}_{2}C\text{H}_{2}), 30.09 \text{ (d, } {}^{2}J_{\text{C-P}} = 14.25 \text{ Hz}, \text{ CH}C\text{H}_{2}), 42.45 \text{ (N}C\text{H}_{2}C\text{H}_{3}), 42.67 \text{ (d, } {}^{1}J_{\text{C-P}} = 135.45 \text{ Hz}, \text{ PCH}), 61.63 \text{ (d, } {}^{3}J_{\text{C-P}} = 7.21 \text{ Hz}, \text{ CH}_{3}C\text{H}_{2}), 61.99 \text{ (d, } {}^{3}J_{\text{C-P}} = 6.71 \text{ Hz}, \text{ CH}_{3}C\text{H}_{2}), 127.32, 128.7, 129.52 \text{ (d, } {}^{3}J_{\text{C-P}} = 6.67 \text{ Hz}), 136.53 \text{ (d, } {}^{2}J_{\text{C-P}} = 6.61 \text{ (d, }$

Hz, aromat.), 172.12 (C=O)

 $C_{16}H_{26}NO_5P$ [343.15]

Ber.[%]: C 55.97 H 7.63 N 4.08 Gef.[%] C 56.11 H 7.78 N 4.27

4-Diethoxyphosphoryl-N-hydroxy-N-propan-2-yl-4-phenyl-butansäureamid 13

Hergestellt aus 0,45 g 8 (1 mmol) nach AAV6.

Ausbeute: 63,4 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 116 ℃

IR \tilde{v} (KBr): 3149 cm⁻¹ (O-H), 1641 cm⁻¹ (C=O), 1227 cm⁻¹ (P=O),

1030 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 1.00 (dt, J = 9.34, 6.78 Hz, 9H,

CH₂C H_3), 1.21 (t, J = 7.04 Hz, 3H, CH₂C H_3), 1.92-2.09 (m, 1H, CHC H_2), 2.09-2.31 (m, 3H, CHC H_2 , CH₂C H_2), 3.23 (ddd, J = 21.71, 11.17, 2.07 Hz, 1H, PCH), 3.64-3.76 (m, 1H, POCH₂), 3,76-3.89 (m, POCH₂), 3.89-4.12 (POCH₂), 4.49 (dt, J = 12.13, 5.87 Hz, 1H, NCH), 7.20-7.41 (m, 5H, aromat.), 9.12 (s, 1H, OH)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 16.41 (d, ${}^3J_{C-P} = 5.49$ Hz, CH₂CH₃),

16.64 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 5.5 \text{ Hz}$, $CH_{2}CH_{3}$), 19.18 ($CH(CH_{3})_{2}$), 24.94 ($CH_{2}CH_{2}$), 30.47 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 16.07 \text{ Hz}$, $CH_{2}CH_{2}$), 42.68 (d, ${}^{1}J_{\text{C-P}} = 135.63 \text{ Hz}$, PCH), 46.25 (NCH), 61.62 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 6.94 \text{ Hz}$, $CH_{3}CH_{2}$), 61.99 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 6.72 \text{ Hz}$, $CH_{3}CH_{2}$), 127.31, 128.7, 129.52 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 6.9 \text{ Hz}$), 136.55 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 6.78 \text{ Hz}$, aromat.),

172.19 (C=O)

 $C_{17}H_{28}NO_5P$ [357.38]

Ber.[%]: C 57.13 H 7.90 N 3.92 Gef.[%] C 57.24 H 7.85 N 3.88

N-benzyloxy-4-dibenzyloxyphosphoryl-4-phenyl-butansäureamid 14

Hergestellt aus 1,42 g **5** (3,5 mmol), 2,68 g Trimethylsilylbromid (17,5 mmol) und 2,21 g **LXVII** (7 mmol) nach **AAV5**.

Ausbeute: 12 %, farbloses Öl

IR \tilde{v} (NaCl): 3450 cm⁻¹ (N-H), 1669 cm⁻¹ (C=O), 1229 cm⁻¹ (P=O),

1005 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃), (ppm): 1.83 (t, J = 7.5 Hz, 2H, CH₂C H_2), 1.95-

2.18 (m, 1H, CHC H_2), 2.19-2.38 (m, 1H, CHC H_2), 3.27-3.33 (m, 1H, PCH), 4.61-4.78 (m, 2H, PhCH₂), 4.78-4.90 (dd, J = 12.0 Hz, 2H, PhCH₂), 4.98-5.17 (qd, J = 12.01, 12.02, 8.0 Hz, 2H, PhCH₂), 6.84-7.99 (m, 20H, aromat.), 10.43 (s, 0.12H, *E*-isomer,

NH), 10.88 (s, 0.88H, *Z*-isomer, NH)

¹³C-NMR: (125 MHz, CDCl₃), (ppm): 24.82 (d, ${}^{3}J_{C-P} = 3.81$ Hz, CH₂CH₂),

29.75 (d, ${}^{2}J_{C-P}$ = 12.75 Hz. CH $^{C}H_{2}$), 42.44 (d, ${}^{1}J_{C-P}$ = 133.27 Hz, PCH), 66.5 (d, ${}^{2}J_{C-P}$ = 7.92 Hz, POCH₂), 66.95 (d, ${}^{2}J_{C-P}$ = 6.95 Hz, POCH₂), 77.02 (PhCH₂), 126.46, 126.49, 126.78, 126.99, 127.24, 127.37, 127.43, 127.53, 127.6, 127.7 (d, ${}^{4}J_{C-P}$ = 1.89 Hz), 128.08, 128.24 (d, ${}^{3}J_{C-P}$ = 6.4 Hz), 134.4, 134.36, 134.17 (d, ${}^{2}J_{C-P}$ = 7.23 Hz), 135.19 (d, ${}^{3}J_{C-P}$ = 4.42 Hz), 135.22 (d,

 $^{3}J_{\text{C-P}} = 4.42 \text{ Hz}, \text{ aromat.}), 168.88 (C=O)$

 $C_{31}H_{32}NO_5P$ [529.56]

MS (ESI⁺): m/z (%): 530.7 (5) $[M+H]^+$, 552.6 (100) $[M+Na]^+$

(ESI⁻): m/z (%): 528.5 (100) [*M*-H]⁻

Ber.[%]: C 70.31 H 6.09 N 2.64 Gef.[%] C 70.04 H 6.17 N 2.57

N-benzyloxy-4-dibenzyloxyphosphoryl-N-ethyl-4-phenyl-butansäureamid 15

Hergestellt aus 2,6 g **7** (6 mmol), 4,59 g Trimethylsilylbromid (30 mmol) und 3,79 g **LXVII** (12 mmol) nach **AAV5** und anschließender Säulenchromatographie über Kieselgel (1 Teil Ethylacetat: 1 Teil n-Hexan). Umkristallisation erfolgte in Diethylether bei 7 $^{\circ}$ C

Ausbeute: 73,2 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 61 ℃

IR \tilde{v} (KBr): 3062, 3032 cm⁻¹ (C-H_{arom}), 2970, 2936 cm⁻¹ (C-H_{aliph}),

1651 cm⁻¹ (C=O), 1257 cm⁻¹ (P=O), 1046, 1013 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃), (ppm): 1.01 (t, J = 7 Hz, 3H, CH₃), 2.00-2.14

(m, 1H, CHC H_2), 2.15-2.37 (m, 3H, CHC H_2 , CH₂C H_2), 3.40 (dd, J = 22.8, 9 Hz, 1H, PCH), 3.54 (s, 2H, NCH₂), 4.52-4.68 (dd, J = 25.3, 9.8 Hz, 2H, PhCH₂), 4.68-4.90 (ddd, J = 20.1, 12.1, 7.5 Hz, 2H, PhCH₂), 4.92-5.09 (qd, J = 12.0, 8.0 Hz, 2H, PhCH₂),

7.06-7.24 (m, 4H) 7.24-7.50 (m, 16H, aromat.)

¹³C-NMR: (125 MHz, CDCl₃), (ppm): 12.30 (CH₃), 24.76 (CH₂CH₂), 30.02

(d, ${}^2J_{\text{C-P}} = 15.8$ Hz. CH 2CH_2), 40.49 (NCH $_2$), 42.70 (d, ${}^1J_{\text{C-P}} = 135.5$ Hz, PCH), 67.03 (d, ${}^2J_{\text{C-P}} = 6.9$ Hz, POCH $_2$), 67.23 (d, ${}^2J_{\text{C-P}} = 6.5$ Hz, POCH $_2$), 75.86 (PhCH $_2$), 127.52, 127.78, 128.07, 128.39, 128.52, 128.69, 128.77, 128.79, 128.86, 129.00, 129.61 (d, ${}^3J_{\text{C-P}} = 6.6$ Hz), 129.69, 134.86, 136.11 (d, ${}^2J_{\text{C-P}} = 7.1$ Hz), 136.89 (d, ${}^3J_{\text{C-P}} = 6.3$ Hz), 136.96 (d, ${}^3J_{\text{C-P}} = 6.3$ Hz,

aromat.), 172.90 (C=O)

 $C_{33}H_{36}NO_5P$ [557.62]

Ber.[%]: C 71.08 H 6.51 N 2.51 Gef.[%] C 70.82 H 6.57 N 2.67

N-benzyloxy-4-dibenzyloxyphosphoryl-N-propan-2-yl-4-phenyl-butansäureamid 16

Hergestellt aus 0,98 g **8** (2,2 mmol), 1,68 g Trimethylsilylbromid (11 mmol) und 1,39 g **LXVII** (4,4 mmol) nach **AAV5** und anschließender Säulenchromatographie über Kieselgel (Ethylacetat).

Ausbeute: 41,5 %, farbloses Öl

IR v (NaCl): 3063, 3033 cm⁻¹ (C-H_{arom.}), 2976, 2938 cm⁻¹ (C-H_{aliph.}),

1663 cm⁻¹ (C=O), 1247 cm⁻¹ (P=O), 1025 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃), (ppm): 0.88-1.44 (m, 6H, CH₃), 1.95-2.22 (m,

1H, CHC H_2), 2.23-2.43 (m, 3H, CHC H_2 , CH₂C H_2), 3.36-3.51 (m, 1H, PCH), 4.40 (s, 1H, NCH), 4.55-4.69 (dd, J= 20.5, 8.9 Hz, 2H, PhCH₂), 4.69-4.78 (m, 1H, PhCH₂), 4.78-4.90 (ddt, J= 10.6, 6.9, 3.4 Hz, 2H, PhCH₂), 4.90-5.14 (m, 2H, PhCH₂), 6.84-7.24 (m,

4H), 7.23-7.68 (m, 16H, aromat.)

¹³C-NMR: (125 MHz, CDCl₃), (ppm): 19.33 (CH₃), 19.43 (CH₃), 24.29

 (CH_2CH_2) , 30.19 (d, ${}^2J_{C-P}$ = 16.1 Hz. $CHCH_2$), 42.23 (d, ${}^1J_{C-P}$ = 135.9 Hz, PCH), 49.21 (NCH), 66.57 (d, ${}^2J_{C-P}$ = 6.8 Hz, POCH₂), 66.77 (d, ${}^2J_{C-P}$ = 6.7 Hz, POCH₂), 78.39 (PhCH₂), 127.05, 127.07, 127.32, 127.61, 127.93, 128.06, 128.23, 128.33, 128.40, 128.52, 128.95, 129.14 (d, ${}^3J_{C-P}$ = 6.8 Hz), 134.49, 135.42 (d, ${}^3J_{C-P}$ = 6 Hz), 135.67 (d, ${}^2J_{C-P}$ = 6.7 Hz), 136.49 (d,

 $^{3}J_{C-P} = 5.7 \text{ Hz}, \text{ aromat.}, 175.03 (C=O)$

 $C_{34}H_{38}NO_5P$ [571.64]

Ber.[%]: C 71.44 H 6.70 N 2.45 Gef.[%] C 71.21 H 6.81 N 2.49

[4-(Hydroxyamino)-4-oxo-1-phenyl-butyl]phosphonsäure 17

Hergestellt aus 0,53 g **14** (1 mmol) nach **AAV6**, Umkristallisation in Ethanol/Ethylacetat bei RT.

Ausbeute: 67 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 164 ℃

IR \tilde{v} (KBr): 3365 cm⁻¹ (N-H), 2890 cm⁻¹ (CH_{aliph.}), 1624 cm⁻¹ (C=O),

1239 cm⁻¹ (P=O), 1093, 1036 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆), (ppm): 1.76-1.84 (m, 2H, CH₂C*H*₂), 1.88-

2.03 (m, 1H, CHC H_2), 2.17-2.34 (m, 1H, CHC H_2), 2.84 (ddd, J=21.8, 11.2, 3.7 Hz, 1H, PCH), 7.24 (qd, J=13.3, 7.3, 6.9 Hz, 5H, aromat.), 8.63 (s, 0.8H, Z-Isomer, OH), 8.90 (s, 0.2H, E-Isomer, OH), 9.72 (s, 0.2H, E-isomer, NH), 10.25 (s, 0.88H,

Z-isomer, NH)

¹³C-NMR: (125 MHz, D₂O), (ppm): 25.32 (CH₂CH₂), 30.8 (d, $^2J_{C-P} = 16.9$ Hz.

CH CH_2), 44.8 (d, ${}^{1}J_{C-P} = 132.3$ Hz, PCH), 127.7 (d, ${}^{5}J_{C-P} = 2.8$ Hz), 129.1 (d, ${}^{4}J_{C-P} = 1.96$ Hz), 129.5 (d, ${}^{3}J_{C-P} = 6.2$

Hz), 136.4 (d, ${}^{2}J_{C-P} = 7.1$ Hz, aromat.), 172.4 (C=O)

³¹P-NMR: (200 MHz, DMSO-*d*₆), (ppm): 24.43

 $C_{10}H_{14}NO_5P$ [259.20]

Ber.[%]: C 46.34 H 5.44 N 5.40 Gef.[%] C 46.10 H 5.52 N 5.28

{4-[Hydroxy(methyl)amino]-4-oxo-1-phenyl-butyl}phosphonsäure 18

Hergestellt aus 0,36 g **9** (1 mmol) nach AAV6, Umkristallisation in Methanol/Ethylacetat bei 7 °C.

Ausbeute: 92 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 126 ℃

IR \tilde{v} (KBr): 3363 cm⁻¹ (O-H), 3145 cm⁻¹ (CH_{aromat.}), 1606 cm⁻¹ (C=O),

1207 cm⁻¹ (P=O), 1016 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 1.98 (ddd, J = 16.8, 11.2, 4.9 Hz,

1H, CHC*H*₂), 2.11-2.34 (m, 3H, CH₂C*H*₂, CHC*H*₂), 2.84-2.94 (m, 1H, PCH), 3.02 (s, 3H, NCH₃), 7.14-7.42 (m, 5H, aromat.), 9.64

(s, 1H, Z-Isomer, NOH)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 25.0 (d, $^3J_{C-P} = 2.1$ Hz, CH_2CH_2),

29.9 (d, ${}^{2}J_{C-P} = 14.8$ Hz. $CHCH_{2}$), 35.6 (NCH₃), 44.6 (d, ${}^{1}J_{C-P} = 134.2$ Hz, PCH), 126.1 (d, ${}^{5}J_{C-P} = 2.9$ Hz), 127.9, 129.0 (d, ${}^{3}J_{C-P} = 6.3$ Hz), 138.2 (d, ${}^{2}J_{C-P} = 4.5$ Hz, aromat.), 172.5 (C=O)

³¹P-NMR: (200 MHz, DMSO-*d*₆), (ppm): 24.64

 $C_{11}H_{16}NO_5P$ [273.22]

Ber.[%]: C 48.36 H 5.90 N 5.13 Gef.[%] C 48.12 H 6.00 N 5.03

{4-[Hydroxy(ethyl)amino]-4-oxo-1-phenyl-butyl}phosphonsäure 19

Hergestellt aus 0,56 g 15 (1 mmol) nach AAV6.

Ausbeute: 74,3 %, orangenes Harz

IR ṽ (NaCl): 3398 cm⁻¹ (OH), 3156 cm⁻¹ (CH_{aromat.}), 2938 cm⁻¹ (CH_{aliphat.}),

1606 cm⁻¹ (C=O), 1184 cm⁻¹ (P=O), 993 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 1.01 (t, J = 7.08 Hz, CH₃), 1.89-

2.07 (m, 1H, CHC H_2), 2.08-2.40 (m, 3H, CH₂C H_2 , CHC H_2), 2.77-3.08 (dd, J = 21.5, 10.6 Hz, 1H, PCH), 3.48 (dd, J = 13.25, 6.35 Hz, 2H, NCH₂), 5.17-6.68 (s, 2H, POH), 7.12-7.42 (m, 5H,

aromat.), 9.52 (s, 1H, NOH)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 11.77 (CH₃), 24.98 (CH₂CH₂),

30.18 (d, ${}^{2}J_{C-P} = 15.6$ Hz. CHCH₂), 41.97 (NCH₂), 44.56 (d, ${}^{1}J_{C-P} = 133.6$ Hz, PCH), 126.05 (d, ${}^{5}J_{C-P} = 2$ Hz), 127.89 (d, ${}^{4}J_{C-P} = 1.1$ Hz), 129.01 (d, ${}^{3}J_{C-P} = 6.3$ Hz), 138.19 (d,

 $^{2}J_{C-P} = 6.4 \text{ Hz}$, aromat.), 172.0 (C=O)

³¹P-NMR: (200 MHz, DMSO-*d*₆), (ppm): 22.85

 $C_{12}H_{18}NO_5P$ [287.25]

HPLC: 20 Minuten Laufzeit, isokratische Elution (1:1) (Acetonitril,

5 % wässrige NH₄OAc-Lösung):

Retentionszeit: 1,880 min (99,9 % AUC)

{4-[Hydroxy(propan-2-yl)amino]-4-oxo-1-phenyl-butyl}phosphonsäure 20

Hergestellt aus 0,57 g 16 (1 mmol) nach AAV6.

Ausbeute: 99 %, farbloses Öl

IR \tilde{v} (NaCl): 3387, 3214 cm⁻¹ (OH), 3063, 3031 cm⁻¹ (CH_{aromat.}),

2981, 2936 cm⁻¹ (CH_{aliphat.}), 1605 cm⁻¹ (C=O), 1188 cm⁻¹ (P=O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 0.99 (dd, J = 6.5, 4.5 Hz, 6H, CH₃),

1.92-2.07 (m, 1H, CHC H_2), 2.07-2.34 (m, 3H, CH₂C H_2 , CHC H_2), 2.75-2.99 (ddd, J = 14.2, 10.6, 2.5 Hz, 1H, PCH), 4.38-4.64 (m, 1H, NCH), 6.90-7.72 (m, 5H, aromat.), 8.37-9.80 (s, 1H, NOH)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 18.74 (CH₃), 25.21 (CH₂CH₂),

30.72 (d, ${}^{2}J_{C-P} = 15.4$ Hz. CHCH₂), 44.81 (d, ${}^{1}J_{C-P} = 132.8$ Hz, PCH), 45.70 (NCH), 125.88, 127.80, 129.02 (d, ${}^{3}J_{C-P} = 5.9$ Hz),

136.68 (d, ${}^{2}J_{C-P}$ = 4.9 Hz, aromat.), 172.15 (C=O)

³¹P-NMR: (200 MHz, DMSO-*d*₆), (ppm): 24.43

 $C_{13}H_{20}NO_5P$ [301.28]

HPLC: 20 Minuten Laufzeit, isokratische Elution (1:1) (Acetonitril,

5 % wässrige NH₄OAc-Lösung):

Retentionszeit: 1,933 min (97,5 % AUC)

N-benzyloxy-3-diethoxyphosphoryl-3-phenyl-propansäureamid 21

Hergestellt aus 0,57 g 4 (2 mmol) und 0,25 g LI (2 mmol) nach AAV12.

Ausbeute: 71 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 93,6 ℃

IR \tilde{v} (KBr): 3229 cm⁻¹ (NH), 3061 cm⁻¹ (CH_{aromat.}), 2985 cm⁻¹ (CH_{aliphat.}),

1690 cm⁻¹ (C=O), 1231 cm⁻¹ (P=O), 1025 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 1.04 (t, J = 7.0 Hz, 3H, CH₃), 1.21

(t, J = 7.0 Hz, 3H, CH₃), 2.54-2.67 (m, 2H, CHC H_2), 3.60 (ddd, J = 21.6, 9.2, 6.1 Hz, 1H, PCH), 3.69-3.79 (m, 1H, CH₃C H_2), 3.79-3.89 (m, 1H, CH₃C H_2), 3.91-4.06 (m, 2H, CH₃C H_2), 4.51 (dd, $J_{gem.H,H} = 41.2$, 11.1 Hz, 1.83H, PhCH₂), 4.73 (dd, $J_{gem.H,H} = 34.7$, 11.6 Hz, 0.17H, PhCH₂), 7.12–7.21 (m, 2H), 7.23-7.58 (m, 8H, aromat.), 10.59 (s, 0.09H, NH), 11.03 (s, 0.91H,

NH)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 16.41 (d, ${}^3J_{C-P} = 5.4$ Hz, CH₃),

16.61 (d, ${}^{3}J_{C-P} = 5.6$ Hz, CH₃), 33.03 (CH*C*H₂), 39.79 (d, ${}^{1}J_{C-P} = 127.6$ Hz, PCH), 62.00 (d, ${}^{3}J_{C-P} = 7.0$ Hz, CH₃*C*H₂), 62.37 (d, ${}^{3}J_{C-P} = 6.7$ Hz, CH₃*C*H₂), 77.10 (PhCH₂), 127.49 (d, ${}^{5}J_{C-P} = 1.9$ Hz), 128.52 (d, ${}^{4}J_{C-P} = 1.5$ Hz), 128.63, 129.27, 129.51 (d, ${}^{3}J_{C-P} = 6.2$ Hz), 135.57 (d, ${}^{2}J_{C-P} = 6.3$ Hz), 136.10

(aromat.), 166.45 (d, ${}^{3}J_{C-P}$ = 18.2 Hz, C=O)

 $C_{20}H_{26}NO_5P$ [391.39]

Ber.[%]: C 61.37 H 6.70 N 3.58 Gef.[%] C 61.64 H 6.71 N 3.61

N-benzyloxy-3-diethoxyphosphoryl-N-methyl-3-phenyl-propansäureamid 22

Hergestellt aus 1,43 g 4 (5 mmol) und 0,69 g LII (5 mmol) nach AAV12.

Ausbeute: 98,6 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 64 ℃

IR \tilde{v} (KBr): 2986, 2932 cm⁻¹ (CH_{aliphat}), 1666 cm⁻¹ (C=O), 1244 cm⁻¹ (P=O),

1025 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 1.05 (t, J = 7.03 Hz, 3H, CH₂C H_3),

1.19 (t, J = 7.03 Hz, 3H, CH_2CH_3), 2.80-2.94 (m, 1H, $CHCH_2$), 2.94-3.05 (m, 1H, $CHCH_2$), 3.07 (s, NCH_3), 3.60 (ddd, J = 21.76, 10.08, 3.7 Hz, 1H, PCH), 3.69-3.79 (m, 1H, CH_3CH_2), 3.79-3.89 (m, 1H, CH_3CH_2), 3.89-4.00 (m, 2H, CH_3CH_2), 4.87 (dd, $J_{gem.H,H} = 30.84$, 11.1 Hz, 2H, PhCH₂), 7.08–7.37 (m, 5H), 7.37-

7.75 (m, 5H, aromat.)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 16.42 (d, $^3J_{C-P} = 5.5$ Hz, CH₂CH₃),

16.57 (d, ${}^{3}J_{C-P} = 5.58$ Hz, $CH_{2}CH_{3}$), 32.46 ($CHCH_{2}$), 33.20 (NCH_{3}), 39.89 (d, ${}^{1}J_{C-P} = 125.84$ Hz, PCH), 61.91 (d, ${}^{3}J_{C-P} = 7.11$ Hz, $CH_{3}CH_{2}$), 62.26 (d, ${}^{3}J_{C-P} = 6.6$ Hz, $CH_{3}CH_{2}$), 75.54 ($PhCH_{2}$), 127.23 (d, ${}^{4}J_{C-P} = 2.6$ Hz), 128.46 (d, ${}^{5}J_{C-P} = 1.79$ Hz), 128.93, 129.21, 129.35 (d, ${}^{3}J_{C-P} = 6.24$ Hz), 130.02, 135.06, 136.44 (d, ${}^{2}J_{C-P} = 6.75$ Hz, aromat.), 170.52 (d, ${}^{3}J_{C-P} = 15.82$ Hz,

C=O)

 $C_{21}H_{28}NO_5P$ [391.39]

Ber.[%]: C 62.21 H 6.96 N 3.45 Gef.[%] C 62.21 H 6.76 N 3.37

{3-[Benzyloxy(methyl)amino]-3-oxo-1-phenyl-propyl}phosphonat 23

Hergestellt aus 0,39 g **22** (1 mmol) und 0,77 g Trimethylsilylbromid (5 mmol) nach **AAV3**.

Ausbeute: 89 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 178 ℃

IR \tilde{v} (KBr): 2886 cm⁻¹ (CH_{aliphat}), 1609 cm⁻¹ (C=O), 1186, 1152 cm⁻¹ (P=O),

988 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 2.95 (dd, J = 28.0, 17.0 Hz, 1H,

CHC H_2), 2.99-3.22 (m, 4H, CHC H_2 , NCH₃), 3.27-3.56 (m, 1H, PCH), 4.83 (dd, $J_{gem.H,H} = 45.0$, 9.6 Hz, 2H, PhCH₂), 6.96–7.34

(m, 5H), 7.34-7.88 (m, 5H, aromat.)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 32.95 (CHCH₂), 33.34 (NCH₃),

41.07 (d, ${}^{1}J_{C-P}$ = 138.46 Hz, PCH), 75.65 (PhCH₂), 126.50 (d, ${}^{4}J_{C-P}$ = 2.25 Hz), 128.18, 128.92, 129.13, 129.34 (d, ${}^{3}J_{C-P}$ = 5.82 Hz), 129.84, 135.07, 138.51 (d, ${}^{2}J_{C-P}$ = 6.52 Hz,

aromat.), 171.14 (C=O)

 $C_{17}H_{20}NO_5P$ [349.32]

Ber.[%]: C 58.45 H 5.77 N 4.01 Gef.[%] C 58.28 H 5.89 N 3.88

{3-[Hydroxy(methyl)amino]-3-oxo-1-phenyl-propyl}phosphonsäure 24

Hergestellt aus 0,35 g 23 (1 mmol) nach AAV6.

Ausbeute: 92 %, gelbes Öl

IR \tilde{v} (NaCl): 3421 cm⁻¹ (OH), 2927 cm⁻¹ (CH_{aliphat.}), 1631 cm⁻¹ (C=O),

1199 cm⁻¹ (P=O), 1004 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆), (ppm): 2.82-2.94 (m, 1H, CHC*H*₂), 2.98 (s,

1H, CHC H_2), 3.08-3.22 (m, 3H, NC H_3), 3.40 (ddd, J = 21.7, 11.0,

2.6 Hz, 1H, PCH), 6.68-7.54 (m, 5H, aromat.)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 32.5 (CHCH₂), 35.7 (NCH₃), 40.5

(d, ${}^{1}J_{C-P} = 131.4$ Hz, PCH), 125.9 (d, ${}^{4}J_{C-P} = 1.7$ Hz), 127.6, 128.9 (d, ${}^{3}J_{C-P} = 6$ Hz), 138.4 (d, ${}^{2}J_{C-P} = 6.7$ Hz, aromat.), 170.6 (d,

 $^{3}J_{C-P} = 17.7 \text{ Hz}, C=O)$

 $C_{10}H_{14}NO_5P$ [259.19]

HPLC: 20 Minuten Laufzeit, isokratische Elution (1:1) (Acetonitril,

5 % wässrige NH₄OAc-Lösung):

Retentionszeit: 1,880 min (97,83 % AUC)

7.4. Analytische Daten zu Kapitel 3

Diethyl (3-bromo-1-phenylpropyl)phosphonat 25

Hergestellt aus 9,13 g **LV** (40 mmol) und 30,06 g 1,2-Dibromethan (160 mmol) nach **AAV1**.

Ausbeute: 52 %, farbloses Öl

IR v (NaCl): 1284, 1247 cm⁻¹ (P=O), 1053, 1028 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 1.03 (t, J = 7.0 Hz, 3H, CH_3), 1.21

(t, J = 7.0 Hz, 3H, CH_3), 2.29-2.48 (m, 2H, CH_2Br), 3.16 (dd, J = 16.2, 9.1 Hz, 1H, $CHCH_2$), 3.35 (ddd, J = 22.4, 10.1, 4.8 Hz, 1H, $CHCH_2$), 3.41-3.52 (m, 1H, $CHCH_2$), 3.68-3.79 (m, 1H, CH_3CH_2), 3.79-3.90 (m, 1H, CH_3CH_2), 3.91-4.09 (m, 2H,

 CH_3CH_2), 7.05-7.65 (m, 5H, aromat.)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 15.94 (d, $^3J_{C-P} = 5.5$ Hz, CH_3),

16.16 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 5.5 \text{ Hz}$, CH_{3}), 32.18 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 18.1 \text{ Hz}$, $CHCH_{2}$), 32.48 (CH_{2} Br), 41.62 (d, ${}^{1}J_{\text{C-P}} = 137.8 \text{ Hz}$, CH), 61.42 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 7.0 \text{ Hz}$, $CH_{3}CH_{2}$), 61.85 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 6.7 \text{ Hz}$, $CH_{3}CH_{2}$), 127.21 (d, ${}^{5}J_{\text{C-P}} = 2.7 \text{ Hz}$), 128.42 (d, ${}^{4}J_{\text{C-P}} = 2.3 \text{ Hz}$), 129.05 (d,

 $^{3}J_{C-P} = 6.5 \text{ Hz}$), 134.68 (d, $^{2}J_{C-P} = 7.0 \text{ Hz}$, aromat.)

 $C_{13}H_{20}Br_1O_3P$ [335.17]

Ber.[%]: C 46.59 H 6.01 Gef.[%] C 46.52 H 5.94

S-[3-(diethoxyphosphoryl)-3-phenylpropyl] thioacetat 26

Hergestellt aus 1,68 g **25** (5 mmol) und 0,71 g Kaliumthioacetat (6,25 mmol) nach **AAV2**.

Ausbeute: 91 %, farbloses Öl

IR \tilde{v} (NaCl): 1693 cm⁻¹ (C=O), 1246 cm⁻¹ (P=O), 1054, 1027 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 1.02 (t, J = 7 Hz, 3H, CH₃), 1.19 (t,

J = 7 Hz, 3H, CH₃), 2.10-2.15 (m, 2H, CHC H_2), 2.28 (s, 3H, COCH₃), 2.56-2.76 (m, 2H, SCH₂), 3.20-3.31 (m, 1H, CHCH₂), 3.64-3.76 (m, 1H, CH₃C H_2), 3.76-3.89 (m, 1H, CH₃C H_2), 3.89-

4.08 (m, 2H, CH₃C*H*₂), 7.13-7.45 (m, 5H, aromat.)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 15.93 (d, $^3J_{C-P} = 5.4$ Hz, CH₃),

16.14 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 5.5 \text{ Hz}$, CH₃), 26.51 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 17.7 \text{ Hz}$, CH*C*H₂), 29.37 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 1.7 \text{ Hz}$, CH₂S), 30.45 (CO*C*H₃), 42.22 (d, ${}^{1}J_{\text{C-P}} = 136.4 \text{ Hz}$, CH), 61.31 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 6.8 \text{ Hz}$, CH₃*C*H₂), 61.71 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 6.7 \text{ Hz}$, CH₃*C*H₂), 127.03 (d, ${}^{5}J_{\text{C-P}} = 2.9 \text{ Hz}$), 128.28 (d, ${}^{4}J_{\text{C-P}} = 1.6 \text{ Hz}$), 129.06 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 6.5 \text{ Hz}$), 135.26 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 7 \text{ Hz}$,

aromat.), 194.89 (C=O)

 $C_{15}H_{23}O_4PS$ [330.38]

Ber.[%]: C 54.53 H 7.02 Gef.[%] C 54.37 H 7.20

[3-(Acetylthio)-1-phenylpropyl]phosphonsäure 27

Hergestellt aus 1,52 g **26** (4,6 mmol) und 3,51 g Trimethylsilylbromid (22,9 mmol) nach **AAV3** mit anschließender Säulenchromatographie über Kieselgel 60 (Elutionsmittel: 9 Teile Ethylacetat: 1 Teil Ethanol).

Ausbeute: 94,3 %, hellgelbes Harz

IR \tilde{v} (NaCl): 1692 cm⁻¹ (C=O), 1135 cm⁻¹ (P=O), 998, 952 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆), (ppm): 2.02-2.11 (m, 1H, CHC*H*₂), 2.12-

2.23 (m, 1H, CHC H_2), 2.29 (s, 3H, COCH₃), 2.56 (m, 1H, SCH₂), 2.73 (ddd, J = 13.6, 8.9, 4.9 Hz, 1H, SCH₂), 2.94 (ddd, J = 22.2, 11.1, 4.1 Hz, 1H, CHCH₂), 3.02-3.83 (m, 2H, OH), 6.89-7.66 (m,

5H, aromat.)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 26.98 (d, $^2J_{C-P} = 17.6$ Hz, CHCH₂),

29.81 (d, ${}^{3}J_{C-P} = 1.8$ Hz, CH₂S), 30.46 (CO*C*H₃), 44.53 (d, ${}^{1}J_{C-P} = 133$ Hz, *C*HCH₂), 126.12, 127.91, 129.06 (d, ${}^{3}J_{C-P} = 5.7$

Hz), 137.79 (d, ${}^{2}J_{C-P} = 7$ Hz), 194.95 (C=O)

 $C_{11}H_{15}O_4PS$ [274.27]

Ber.[%]: C 48.17 H 5.51 Gef.[%] C 47.87 H 5.75

Diethyl [3-bromo-1-(naphthalen-1-yl)propyl]phosphonat 28

Hergestellt aus 15,41 g Diethyl (naphthalen-1-ylmethyl)phosphonat (40 mmol) und 30,06 g 1,2-Dibromethan (160 mmol) nach **AAV1**.

Ausbeute: 60 %, weißer, wachsartiger Feststoff

Schmelzpunkt: 57 ℃

IR \tilde{v} (KBr): 1239 cm⁻¹ (P=O), 1052, 1023 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 0.83 (t, J = 7.04 Hz, 3H, CH₃), 1.20

(t, J=7 Hz, 3H, CH₃), 2.61 (m, 2H, CH₂Br), 3.24 (dd, J=16.12, 8.5 Hz, 1H, CHC H_2), 3.48 (m, 1H, CHC H_2), 3.57 (m, 1H, CHCH₂), 3.75 (m, 1H, CH₃C H_2), 4.00 (dd, J=13.81, 6.98 Hz, 2H, CH₃C H_2), 4.33 (ddd, J=23.15, 9.27, 5.11 Hz, 1H, CH₃C H_2), 7.58 (m, 4H), 7.89 (d, J=7.94 Hz, 1H), 7.96 (d, J=7.58 Hz, 1H),

8.21 (d, J = 8.42 Hz, 1H, aromat.)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 16.20 (d, ${}^3J_{C-P} = 5.35$ Hz, CH₃),

16.62 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 5.5 \text{ Hz}$, CH₃), 32.72 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 17.33 \text{ Hz}$, CH*C*H₂), 33.90 (CH₂Br), 35.83 (d, ${}^{1}J_{\text{C-P}} = 138.5 \text{ Hz}$, CH), 62.09 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 6.98 \text{ Hz}$, CH₃*C*H₂), 62.35 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 7.06 \text{ Hz}$, CH₃*C*H₂), 123.73, 125.76 (d, ${}^{4}J_{\text{C-P}} = 3.31 \text{ Hz}$), 126.10, 126.19 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 5.7 \text{ Hz}$), 126.65, 128.05 (d, ${}^{4}J_{\text{C-P}} = 2.18 \text{ Hz}$), 129.10, 131.46 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 6.33 \text{ Hz}$), 132.51 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 6.4 \text{ Hz}$), 133.88

(aromat.)

 $C_{17}H_{22}BrO_3P$ [385.23]

Ber.[%]: C 53.00 H 5.76 Gef.[%] C 52.98 H 5.85

Tetraethyl [1-(naphthalen-1-yl)propan-1,3-diyl]bisphosphonat 29

Hergestellt aus 5,80 g **28** (15 mmol) und 16,62 g Triethylphosphit (100 mmol) nach **AAV4**.

Ausbeute: 96,5 %, dunkelgelbes Öl

IR \tilde{v} (NaCl): 1242 cm⁻¹ (P=O), 1051, 1027 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 0.83 (t, J = 7 Hz, 3H, CH₃), 1.10-

1.30 (m, 9H, CH₃), 1.36-1.54 (m, 1H, CH₂P), 1.73 (tdd, J = 21, 10.9, 5.7 Hz, 1H, CH₂P), 2.07-2.25 (m, 1H, CHC H_2), 2.29-2.44 (m, 1H, CHC H_2), 3.50-3.65 (m, 1H, C H_2 CH₃), 3.67-3.81 (m, 1H, C H_2 CH₃), 3.82-3.96 (m, 4H, C H_2 CH₃), 3.96-4.10 (m, 2H, C H_2 CH₃), 4.29 (ddd, J = 22.6, 9.8, 3.9 Hz, 1H, CH), 7.55 (dd, J = 15.8, 7.6 Hz, 3H), 7.62 (m, 1H), 7.87 (d, J = 8 Hz, 1H), 7.95

(d, J = 7.4 Hz, 1H), 8.25 (d, J = 8.1 Hz, 1H)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 15.74 (d, $^3J_{C-P} = 5.5$ Hz, CH₃),

16.09 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 5 \text{ Hz}$, CH₃), 16.12 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 4.2 \text{ Hz}$, CH₃), 16.16 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 5.1 \text{ Hz}$, CH₃), 22.49 (dd, ${}^{1}J_{\text{C-P}} = 141.3 \text{ Hz}$, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 12.5 \text{ Hz}$, CH₂P), 24.77 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 7.1 \text{ Hz}$, PCH*C*H₂), 36.48 (dd, ${}^{1}J_{\text{C-P}} = 136.9 \text{ Hz}$, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 16.9 \text{ Hz}$, PCH), 60.84 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 5.6 \text{ Hz}$,), 60.88 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 5.4 \text{ Hz}$, CH₃*C*H₂), 61.42 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 6.9 \text{ Hz}$, CH₃*C*H₂), 61.71 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 6.7 \text{ Hz}$, CH₃*C*H₂), 123.56, 125.28 (d, ${}^{4}J_{\text{C-P}} = 2.8 \text{ Hz}$), 125.41 (d, ${}^{4}J_{\text{C-P}} = 5.4 \text{ Hz}$), 125.61, 126.07, 127.46, 128.56, 131.96 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 6 \text{ Hz}$), 132.28

 $(d_1^3 J_{C-P} = 8.3 \text{ Hz})$, 133.33 $(d_1^2 J_{C-P} = 13.7 \text{ Hz}$, aromat.)

 $C_{21}H_{32}O_6P_2$ [442.42]

Ber.[%]: C 57.01 H 7.29 Gef.[%] C 56.72 H 6.89

Tetrabenzyl (1-(naphthalen-1-yl)propan-1,3-diyl)bisphosphonat 30

Hergestellt aus 1,54 g **29** (3,48 mmol), 3,73 g Trimethylsilylbromid (24,4 mmol) und 2,19 g **LXVII** (6,96 mmol) nach **AAV5**.

Ausbeute: 15,5 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 109 ℃

IR \tilde{v} (KBr): 3034 cm⁻¹ (C-H, arom.), 2934 cm⁻¹ (C-H, aliph.),

1249 cm⁻¹ (P=O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆), (ppm): 1.39-1.59 (m, 1H, CH₂P), 1.69-1.89

(m, 1H, CH₂P), 2.05-2.32 (m, 1H, CHC H_2), 2.36-2.48 (m, 1H, CHC H_2), 4.39 (ddd, 13.9, 10.1, 4.2 Hz, 1H, PCH), 4.56 (dd, J = 11.8, 7.8 Hz, 1H, PhCH₂), 4.75 (dd, J = 11.9, 7.1 Hz, 1H, PhCH₂), 4.81-5.13 (m, 6H, PhCH₂), 7.08-7.45 (m, 20H), 7.45-7.66 (m, 4H), 7.88 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.96 (d, J = 7.7 Hz, 1H),

8.17 (d, J = 8.1 Hz, 1H, aromat.)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 22.75 (dd, $^1J_{C-P} = 137.84$ Hz,

 $^{3}J_{\text{C-P}} = 12.43$ Hz, CH₂P), 23.8 (m, PCH*C*H₂), 36.53 (dd, $^{1}J_{\text{C-P}} = 132.38$ Hz, $^{3}J_{\text{C-P}} = 8.3$ Hz, PCH), 2x66.27 (d, $^{2}J_{\text{C-P}} = 6.01$ Hz, PhCH₂), 66.74 (d, $^{2}J_{\text{C-P}} = 7.01$ Hz, PhCH₂), 66.89 (d, $^{2}J_{\text{C-P}} = 6.65$ Hz, PhCH₂), 123.49, 125.27 (d, $^{4}J_{\text{C-P}} = 3.43$ Hz), 125.49 ($^{4}J_{\text{C-P}} = 5.34$ Hz), 125.61, 126.17, 127.17, 127.57, 127.59, 127.85, 128.07 (d, $^{4}J_{\text{C-P}} = 1.68$ Hz), 128.31, 128.57, 131.5 (d, $^{3}J_{\text{C-P}} = 5.77$ Hz), 132.25 (d, $^{3}J_{\text{C-P}} = 6.14$ Hz), 133.39 (d, $^{2}J_{\text{C-P}} = 1.58$ Hz), 136.34 (d, $^{3}J_{\text{C-P}} = 6.42$ Hz), 136.40 (d, $^{3}J_{\text{C-P}} = 1.58$ Hz), 136.11 (d, $^{3}J_{\text{C-P}} = 6.41$ Hz), 136.40 (d,

 $^{3}J_{\text{C-P}} = 2.59 \text{ Hz, aromat.}$

 $C_{21}H_{32}O_6P_2$ [690.70]

Ber.[%]: C 71.30 H 5.84 Gef.[%] C 71.22 H 5.80

[1-(1-Naphthyl)-3-phosphono-propyl]phosphonsäure 31

Hergestellt aus 0,35 g **30** (0,5 mmol) nach **AAV6** für 3 h bei 1,5 bar Überdruck (H₂)

Ausbeute: 97 %, gelbes Harz

IR v (KBr): 2935 cm⁻¹ (C-H, aliph.), 1161 cm⁻¹ (P=O), 1006 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆), (ppm): 1.11-1.31 (m, 2H, CH₂P), 1.34-1.56

(m, 1H, CHC H_2), 1.56-1.83 (m, 1H, CHC H_2), 3.92 (ddd, J = 13.03, 10.31, 4.20 Hz, 1H, PCH), 7.51 (dd, J = 15.39, 7.95 Hz, 3H), 7.64 (d, J = 5.9 Hz, 1H), 7.80 (d, J = 7.98 Hz, 1H), 7.92

(d, J = 7.21 Hz, 1H), 8.18 (d, J = 7.73 Hz, 1H, aromat.)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 22.35 (dd, $^1J_{\text{C-P}} = 141.4 \text{ Hz}$,

 ${}^{3}J_{C-P} = 14.91$ Hz, CH₂P), 24.76 (d, ${}^{2}J_{C-P} = 7.09$ Hz, PCH*C*H₂), 37.55 (dd, ${}^{1}J_{C-P} = 149.02$ Hz, ${}^{3}J_{C-P} = 16.79$ Hz, PCH), 123.57, 125.15 (d, ${}^{4}J_{C-P} = 4.06$ Hz), 125.39, 125.93, 126.02, 126.67, 128.50, 132.44 (d, ${}^{3}J_{C-P} = 4.76$ Hz), 133.33 (d, ${}^{3}J_{C-P} = 6.13$ Hz),

134.18 (d, ${}^{2}J_{C-P} = 10.08$ Hz, aromat.)

 $C_{13}H_{16}O_6P_2$ [330.21]

HPLC: 5 Minuten Laufzeit, isokratische Elution (1:1) (Acetonitril, 5 %

wässrige NH₄OAc-Lösung):

Retentionszeit: 1,807 min (95,40 % AUC)

Methyl *N*-benzyloxy-*N*-(3-diethoxyphosphoryl-3-phenyl-propyl)carbamat **32**

Hergestellt aus 1,36 g **LXXI** (3,6 mmol) und 0,17 mL Chlorameisensäureethylester (2,2 mmol) nach **AAV7**.

Ausbeute: 25 %, weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 85 ℃

IR \tilde{v} (KBr): 1710 cm⁻¹ (C=O), 1236 cm⁻¹ (P=O), 1021 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 1.01 (t, J = 7.03 Hz, CH₂C H_3), 1.17

(t, J = 7.04 Hz, CH_2CH_3), 2.01-2.05 (m, 1H, $CHCH_2$), 2.22-2.26 (m, 1H, $CHCH_2$), 3.16-3.20 (m, 2H, NCH_2), 3.64 (s, 3H, OCH_3), 3.68-3.72 (m, 1H, CH_3CH_2), 3.79-3.83 (m, 1H, CH_3CH_2), 3.94-3.97 (m, 2H, CH_3CH_2), 4.75 (d, $J_{gem.H,H} = 10.31$ Hz, $PhCH_2$), 4.78 (d, $J_{gem.H,H} = 10.29$ Hz, 1H, $PhCH_2$), 7.13-7.57 (m, 10H, aromat.)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 16.38 (d, $^3J_{C-P} = 5.45$ Hz, CH₂CH₃),

16.57 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 5.57$ Hz, $CH_{2}CH_{3}$), 27.02 (NCH₂), 40.71 (d, ${}^{1}J_{\text{C-P}} = 142.49$ Hz, CH), 47.55 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 17.64$ Hz, $CHCH_{2}$), 53.24 (OCH₃), 61.74 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 7.04$ Hz, $CH_{3}CH_{2}$), 62.15 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 6.77$ Hz, $CH_{3}CH_{2}$), 76.52 (Ph CH_{2}), 127.41, 127.43, 128.68, 128.80, 129.42, 129.48, 135.69, 136.00 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 7.14$

Hz, aromat.), 156.74 (C=O)

 $C_{22}H_{30}NO_6P$ [435.45]

Ber.[%]: C 60.68 H 6.94 N 3.22 Gef.[%] C 60.44 H 6.77 N 3.29

Methyl N-benzyloxy-N-(3-dibenzyloxyphosphoryl-3-phenyl-propyl)carbamat 33

Hergestellt aus 0,87 g **32** (2 mmol), 1,53 g Trimethylsilylbromid (10 mmol) und 1,26 g **LXVII** (4 mmol) nach **AAV5**.

Ausbeute: 96,5 %, weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 53 ℃

IR \tilde{v} (KBr): 1711 cm⁻¹ (C=O), 1248 cm⁻¹ (P=O), 1048 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆), (ppm): 2.01-2.17 (m, 1H, CHC*H*₂), 2.23-

2.35 (m, 1H, CHC H_2), 3.08-3.24 (m, 1H, PCH), 3.27-3.46 (m, 2H, CH₂N), 3.62 (s, 3H, OCH₃), 4.66-4.79 (m, 3H, PhCH₂), 4.82 (d, $J_{\rm gem.H,H}=7.14$ Hz, 0.5H, PhCH₂), 4.84 (d, $J_{\rm gem.H,H}=7.16$ Hz, 0.5H, CH₃C H_2), 4.91 (d, $J_{\rm gem.H,H}=7.33$ Hz, 0.5H, PhCH₂), 4.94 (d, $J_{\rm gem.H,H}=7.36$ Hz, 0.5H, PhCH₂), 4.98 (d, $J_{\rm gem.H,H}=8.54$ Hz, 0.5H, PhCH₂), 5.00 (d, $J_{\rm gem.H,H}=8.61$ Hz, 0.5H, PhCH₂), 7.14 (s,

1H), 7.22-7.63 (m, 19H, aromat.)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 26.46 (NCH₂) 40.34 (d,

 $^{1}J_{\text{C-P}} = 127.34 \text{ Hz}, \text{ PCH}), 47.03 (d, {}^{2}J_{\text{C-P}} = 18.02 \text{ Hz}, \text{ CH}C\text{H}_{2}), 52.78 (OCH_{3}), 66.64 (d, {}^{2}J_{\text{C-P}} = 6.86 \text{ Hz}, \text{ PhCH}_{2}), 66.88 (d, {}^{2}J_{\text{C-P}} = 6.56 \text{ Hz}, \text{ PhCH}_{2}), 76.06 (\text{PhCH}_{2}), 127.09 (d, {}^{5}J_{\text{C-P}} = 2.32 \text{ Hz}), 127.35, 127.60, 127.95, 128.06, 128.21 (d, {}^{4}J_{\text{C-P}} = 4.57 \text{ Hz}), 128.31, 128.94, 129.05 (d, {}^{3}J_{\text{C-P}} = 6.64 \text{ Hz}), 135.19 (d, {}^{2}J_{\text{C-P}} = 6.21 \text{ Hz}), 136.33, 136.38, 136.42 (aromat.), 156.72 (C=O)$

 $C_{22}H_{30}NO_6P$ [559.59]

Ber.[%]: C 68.68 H 6.12 N 2.50 Gef.[%] C 68.42 H 6.15 N 2.68

{[3-[Benzyloxy(methoxycarbonyl)amino]-1-phenyl-propyl]-(2,2-dimethylpropanoyloxy-methoxy)phosphoryl}oxymethyl 2,2-dimethylpropionat **34**

Hergestellt aus 1,31 g **32** (3 mmol), 2,3 g Trimethylsilylbromid (15 mmol) und 6,02 g Chloromethylpivalat nach **AAV3** und **AAV8**.

Ausbeute: 66 %, farbloses Öl

IR \tilde{v} (NaCl): 1754 cm⁻¹ (C=O, POM), 1712 cm⁻¹ (C=O, Carbamat),

1263 cm⁻¹ (P=O), 1139 cm⁻¹ (C-O, Acylal), 1025 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆), (ppm): 1.10 (s, 9H, CCH₃), 1.13 (s, 9H,

CCH₃), 1.97-2.13 (m, 1H, CHC H_2), 2.15-2.31 (m, 1H, CHC H_2), 3.03-3.18 (m, 1H, NCH₂), 3.24-3.43 (m, 4H, PCH. NCH₂), 3.63 (s, 3H, OCH₃), 4.74 (dd, $J_{\text{gem.H,H}}$ = 10.3 Hz, 2H, PhCH₂), 5.40-5.50 (m, 2H, POCH₂), 5.56 (ddd, J = 20.4, 12.5, 5.4 Hz, 2H,

POCH₂), 7.10-7.56 (m, 10H)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 25.79 (CHCH₂), 26.31 (C(CH₃)₃),

26.33 (C(CH_3)₃), 26.91 (NCH₂), 38.02 ($C(CH_3)_3$), 38.06 ($C(CH_3)_3$), 40.57 (d, $^1J_{C-P}$ = 138.2 Hz, PCH), 52.78 (OCH₃), 76.07 (PhCH₂), 81.38 (d, $^2J_{C-P}$ = 2.1 Hz, POCH₂), 81.43 (d, $^2J_{C-P}$ = 2.3 Hz, POCH₂), 127.33, 128.20, 128.33, 128.37, 128.99, 129.02, 134.12 (d, $^2J_{C-P}$ = 9.2 Hz), 135.15 (aromat.), 156.66 (C=O,

Carbamat), 175.95 (C=O, POM), 175.97 (C=O, POM)

 $C_{30}H_{42}NO_{10}P$ [559.59]

Ber.[%]: C 59.30 H 6.97 N 2.31 Gef.[%] C 59.04 H 6.98 N 2.25

{2,2-Dimethylpropionyloxymethoxy-[3-[hydroxy(methoxycarbonyl)amino]-1-phenyl-propyl]phosphoryl}oxymethyl 2,2-dimethylpropionat **35**

Hergestellt aus 0,56 g **34** (1 mmol) 1,5 h bei 1,5 bar H₂ nach **AAV6** und anschließender Säulenchromatographie über Kieselgel 60 (Diethylether 100 %).

Ausbeute: 98 %, farbloses Öl

IR \tilde{v} (NaCl): 3254 cm⁻¹ (O-H), 1754 cm⁻¹ (C=O, POM), 1703 cm⁻¹ (C=O,

Carbamat), 1279, 1259 cm⁻¹ (P=O), 1139 cm⁻¹ (C-O, Acylal),

1025 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 1.12 (s, 9H, CC H_3), 1.16 (s, 9H,

 CCH_3), 1.91-2.13 (m, 1H, $CHCH_2$), 2.16-2.35 (m, 1H, $CHCH_2$), 3.13 (ddd, J = 13.7, 9.1, 4.2 Hz, 1H, PCH), 3.23-3.46 (m, 2H, NCH₂), 3.55 (s, 3H, OCH₃), 5.37-5.50 (m, 2H, POCH₂), 5.51-5.65 (m, 2H, POCH₂), 7.20-7.31 (m, 3H), 7.31-7.42 (m, 2H, aromat.),

9.42 (s, 1H, OH)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 26.00 (CHCH₂), 26.33 (C(CH₃)₃),

26.36 (C(CH_3)₃), 26.90 (NCH₂), 38.04 ($C(CH_3)_3$), 38.08 ($C(CH_3)_3$), 40.51 (d, ${}^1J_{C-P}$ = 124.9 Hz, PCH), 52.25 (OCH₃), 81.34 (d, ${}^2J_{C-P}$ = 4.4 Hz, POCH₂O), 81.39 (d, ${}^2J_{C-P}$ = 3.8 Hz, POCH₂O), 127.24 (d, ${}^5J_{C-P}$ = 2.3 Hz), 128.36, 128.99 (d, ${}^3J_{C-P}$ = 7.0 Hz), 134.29 (d, ${}^2J_{C-P}$ = 7.3 Hz, aromat.), 156.84 (C=O, Carbamat),

175.95 (C=O, POM), 175.99 (C=O, POM)

 $C_{23}H_{36}NO_{10}P$ [559.59]

Ber.[%]: C 53.38 H 7.01 N 2.71 Gef.[%] C 53.56 H 7.02 N 2.68

4-Phenyl-4-phosphono-butansäure 36

Hergestellt aus 0,9 g **3** (3 mmol) und 2,3 g Trimethylsilylbromid (15 mmol) nach **AAV3**.

Ausbeute: 50,5 %, gelbes Öl

IR \tilde{v} (NaCl): 1711 cm⁻¹ (C=O), 1219 cm⁻¹ (P=O), 1004 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 1.84-1.97 (m, 1H, CHC H_2), 1.96-

2.08 (ddd, J = 10.7, 8.6, 4.7 Hz, 2H, CH₂C H_2 , CHC H_2), 2.13-2.28 (m, 1H, CH₂C H_2), 2.83 (ddd, J = 21.8, 11.0, 4.1 Hz, 1H, PCH),

7.02-7.38 (m, 5H, aromat.), 7.40-8.70 (m, 3H, OH)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 23.4 (CH₂CH₂), 29.8 (d,

 $^{3}J_{C-P} = 14.74 \text{ Hz}, CHCH_{2}), 42.2 (d, ^{1}J_{C-P} = 134.1 \text{ Hz}, PCH),$

124.3, 126.1, 127.1, 135.9 (aromat.), 172.1 (C=O).

 $C_{10}H_{13}O_5P$ [244.18]

HPLC: 5 Minuten Laufzeit, isokratische Elution (1:1) (Acetonitril, 5 %

wässrige NH₄OAc-Lösung):

Retentionszeit: 1,773 min (97,97 % AUC)

7.5. Analytische Daten zu Kapitel 4

2-[3-Diethoxyphosphoryl-3-(1-naphthyl)propyl]-1,3-dioxolan 37

Hergestellt aus 11,13 g **LXXIV** (40 mmol) und 7,24 g **LVI** (40 mmol) nach **AAV9** und anschließende Säulenchromatographie über Kieselgel (Elutionsmittel: Ethylacetat).

Ausbeute: 92 %, farbloses Öl

IR \tilde{v} (NaCl): 3050 cm⁻¹ (C-H_{arom.}), 2981 cm⁻¹ (C-H_{aliph.}), 1241 cm⁻¹ (P=O),

1026 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 0.82 (t, 3H, J = 7 Hz, CH₃), 1.19 (t,

3H, J = 7 Hz, CH₃), 1.33 (d, J = 10.5 Hz, 1H, CHC H_2), 1.52 (ddd, J = 15.7, 10.5, 5.3 Hz, 1H, CHC H_2), 2.19-2.34 (m, 2H, CH₂C H_2), 3.56 (dt, J = 17.4, 8.7 Hz, 1H, PCH), 3.63-3.76 (m, 3H, CH₃C H_2 , HCOOC H_2), 3.77-3.86 (m, 2H, CH₃C H_2), 3.90-4.08 (m, 2H), 4.16 (dd, J = 22.9, 6.9 Hz, 1H, HCOOC H_2), 4.72 (t, J = 4.6 Hz, 1H, HCOO), 7.54 (m, 3H), 7.65 (s, 1H), 7.85 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.94

(d, J = 7.6 Hz, 1H) 8.08 (d, J = 8.1 Hz, 1H, aromat.)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 16.2 (d, $^3J_{C-P} = 5.4$ Hz, CH₃), 16.62

(d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 5.5 \text{ Hz}$, CH₃), 25.3 (CH₂CH₂), 31.41 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 14.3 \text{ Hz}$, CHCH₂), 36.55 (d, ${}^{1}J_{\text{C-P}} = 136.9 \text{ Hz}$, PCH), 61.75 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 7.1 \text{ Hz}$, CH₃CH₂), 62.02 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 7 \text{ Hz}$, CH₃CH₂), 64.56 (COO*C*H₂), 64.6 (COO*C*H₂), 103.44 (CHOO), 123.92, 125.69, 125.93 (d, ${}^{4}J_{\text{C-P}} = 3.2 \text{ Hz}$), 125.98, 126.47, 127.63, 128.99, 132.72 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 7.9 \text{ Hz}$), 133.05 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 6 \text{ Hz}$), 133.8

(aromat.)

 $C_{20}H_{27}O_5P$ [378.39]

Ber.[%]: C 63.48 H 7.19 Gef.[%] C 63.58 H 7.40

2-[3-Diethoxyphosphoryl-3-(3,4-difluorophenyl)propyl]-1,3-dioxolan 38

Hergestellt aus 10,57 g **LXXV** (40 mmol) und 7,24 g **LVI** (40 mmol) nach **AAV9** und anschließende Säulenchromatographie über Kieselgel (Elutionsmittel: Ethylacetat).

Ausbeute: 60 %, farbloses Öl

IR \tilde{v} (NaCl): 3034 cm⁻¹ (C-H_{arom.}), 2938 cm⁻¹ (C-H_{aliph.}), 1245 cm⁻¹ (P=O),

1028 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 1.06 (t, 3H, J = 7 Hz, CH₃), 1.21 (t,

3H, J=7 Hz, CH₃), 1.33 (ddd, J=15.4, 9.9, 4.7 Hz, 1H, CH₂CH₂), 1.47 (ddd, J=20.2, 10.5, 5.4 Hz, 1H, CH₂CH₂), 1.84 (m, 1H, CHCH₂), 2.01 (ddd, J=19.2, 9.6, 4.9 Hz, 1H, CHCH₂), 3.30 (m, 1H, PCH), 3.65-3.92 (m, 6H, CH₃CH₂, COOCH₂), 3.98 (m, 2H, COOCH₂), 4.75 (t, J=4.6 Hz, 1H, HCOO), 7.17 (s, 1H),

7.39 (m, 2H, aromat.)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 15.3 (d, ${}^3J_{C-P} = 5.6$ Hz, CH₃), 15.4

(d, ${}^{3}J_{C-P} = 5.8 \text{ Hz}$, CH₃), 22.98 (CH₂CH₂), 30.4 (d, ${}^{2}J_{C-P} = 14.9 \text{ Hz}$, CHCH₂), 42.54 (d, ${}^{1}J_{C-P} = 139.1 \text{ Hz}$, PCH), 61.01 (d, ${}^{2}J_{C-P} = 7.2 \text{ Hz}$, CH₃CH₂), 61.55 (d, ${}^{2}J_{C-P} = 7 \text{ Hz}$, CH₃CH₂), 63.83 (COOCH₂), 63.95 (COOCH₂), 102.82 (CHOO), 116.23 (d, ${}^{2}J_{C-F} = 17.4 \text{ Hz}$, ${}^{3}J_{C-F} = 1.3 \text{ Hz}$), 117.06 (dd, ${}^{2}J_{C-P} = 17.6 \text{ Hz}$, ${}^{3}J_{C-F} = 6.3 \text{ Hz}$), 124.39, 132.15 (dd, ${}^{2}J_{C-P} = 16.0 \text{ Hz}$, ${}^{3}J_{C-F} = 3.4 \text{ Hz}$), 148.53 (dd, ${}^{1}J_{C-F} = 250.1 \text{ Hz}$, ${}^{2}J_{C-F} = 10.8 \text{ Hz}$),

149.2 (dd, ${}^{1}J_{C-F} = 246.6 \text{ Hz}$, ${}^{2}J_{C-F} = 13.7 \text{ Hz}$, aromat.)

 $C_{16}H_{23}F_2O_5P$ [364.32]

Ber.[%]: C 52.75 H 6.36 Gef.[%] C 52.46 H 6.48

2-[3-(3,4-Dichlorophenyl)-3-diethoxyphosphoryl-propyl]-1,3-dioxolan 39

Hergestellt aus 11,88 g **LXXVI** (40 mmol) und 7,24 g **LVI** (40 mmol) nach **AAV9** und anschließende Säulenchromatographie über Kieselgel (Elutionsmittel: Ethylacetat).

Ausbeute: 63 %, farbloses Öl

IR \tilde{v} (NaCl): 3034 cm⁻¹ (C-H_{arom.}), 2982 cm⁻¹ (C-H_{aliph.}), 1245 cm⁻¹ (P=O),

1029 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 1.07 (t, 3H, J = 7 Hz, CH₃), 1.21 (t,

3H, J = 7 Hz, CH₃), 1.27-1.39 (m, 1H, CH₂), 1.49 (ddd, J = 19.9, 10.5, 5.4 Hz, 1H, CH₂), 1.78-1.93 (m, 1H, CH₂), 1.98-2.10 (m, 1H, CH₂), 3.26-3.35 (m, 1H, PCH), 3.66-3.77 (m, 2H, POCH₂), 3.78-3.94 (m, 4H, POCH₂, COOCH₂), 3.94-4.09 (m, 2H, COOCH₂), 4.75 (t, J = 4.6 Hz, 1H, HCOO), 7.31 (td, J = 8.4, 2 Hz, 1H), 7.56 (t, J = 2.1 Hz, 1H), 7.62 (d, J = 8.3 Hz, 1H,

aromat.)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 16.61 (d, ${}^3J_{C-P} = 5.5$ Hz, CH₃),

16.45 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 5.5 \text{ Hz}$, CH₃), 24.0 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 2.8 \text{ Hz}$, CH₂CH₂), 31.44 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 14.7 \text{ Hz}$, CHCH₂), 41.82 (d, ${}^{1}J_{\text{C-P}} = 136.6 \text{ Hz}$, PCH), 61.96 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 6.9 \text{ Hz}$, CH₃CH₂), 62.2 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 6.9 \text{ Hz}$, CH₃CH₂), 64.2 (COOCH₂), 64.65 (COOCH₂), 103.18 (CHOO), 129.67 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 6.4 \text{ Hz}$), 129.95 (d, ${}^{4}J_{\text{C-P}} = 3.4 \text{ Hz}$), 130.87 (d, ${}^{4}J_{\text{C-P}} = 2.4 \text{ Hz}$), 131.2 (d, ${}^{5}J_{\text{C-P}} = 1.7 \text{ Hz}$), 131.44 (d,

 ${}^{3}J_{C-P} = 6.6 \text{ Hz}$), 138.21 (d, ${}^{2}J_{C-P} = 7 \text{ Hz}$, aromat.)

 $C_{16}H_{23}CI_2O_5P$ [397.23]

Ber.[%]: C 48.38 H 5.84 Gef.[%] C 48.14 H 6.18

2-[3-Diethoxyphosphoryl-3-(p-tolyl)propyl]-1,3-dioxolan 40

Hergestellt aus 9,69 g **LXXVII** (40 mmol) und 7,24 g **LVI** (40 mmol) nach **AAV9** und anschließende Säulenchromatographie über Kieselgel (Elutionsmittel: Ethylacetat).

Ausbeute: 70,6 %, farbloses Öl

IR v (NaCl): 2981 cm⁻¹ (C-H_{aliph.}), 1244 cm⁻¹ (P=O), 1027 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 1.03 (t, 3H, J = 6.97 Hz, CH₂CH₃),

1.20 (t, 3H, J = 6.96 Hz, CH_2CH_3), 1.32 (ddd, J = 18.2, 13.81, 4.1 Hz, 1H, CH_2), 1.45 (dq, J = 15.08, 4.93, 4.88 Hz, 1H, CH_2), 1.77-1.93 (m, 1H, CH_2), 1.93-2.08 (m, 1H, CH_2), 2.27 (s, 3H, $PhCH_3$), 3.12 (ddd, J = 21.83, 11.28, 3.31 Hz, 1H, PCH), 3.88-4.07 (m, 8H, CH_3CH_2 , $COOCH_2$), 4.72 (t, J = 4.1 Hz, 1H,

HCOO), 7.15 (dd, J = 22.3, 7.7 Hz, 4H, aromat.)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 16.0 (d, ${}^3J_{C-P} = 5.34$ Hz, CH₂CH₃),

16.19 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 5.51$ Hz, $\text{CH}_{2}C\text{H}_{3}$), 20.55 (PhCH₃), 23.86 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 1.96$ Hz, $\text{CH}_{2}C\text{H}_{2}$), 31.08 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 14.75$ Hz, $\text{CH}C\text{H}_{2}$), 42.03 (d, ${}^{1}J_{\text{C-P}} = 136.46$ Hz, PCH), 61.07 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 7.01$ Hz, $\text{CH}_{3}C\text{H}_{2}$), 61.49 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 7.02$ Hz, $\text{CH}_{3}C\text{H}_{2}$), 64.11 (COO $C\text{H}_{2}$), 64.16 (COO $C\text{H}_{2}$), 102.94 (CHOO), 128.80, 128.88 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 6.8$ Hz), 133.02 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 6.7$ Hz), 135.84 (d, ${}^{5}J_{\text{C-P}} = 3.02$

Hz, aromat.)

 $C_{17}H_{27}O_5P$ [342.37]

Ber.[%]: C 59.64 H 7.95 Gef.[%] C 59.45 H 8.26

4-Diethoxyphosphoryl-4-(1-naphthyl)butanal 41

Hergestellt aus 11,35 g **37** (30 mmol) nach **AAV10** und anschließende Säulenchromatographie über Kieselgel (Elutionsmittel: Ethylacetat:*n*-Hexan 1:1).

Ausbeute: 83 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 75 ℃

IR \tilde{v} (KBr): 3061 cm⁻¹ (C-H_{arom.}), 2986 cm⁻¹ (C-H_{aliph.}), 1713 cm⁻¹ (C=O),

1234 cm⁻¹ (P=O), 1037, 1027 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 0.82 (t, 3H, J = 7 Hz, CH₃), 1.20 (t,

3H, J = 7 Hz, CH₃), 2.17-2.35 (m, 2H, CH₂), 2.35-2.47 (m, 2H, CH₂), 3.49-3.65 (m, 1H, PCH), 3.66-3.79 (m, 1H, CH₃C H_2), 4.01 (ddt, J = 19.5, 12.8, 6.6 Hz, 2H, CH₃C H_2), 4.16 (ddd, J = 14.2, 11.0, 4.0 Hz, 1H, CH₃C H_2), 7.55 (dd, J = 17.5, 7.4 Hz, 3H), 7.65 (s, 1H), 7.86 (d, J = 8 Hz, 1H), 7.94 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 8.17 (d,

J = 8.2 Hz, 1H, aromat.), 9.53 (CHO)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 15.75 (d, $^3J_{C-P} = 5.4$ Hz, CH₃),

16.17 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 5.5$ Hz, CH₃), 23.03 (CH₂CH₂), 35.51 (d, ${}^{1}J_{\text{C-P}} = 137.3$ Hz, PCH), 40.79 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 14.1$ Hz, CH*C*H₂), 61.39 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 7$ Hz, CH₃CH₂), 61.66 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 6.8$ Hz, CH₃CH₂), 123.32, 125.26 (d, ${}^{4}J_{\text{C-P}} = 3.3$ Hz), 125.55, 125.65 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 5.5$ Hz), 126.11, 127.36, 128.59, 132.14 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 11.8$ Hz), 132.13,

133.8 (aromat.), 202.6 (C=O)

 $C_{18}H_{23}O_4P$ [334.35]

Ber.[%]: C 64.66 H 6.93 Gef.[%] C 64.42 H 6.92

4-Diethoxyphosphoryl-4-(3,4-difluorophenyl)butanal 42

Hergestellt aus 10,93 g **38** (30 mmol) nach **AAV10** und anschließende Säulenchromatographie über Kieselgel (Elutionsmittel: 1 Teil Ethylacetat, 1 Teil *n*-Hexan).

Ausbeute: 60 %, hellgelbes Öl

IR v (NaCl): 3053 cm⁻¹ (C-H_{arom.}), 2985 cm⁻¹ (C-H_{aliph.}), 1724 cm⁻¹ (C=O),

1283, 1242 cm⁻¹ (P=O), 1052 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 1.07 (t, 3H, J = 7 Hz, CH₃), 1.21 (t,

3H, J = 7 Hz, CH₃), 1.33 (ddd, J = 15.4, 9.9, 4.7 Hz, 1H, CH₂), 1.41 (t, J = 20.2, 10.5, 5.4 Hz, 1H, CH₂), 1.87-2.14 (m, 1H, CH₂), 2.12-2.44 (m, 1H, CH₂), 3.17-3.32 (m, 1H, PCH), 3.67-3.93 (m, 2H, CH₃CH₂), 3.93-4.16 (m, 2H, CH₃CH₂), 6.99-7.28 (m, 1H),

7.28-7.68 (dt, J = 19.9, 9.29 Hz, 2H, aromat.), 9.56 (CHO)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 16.3 (d, ${}^3J_{C-P} = 5.6$ Hz, CH₃), 16.42

(d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 5.8 \text{ Hz}$, CH₃), 22.59 (${}^{3}J_{\text{C-P}} = 2.1 \text{ Hz}$, CH₂CH₂), 41.39 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 13.7 \text{ Hz}$, CHCH₂), 42.62 (d, ${}^{1}J_{\text{C-P}} = 139.5 \text{ Hz}$, PCH), 62.20 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 7.3 \text{ Hz}$, CH₃CH₂), 62.77 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 7.1 \text{ Hz}$, CH₃CH₂), 117.48 (d, ${}^{2}J_{\text{C-F}} = 17.2 \text{ Hz}$, ${}^{3}J_{\text{C-F}} = 1.2 \text{ Hz}$), 118.00 (dd,

 $^{2}J_{\text{C-F}} = 17.8 \text{ Hz}, \, ^{3}J_{\text{C-F}} = 6.4 \text{ Hz}), \, 125.38, \, 132.66 \text{ (d, } ^{3}J_{\text{C-P}} = 5.4 \text{ Hz}), \, 148.55 \text{ (dd, } ^{1}J_{\text{C-F}} = 225 \text{ Hz}, \, ^{2}J_{\text{C-F}} = 16 \text{ Hz}), \, 149.56 \text{ (dd, } ^{1}J_{\text{C-F}} = 225 \text{ Hz}, \, ^{2}J_{\text{C-F}} = 16 \text{ Hz}), \, 149.56 \text{ (dd, } ^{1}J_{\text{C-F}} = 225 \text{ Hz}, \, ^{2}J_{\text{C-F}} = 16 \text{ Hz}), \, 149.56 \text{ (dd, } ^{1}J_{\text{C-F}} = 225 \text{ Hz}, \, ^{2}J_{\text{C-F}} = 16 \text{ Hz}), \, 149.56 \text{ (dd, } ^{1}J_{\text{C-F}} = 225 \text{ Hz}, \, ^{2}J_{\text{C-F}} = 16 \text{ Hz}), \, 149.56 \text{ (dd, } ^{1}J_{\text{C-F}} = 225 \text{ Hz}, \, ^{2}J_{\text{C-F}} = 16 \text{ Hz}), \, 149.56 \text{ (dd, } ^{1}J_{\text{C-F}} = 225 \text{ Hz}, \, ^{2}J_{\text{C-F}} = 16 \text{ Hz}), \, 149.56 \text{ (dd, } ^{1}J_{\text{C-F}} = 225 \text{ Hz}, \, ^{2}J_{\text{C-F}} = 16 \text{ Hz}), \, 149.56 \text{ (dd, } ^{1}J_{\text{C-F}} = 225 \text{ Hz}, \, ^{2}J_{\text{C-F}} = 16 \text{ Hz}), \, 149.56 \text{ (dd, } ^{1}J_{\text{C-F}} = 225 \text{ Hz}, \, ^{2}J_{\text{C-F}} = 16 \text{ Hz}), \, 149.56 \text{ (dd, } ^{1}J_{\text{C-F}} = 225 \text{ Hz}, \, ^{2}J_{\text{C-F}} = 16 \text{ Hz}), \, 149.56 \text{ (dd, } ^{1}J_{\text{C-F}} = 225 \text{ Hz}, \, ^{2}J_{\text{C-F}} = 16 \text{ Hz}), \, 149.56 \text{ (dd, } ^{1}J_{\text{C-F}} = 225 \text{ Hz}, \, ^{2}J_{\text{C-F}} = 16 \text{ Hz}), \, 149.56 \text{ (dd, } ^{1}J_{\text{C-F}} = 225 \text{ Hz}, \, ^{2}J_{\text{C-F}} = 16 \text{ Hz}), \, 149.56 \text{ (dd, } ^{1}J_{\text{C-F}} = 225 \text{ Hz}, \, ^{2}J_{\text{C-F}} = 16 \text{ Hz}), \, 149.56 \text{ (dd, } ^{1}J_{\text{C-F}} = 225 \text{ Hz}, \, ^{2}J_{\text{C-F}} = 16 \text{ Hz}), \, 149.56 \text{ (dd, } ^{1}J_{\text{C-F}} = 225 \text{ Hz}, \, ^{2}J_{\text{C-F}} = 16 \text{ Hz}), \, 149.56 \text{ (dd, } ^{1}J_{\text{C-F}} = 225 \text{ Hz}, \, ^{2}J_{\text{C-F}} = 16 \text{ Hz}), \, 149.56 \text{ (dd, } ^{1}J_{\text{C-F}} = 225 \text{ Hz}, \, ^{2}J_{\text{C-F}} = 16 \text{ Hz}), \, 149.56 \text{ (dd, } ^{1}J_{\text{C-F}} = 225 \text{ Hz}, \, ^{2}J_{\text{C-F}} = 16 \text{ Hz}), \, 149.56 \text{ (dd, } ^{1}J_{\text{C-F}} = 225 \text{ Hz}, \, ^{2}J_{\text{C-F}} = 225 \text{ Hz}, \, ^{2}J_{\text{C-F}}$

 $^{1}J_{C-F} = 206.3 \text{ Hz}, ^{2}J_{C-F} = 10.4 \text{ Hz}, \text{ aromat.}), 200.86 (CHO)$

 $C_{14}H_{19}F_2O_4P$ [320.27]

Ber.[%]: C 52.50 H 5.98 Gef.[%] C 52.69 H 6.02

4-Diethoxyphosphoryl-4-(3,4-chlorophenyl)butanal 43

Hergestellt aus 11,92 g **39** (30 mmol) nach **AAV10** und anschließende Säulenchromatographie über Kieselgel (Elutionsmittel: 1 Teil Ethylacetat, 1 Teil *n*-Hexan).

Ausbeute: 90 %, farbloses Öl

IR v (NaCl): 3061 cm⁻¹ (C-H_{arom.}), 2982, 2933 cm⁻¹ (C-H_{aliph.}),

1718 cm⁻¹ (C=O), 1239 cm⁻¹ (P=O), 1052, 1028 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 1.07 (t, 3H, J = 7 Hz, CH₃), 1.22 (t,

3H, J = 7 Hz, CH₃), 1.96-2.12 (m, 2H, CH₂), 2.13-2.44 (m, 2H, CH₂), 3.26-3.33 (m, 1H, PCH), 3.77-3.94 (m, 2H, CH₃CH₂), 3.94-4.13 (m, 2H, CH₃CH₂), 7.32 (d, J = 6.5 Hz, 1H), 7.57 (t,

J = 1.6 Hz, 1H), 7.62 (d, J = 8.3 Hz, aromat.), 9.57 (CHO)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 16.44 (d, ${}^3J_{C-P} = 5.4$ Hz, CH₃),

16.60 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 5.6 \text{ Hz}$, CH₃), 24.01 (${}^{3}J_{\text{C-P}} = 2.9 \text{ Hz}$, CH₂CH₂), 31.45 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 14.6 \text{ Hz}$, CHCH₂), 41.41 (d, ${}^{1}J_{\text{C-P}} = 136.2 \text{ Hz}$, PCH), 62.04 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 6.7 \text{ Hz}$, CH₃CH₂), 62.27 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 6.7 \text{ Hz}$, CH₃CH₂), 129.76 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 6.4 \text{ Hz}$), 130.11 (d, ${}^{4}J_{\text{C-P}} = 3.6 \text{ Hz}$), 130.89 (d, ${}^{5}J_{\text{C-P}} = 1.8 \text{ Hz}$), 131.28 (d, ${}^{4}J_{\text{C-P}} = 2.6 \text{ Hz}$), 131.49 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 6.8 \text{ Hz}$), 137.80 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 6.6 \text{ Hz}$, aromat.), 202.76 (CHO)

 $C_{16}H_{23}CI_2O_4P$ [353.18]

Ber.[%]: C 47.61 H 5.42 Gef.[%] C 47.78 H 5.64

4-Diethoxyphosphoryl-4-(p-tolyl)butanal 44

Hergestellt aus 13,69 g **40** (40 mmol) nach **AAV10** und anschließende Säulenchromatographie über Kieselgel (Elutionsmittel: Ethylacetat:*n*-Hexan 1:1)

Ausbeute: 66 %, farbloses Öl

IR v (NaCl): 2983 cm⁻¹ (C-H_{aliph.}), 1723 cm⁻¹ (C=O), 1244 cm⁻¹ (P=O),

1027 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 1.04 (t, 3H, J = 7.03 Hz, CH₂CH₃),

1.21 (t, 3H, J = 7.02 Hz, CH_2CH_3), 1.92-2.10 (m, 1H, CH_2), 2.11-2.44 (m, 6H, CH_2 , $PhCH_2$), 3.13 (ddd, J = 21.68, 11.14, 3.88 Hz, 1H, PCH), 3.65-3.77 (m, 1H, CH_3CH_2), 3.77-3.88 (m, 1H, CH_3CH_2), 3.87-4.05 (m, 2H, CH_3CH_2), 6.98-7.30 (dt,

J = 17.4, 4.72 Hz, 4H, aromat.), 9.55 (s, 1H, CHO)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 15.99 (d, ${}^3J_{C-P} = 5.45$ Hz, CH₂CH₃),

16.18 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 5.47$ Hz, $\text{CH}_{2}C\text{H}_{3}$), 20.54 (PhCH₃), 22.11 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 1.48$ Hz, $\text{CH}_{2}C\text{H}_{2}$), 40.84 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 14.58$ Hz, $\text{CH}_{2}C\text{H}_{2}$), 41.54 (d, ${}^{1}J_{\text{C-P}} = 136.59$ Hz, PCH), 61.16 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 6.96$ Hz, CH₃ $C\text{H}_{2}$), 61.57 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 6.75$ Hz, CH₃ $C\text{H}_{2}$), 128.87, 128.92, 132.60 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 6.78$ Hz), 136.03 (d, ${}^{5}J_{\text{C-P}} = 3.28$ Hz, aromat.),

202.53 (C=O)

 $C_{15}H_{23}O_4P$ [298.31]

Ber.[%]: C 60.39 H 7.77 Gef.[%] C 60.14 H 7.48

4-Diethoxyphosphoryl-4-(1-naphthyl)butansäure 45

Hergestellt aus 1,67 g 41 (5 mmol) nach AAV11.

Ausbeute: 72 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 130 ℃

IR \tilde{v} (KBr): 2982 cm⁻¹ (C-H_{aliph.}), 1722 cm⁻¹ (C=O), 1243 cm⁻¹ (P=O),

1025 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 0.82 (t, 3H, J = 7 Hz, CH₃), 1.20 (t,

3H, J = 7 Hz, CH₃), 2.13 (ddd, J = 25.7, 18.6, 11.1 Hz, 3H, CH₂), 2.39 (d, J = 8.5 Hz, 1H, CH₂), 3.56 (dd, J = 17.1, 8.3 Hz, 1H, PCH), 3.74 (ddd, J = 14.6, 7.2, 3 Hz, 1H, CH₃CH₂), 3.90-4.12 (m, 2H, CH₃CH₂), 4.21 (dd, J = 20.6, 8 Hz, 1H, CH₃CH₂), 7.44-7.62 (m, 3H), 7.65 (s, 1H), 7.86 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.95 (d, J = 8.1

Hz, 1H), 8.16 (d, J = 8.2 Hz, 1H, aromat.), 12.07 (COOH)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 15.75 (d, $^3J_{C-P} = 5.4$ Hz, CH₃),

16.17 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 5.5 \text{ Hz}$, CH₃), 25.81 (CH₂CH₂), 31.08 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 14.6 \text{ Hz}$, CH_CH₂), 35.44 (d, ${}^{1}J_{\text{C-P}} = 137.3 \text{ Hz}$, PCH), 61.39 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 7.1 \text{ Hz}$, CH₃CH₂), 61.64 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 6.7 \text{ Hz}$, CH₃CH₂), 123.24, 125.29 (d, ${}^{4}J_{\text{C-P}} = 3.3 \text{ Hz}$), 125.54, 125.56 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 5.4 \text{ Hz}$), 126.09, 127.31 (d, ${}^{4}J_{\text{C-P}} = 3.3 \text{ Hz}$), 128.60,

132.17 (d, ${}^{2}J_{C-P} = 12.4 \text{ Hz}$), 133.37 (aromat.), 173.71 (C=O)

 $C_{18}H_{23}O_4P$ [350.35]

Ber.[%]: C 61.71 H 6.62 Gef.[%] C 61.83 H 6.57

4-Diethoxyphosphoryl-4-(3,4-difluorophenyl)butansäure 46

Hergestellt aus 1,60 g 42 (5 mmol) nach AAV11.

Ausbeute: 84 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 142 ℃

IR \tilde{v} (KBr): 3051 cm⁻¹ (C-H_{arom...}), 2988 cm⁻¹ (C-H_{alioh.}), 1721 cm⁻¹ (C=O),

1275 cm⁻¹ (P=O), 1046 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 1.07 (t, 3H, J = 7 Hz, CH₃), 1.22 (t,

3H, J = 7 Hz, CH₃), 1.89-2.33 (m, 4H, CH₂), 3.30 (ddd, J = 14.8, 11.2, 4.1 Hz, 1H, PCH), 3.65-3.95 (m, 2H, CH₃C H_2), 3.95-4.21 (m, 2H, CH₃C H_2), 7.16 (s, 1H), 7.27-7.64 (m, 2H, aromat.), 12.13

(COOH)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 16.26 (d, ${}^3J_{C-P} = 5.7$ Hz, CH₃),

16.34 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 5.8$ Hz, CH₃), 25.06 (CH₂CH₂), 31.43 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 14.9$ Hz, CH $_{\text{CH}_{2}}$), 42.6 (d, ${}^{1}J_{\text{C-P}} = 139.5$ Hz, PCH), 62.47 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 7.2$ Hz, CH₃CH₂), 62.97 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 7.3$ Hz, CH₃CH₂), 117.42 (dd, ${}^{2}J_{\text{C-F}} = 16.9$ Hz, ${}^{3}J_{\text{C-F}} = 1.8$ Hz), 118.06 (dd, ${}^{2}J_{\text{C-F}} = 17.9$ Hz, ${}^{3}J_{\text{C-F}} = 6.8$ Hz), 125.46, 132.38, 148.89 (dd, ${}^{1}J_{\text{C-F}} = 242.3$ Hz, ${}^{2}J_{\text{C-F}} = 14.6$ Hz), 149.81 (dd, ${}^{1}J_{\text{C-F}} = 253.5$ Hz,

 $^{2}J_{C-F} = 11.7 \text{ Hz}, \text{ aromat.}), 176.47 (COOH)$

 $C_{14}H_{19}F_2O_5P$ [336.27]

Ber.[%]: C 50.00 H 5.70 Gef.[%] C 50.06 H 5.58

4-(3,4-Dichlorophenyl)-4-diethoxyphosphoryl-butansäure 47

Hergestellt aus 1,77 g 43 (5 mmol) nach AAV11.

Ausbeute: 86 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 115 ℃

IR \tilde{v} (KBr): 3058 cm⁻¹ (C-H_{arom.}), 2983 cm⁻¹ (C-H_{aliph.}), 1720 cm⁻¹ (C=O),

1273 cm⁻¹ (P=O), 1028 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 1.08 (t, 3H, J = 7 Hz, CH₂CH₃),

1.22 (t, 3H, J = 7 Hz, CH_2CH_3), 1.79-2.36 (m, 4H, CH_2), 3.26-3.42 (m, 1H, PCH), 3.76-3.94 (m, 2H, CH_3CH_2), 3.94-4.24 (m, 2H, CH_3CH_2), 7.27-7.35 (m, 1H), 7.56 (t, J = 1.79 Hz, 1H), 7.63

(d, J = 8.3 Hz, 1H, aromat.), 12.14 (COOH)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 16.45 (d, ${}^3J_{C-P} = 5.5$ Hz, CH₃),

16.61 (d, ${}^{3}J_{C-P} = 5.5 \text{ Hz}$, CH₃), 24.97 (${}^{3}J_{C-P} = 1.9 \text{ Hz}$, CH₂CH₂), 31.79 (d, ${}^{2}J_{C-P} = 15 \text{ Hz}$, CH*C*H₂), 41.6 (d, ${}^{1}J_{C-P} = 136.5 \text{ Hz}$, PCH), 62.04 (d, ${}^{2}J_{C-P} = 7.1 \text{ Hz}$, CH₃CH₂), 62.27 (d, ${}^{2}J_{C-P} = 6.7 \text{ Hz}$, CH₃CH₂), 129.74 (d, ${}^{3}J_{C-P} = 6.4 \text{ Hz}$), 130.10 (d, ${}^{4}J_{C-P} = 3.5 \text{ Hz}$), 130.91 (d, ${}^{5}J_{C-P} = 2 \text{ Hz}$), 131.28 (d, ${}^{4}J_{C-P} = 2.4 \text{ Hz}$), 131.44 (d, ${}^{3}J_{C-P} = 6.9 \text{ Hz}$), 137.76 (d, ${}^{2}J_{C-P} = 6.6 \text{ Hz}$, aromat.), 173.89

(COOH)

 $C_{14}H_{19}Cl_2O_5P$ [369.18]

Ber.[%]: C 45.55 H 5.19 Gef.[%] C 45.81 H 5.04

4-Diethoxyphosphoryl-4-(p-tolyl)butansäure 48

Hergestellt aus 1,49 g 44 (5 mmol) nach AAV11.

Ausbeute: 76 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 78 ℃

IR \tilde{v} (KBr): 2984 cm⁻¹ (C-H_{aliph}), 1722 cm⁻¹ (C=O), 1201 cm⁻¹ (P=O),

1021 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 1.04 (t, 3H, J = 7.04 Hz, CH₃), 1.21

(t, 3H, J = 7.04 Hz, CH_2CH_3), 1.88-2.02 (m, 1H, CH_2), 2.02-2.13 (m, 2H, CH_2), 2.13-2.24 (m, 1H, CH_2), 2.30 (s, 3H, $PhCH_3$), 3.05-3.24 (ddd, J = 21.94, 11.06, 4.1 Hz, 1H, PCH_3), 3.64-3.77 (m, 1H, CH_3CH_2), 3.76-3.89 (m, 1H, CH_3CH_2), 3.89-4.08 (m, 2H,

CH₃C*H*₂), 7.06-7.25 (m, 4H, aromat.), 12.08 (s, 1H, COOH)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 15.99 (d, $^3J_{C-P} = 5.50$ Hz, CH₃),

16.18 (d, ${}^{3}J_{C-P} = 5.70$ Hz, CH₃), 20.55 (PhCH₃), 24.84 (CH₂CH₂), 41.27 (d, ${}^{2}J_{C-P} = 15.16$ Hz, CHCH₂), 41.58 (d, ${}^{1}J_{C-P} = 136.80$ Hz, PCH), 61.17 (d, ${}^{2}J_{C-P} = 6.92$ Hz, CH₃CH₂), 61.56 (d, ${}^{2}J_{C-P} = 6.82$ Hz, CH₃CH₂), 128.84, 128.89, 132.60 (d, ${}^{2}J_{C-P} = 6.88$

Hz), 136.01 (d, ${}^{5}J_{C-P}$ = 2.69 Hz, aromat.), 173.65 (COOH)

 $C_{15}H_{23}O_5P$ [314.31]

Ber.[%]: C 57.32 H 7.38 Gef.[%] C 57.32 H 7.24

N-benzyloxy-4-diethoxyphosphoryl-4-(1-naphthyl)butansäureamid 49

Hergestellt aus 1,75 g **45** (5 mmol) und 0,62 g **LI** (5 mmol) nach **AAV12** und anschließender Umkristallisation in Diethylether.

Ausbeute: 79 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 128 ℃

IR \tilde{v} (KBr): 3175 cm⁻¹ (N-H), 3058 cm⁻¹ (C-H_{arom.}), 2985 cm⁻¹ (C-H_{aliph.}),

1681 cm⁻¹ (C=O), 1220 cm⁻¹ (P=O), 1024 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 0.82 (t, 3H, J = 7 Hz, CH₃), 1.20 (t,

3H, J=7 Hz, CH₃), 1.82-1.90 (m, 2H, CH₂), 2.12-2.24 (m, 1H, CH₂), 2.38-2.43 (m, 1H, CH₂), 3.54-3.61 (m, 1H, PCH), 3.69-3.75 (m, 1H, CH₃C H_2), 4.01 (dt, J=15.8, 7 Hz, 2H, CH₃C H_2), 4.14-4.22 (m, 1H, CH₃C H_2), 4.33-4.37 (m, 0.27H, *E*-Isomer, PhCH₂), 4.66 (dd, $J_{\text{gem.H,H}}=25$, 11 Hz, 1.73H, *Z*-Isomer, PCH₂), 7.18-7.42 (m, 5H), 7.53-7.62 (m, 3H), 7.64 (s, 1H), 7.86 (d, J=8 Hz, 1H), 7.94 (d, J=8 Hz, 1H), 8.17 (d, J=8 Hz, 1H, aromat.), 10.47 (s,

0.13H, *E*-Isomer, NH), 10.78 (s, 0.87H, *Z*-Isomer, NH)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 15.76 (d, ${}^3J_{C-P} = 5.4$ Hz, CH₃),

16.19 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 5.6$ Hz, CH₃), 25.90 (CH₂CH₂), 29.49 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 14.8$ Hz, CHCH₂), 35.71 (d, ${}^{1}J_{\text{C-P}} = 137$ Hz, PCH), 61.40 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 6.6$ Hz, CH₃CH₂), 61.61 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 7$ Hz, CH₃CH₂), 76.60 (PhCH₂), 123.39, 125.29 (d, ${}^{4}J_{\text{C-P}} = 3$ Hz), 125.54, 125.51 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 5$ Hz), 125.60, 126.06, 127.28, 128.05, 128.13, 128.56, 132.00, 132.10, 132.30 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 6$ Hz), 133.40, 135.91

(aromat.), 168.54 (C=O)

 $C_{25}H_{30}NO_5P$ [455.48]

Ber.[%]: C 65.92 H 6.64 N 3.08 Gef.[%] C 65.79 H 6.38 N 3.19

N-benzyloxy-4-diethoxyphosphoryl-N-methyl-4-(1-naphthyl)butansäureamid 50

Hergestellt aus 1,75 g 45 (5 mmol) und 0,69 g LII nach AAV12.

Ausbeute: 87 %, orangenes Öl

IR \tilde{v} (NaCl): 2979 cm⁻¹ (C-H_{aliph.}), 1655 cm⁻¹ (C=O), 1244 cm⁻¹ (P=O),

1025 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 0.83 (t, 3H, J = 6.8 Hz, CH₂C H_3),

1.21 (t, 3H, J = 6.8 Hz, CH_2CH_3), 2.16 (d, J = 10.1 Hz, 2H, CH_2CH_2), 2.26 (d, J = 7.2 Hz, 1H, CH_2), 2.38 (s, 1H, CH_2), 3.03 (s, 3H, NCH_3), 3.58 (d, J = 7.2 Hz, 1H, PCH), 3.74 (d, J = 7.2 Hz, 1H, CH_3CH_2), 4.00 (s, 1H, CH_3CH_2), 4.20 (dd, J = 20.8, 6.7 Hz, 1H, CH_3CH_2), 4.42 (d, J = 31.7 Hz, 2H, $PhCH_2$), 6.93 (s, 2H), 7.16 (s, 2H), 7.25 (s, 1H), 7.57 (dd, J = 18.5, 9.5 Hz, 3H), 7.66 (s, 1H), 7.87 (d, J = 7 Hz, 1H), 7.97 (d, J = 6.7 Hz, 1H), 8.18 (d,

J = 7.3 Hz, 1H, aromat.)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 15.76 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 5.2 \text{ Hz}$, CH₂CH₃),

16.18 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 5.5 \text{ Hz}$, $\text{CH}_{2}C\text{H}_{3}$), 25.51 ($\text{CH}_{2}C\text{H}_{2}$), 28.95 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 15.3 \text{ Hz}$, $\text{CH}C\text{H}_{2}$), 32.55 (NCH₃), 35.47 (d, ${}^{1}J_{\text{C-P}} = 138.1 \text{ Hz}$, PCH), 61.35 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 6.9 \text{ Hz}$, $\text{CH}_{3}C\text{H}_{2}$), 61.59 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 6.9 \text{ Hz}$, $\text{CH}_{3}C\text{H}_{2}$), 74.83 (PhCH₂), 123.26, 125.29 (d, ${}^{4}J_{\text{C-P}} = 3.4 \text{ Hz}$), 125.57 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 6.6 \text{ Hz}$), 126.11, 127.27, 128.12, 128.45, 128.62, 129.19, 132.25 (d, ${}^{4}J_{\text{C-P}} = 3.6 \text{ Hz}$), 132.31, 132.33 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 9.4 \text{ Hz}$), 134.04 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 4.4 \text{ Hz}$),

133.41 (aromat.), 172.90 (C=O)

 $C_{26}H_{32}NO_5P$ [469.51]

Ber.[%]: C 66.51 H 6.87 N 2.98 Gef.[%] C 66.23 H 7.03 N 2.68

N-benzyloxy-4-diethoxyphosphoryl-4-(3,4-difluorophenyl)butansäureamid 51

Hergestellt aus 1,68 g 46 (5 mmol) und 0,62 g LI (5 mmol) nach AAV12.

Ausbeute: 97 %, farbloses Öl

IR \tilde{v} (NaCl): 3151 cm⁻¹ (N-H), 3065 cm⁻¹ (C-H_{arom..}), 2985 cm⁻¹ (C-H_{aliph.}),

1673 cm⁻¹ (C=O), 1232 cm⁻¹ (P=O), 1052, 1027 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 1.07 (t, 3H, J = 7 Hz, CH₃), 1.22 (t,

3H, J=7 Hz, CH₃), 1.63-1.89 (m, 2H, CH₂), 1.89-2.07 (m, 1H, CH₂), 2.06-2.36 (m, 1H, CH₂), 3.17-3.29 (m, 1H, PCH), 3.66-3.93 (m, 2H, CH₃C H_2), 3.93-4.20 (m, 2H, CH₃C H_2), 4.59 (s, 0.21H, E-Isomer, PhCH₂), 4.74 (s, 1.79H, Z-Isomer, PhCH₂), 6.85-7.25 (m, 1H), 7.21-7.23 (m, 7H, aromat.), 10.53 (s, 0.11H, E-Isomer,

NH), 10.87 (s, 0.89H, Z-Isomer, NH)

¹³C-NMR: (125 MHz, CDCl₃), (ppm): 16.69 (d, ${}^{3}J_{G-P} = 5.6$ Hz, CH₃), 16.77

(d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 5.9 \text{ Hz}$, CH₃), 26.3 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 5.9 \text{ Hz}$, CH₂CH₂), 30.7 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 16.4 \text{ Hz}$, CHCH₂), 42.77 (d, ${}^{1}J_{\text{C-P}} = 135.4 \text{ Hz}$, PCH), 62.69 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 5.9 \text{ Hz}$, CH₃CH₂), 63.07 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 7 \text{ Hz}$, CH₃CH₂), 78.46 (PhCH₂), 117.75 (dd, ${}^{2}J_{\text{C-F}} = 16.9 \text{ Hz}$, ${}^{3}J_{\text{C-F}} = 2 \text{ Hz}$), 118.38 (dd, ${}^{2}J_{\text{C-F}} = 19.2 \text{ Hz}$, ${}^{3}J_{\text{C-F}} = 2.8 \text{ Hz}$), 125.76, 129.05, 129.46,

133.26, 135.79, 148.81 (dd, ${}^{1}J_{C-F} = 206.3 \text{ Hz}$, ${}^{2}J_{C-F} = 13.8 \text{ Hz}$), 149.50 (dd, ${}^{1}J_{C-F} = 228.6 \text{ Hz}$, ${}^{2}J_{C-F} = 12.3 \text{ Hz}$, aromat.), 170.02

(C=O)

 $C_{21}H_{26}F_2NO_5P$ [441.41]

Ber.[%]: C 57.14 H 5.94 N 3.17 Gef.[%] C 56.90 H 5.81 N 3.26

<u>N-benzyloxy-4-diethoxyphosphoryl-4-(3,4-difluorophenyl)-N-methyl-butansäureamid</u> <u>52</u>

Hergestellt aus 1,68 g **46** (5 mmol) und 0,69 g **LII** (5 mmol) nach **AAV12** und anschließender Umkristallisation in Diethylether.

Ausbeute: 92 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 60 ℃

IR \tilde{v} (KBr): 3049 cm⁻¹ (C-H_{arom...}), 2984, 2963 cm⁻¹ (C-H_{aliph.}),

 $1672 \text{ cm}^{-1} \text{ (C=O)}, 1287 \text{ cm}^{-1} \text{ (P=O)}, 1053, 1027 \text{ cm}^{-1} \text{ (P-O)}$

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 1.06 (t, 3H, J = 7 Hz, CH₂C H_3),

1.20 (t, 3H, J = 6.9 Hz, CH_2CH_3), 1.76-2.08 (m, 1H, $CHCH_2$), 2.07-2.42 (m, 3H, CH_2), 3.10 (s, 3H, NCH_3), 3.22-3.34 (dd, J = 24.0, 11.0 Hz, 1H, PCH), 3.70-3.92 (m, 2H, CH_3CH_2), 3.92-4.25 (m, 2H, CH_3CH_2), 4.71 (s, 2H, $PhCH_2$), 7.01-7.28 (m, 3H),

7.28-7.61 (m, 5H, aromat.)

¹³C-NMR: (125 MHz, CDCl₃), (ppm): 15.99 (d, ${}^{3}J_{C-P} = 5.4$ Hz, CH₂CH₃),

16.14 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 5.5$ Hz, $\text{CH}_{2}C\text{H}_{3}$), 24.31 ($\text{CH}_{2}C\text{H}_{2}$), 29.17 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 15.5$ Hz, $\text{CH}C\text{H}_{2}$), 32.63 (NCH₃), 41.28 (d, ${}^{1}J_{\text{C-P}} = 136.9$ Hz, PCH), 61.45 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 7.1$ Hz, $\text{CH}_{3}C\text{H}_{2}$), 61.73 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 6.8$ Hz, $\text{CH}_{3}C\text{H}_{2}$), 75.08 (PhCH₂), 117.26 (dd, ${}^{2}J_{\text{C-F}} = 16.7$ Hz, ${}^{3}J_{\text{C-F}} = 1.4$ Hz), 117.87 (dd, ${}^{2}J_{\text{C-F}} = 17.4$ Hz, ${}^{3}J_{\text{C-F}} = 6.5$ Hz), 125.92, 128.24, 128.58, 129.27, 133.97, 134.38, 148.43 (dd, ${}^{1}J_{\text{C-F}} = 242.7$ Hz, ${}^{2}J_{\text{C-F}} = 12$ Hz), 149.07 (dd, ${}^{1}J_{\text{C-F}} = 246.9$ Hz,

 $^{2}J_{C-F} = 14.1 \text{ Hz}, \text{ aromat.}), 172.65 (C=O)$

 $C_{22}H_{28}F_2NO_5P$ [455.43]

Ber.[%]: C 58.02 H 6.20 N 3.08 Gef.[%] C 58.29 H 6.29 N 2.78

N-benzyloxy-4-(3,4-dichlorophenyl)-4-diethoxyphosphoryl-butansäureamid 53

Hergestellt aus 1,85 g 47 (5 mmol) und 0,62 g LI (5 mmol) nach AAV12.

Ausbeute: 83 %, farbloses Öl

IR v (NaCl): 3298 cm⁻¹ (N-H), 3065 cm⁻¹ (C-H_{arom.}), 2939 cm⁻¹ (C-H_{aliph.}),

1693 cm⁻¹ (C=O), 1234 cm⁻¹ (P=O), 1022 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 1.08 (t, 3H, J = 7.02 Hz, CH₃), 1.22

(t, 3H, J = 7.01 Hz, CH₃), 1.83 (t, J = 7.4 Hz, 2H, CH₂), 1.92-2.05 (m, 1H, CH₂), 2.12-2.29 (m, 1H, CH₂), 3.26 (ddd, J = 22.17, 10.98, 3.56 Hz, 1H, PCH), 3.75-3.94 (m, 2H, CH₃CH₂), 3.94-4.15 (m, 2H, CH₃CH₂), 4.59 (s, 0.25H, E-Isomer, PhCH₂), 4.74 (s, 1.75H, E-Isomer, PhCH₂), 7.26 (d, E-Isomer, PhCH₂), 7.30-7.46 (m, 5H), 7.51 (s, 1H), 7.60 (d, E-Isomer, 1H, aromat.), 10.52 (s,

0.15H, *E*-Isomer, NH), 10.86 (s, 0.85H, *Z*-Isomer, NH)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 15.98 (d, $^3J_{C-P} = 5.45$ Hz, CH₃),

16.14 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 5.5 \text{ Hz}$, CH₃), 24.70 (${}^{3}J_{\text{C-P}} = 3.14 \text{ Hz}$, CH₂CH₂), 29.73 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 15.68 \text{ Hz}$, CH*C*H₂), 41.24 (d, ${}^{1}J_{\text{C-P}} = 136.5 \text{ Hz}$, PCH), 61.60 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 6.51 \text{ Hz}$, CH₃CH₂), 61.79 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 6.48 \text{ Hz}$, CH₃CH₂), 128.10, 128.19, 128.60, 129.05, 129.46 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 5.65 \text{ Hz}$), 129.61 (d, ${}^{4}J_{\text{C-P}} = 3.32 \text{ Hz}$), 130.41, 130.83 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 5.29 \text{ Hz}$), 131.03 (d, ${}^{4}J_{\text{C-P}} = 7.04 \text{ Hz}$), 136.02 (d,

 $^{2}J_{C-P} = 6.0 \text{ Hz}$, aromat.), 168.18 (C=O)

 $C_{21}H_{26}CI_2NO_5P$ [474.31]

Ber.[%]: C 53.18 H 5.53 N 2.95 Gef.[%] C 53.35 H 5.39 N 2.86

$\frac{\textit{N}\text{-}\text{benzyloxy-4-}(3,4\text{-}\text{dichlorophenyl})\text{-}4\text{-}\text{diethoxyphosphoryl-}\textit{N}\text{-}\text{methyl-butans\"{a}ureamid}}{\textbf{54}}$

Hergestellt aus 1,85 g **47** (5 mmol) und 0,69 g **LII** (5 mmol) nach **AAV12** und anschließender Umkristallisierung in Diethylether.

Ausbeute: 97 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 65 ℃

IR \tilde{v} (KBr): 3037 cm⁻¹ (C-H_{arom.}), 2982, 2963 cm⁻¹ (C-H_{aliph.}),

1672 cm⁻¹ (C=O), 1233 cm⁻¹ (P=O), 1052, 1026 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 1.08 (t, 3H, J = 7 Hz, CH₂CH₃),

1.21 (t, 3H, J = 7 Hz, CH_2CH_3), 1.87-2.05 (m, 1H, $CHCH_2$), 2.08-2.33 (m, 3H, CH_2), 3.11 (s, 3H, NCH_3), 3.35-3.42 (m, 1H, PCH_3), 3.75-3.94 (m, 2H, CH_3CH_2), 3.94-4.06 (m, 2H, CH_3CH_2), 4.70 (s, 2H, $PhCH_2$), 7.19 (d, J = 6 Hz, 2H), 7.27-7.42 (m, 4H), 7.56 (t,

J = 2 Hz, 1H), 7.63 (d, J = 8.3 Hz, 1H aromat.)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 16.45 (d, ${}^3J_{C-P} = 5.4$ Hz, CH₂CH₃),

16.60 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 5.6 \text{ Hz}$, $\text{CH}_{2}C\text{H}_{3}$), 24.54 ($\text{CH}_{2}C\text{H}_{2}$), 29.65 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 15.9 \text{ Hz}$, $\text{CH}C\text{H}_{2}$), 32.98 (NCH₃), 41.65 (d, ${}^{1}J_{\text{C-P}} = 136.5 \text{ Hz}$, PCH), 62.0 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 7.1 \text{ Hz}$, $\text{CH}_{3}C\text{H}_{2}$), 62.22 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 6.6 \text{ Hz}$, $\text{CH}_{3}C\text{H}_{2}$), 75.50 (PhCH₂), 128.71, 129.03, 129.72 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 6.6 \text{ Hz}$), 129.76, 130.08 (d, ${}^{5}J_{\text{C-P}} = 3.7 \text{ Hz}$), 130.92, 131.33 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 2.6 \text{ Hz}$), 131.49 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 7.3 \text{ Hz}$), 134.77,

137.92 (d, ${}^{2}J_{C-P} = 6.9$ Hz, aromat.), 173.10 (C=O)

 $C_{22}H_{28}CI_2NO_5P$ [488.34]

Ber.[%]: C 54.11 H 5.78 N 2.87 Gef.[%] C 53.98 H 5.92 N 2.73

N-benzyloxy-4-diethoxyphosphoryl-4-(p-tolyl)butansäureamid 55

Hergestellt aus 1,57 g 48 (5 mmol) und 0,62 g LI (5 mmol) nach AAV12.

Ausbeute: 77,2 %, farbloses Öl

IR \tilde{v} (NaCl): 3178 cm⁻¹ (C-H_{arom.}), 2983 cm⁻¹ (C-H_{aliph.}), 1680 cm⁻¹ (C=O),

1226 cm⁻¹ (P=O), 1025 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 1.04 (t, 3H, J = 7.03 Hz, CH₂C H_3),

1.21 (t, 3H, J = 7.02 Hz, CH₂CH₃), 1.81 (t, J = 7.4 Hz, 2H, CH₂), 1.89-2.06 (m, 1H, CH₂), 2.07-2.43 (m, 4H, CH₂, PhCH₃), 3.00-3.21 (ddd, J = 22.02, 11.28, 3.24 Hz, 1H, PCH), 3.62-3.76 (m, 1H, CH₃CH₂), 3.76-3.89 (m, 1H, CH₃CH₂), 3.89-4.14 (m, 2H, CH₃CH₂), 4.52 (s, 0.26H, E-Isomer, PhCH₂), 4.74 (s, 1.74H, E-Isomer, PhCH₂), 7.13 (s, 4H) 7.36 (s, 5H, aromat.), 10.50 (s,

0.13H, *E*-Isomer, NH), 10.86 (s, 0.87H, *Z*-Isomer, NH)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 16.00 (d, ${}^3J_{C-P} = 5.52$ Hz, CH₂CH₃),

16.19 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 5.54$ Hz, $\text{CH}_{2}C\text{H}_{3}$), 20.55 (PhCH₃), 25.11 (CH₂CH₂), 29.82 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 16.29$ Hz, $\text{CH}C\text{H}_{2}$), 41.80 (d, ${}^{1}J_{\text{C-P}} = 136.57$ Hz, PCH), 61.18 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 7.23$ Hz, $\text{CH}_{3}C\text{H}_{2}$), 61.53 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 6.63$ Hz, $\text{CH}_{3}C\text{H}_{2}$), 76.59 (PhCH₂), 128.07, 128.17, 128.58, 128.85, 128.93 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 6.74$ Hz), 132.57 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 5.47$ Hz), 135.93 (d, ${}^{5}J_{\text{C-P}} = 2.64$ Hz, aromat.), 168.47

(C=O)

 $C_{22}H_{30}NO_5P$ [419.45]

Ber.[%]: C 63.00 H 7.21 N 3.34 Gef.[%] C 62.79 H 7.55 N 3.31

N-benzyloxy-4-diethoxyphosphoryl-N-methyl-4-(p-tolyl)butansäureamid 56

Hergestellt aus 1,57 g 48 (5 mmol) und 0,69 g LII (5 mmol) nach AAV12.

Ausbeute: 82,7 %, farbloses Öl

IR \tilde{v} (NaCl): 2981 cm⁻¹ (C-H_{aliph.}), 1661 cm⁻¹ (C=O), 1243 cm⁻¹ (P=O),

1055, 1027 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 1.04 (t, 3H, J = 6.99 Hz, CH₂C H_3),

1.21 (t, 3H, J = 6.82 Hz, CH_2CH_3), 1.86-1.99 (m, 1H, $CHCH_2$), 2.13-2.26 (m, 3H, CH_2), 2.29 (s, 3H, $PhCH_3$), 3.10 (s, 3H, NCH_3), 3.12-3.22 (m, 1H, PCH_3), 3.65-3.78 (m, 1H, CH_3CH_2), 3.78-3.89 (m, 1H, CH_3CH_2), 3.89-4.03 (m, 2H, CH_3CH_2), 4.66 (dd, $J_{gem.H,H} = 24.22$, 9.88 Hz, 2H, $PhCH_2$), 7.04-7.27 (m, 6H), 7.27-

7.49 (m, 3H, aromat.)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 16.46 (d, ${}^3J_{\text{C-P}} = 5.47 \text{ Hz}$, CH₂CH₃),

16.64 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 5.56$ Hz, $CH_{2}CH_{3}$), 21.03 (PhCH₃), 24.86 (CH₂CH₂), 29.67 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 15.25$ Hz, $CHCH_{2}$), 33.08 (NCH₃), 42.21 (d, ${}^{1}J_{\text{C-P}} = 136.50$ Hz, PCH), 61.60 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 6.84$ Hz, $CH_{3}CH_{2}$), 61.97 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 6.88$ Hz, $CH_{3}CH_{2}$), 75.58 (PhCH₂), 128.72, 129.03, 128.34, 124.41, 129.75, 133.23 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 6.62$ Hz), 134.78, 136.42 (d, ${}^{5}J_{\text{C-P}} = 2.86$ Hz, aromat.),

173.33 (C=O)

 $C_{23}H_{32}NO_5P$ [433.48]

Ber.[%]: C 63.73 H 7.44 N 3.23 Gef.[%] C 63.55 H 7.45 N 3.16

{4-[Benzyloxy(methyl)amino]-1-(1-naphthyl)-4-oxo-butyl}phosphonsäure 57

Hergestellt aus 1,41 g **50** (3 mmol) und 2,31 g Trimethylsilylbromid (15 mmol) nach **AAV3** mit anschließender Umkristallisation in Ethylacetat bei 7 $^{\circ}$ C.

Ausbeute: 73 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 145 ℃

IR \tilde{v} (KBr): 3036 cm⁻¹ (C-H_{arom.}), 2981 cm⁻¹ (C-H_{aliph.}), 1608 cm⁻¹ (C=O),

1212 cm⁻¹ (P=O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 2.06-2.27 (m, 3H, CH₂), 2.32-2.47

(m, 1H, CHC H_2), 3.02 (s, 3H, NCH₃), 3.92 (ddd, J = 22.2, 10.4, 3.6 Hz, 1H, PCH), 4.41 (dd, $J_{gem.H,H}$ = 32.1, 9.2 Hz, 2H, PhCH₂), 6.93 (s, 2H), 7.17 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 7.26 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 7.53 (dt, J = 18.0, 7.1 Hz, 3H), 7.67 (d, J = 4.7 Hz, 1H), 7.81 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.94 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 8.14 (d, J = 8.2 Hz, 1H,

aromat.)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 26.2 (CH₂CH₂), 29.4 (d,

 $^{2}J_{\text{C-P}} = 15 \text{ Hz}, \text{ CH}\textsubscript{CH}_{2}), 32.59 (\text{NCH}_{3}), 37.3 (d, {}^{1}J_{\text{C-P}} = 134.6 \text{ Hz}, \text{PCH}), 74.82 (\text{PhCH}_{2}), 123.55, 125.25, 125.33 (d, {}^{4}J_{\text{C-P}} = 2.8 \text{ Hz}), 125.75, 126.46, 128.13, 128.44, 128.48, 129.24, 132.4 (d, {}^{4}J_{\text{C-P}} = 3.5 \text{ Hz}), 132.48, 133.50 (d, {}^{2}J_{\text{C-P}} = 9.1 \text{ Hz}), 134.08, 134.08$

134.70 (d, ${}^{3}J_{C-P} = 5.9$ Hz, aromat.), 173.17 (C=O)

 $C_{22}H_{24}NO_5P$ [469.51]

Ber.[%]: C 63.92 H 5.85 N 3.39 Gef.[%] C 63.73 H 6.13 N 3.10

{4-[Benzyloxy(methyl)amino]-1-(3,4-difluorophenyl)-4-oxo-butyl}phosphonsäure 58

Hergestellt aus 1,37 g **52** (3 mmol) und 2,31 g Trimethylsilylbromid (15 mmol) nach **AAV3** mit anschließender Umkristallisation in Ethylacetat bei 7 °C.

Ausbeute: 40 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 144 ℃

IR \tilde{v} (KBr): 3437 cm⁻¹ (O-H), 3037 cm⁻¹ (C-H_{arom..}), 2944 cm⁻¹ (C-H_{aliph.}),

1607 cm⁻¹ (C=O), 1277 cm⁻¹ (P=O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆), (ppm): 1.94 (m, 1H, CHC*H*₂), 2.22 (s, 3H,

CH₂), 2.94 (dd, J = 20.0, 11 Hz, 1H, PCH), 3.09 (s, 3H, NCH₃), 4.70 (s, 2H, PhCH₂), 7.08 (s, 1H), 7.15-7.62 (m, 7H, aromat.)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 24.90 (d, ${}^3J_{C-P} = 2.1 \text{ Hz}$, CH_2CH_2),

29.57 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}}$ = 16.8 Hz, CH*C*H₂), 32.68 (NCH₃), 43.53 (d, ${}^{1}J_{\text{C-P}}$ = 133.4 Hz, PCH), 75.06 (PhCH₂), 116.84 (d, ${}^{2}J_{\text{C-F}}$ = 16.4 Hz), 117.57 (dd, ${}^{2}J_{\text{C-F}}$ = 16.5 Hz, ${}^{3}J_{\text{C-F}}$ = 5.7 Hz), 125.80, 128.23, 128.58, 129.29, 134.39, 136.11 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}}$ = 8.8 Hz), 148.12 (dd, ${}^{1}J_{\text{C-F}}$ = 228.1 Hz, ${}^{2}J_{\text{C-F}}$ = 13.3 Hz), 149.02 (dd,

 $^{1}J_{C-F} = 233.9 \text{ Hz}, ^{2}J_{C-F} = 12.7 \text{ Hz}, \text{ aromat.}), 172.66 (C=O)$

 $C_{18}H_{20}F_2NO_5P$ [399.33]

Ber.[%]: C 54.14 H 5.05 N 3.51 Gef.[%] C 54.02 H 5.06 N 3.23

{4-[Benzyloxy(methyl)amino]-1-(3,4-dichlorophenyl)-4-oxo-butyl}phosphonsäure 59

Hergestellt aus 1,47 g **54** (3 mmol) und 2,31 g Trimethylsilylbromid (15 mmol) nach **AAV3** mit anschließender Umkristallisation in Ethylacetat bei 7 ℃.

Ausbeute: 60 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 150 ℃

IR \tilde{v} (KBr): 3031 cm⁻¹ (C-H_{arom.}), 2944 cm⁻¹ (C-H_{aliph.}),1629 cm⁻¹ (C=O),

1232 cm⁻¹ (P=O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 1.82-1.98 (m, 1H, CHC H_2), 2.13-

2.33 (td, J = 15.6, 15.5, 9.5 Hz, 3H, CH₂), 2.91-3.04 (m, 1H, PCH), 3.10 (s, 3H, NCH₃), 4.70 (s, 2H, PhCH₂), 7.15-7.22 (d, J = 5.2 Hz, 2H), 7.22-7.28 (m, 1H), 7.28-7.42 (m, 3H), 7.45-7.53

(m, 1H), 7.58 (d, J = 8.3 Hz, 1H aromat.), 10.36 (s, 1H, OH)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 25.18 (CH₂CH₂), 30.03 (d,

 $^{2}J_{\text{C-P}} = 14.7 \text{ Hz}, \text{ CH}C\text{H}_{2}), 33.00 \text{ (NCH}_{3}), 44.03 \text{ (d, } ^{1}J_{\text{C-P}} = 136.5 \text{ Hz}, \text{PCH}), 75.53 \text{ (PhCH}_{2}), 128.72, 129.04, 129.45 \text{ (d, } ^{3}J_{\text{C-P}} = 3.9 \text{ Hz}), 129.80, 130.60 \text{ (d, } ^{5}J_{\text{C-P}} = 1.1 \text{ Hz}), 130.79, 131.14 \text{ (d, } ^{4}J_{\text{C-P}} = 2.2 \text{ Hz}), 131.32 \text{ (d, } ^{3}J_{\text{C-P}} = 8 \text{ Hz}), 134.88, 140.18 \text{ (d, } ^{4}J_{\text{C-P}} = 2.2 \text{ Hz}), 131.32 \text{ (d, } ^{3}J_{\text{C-P}} = 8 \text{ Hz}), 134.88, 140.18 \text{ (d, } ^{4}J_{\text{C-P}} = 2.2 \text{ Hz}), 131.32 \text{ (d, } ^{3}J_{\text{C-P}} = 8 \text{ Hz}), 134.88, 140.18 \text{ (d, } ^{4}J_{\text{C-P}} = 2.2 \text{ Hz}), 131.32 \text{ (d, } ^{3}J_{\text{C-P}} = 8 \text{ Hz}), 134.88, 140.18 \text{ (d, } ^{4}J_{\text{C-P}} = 2.2 \text{ Hz}), 131.32 \text{ (d, } ^{3}J_{\text{C-P}} = 8 \text{ Hz}), 134.88, 140.18 \text{ (d, } ^{4}J_{\text{C-P}} = 2.2 \text{ Hz}), 131.32 \text{ (d, } ^{3}J_{\text{C-P}} = 8 \text{ Hz}), 134.88, 140.18 \text{ (d, } ^{4}J_{\text{C-P}} = 2.2 \text{ Hz}), 134.88, 140.18 \text{ (d, } ^{4}J_{\text{C-P}} = 2.2 \text{ Hz}), 134.88, 140.18 \text{ (d, } ^{4}J_{\text{C-P}} = 2.2 \text{ Hz}), 134.88, 140.18 \text{ (d, } ^{4}J_{\text{C-P}} = 2.2 \text{ Hz}), 134.88, 140.18 \text{ (d, } ^{4}J_{\text{C-P}} = 2.2 \text{ Hz}), 134.88, 140.18 \text{ (d, } ^{4}J_{\text{C-P}} = 2.2 \text{ Hz}), 134.88, 140.18 \text{ (d, } ^{4}J_{\text{C-P}} = 2.2 \text{ Hz}), 134.88, 140.18 \text{ (d, } ^{4}J_{\text{C-P}} = 2.2 \text{ Hz}), 134.88, 140.18 \text{ (d, } ^{4}J_{\text{C-P}} = 2.2 \text{ Hz}), 134.88, 140.18 \text{ (d, } ^{4}J_{\text{C-P}} = 2.2 \text{ Hz}), 134.88, 140.18 \text{ (d, } ^{4}J_{\text{C-P}} = 2.2 \text{ Hz}), 134.88, 140.18 \text{ (d, } ^{4}J_{\text{C-P}} = 2.2 \text{ Hz}), 134.88, 140.18 \text{ (d, } ^{4}J_{\text{C-P}} = 2.2 \text{ Hz}), 134.88, 140.18 \text{ (d, } ^{4}J_{\text{C-P}} = 2.2 \text{ Hz}), 134.88, 140.18 \text{ (d, } ^{4}J_{\text{C-P}} = 2.2 \text{ Hz}), 134.88, 140.18 \text{ (d, } ^{4}J_{\text{C-P}} = 2.2 \text{ Hz}), 134.88, 140.18 \text{ (d, } ^{4}J_{\text{C-P}} = 2.2 \text{ Hz}), 134.88, 140.18 \text{ (d, } ^{4}J_{\text{C-P}} = 2.2 \text{ Hz}), 134.88, 140.18 \text{ (d, } ^{4}J_{\text{C-P}} = 2.2 \text{ Hz}), 134.88, 140.18 \text{ (d, } ^{4}J_{\text{C-P}} = 2.2 \text{$

 $^{2}J_{C-P} = 9.9 \text{ Hz}, \text{ aromat.}), 173.40 (C=O)$

 $C_{18}H_{20}CI_2NO_5P$ [432.23]

Ber.[%]: C 50.02 H 4.66 N 3.24 Gef.[%] C 49.76 H 4.76 N 3.12

{4-[Benzyloxy(methyl)amino]-4-oxo-1-(p-tolyl)butyl}phosphonsäure 60

Hergestellt aus 1,3 g **56** (3 mmol) und 2,31 g Trimethylsilylbromid (15 mmol) nach **AAV3** mit anschließender Umkristallisation in Ethylacetat bei 7 ℃.

Ausbeute: 60,3 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 164 ℃

IR \tilde{v} (KBr): 3413 cm⁻¹ (O-H), 2953 cm⁻¹ (C-H_{aliph.}), 1604 cm⁻¹ (C=O),

1239 cm⁻¹ (P=O), 1001 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆), (ppm): 1.83-1.97 (m, 1H, CHC*H*₂), 2.16-

2.25 (m, 3H, CH₂), 2.27 (s, 3H, PhCH₃), 2.82 (ddd, J = 13.57, 11.13, 1.8 Hz, 1H, PCH), 3.08 (s, 3H, NCH₃), 4.45-4.83 (dd, $J_{\text{qem,H,H}} = 21.63$, 9.73 Hz, 2H, PhCH₂), 6.98-7.28 (m, 6H), 7.28-

7.56 (m, 3H, aromat.)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 21.02 (PhCH₃), 25.33 (CH₂CH₂),

30.14 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 15.06$ Hz, CH*C*H₂), 33.10 (NCH₃), 44.42 (d, ${}^{1}J_{\text{C-P}} = 134.10$ Hz, PCH), 75.57 (PhCH₂), 128.73, 129.03, 129.37 (d, ${}^{4}J_{\text{C-P}} = 6.33$ Hz), 129.79, 133.14, 134.81, 135.39 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 6.68$ Hz), 135.57 (d, ${}^{5}J_{\text{C-P}} = 2.67$ Hz, aromat.), 173.70

(C=O)

 $C_{19}H_{24}NO_5P$ [377.37]

Ber.[%]: C 60.47 H 6.41 N 3.71 Gef.[%] C 60.22 H 6.37 N 3.61

{4-[Hydroxy(methyl)amino]-1-(1-naphthyl)-4-oxo-butyl}phosphonsäure 61

Hergestellt aus 0,41 g 57 (1 mmol) nach AAV6 mit anschließender Umkristallisation in Ethylacetat bei 7 $^{\circ}$ C.

Ausbeute: 98 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 111 ℃

IR \tilde{v} (KBr): 3162 cm⁻¹ (O-H), 2932 cm⁻¹ (C-H_{aliph.}), 1607 cm⁻¹ (C=O),

1197 cm⁻¹ (P=O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆), (ppm): 2.09-2.13 (m, 3H, CH₂), 2.39-2.44

(m, 1H, CHC H_2), 2.98 (s, 3H, NCH₃), 3.88-3.93 (m, 1H, PCH), 7.45-7.50 (m, 3H), 7.63 (d, J = 4.9 Hz, 1H), 7.78 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.90 (d, J = 6.6 Hz, 1H), 8.13 (d, J = 7.7 Hz, 1H, aromat.),

9.58 (s, 1H, OH)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 26.80 (CH₂CH₂), 30.19 (d,

 $^2J_{\text{C-P}}$ = 13.9 Hz, CH*C*H₂), 36.0 (NCH₃), 38.24 (d, $^1J_{\text{C-P}}$ = 134.6 Hz, PCH), 124.04, 124.21, 125.61, 125.78 (d, $^4J_{\text{C-P}}$ = 3.2 Hz), 126.08, 126.74, 128.84, 132.94 (d, $^4J_{\text{C-P}}$ = 6.9 Hz), 133.81, 135.56 (d,

 $^{3}J_{\text{C-P}} = 3.8 \text{ Hz}, \text{ aromat.}, 172.97 (C=O)$

³¹P-NMR: (202,5 MHz, DMSO-*d*₆), (ppm): 24.71

 $C_{15}H_{18}NO_5P$ [323.28]

HPLC: 20 Minuten Laufzeit, isokratische Elution (1:1) (Acetonitril,

5 % wässrige NH₄OAc-Lösung):

Retentionszeit: 2,080 min (98,9 % AUC)

{1-(3,4-Difluorophenyl)-4-[hydroxy(methyl)amino]-4-oxo-butyl}phosphonsäure 62

Hergestellt aus 0,40 g **58** (1 mmol) nach **AAV6** mit anschließender Umkristallisation in Ethylacetat bei 7 °C.

Ausbeute: 84 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 116,8 ℃

IR \tilde{v} (KBr): 3405 cm⁻¹ (O-H), 1615 cm⁻¹ (C=O), 1282 cm⁻¹ (P=O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 1.82-1.98 (m, 1H, CHC H_2), 2.20 (s,

3H, CH_2), 2.97 (dd, J = 21.7, 9.6 Hz, 1H, PCH), 3.02 (s, 3H, NCH_3), 6.86-7.18 (m, 1H), 7.22-7.30 (m, 1H), 7.35 (dd, J = 19.0,

8.91 Hz, 1H, aromat.), 9.67 (s, 1H, OH)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 25.00 (CH₂CH₂), 29.69 (d,

 $^2J_{\text{C-P}} = 15.1$ Hz, CH 2 CH, 35.54 (NCH₃), 43.61 (d, $^1J_{\text{C-P}} = 133.4$ Hz, PCH), 116.77 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 16.6$ Hz, $^3J_{\text{C-F}} = 1.5$ Hz), 117.54 (dd, $^2J_{\text{C-F}} = 16.9$ Hz, $^3J_{\text{C-F}} = 5.8$ Hz), 125.82, 136.13, 148.96 (dd, $^1J_{\text{C-F}} = 250.6$ Hz, $^2J_{\text{C-F}} = 13.9$ Hz), 149.76 (dd, $^1J_{\text{C-F}} = 242.9$ Hz,

 $^{2}J_{C-F} = 10.8 \text{ Hz}, \text{ aromat.}), 172.20 (C=O)$

³¹P-NMR: (202,5 MHz, DMSO-*d*₆), (ppm): 23,84

 $C_{11}H_{14}F_2NO_5P$ [309.20]

Ber.[%]: C 42.73 H 4.56 N 4.53 Gef.[%] C 43.00 H 4.77 N 4.50

{1-(3,4-Dichlorophenyl)-4-[hydroxy(methyl)amino]-4-oxo-butyl}phosphonsäure 63

Hergestellt aus 0,43 g 59 (1 mmol) nach AAV6.

Ausbeute: 97 %, orangenes Öl

IR \tilde{v} (NaCl): 3175 cm⁻¹ (O-H), 2938 cm⁻¹ (C-H_{aliph.}),1615 cm⁻¹ (C=O),

1200 cm⁻¹ (P=O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆), (ppm): 1.83-2.00 (m, 1H, CHC*H*₂), 2.08-

2.34 (m, 3H, CH₂), 2.92-3.01 (m, 1H, PCH), 3.03 (s, 3H, NCH₃), 7.15-7.39 (m, 1H), 7.49 (t, J = 1.9 Hz, 1H), 7.57 (d, J = 8.3 Hz,

1H, aromat.), 9.68 (s, 1H)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 25.34 (CH₂CH₂), 30.02 (d,

 $^2J_{\text{C-P}} = 14.6 \text{ Hz}, \text{ CH}\textsubscript{CH}_2), 36.01 (NCH_3), 44.12 (d, <math>^1J_{\text{C-P}} = 132.6 \text{ Hz}, \text{ PCH}), 129.19 (d, <math>^4J_{\text{C-P}} = 3.6 \text{ Hz}), 129.92 (d, <math>^3J_{\text{C-P}} = 6.2 \text{ Hz}), 130.50, 130.90 (d, <math>^4J_{\text{C-P}} = 2.5 \text{ Hz}), 131.21 (d, {}^3J_{\text{C-P}} = 6 \text{ Hz}),$

140.25 (d, ${}^{2}J_{C-P} = 6.4$ Hz, aromat.), 172.66 (C=O)

³¹P-NMR: (202,5 MHz, DMSO-*d*₆), (ppm): 23,13

 $C_{11}H_{14}CI_2NO_5P$ [342.11]

HPLC: 20 Minuten Laufzeit, isokratische Elution (1:1) (Acetonitril,

5 % wässrige NH_4OAc -Lösung):

Retentionszeit: 1,967 min (99 % AUC)

{4-[Hydroxy(methyl)amino]-4-oxo-1-(p-tolyl)butyl}phosphonsäure 64

Hergestellt aus 0,43 g 60 (1 mmol) nach AAV6.

Ausbeute: 98 %, farbloses Öl

IR \tilde{v} (NaCl): 1615 cm⁻¹ (C=O), 1203 cm⁻¹ (P=O), 995 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆), (ppm):1.86-2.00 (m, 1H, CHC*H*₂), 2.11-

2.23 (m, 3H, CH_2), 2.26 (s, 3H, $PhCH_3$), 2.73-2.89 (m, 1H, PCH), 3.02 (s, 3H, NCH_3), 6.95-7.10 (m, 2H), 7.18 (dd, J = 8.01, 1.76

Hz, 2H, aromat.), 10.16 (OH)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 20.51 (PhCH₃), 25.14 (CH₂CH₂),

29.98 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 15.25 Hz, CH*C*H₂), 35.54 (NCH₃), 44.26 (d, $^1J_{\text{C-P}}$ = 133.13 Hz, PCH), 128.43, 128.86 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 6 Hz), 134.85 (d, $^5J_{\text{C-P}}$ = 2.86 Hz), 135.34 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 6.24 Hz, aromat.), 172.54

(C=O)

³¹P-NMR: (202,5 MHz, DMSO-*d*₆), (ppm): 25,07

 $C_{12}H_{18}NO_5P$ [287.25]

HPLC: 20 Minuten Laufzeit, isokratische Elution (1:1) (Acetonitril,

5% wässrige NH₄OAc-Lösung):

Retentionszeit: 1,887 min (99,6 % AUC)

N-benzyloxy-4-dibenzyloxyphosphoryl-4-(1-naphthyl)butansäureamid 65

Hergestellt aus 1,37 g **49** (3 mmol), 2,29 g Trimethylsilylbromid (15 mmol) und 1,89 g **LXVII** (6 mmol) nach **AAV5** und anschließender Säulenchromatographie über Kieselgel (Ethylacetat).

Ausbeute: 19 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 82 ℃

IR \tilde{v} (KBr): 3376 cm⁻¹ (N-H), 3062, 3033 cm⁻¹ (C-H_{arom.}), 2941 cm⁻¹ (C-H_{aliph.}),

1666 cm⁻¹ (C=O), 1232 cm⁻¹ (P=O)

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃), (ppm): 1.73-1.96 (m, 2H, CH₂), 2.12-2.33 (m,

2H, CH₂), 3.26-3.39 (m, 1H, PCH), 4.33 (d, J = 22.8 Hz, 1H, PhCH₂), 4.56 (dd, J = 11.9, 7.8 Hz, 1H, PhCH₂), 4.65 (dd, J = 23.1, 11 Hz, 1H, PhCH₂), 4.76 (dd, J = 11.9, 7.6 Hz, 1H, PhCH₂), 5.00 (t, J = 7.4 Hz, 2H, PhCH₂), 6.93 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.25-7.43 (m, 13H), 7.53 (t, J = 7.4 Hz, 3H), 7.67 (s, 1H), 7.88 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.95 (d, J = 5.3 Hz, 1H), 8.17 (s, 1H, aromat.), 10.47 (s, 0.13H, E-Isomer, NH), 10.77 (s, 0.87H, Z-Isomer, NH)

¹³C-NMR: (125 MHz, CDCl₃), (ppm): 25.83 (CH₂CH₂), 29.44 (d, ${}^{2}J_{C-P} = 15.8$

Hz, CH $^{\prime}CH_2$), 35.83 (d, $^{1}J_{\text{C-P}}$ = 135.6 Hz, PCH), 66.73 (d, $^{2}J_{\text{C-P}}$ = 6.7 Hz, CH $_2$ OP), 66.79 (d, $^{2}J_{\text{C-P}}$ = 6.4 Hz, CH $_2$ OP), 76.58 (PhCH $_2$), 123.42 (d, $^{5}J_{\text{C-P}}$ = 1.3 Hz), 125.30 (d, $^{4}J_{\text{C-P}}$ = 3.6 Hz), 125.55, 126.18, 127.15, 127.42 (d, $^{4}J_{\text{C-P}}$ = 3.2 Hz), 127.61, 127.81, 128.04, 128.07, 128.11, 128.30, 128.55, 133.43 (d, $^{2}J_{\text{C-P}}$ = 9.8 Hz), 135.88, 136.16, 136.19, 136.44 (d, $^{3}J_{\text{C-P}}$ = 6.2 Hz,

aromat.), 168.43 (C=O)

 $C_{35}H_{34}NO_5P$ [579.62]

Ber.[%]: C 72.53 H 5.91 N 2.42 Gef.[%] C 72.65 H 5.94 N 2.26

N-benzyloxy-4-dibenzyloxyphosphoryl-4-(3,4-difluorophenyl)butansäureamid 66

Hergestellt aus 1,32 g **52** (3 mmol), 2,29 g Trimethylsilylbromid (15 mmol) und 1,89 g **LXVII** (6 mmol) nach **AAV5** und anschließender Säulenchromatographie über Kieselgel (Ethylacetat).

Ausbeute: 75 %, farbloses Öl

IR \tilde{v} (NaCl): 3188 cm⁻¹ (N-H), 3065, 3034 cm⁻¹ (C-H_{arom..}),

2960 cm⁻¹ (C-H_{aliph.}), 1671 cm⁻¹ (C=O), 1282 cm⁻¹ (P=O),

1239, 1217 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃), (ppm): 1.66-1.92 (m, 2H, CH₂), 1.92-2.16 (m,

1H, CH₂), 2.16-2.32 (m, 1H, CH₂), 3.35-3.46 (m, 1H, PCH), 4.56 (s, 0.26H, *E*-Isomer, PhCH₂), 4.73 (s, 1.76H, *Z*-Isomer, PhCH₂), 4.84 (dt, J = 20.4, 12 Hz, 2H, PhCH₂), 5.00 (dt, J = 19.3, 11.9 Hz, 2H, PhCH₂), 6.92-7.87 (m, 18H), 10.51 (s, 0.13H, *E*-Isomer, NH),

10.85 (s, 0.87H, Z-Isomer, NH)

¹³C-NMR: (125 MHz, CDCl₃), (ppm): 24.78 (d, ${}^{3}J_{C-P} = 1.7$ Hz, CH₂CH₂),

29.65 (d, ${}^2J_{\text{C-P}} = 15.3$ Hz, $\text{CH}\textit{CH}_2$), 41.27 (d, ${}^1J_{\text{C-P}} = 136$ Hz, PCH), 66.76 (d, ${}^2J_{\text{C-P}} = 6.6$ Hz, CH_2OP), 66.89 (d, ${}^2J_{\text{C-P}} = 6.6$ Hz, CH_2OP), 76.58 (PhCH $_2$), 117.24 (dd, ${}^2J_{\text{C-F}} = 17.7$ Hz, ${}^3J_{\text{C-F}} = 1.9$ Hz), 117.98 (dd, ${}^2J_{\text{C-F}} = 17$ Hz, ${}^3J_{\text{C-F}} = 6.4$ Hz), 125.91, 127.38, 127.66, 128.00, 128.08, 128.14, 128.16, 128.21, 128.35, 133.20, 135.96, 136.27 (d, ${}^3J_{\text{C-P}} = 6.4$ Hz), 136.33 (d, ${}^3J_{\text{C-P}} = 7.1$ Hz), 148.62 (dd, ${}^1J_{\text{C-F}} = 242.4$ Hz, ${}^2J_{\text{C-F}} = 15.8$ Hz), 149.56 (dd,

 $^{1}J_{C-F} = 246.3 \text{ Hz}, ^{2}J_{C-F} = 17.3 \text{ Hz}, \text{ aromat.}), 168.14 (C=O)$

 $C_{31}H_{30}F_2NO_5P$ [565.54]

Ber.[%]: C 65.84 H 5.35 N 2.48 Gef.[%] C 65.72 H 5.41 N 2.39

N-benzyloxy-4-dibenzyloxyphosphoryl-4-(3,4-dichlorophenyl)butansäureamid 67

Hergestellt aus 1,42 g **53** (3 mmol), 2,29 g Trimethylsilylbromid (15 mmol) und 1,89 g **LXVII** (6 mmol) nach **AAV5** und anschließender Säulenchromatographie über Kieselgel (1 Teil Ethylacetat, 1 Teil *n*-Hexan).

Ausbeute: 57,3 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 84 ℃

IR v (KBr): 3296 cm⁻¹ (N-H), 3065, 3034 cm⁻¹ (C-H_{arom.}), 2939 cm⁻¹ (C-H_{aliph.}),

1693 cm⁻¹ (C=O), 1234 cm⁻¹ (P=O), 1022 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 1.83 (t, J = 7.42 Hz, 2H, CH₂),

1.95-2.14 (m, 1H, CH_2), 2.17-2.34 (m, 1H, CH_2), 3.37-3.52 (m, 1H, PCH), 4.56 (s, 0.15H, E-Isomer, $PhCH_2$), 4.73 (s, 1.85H, Z-Isomer, $PhCH_2$), 4.81-4.94 (m, 2H, $PhCH_2$), 5.02 (ddd, J = 19.35, 11.93, 8.17 Hz, 2H, $PhCH_2$), 7.17 (d, 2H), 7.24 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.28-7.45 (dd, J = 30.05, 9.53 Hz, 10H), 7.47 (s, 1H), 7.56 (d, J = 8.33 Hz, 1H, aromat.), 10.55 (s, 0.07H,

E-Isomer, NH), 10.86 (s, 0.93H, *Z*-Isomer, NH)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 24.57 ($^3J_{C-P} = 2.58$ Hz, CH₂CH₂),

29.70 (d, ${}^2J_{\text{C-P}} = 16.58$ Hz, CH 2CH_2), 41.30 (d, ${}^1J_{\text{C-P}} = 135.55$ Hz, PCH), 66.87 (d, ${}^2J_{\text{C-P}} = 6.56$ Hz, CH $_2$ OP), 66.92 (d, ${}^2J_{\text{C-P}} = 6.40$ Hz, CH $_2$ OP), 76.61 (PhCH $_2$), 127.40, 127.70, 128.09, 128.17, 128.22, 128.37, 128.59, 129.26 (d, ${}^3J_{\text{C-P}} = 4.79$ Hz), 129.75, 130.39 (d, ${}^4J_{\text{C-P}} = 3.45$ Hz), 130.90 (d, ${}^5J_{\text{C-P}} = 2.18$ Hz), 131.14 (d, ${}^3J_{\text{C-P}} = 6.53$ Hz), 131.47 (d, ${}^4J_{\text{C-P}} = 3.05$ Hz), 136.21 (d, ${}^3J_{\text{C-P}} = 6.53$ Hz), 136.73 (d, ${}^2J_{\text{C-P}} = 9.31$ Hz, aromat.), 168.09

(C=O)

 $C_{31}H_{30}CI_2NO_5P$ [598.45]

Ber.[%]: C 62.22 H 5.05 N 2.34 Gef.[%] C 62.34 H 4.93 N 2.34

N-benzyloxy-4-dibenzyloxyphosphoryl-4-(p-tolyl)butansäureamid 68

Hergestellt aus 1,26 g **55** (3 mmol), 2,29 g Trimethylsilylbromid (15 mmol) und 1,89 g **LXVII** (6 mmol) nach **AAV5** und anschließender Säulenchromatographie über Kieselgel (Ethylacetat).

Ausbeute: 38.1 %, farbloses Öl

IR \tilde{v} (NaCl): 1660 cm⁻¹ (C=O), 1245 cm⁻¹ (P=O), 995 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆), (ppm): 1.43-1.94 (m, 2H, CH₂), 1.94-2.11

(m, 2H, CH₂), 2.28 (s, 3H, PhCH₃), 3.20-3.30 (ddd, J = 11.63, 3.54 Hz, 1H, PCH), 4.45-4.64 (m, 0.26H, E-Isomer, PhCH₂), 4.66-4.90 (m, 3.74H, Z-Isomer, PhCH₂), 4.90-5.07 (qd, J = 12.03, 12.01, 7.93 Hz, 2H, PhCH₂), 6.90-7.23 (m, 6H) 7.24-7.65 (m, 13H, aromat.), 10.53 (s, 0.13H, E-Isomer, NH), 10.90 (s, 0.87H,

Z-Isomer, NH)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 20.55 (PhCH₃), 24.98 (CH₂CH₂),

29.75 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}}$ = 13.94 Hz, CH*C*H₂), 41.86 (d, ${}^{1}J_{\text{C-P}}$ = 136.02 Hz, PCH), 66.55 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}}$ = 6.98 Hz, CH₂OP), 66.72 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}}$ = 6.54 Hz, CH₂OP), 76.58 (PhCH₂), 127.33, 127.61, 127.91, 128.05, 128.15, 128.20, 128.32, 128.57, 128.94 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}}$ = 4.03 Hz), 129.01, 132.20 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}}$ = 7.62 Hz), 135.98, 136.13 (d, ${}^{5}J_{\text{C-P}}$ = 3.06 Hz), 136.42, 136.47 (d, ${}^{5}J$ = 2.26 Hz), 136.53

(aromat.), 168.36 (C=O)

 $C_{32}H_{34}NO_5P$ [543.59]

Ber.[%]: C 70.70 H 6.30 N 2.58 Gef.[%] C 70.29 H 6.41 N 2.89

{4-[Hydroxyamino]-1-(1-naphthyl)-4-oxo-butyl}phosphonsäure 69

Hergestellt aus 0,58 g **65** (1 mmol) nach **AAV6** mit anschließender Umkristallisation in Methanol und Ethylacetat bei 7 °C.

Ausbeute: 90 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 208 ℃

IR \tilde{v} (KBr): 3360 cm⁻¹ (N-H), 3163 cm⁻¹ (C-H_{arom.}), 2927 cm⁻¹ (C-H_{aliph.}),

1699 cm⁻¹ (C=O), 1239 cm⁻¹ (P=O), 1139 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆), (ppm): 1.68-1.89 (m, 3H, CH₂), 2.04-2.22

(m, 1H, CHC H_2), 3.88 (ddd, J=23, 10.7, 3.2 Hz, 1H, PCH), 7.44-7.59 (m, 3H), 7.62 (s, 1H), 7.79 (d, J=8.3 Hz, 1H), 7.91 (d, J=8 Hz, 1H), 8.13 (d, J=7.7 Hz, 1H, aromat.), 8.61 (s, 0.9H, Z-Isomer, NH), 8.80 (s, 0.1H, E-Isomer, NH), 9.67 (s, 0.1H,

E-Isomer, OH), 10.16 (s, 0.9H, Z-Isomer, OH)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 27.17 (CH₂CH₂), 30.22 (d,

 $^{2}J_{\text{C-P}} = 14 \text{ Hz}, \text{CH}C\text{H}_{2}), 37.78 \text{ (d, }^{1}J_{\text{C-P}} = 134.3 \text{ Hz}, \text{PCH)}, 123.68, 125.10, 125.18, 125.32 (d, <math>^{4}J_{\text{C-P}} = 2.7 \text{ Hz}), 125.67, 126.43, 128.38, 132.42 (d, <math>^{3}J_{\text{C-P}} = 7.1 \text{ Hz}), 133.36, 134.55 \text{ (d, }^{4}J_{\text{C-P}} = 7.1 \text{ Hz}), 133.36, 134.55 \text{ (d, }^{4}J_{\text{C-P}} = 7.1 \text{ Hz}), 133.36, 134.55 \text{ (d, }^{4}J_{\text{C-P}} = 7.1 \text{ Hz}), 133.36, 134.55 \text{ (d, }^{4}J_{\text{C-P}} = 7.1 \text{ Hz}), 133.36, 134.55 \text{ (d, }^{4}J_{\text{C-P}} = 7.1 \text{ Hz}), 133.36, 134.55 \text{ (d, }^{4}J_{\text{C-P}} = 7.1 \text{ Hz}), 133.36, 134.55 \text{ (d, }^{4}J_{\text{C-P}} = 7.1 \text{ Hz}), 133.36, 134.55 \text{ (d, }^{4}J_{\text{C-P}} = 7.1 \text{ Hz}), 133.36, 134.55 \text{ (d, }^{4}J_{\text{C-P}} = 7.1 \text{ Hz}), 133.36, 134.55 \text{ (d, }^{4}J_{\text{C-P}} = 7.1 \text{ Hz}), 133.36, 134.55 \text{ (d, }^{4}J_{\text{C-P}} = 7.1 \text{ Hz}), 133.36, 134.55 \text{ (d, }^{4}J_{\text{C-P}} = 7.1 \text{ Hz}), 133.36, 134.55 \text{ (d, }^{4}J_{\text{C-P}} = 7.1 \text{ Hz}), 133.36, 134.55 \text{ (d, }^{4}J_{\text{C-P}} = 7.1 \text{ Hz}), 133.36, 134.55 \text{ (d, }^{4}J_{\text{C-P}} = 7.1 \text{ Hz}), 133.36, 134.55 \text{ (d, }^{4}J_{\text{C-P}} = 7.1 \text{ Hz}), 133.36, 134.55 \text{ (d, }^{4}J_{\text{C-P}} = 7.1 \text{ Hz}), 133.36, 134.55 \text{ (d, }^{4}J_{\text{C-P}} = 7.1 \text{ Hz}), 133.36, 134.55 \text{ (d, }^{4}J_{\text{C-P}} = 7.1 \text{ Hz}), 133.36, 134.55 \text{ (d, }^{4}J_{\text{C-P}} = 7.1 \text{ Hz}), 133.36, 134.55 \text{ (d, }^{4}J_{\text{C-P}} = 7.1 \text{ Hz}), 133.36, 134.55 \text{ (d, }^{4}J_{\text{C-P}} = 7.1 \text{ Hz}), 133.36, 134.55 \text{ (d, }^{4}J_{\text{C-P}} = 7.1 \text{ Hz}), 133.36, 134.55 \text{ (d, }^{4}J_{\text{C-P}} = 7.1 \text{ Hz}), 133.36, 134.55 \text{ (d. }^{4}J_{\text{C-P}} = 7.1 \text{ Hz}), 133.36, 134.55 \text{ (d. }^{4}J_{\text{C-P}} = 7.1 \text{ Hz}), 133.36, 134.55 \text{ (d. }^{4}J_{\text{C-P}} = 7.1 \text{ Hz}), 133.36, 134.55 \text{ (d. }^{4}J_{\text{C-P}} = 7.1 \text{ Hz}), 133.36, 134.55 \text{ (d. }^{4}J_{\text{C-P}} = 7.1 \text{ Hz}), 133.36, 134.55 \text{ (d. }^{4}J_{\text{C-P}} = 7.1 \text{ Hz}), 133.36, 134.55 \text{ (d. }^{4}J_{\text{C-P}} = 7.1 \text{ Hz}), 133.36, 134.55 \text{ (d. }^{4}J_{\text{C-P}} = 7.1 \text{ Hz}), 133.36, 134.55 \text{ (d. }^{4}J_{\text{C-P}} = 7.1 \text{ Hz}), 133.36, 134.55 \text{ (d. }^{4}J_{\text{C-P}} = 7.1 \text{ Hz}), 133.36, 134$

 $^{2}J_{C-P} = 6.1 \text{ Hz}, \text{ aromat.}), 168.59 (C=O)$

³¹P-NMR: $(202,5 \text{ MHz}, DMSO-d_6), (ppm): 24.72$

 $C_{14}H_{16}NO_5P$ [309.25]

Ber.[%]: C 54.37 H 5.21 N 4.53 Gef.[%] C 54.09 H 5.50 N 4.25

{1-(3,4-Difluorophenyl)-4-[hydroxyamino]-4-oxo-butyl}phosphonsäure 70

Hergestellt aus 0,57 g 66 (1 mmol) nach **AAV6** mit anschließender Umkristallisation in Ethylacetat bei 7 °C.

Ausbeute: 85 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 169 ℃

IR \tilde{v} (KBr): 3367 cm⁻¹ (N-H), 3175 cm⁻¹ (O-H), 1610 cm⁻¹ (C=O),

1257 cm⁻¹ (P=O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 1.80 (t, J = 7.6 Hz, 2H, CH₂), 1.83-

1.95 (m, 1H, CH₂), 2.16-2.30 (m, 1H, CH₂), 2.91 (ddd, J = 15.0, 11.1, 3.5 Hz, 1H, PCH), 7.08 (s, 1H), 7.18-7.31 (m, 1H), 7.36 (dd, J = 19.2, 8.7 Hz, 1H, aromat.), 8.59 (s, 0.83H, Z-Isomer, NH), 8.95 (s, 0.17H, E-Isomer, NH), 9.77 (s, 0.17H, E-Isomer, OH),

10.24 (s, 0.83H, *Z*-Isomer, OH)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 26.44 (CH₂CH₂), 30.71 (d,

 $^{2}J_{\text{C-P}} = 14.9 \text{ Hz}, \text{ CH}\textsubscript{CH}_{2}), 44.15 (d, <math>^{1}J_{\text{C-P}} = 133.3 \text{ Hz}, \text{ PCH}), 117.27 (d, <math>^{2}J_{\text{C-F}} = 15.9), 118.04 (dd, ^{2}J_{\text{C-F}} = 17.1 \text{ Hz}, ^{3}J_{\text{C-F}} = 6 \text{ Hz}), 126.31, 136.42, 148.50 (dd, <math>^{1}J_{\text{C-F}} = 238.8 \text{ Hz}, ^{2}J_{\text{C-F}} = 13.4 \text{ Hz}), 149.39 (dd, <math>^{1}J_{\text{C-F}} = 245.7 \text{ Hz}, ^{2}J_{\text{C-F}} = 11.7 \text{ Hz}, \text{ aromat.}),$

168.82 (C=O)

³¹P-NMR: (202,5 MHz, DMSO-*d*₆), (ppm): 23,61

 $C_{10}H_{12}F_2NO_5P$ [295.18]

Ber.[%]: C 40.69 H 4.10 N 4.75 Gef.[%] C 40.82 H 4.26 N 4.53

{4-[Hydroxyamino]-4-oxo-1-(p-tolyl)butyl}phosphonsäure 71

Hergestellt aus 0,54 g 67 (1 mmol) nach AAV6.

Ausbeute: 97 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 184 ℃

IR \tilde{v} (KBr): 3354 cm⁻¹ (N-H), 2916 cm⁻¹ (C-H_{aliph.}), 1626 cm⁻¹ (C=O),

1237 cm⁻¹ (P=O), 1036, 1016 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 1.69 (s, 0.5H, CH₂), 1.78 (t,

J = 7.75 Hz, 1.5H, CH₂), 1.84-2.03 (m, 1H, CH₂), 2.27 (s, 3H, PhCH₃), 2.67-2.93 (ddd, J = 21.79, 11.24, 3.55 Hz, 1H, PCH), 3.17 (s 1H, CH₂), 6.91-7.91 (dd, J = 18.94, 7.31 Hz, 4H, aromat.), 8.68 (s, 1H, NH), 9.69 (s, 0.18H, *E*-Isomer, OH), 10.25 (s, 0.82H,

Z-Isomer, OH)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 20.51 (PhCH₃), 26.14 (CH₂CH₂),

30.53 (d, ${}^{2}J_{C-P} = 15.42$ Hz, CHCH₂), 44.34 (d, ${}^{1}J_{C-P} = 133.74$ Hz, PCH), 128.46 (d, ${}^{4}J_{C-P} = 1.04$ Hz), 128.86 (d, ${}^{3}J_{C-P} = 5.97$ Hz), 134.90 (d, ${}^{5}J_{C-P} = 2.66$ Hz), 135.13 (d, ${}^{2}J_{C-P} = 6.59$ Hz, aromat.),

168.68 (C=O)

³¹P-NMR: $(202,5 \text{ MHz}, DMSO-d_6), (ppm): 24,58$

 $C_{11}H_{16}NO_5P$ [273.22]

HPLC: 20 Minuten Laufzeit, isokratische Elution (1:1) (Acetonitril,

5 % wässrige NH₄OAc-Lösung):

Retentionszeit: 1,893 min (97,71 % AUC)

7.6 Analytische Daten zu Kapitel 5

N-acetyl-N-benzyloxy-4-diethoxyphosphoryl-4-(3,4-difluorophenyl)butansäureamid 72

Hergestellt nach AAV14.

Ausbeute: 68 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 97 ℃

IR \tilde{v} (KBr): 3032 cm⁻¹ (C-H_{arom...}), 2984, 2930 cm⁻¹ (C-H_{aliph.}),

1720 cm⁻¹ (C=O), 1276 cm⁻¹ (P=O), 1054, 1028 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6), (ppm): 1.07 (t, 3H, J = 7 Hz, CH₂CH₃),

1.21 (t, 3H, J=7 Hz, CH_2CH_3), 1.94-2.14 (m, 1H, CH_2), 2.15-2.29 (m, 1H, CH_2), 2.31 (s, 3H, $COCH_3$), 2.53-2.79 (m, 2H, CH_2), 3.36 (ddd, J=29.9, 15.2, 7.8 Hz, 1H, PCH), 3.70-3.93 (m, 2H, CH_3CH_2), 3.93-4.18 (m, 2H, CH_3CH_2), 4.86 (s, 2H, CH_3CH_2), 7.18 (dd, J=5.6, 1.7 Hz, 1H), 7.38 (ddt, J=22.5, 19.3, 7.3 Hz, 7H,

aromat.)

¹³C-NMR: (125 MHz, CDCl₃), (ppm): 15.98 (d, ${}^{3}J_{C-P} = 5.5$ Hz, CH₂CH₃),

16.14 (d, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 5.5 \text{ Hz}$, $\text{CH}_{2}C\text{H}_{3}$), 23.81 (CH₂), 24.73 (CO $C\text{H}_{3}$), 33.53 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 14.4 \text{ Hz}$, $\text{CH}C\text{H}_{2}$), 40.94 (d, ${}^{1}J_{\text{C-P}} = 136.9 \text{ Hz}$, PCH), 61.47 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 7.1 \text{ Hz}$, $\text{CH}_{3}C\text{H}_{2}$), 61.77 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 6.6 \text{ Hz}$, CH₃ $C\text{H}_{2}$), 77.01 (PhCH₂), 117.28 (dd, ${}^{2}J_{\text{C-F}} = 16.2 \text{ Hz}$, ${}^{3}J_{\text{C-F}} = 2 \text{ Hz}$), 117.89 (dd, ${}^{2}J_{\text{C-F}} = 17.6 \text{ Hz}$, ${}^{3}J_{\text{C-F}} = 6.5 \text{ Hz}$), 125.98 (dd, ${}^{3}J_{\text{C-F}} = 9.9 \text{ Hz}$, ${}^{3}J_{\text{C-P}} = 6.1 \text{ Hz}$), 128.33, 128.83, 129.38, 132.08, 133.94, 148.44 (dd, ${}^{1}J_{\text{C-F}} = 265.6 \text{ Hz}$, ${}^{2}J_{\text{C-F}} = 13.5 \text{ Hz}$), 149.05 (dd, ${}^{1}J_{\text{C-F}} = 247.8 \text{ Hz}$, ${}^{2}J_{\text{C-F}} = 12.8 \text{ Hz}$, aromat.), 169.95 (C=O,

Hydroxamat), 171.73 (CH₃CO)

 $C_{23}H_{28}F_2NO_6P$ [483.44]

Ber.[%]: C 57.14 H 5.84 N 2.90 Gef.[%] C 57.24 H 5.67 N 2.98

N-acetyl-N-benzyloxy-4-dibenzyloxyphosphoryl-4-(3,4-difluorophenyl)butansäureamid **73**

Hergestellt aus 1,45 g **72** (3 mmol), 2,29 g Trimethylsilylbromid (15 mmol) und 1,89 g **LXVII** (6 mmol) nach **AAV5** und anschließender Säulenchromatographie über Kieselgel (Ethylacetat); Umkristallisation in Diethylether bei 7 °C.

Ausbeute: 46,9 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 91 ℃

IR \tilde{v} (KBr): 3068, 3036 cm⁻¹ (C-H_{arom...}), 2927 cm⁻¹ (C-H_{aliph.}),

1723, 1707 cm⁻¹ (C=O), 1280 cm⁻¹ (P=O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆), (ppm): 1.98-2.18 (m, 1H, CH₂), 2.20-2.45

(m, 4H, CH₂, COCH₃), 2.53-2.66 (m, 2H, CH₂), 3.51 (ddd, J = 22.3, 11.3, 4.0 Hz, 1H, PCH), 4.74-4.95 (m, 2H, PhC H_2), 5.02 (ddd, J = 19.5, 12, 8.1 Hz, 2H, PhC H_2), 7.18 (dd, J = 6.6, 2.8 Hz,

3H), 7.25-7.55 (m, 15H, aromat.)

¹³C-NMR: (125 MHz, CDCl₃), (ppm): 24.42 (CH₂), 24.92 (CO*C*H₃), 34.14 (d,

 $^2J_{\text{C-P}} = 14.9 \text{ Hz}, \text{CH}_{C}\text{H}_2), 42.82 \text{ (d, }^1J_{\text{C-P}} = 138.9 \text{ Hz}, \text{PCH}), 67.71 \text{ (d, }^2J_{\text{C-P}} = 7.2 \text{ Hz}, \text{CH}_3C\text{H}_2), 68.11 \text{ (d, }^2J_{\text{C-P}} = 6.8 \text{ Hz}, \text{CH}_3C\text{H}_2), 78.19 \text{ (PhCH}_2), 117.39 \text{ (dd, }^2J_{\text{C-F}} = 17.0 \text{ Hz, }^3J_{\text{C-F}} = 2 \text{ Hz}), 118.14 \text{ (dd, }^2J_{\text{C-F}} = 17.6 \text{ Hz, }^3J_{\text{C-F}} = 6.6 \text{ Hz}), 125.39 \text{ (d, }^3J_{\text{C-F}} = 3.4 \text{ Hz}), 127.93, 128.13, 128.43, 128.52, 128.61, 128.72, 129.32, 129.59, 132.20 \text{ (dd, }^2J_{\text{C-P}} = 5.4 \text{ Hz, }^3J_{\text{C-F}} = 2.4 \text{ Hz}), 133.50, 136.00 \text{ (d, }^3J_{\text{C-F}} = 5.6 \text{ Hz}), 136.07 \text{ (d, }^3J_{\text{C-F}} = 5.6 \text{ Hz}), 149.73 \text{ (dd, }^1J_{\text{C-F}} = 249.2 \text{ Hz, }^2J_{\text{C-F}} = 12.2 \text{ Hz}), 150.22 \text{ (dd, }^1J_{\text{C-F}} = 249.0 \text{ Hz, }^2J_{\text{C-F}} = 13.0 \text{ Hz, aromat.}), 169.97 \text{ (C=O, Hydroxamat), 171.73}$

 (CH_3CO)

³¹P-NMR: (202,5 MHz, DMSO-*d*₆), (ppm): 29.23

 $C_{33}H_{32}F_2NO_6P$ [607.58]

Ber.[%]: C 65.23 H 5.31 N 2.31 Gef.[%] C 65.18 H 5.24 N 2.31

{4-[Acetyl(hydroxy)amino]-1-(3,4-difluorophenyl)-4-oxo-butyl}phosphonsäure 74

Hergestellt aus 0,30 g **73** (0,5 mmol) nach **AAV6**, jedoch in 50 mL wasserfreiem THF und H₂-Atmosphäre (1 bar).

Ausbeute: 97 %, farbloses Öl

IR v (NaCl): 2958 cm⁻¹ (C-H_{aliph.}), 1702, 1610 cm⁻¹ (C=O, breit),

1282 cm⁻¹ (P=O), 1119, 998 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, Aceton-d6), (ppm): 1.85-2.02 (m, 2H, CH₂), 2.04-2.35

(m, 3H, COCH₃), 2.45-2.76 (m, 2H, CH₂), 2.89-3.30 (m, 1H,

PCH), 6.90-7.46 (m, 3H, aromat.)

¹³C-NMR: (125 MHz, Aceton-d6), (ppm): 25.15 (CH₂), 26.56 (CO*C*H₃),

34.42 (d, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 17.9 \text{ Hz}$, CH*C*H₂), 36.04 (d, ${}^{1}J_{\text{C-P}} = 160.4 \text{ Hz}$, *C*H), 118.22 (dd, ${}^{2}J_{\text{C-F}} = 15.7 \text{ Hz}$, ${}^{3}J_{\text{C-F}} = 1.2 \text{ Hz}$), 119.36 (dd, ${}^{2}J_{\text{C-F}} = 20.2 \text{ Hz}$, ${}^{3}J_{\text{C-F}} = 6.9 \text{ Hz}$), 126.50 (d, ${}^{3}J_{\text{C-F}} = 8.3 \text{ Hz}$), 132.44 (dd, ${}^{2}J_{\text{C-P}} = 7.9 \text{ Hz}$), 150.75 (dd, ${}^{1}J_{\text{C-F}} = 259.3 \text{ Hz}$, ${}^{2}J_{\text{C-F}} = 12.5 \text{ Hz}$), 149.55 (dd, ${}^{1}J_{\text{C-F}} = 255.5 \text{ Hz}$, ${}^{2}J_{\text{C-F}} = 12.9 \text{ Hz}$, aromat.),

170.48 (C=O, Hydroxamat), 173.41 (CH₃CO)

³¹P-NMR: (202,5 MHz, Aceton-d6), (ppm): 27.77

 $C_{12}H_{14}F_2NO_6P$ [337.21]

HPLC: 20 Minuten Laufzeit, isokratische Elution (1:1), (Acetonitril,

5 % wässrige NH₄OAc-Lösung): Retentionszeit: 1,860 min

(91,73 % AUC)

7.7 Analytische Daten zu Kapitel 6

{[4-(Benzyloxyamino)-4-oxo-1-phenyl-butyl]-(2,2-dimethylpropionyloxymethoxy) phosphoryl}oxymethyl 2,2-dimethylpropionat **75**

Hergestellt aus 1,22 g **5** (3 mmol) nach **AAV3** und **AAV8** mit anschließender Säulenchromatographie über Kieselgel (Elutionsmittel: Diethylether).

Ausbeute: 35 %, hellgelbes, transparentes Öl

IR \tilde{v} (NaCl): 3219 cm⁻¹ (N-H), 3089, 3064, 3032 cm⁻¹ (C-H_{aromat.}),

2876 cm⁻¹ (CH_{aliph.}), 1754 cm⁻¹ (C=O, POM),

1672 cm⁻¹ (C=O, Hydroxam.), 1257 cm⁻¹ (P=O), 1027 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d6), (ppm): 1.12 (s, 9H, CH₃), 1.16 (s, 9H,

CH₃), 1.66-2.39 (m, 4H, CHC H_2 , CH₂C H_2), 3.34-3.44 (m, 1H, PCH), 4.73 (s, 1.6H, PhCH₂, Z-Isomer), 4.87 (s, 0.4H, E-Isomer), 5.36-5.51 (m, 2H, POCH₂), 5.58 (ddd, J = 12.28, 10.83, 5.43 Hz, 2H, POCH₂), 7.01-7.63 (m, 10H, aromat.), 10.5 (s, 0.2H,

E-isomer, NH), 10.87 (s, 0.8H, Z-isomer, NH)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO-d6), (ppm): 24.47 (d, ${}^{3}J_{C-P} = 3.55$ Hz,

CH₂CH₂), 26.34 (CH₃), 26.38 (CH₃), 29.64 (d, ${}^2J_{C-P}$ = 10.61 Hz. CH*C*H₂), 38.03 (*C*(CH₃)₃), 38.09 (*C*(CH₃)₃), 42.48 (d, ${}^1J_{C-P}$ = 136.39 Hz, PCH), 76.60 (PhCH₂), 81.31 (POCH₂), 81.35 (POCH₂), 127.28 (d, ${}^5J_{C-P}$ = 4.66 Hz), 128.08, 128.19 (d, ${}^4J_{C-P}$ = 5.18 Hz), 128.43, 128.59, 129.06 (d, ${}^3J_{C-P}$ = 6.54 Hz), 134.61, 134.42 (d, ${}^2J_{C-P}$ = 7.17 Hz, aromat.), 168.04 (C=O,

Hydroxam.) 175.95 (C=O, POM), 176.01 (C=O, POM)

 $C_{29}H_{40}NO_9P$ [577.60]

Ber.[%]: C 60.30 H 6.98 N 2.42 Gef.[%] C 60.02 H 7.02 N 2.37

{[4-[Benzyloxy(methyl)amino]-4-oxo-1-phenyl-butyl]-(2,2-dimethylpropionyloxy-methoxy)phosphoryl}oxymethyl 2,2-dimethylpropionat **76**

Hergestellt aus 1,26 g **6** (3 mmol) nach **AAV3** und **AAV8** mit anschließender Säulenchromatographie über Kieselgel (Elutionsmittel Diethylether).

Ausbeute: 76,9 %, weißer, wachsartiger Feststoff

Schmelzpunkt: 48 ℃

IR v (KBr): 3064, 3032 cm⁻¹ (C-H_{aromat.}), 2977 cm⁻¹ (CH_{aliph.}),

1754 cm⁻¹ (C=O, POM), 1660 cm⁻¹ (C=O, Hydroxam.),

1281, 1257 cm⁻¹ (P=O), 1059 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d6), (ppm): 1.09 (s, 9H, C(CH₃)), 1.13 (s, 9H,

 $C(CH_3)_3)$, 1.88-2.02 (m, 1H, $CHCH_2$), 2.12-2.25 (m, 3H, $CHCH_2$), CH_2CH_2), 3.05 (s, 3H, NCH_3), 3.30 (m, 1H, PCH_3), 4.62 (dd, J = 20.0, 9.97 Hz, 2H, $PhCH_2$), 5.38-5.48 (m, 2H, $POCH_2$), 5.56 (ddd, J = 17.79, 12.63, 5.41 Hz, 2H, $POCH_2$), 7.14-7.35 (m, 10H,

aromat.)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO-d6), (ppm): 24.30 (CH₂CH₂), 26.80 (C(CH_3)₃),

26.84 (C(CH_3)₃), 29.58 (d, ${}^2J_{C-P}$ = 16.27 Hz. CH CH_2), 35.26 (NCH₃), 38.51 ($C(CH_3)_3$), 38.56 ($C(CH_3)_3$), 42.93 (d, ${}^1J_{C-P}$ = 136.36 Hz, PCH), 75.53 (PhCH₂), 81.28 (POCH₂), 81.78 (POCH₂), 127.74 (d, ${}^5J_{C-P}$ = 2.44 Hz), 128.76, 128.93 (d, ${}^4J_{C-P}$ = 1.26 Hz), 129.05, 129.51 (d, ${}^3J_{C-P}$ = 6.86 Hz), 129.80, 134.7, 135.04 (d, ${}^2J_{C-P}$ = 6.80 Hz, aromat.), 172.13 (C=O,

Hydroxam.), 176.4 (C=O, POM), 176.5 (C=O, POM)

 $C_{30}H_{42}NO_9P$ [591.63]

Ber.[%]: C 60.90 H 7.16 N 2.37 Gef.[%] C 60.68 H 7.41 N 2.34

{[4-[Benzyloxy(ethyl)amino]-4-oxo-1-phenyl-butyl]-(2,2-dimethylpropionyloxy-methoxy)phosphoryl}oxymethyl 2,2-dimethylpropionat **77**

Hergestellt aus 1,3 g **7** (3 mmol) nach **AAV3** und **AAV8** mit anschließender Säulenchromatographie über Kieselgel (Elutionsmittel: Diethylether).

Ausbeute: 64 %, farbloses, hochviskoses Öl

IR v (NaCl): 3064, 3032 cm⁻¹ (C-H_{aromat.}), 2977 cm⁻¹ (CH_{aliph.}),

1754 cm⁻¹ (C=O, POM), 1662 cm⁻¹ (C=O, Hydroxam.),

1262 cm⁻¹ (P=O), 1058 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d6), (ppm): 1.01 (t, J = 7.03 Hz, 3H, CH₂CH₃),

1.11 (s, 9H, C(CH₃)), 1.16 (s, 9H, C(CH₃)), 1.92-2.04 (m, 1H, CHC H_2), 2.14-2.30 (m, 3H, CHC H_2 , CH₂C H_2), 3.31-3.35 (m, 1H, PCH), 3.57 (m, 2H, NCH₂), 4.62 (dd, J = 19.61, 9.88 Hz, 2H, PhCH₂), 5.45 (qd, J = 10.85, 5.38, 5.37 Hz, 2H, POCH₂), 5.59 (ddd, J = 17.93, 12.62, 5.41 Hz, 2H, POCH₂), 7.11-7.37 (m, 10H,

aromat.)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO-d6), (ppm): 12.26 (CH₂CH₃), 24.28 (CH₂CH₂),

26.79 (C(CH_3)), 26.84 (C(CH_3)), 29.91 (d, $^2J_{C-P}$ = 17.07 Hz. CH CH_2), 38.51 ($C(CH_3)_3$), 38.56 ($C(CH_3)_3$), 40.64 (N CH_2), 42.91 (d, $^1J_{C-P}$ = 136.08 Hz, PCH), 75.85 (PhCH₂), 81.76 (POCH₂), 81.81 (POCH₂), 127.73 (d, $^5J_{C-P}$ = 2.85 Hz), 128.23, 128.77, 128.98 (d, $^4J_{C-P}$ = 1.99 Hz), 129.52 (d, $^3J_{C-P}$ = 7.08 Hz), 129.73, 134.82, 135.06 (d, $^2J_{C-P}$ = 7.11 Hz, aromat.), 176.42 (C=O,

POM), 176.47 (C=O, POM), 178.31 (C=O, Hydroxam.)

 $C_{31}H_{44}NO_9P$ [605.66]

Ber.[%]: C 61.48 H 7.32 N 2.31 Gef.[%] C 61.42 H 7.22 N 2.30

{[4-(Benzyloxyamino)-1-(3,4-difluorophenyl)-4-oxo-butyl]-(2,2-dimethylpropionyl-oxymethoxy)phosphoryl}oxymethyl 2,2-dimethylpropionat **78**

Hergestellt aus 1,32 g **52** (3 mmol) nach **AAV3** und **AAV8** mit anschließender Säulenchromatographie über Kieselgel (Elutionsmittel: Diethylether).

Ausbeute: 17 %, hellgelbes, transparentes Öl

IR v (NaCl): 3489 cm⁻¹ (N-H), 3065, 3034 cm⁻¹ (C-H_{aromat.}),

2977 cm⁻¹ (C-H_{aliph.}), 1754 cm⁻¹ (C=O, POM), 1681 cm⁻¹ (C=O),

1280 cm⁻¹ (P=O), 1057, 1026 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d6), (ppm): 0.95-1.31 (m, 18H, C(CH₃)), 1.86-

2.09 (m, 1H, CHC*H*₂), 2.10-2.41 (m, 3H, CHC*H*₂, CH₂C*H*₂), 3.37-3.59 (m, 1H, PCH), 4.67-4.85 (m, 1H, PhCH₂), 4.89-5.17 (m, 1H, PhCH₂), 5.37-5.54 (m, 2H, POCH₂), 5.55-5.75 (m, 2H, POCH₂),

6.92-7.25 (m, 3H), 7.25-7.54 (m, 5H, aromat.)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO-d6), (ppm): 25.02 (CH_2CH_2), 26.26 ($C(CH_3)$),

26.33 (C(CH_3)), 29.56 (d, $^2J_{C-P}$ = 12.6 Hz. CH CH_2), 38.01 ($C(CH_3)_3$), 38.07 ($C(CH_3)_3$), 41.37 (d, $^1J_{C-P}$ = 137.7 Hz, PCH), 76.62 (PhCH₂), 81.36 (d, $^2J_{C-P}$ = 5.6 Hz, POCH₂), 81.41 (d, $^2J_{C-P}$ = 6.2 Hz, POCH₂), 117.47 (dd, $^2J_{C-F}$ = 19.6 Hz, $^3J_{C-F}$ = 3.7 Hz), 117.95 (dd, $^2J_{C-F}$ = 19.6 Hz, $^3J_{C-F}$ = 6.2 Hz), 124.81, 126.02 (d, $^3J_{C-P}$ = 3.7 Hz), 128.20, 128.60, 129.23, 132.49, 134.51, 148.68 (dd, $^1J_{C-F}$ = 249.6 Hz, $^2J_{C-F}$ = 10.2 Hz), 149.15 (dd, $^1J_{C-F}$ = 241.9 Hz, $^2J_{C-F}$ = 11.3 Hz), 167.99 (C=O, Hydroxam.).

175.92 (C=O, POM), 176.00 (C=O, POM)

 $C_{29}H_{38}F_2NO_9P$ [613.58]

Ber.[%]: C 56.77 H 6.24 N 2.28 Gef.[%] C 56.55 H 6.53 N 2.10

{[4-(Benzyloxy(methyl)amino)-1-(3,4-difluorophenyl)-4-oxo-butyl]-(2,2-dimethylpropionyl-oxymethoxy)phosphoryl}oxymethyl 2,2-dimethylpropionat **79**

Hergestellt aus 1,37 g **53** (3 mmol) nach **AAV3** und **AAV8** mit anschließender Säulenchromatographie über Kieselgel (Elutionsmittel: Diethylether).

Ausbeute: 66,1 %, farbloses Öl

IR \tilde{v} (NaCl): 3065, 3034 cm⁻¹ (C-H_{aromat.}), 2978 cm⁻¹ (C-H_{aliph.}),

1754 cm⁻¹ (C=O, POM), 1662 cm⁻¹ (C=O), 1280 cm⁻¹ (P=O),

1058 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃), (ppm): 1.10 (s, 9H, C(CH₃)), 1.15 (s, 9H,

C(CH₃)), 1.67 (s, 1H, NCH₃), 1.96-2.06 (m, 1H, CH₂), 2.06-2.16 (m, 1H, CH₂), 2.16-2.25 (m, 1H, CH₂), 2.25-2.42 (m, 1H, CH₂), 3.15 (ddd, J = 23.1, 10.8, 3.7 Hz, 1H, PCH), 3.56 (d, J = 6.1 Hz, 2H, NCH₃), 4.56 (dd, J = 20.9, 10.1 Hz, 2H, PhCH₂), 5.44 (ddd, J = 17.8, 11.9, 5.0 Hz, 2H, POCH₂), 5.51-5.65 (m, 2H, POCH₂), 6.95 (s, 1H), 6.98-7.09 (m, 2H), 7.13 (s, 2H), 7.19 (s, 1H), 7.22-

7.35 (m, 2H, aromat.)

¹³C-NMR: (125 MHz, CDCl₃), (ppm): 23.25 (CH₂CH₂), 25.74 (C(CH₃)),

25.80 (C(CH_3)), 28.78 (d, $^2J_{C-P}$ = 16.0 Hz. CH CH_2), 37.64 ($C(CH_3)_3$), 37.69 ($C(CH_3)_3$), 39.58 (NCH₃), 41.85 (d, $^1J_{C-P}$ = 139.3 Hz, PCH), 75.33 (PhCH₂), 80.61 (d, $^2J_{C-P}$ = 7.2 Hz, POCH₂), 80.68 (d, $^2J_{C-P}$ = 6.6 Hz, POCH₂), 116.45 (dd, $^2J_{C-F}$ = 17.43 Hz, $^3J_{C-F}$ = 2.09 Hz), 117.27 (dd, $^2J_{C-F}$ = 17.77 Hz, $^3J_{C-F}$ = 6.96 Hz), 124.54, 127.64, 127.93, 128.02, 130.54, 133.23, 148.85 (dd, $^1J_{C-F}$ = 261.9 Hz, $^2J_{C-F}$ = 10.9 Hz), 149.22 (dd, $^1J_{C-F}$ = 251.7 Hz, $^2J_{C-F}$ = 13.6 Hz), 172.22 (C=O, Hydroxam.). 175.78 (C=O, POM),

175.79 (C=O, POM)

³¹P-NMR: (125 MHz, CDCl₃), (ppm): 28.45, 28.43

 $C_{30}H_{40}F_2NO_9P$ [627.61]

Ber.[%]: C 57.41 H 6.42 N 2.23 Gef.[%] C 57.75 H 6.83 N 2.22

[2,2-Dimethylpropionyloxymethoxy-[4-(hydroxyamino)-4-oxo-1-phenyl-butyl]phosphoryl]oxymethyl 2,2-dimethylpropionat **80**

Hergestellt aus 0,29 g **75** (0,5 mmol) nach **AAV6** mit anschließender Säulenchromatographie über Kieselgel (Elutionsmittel: Diethylether).

Ausbeute: 93 %, farbloses, hochviskoses Öl

IR \tilde{v} (NaCl): 3235 cm⁻¹ (N-H), 3063, 3034 cm⁻¹ (C-H_{aromat.}),

2976 cm⁻¹ (CH_{aliph.}), 1754 cm⁻¹ (C=O, POM),

1665 cm⁻¹ (C=O, Hydroxam.), 1255 cm⁻¹ (P=O), 1027 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d6), (ppm): 1.12 (s, 9H, C(CH₃)), 1.16 (s, 9H,

C(CH₃)), 1.69-1.90 (m, 1.4H, CH₂), 1.91-2.07 (m, 1H, CH₂), 2.08-2.35 (m, 1.6H, CH₂), 3.24-3.48 (m, 1H, PCH), 5.39-5.49 (m, 2H, POCH₂), 5.51-5.74 (m, 2H, POCH₂), 7.12-7.64 (m, 5H, aromat.), 8.65 (s, 0.83H, *Z*-Isomer, OH), 8.87 (s, 0.17H, *E*-Isomer, OH), 9.76 (s, 0.17H, *E*-isomer, NH), 10.27 (s, 0.83H, *Z*-isomer, NH)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO-d6), (ppm): 24.75 (d, ${}^{3}J_{C-P} = 2.42$ Hz,

CH₂CH₂), 26.33 (C(CH₃)), 26.38 (C(CH₃)), 29.62 (d, $^2J_{C-P} = 17.04$ Hz. CHCH₂), 38.03 (C(CH₃)₃), 38.09 (C(CH₃)₃), 42.58 (d, $^1J_{C-P} = 135.77$ Hz, PCH), 81.28 (POCH₂), 81.33 (POCH₂), 127.24, 128.42, 129.03 (d, $^3J_{C-P} = 6.45$ Hz), 129.16, 134.45 (d, $^2J_{C-P} = 6.68$ Hz, aromat.), 167.88 (C=O, Hydroxam.) 175.95

(C=O, POM), 176.00 (C=O, POM)

 $C_{22}H_{34}NO_9P$ [487.48]

Ber.[%]: C 54.20 H 7.03 N 2.87 Gef.[%] C 54.21 H 6.51 N 2.94

[2,2-Dimethylpropionyloxymethoxy-[4-[hydroxy(methyl)amino]-4-oxo-1-phenyl-butyl]phosphoryl]oxymethyl 2,2-dimethylpropionat **81**

Hergestellt aus 0,29 g **76** (0,5 mmol) nach **AAV6** mit anschließender Säulenchromatographie über Kieselgel (Elutionsmittel: Diethylether).

Ausbeute: 99 %, hellgelbes, klebriges Harz

IR v (NaCl): 1755 cm⁻¹ (C=O, POM), 1668 cm⁻¹ (C=O, Hydroxam.),

1251 cm⁻¹ (P=O), 1059 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d6), (ppm): 1.12 (s, 9H, C(CH₃)), 1.16 (s, 9H,

 $C(CH_3)$), 2.01 (dq, J = 11.73, 11.56 Hz, 1H, $CHCH_2$), 2.09-2.32 (m, 3H, $CHCH_2$, CH_2CH_2), 3.01 (s, 3H, NCH_3), 3.33-3.46 (m, 1H, PCH_3), 5.39-5.49 (m, 2H, $POCH_2$), 5.51-5.67 (m, 2H, $POCH_2$),

6.97-7.58 (m, 10H, aromat.), 9.64 (s, 1H, OH)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO-d6), (ppm): 23.90 (CH₂CH₂), 26.34 (C(CH₃)),

26.38 (C(CH_3)), 29.22 (d, $^2J_{C-P}$ = 17.06 Hz. CH CH_2), 35.54 (NCH₃), 38.04 ($C(CH_3)_3$), 38.10 ($C(CH_3)_3$), 42.51 (d, $^1J_{C-P}$ = 135.63 Hz, PCH), 81.30 (POCH₂), 81.34 (POCH₂), 127.20 (d, $^5J_{C-P}$ = 3.17 Hz), 128.41, 129.05 (d, $^3J_{C-P}$ = 7.02 Hz), 134.65 (d, $^2J_{C-P}$ = 8.57 Hz, aromat.), 171.74 (C=O, Hydroxam.), 175.95

(C=O, POM), 176.00 (C=O, POM)

 $C_{23}H_{36}NO_9P$ [501.51]

Ber.[%]: C 55.08 H 7.24 N 2.79 Gef.[%] C 54.88 H 7.31 N 2.61

[2,2-Dimethylpropionyloxymethoxy-[4-[ethyl(hydroxy)amino]-4-oxo-1-phenyl-butyl]phosphoryl]oxymethyl 2,2-dimethylpropionat **82**

Hergestellt aus 0,29 g **77** (0,5 mmol) nach **AAV6** mit anschließender Säulenchromatographie über Kieselgel (Elutionsmittel: Diethylether).

Ausbeute: 99 %, orangenes Harz

IR \tilde{v} (NaCl): 3064, 3033 cm⁻¹ (C-H_{aromat.}), 1756 cm⁻¹ (C=O, POM),

1646, 1623 cm⁻¹ (C=O, Hydroxam.), 1260 cm⁻¹ (P=O),

1058 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃), (ppm): 1.12 (t, J = 7.08 Hz, 3H, CH₂CH₃),

1.12 (s, 9H, C(CH₃)), 1.16 (s, 9H, C(CH₃)), 2.01 (dd, J = 20.63, 9.55 Hz, 1H, CHC H_2), 2.10-2.29 (m, 3H, CHC H_2), CH₂C H_2), 3.37-3.41 (m, 1H, PCH), 3.41-3.49 (m, 2H, NCH₂), 5.44 (qd, J = 12.60, 5.37 Hz, 2H, POCH₂), 5.58 (ddd, J = 15.81, 12.67, 5.41 Hz, 2H,

POCH₂), 7.26-7.35 (m, 5H, aromat.), 9.47 (s, 1H, OH)

¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO-d6), (ppm): 15.07 (CH_2CH_3), 23.89 (CH_2CH_2),

26.34 (C(CH_3)), 26.38 (C(CH_3)), 29.49 (d, $^2J_{C-P}$ = 17.55 Hz. CH CH_2), 38.03 ($C(CH_3)_3$), 38.09 ($C(CH_3)_3$), 42.53 (d, $^1J_{C-P}$ = 131.93 Hz, PCH), 39.64 (NCH₂), 81.28 (POCH₂), 81.32 (POCH₂), 127.20 (d, $^5J_{C-P}$ = 2.70 Hz), 128.41 (d, $^4J_{C-P}$ = 1.56 Hz), 129.05 (d, $^3J_{C-P}$ = 6.90 Hz), 134.66 (d, $^2J_{C-P}$ = 7.02 Hz, aromat.), 171.35 (C=O, Hydroxam.), 175.95 (C=O, POM), 176.01 (C=O,

POM)

 $C_{24}H_{38}NO_9P$ [515.53]

Ber.[%]: C 55.91 H 7.43 N 2.72 Gef.[%] C 55.77 H 7.35 N 2.49

{[1-(3,4-Difluorophenyl)-4-(hydroxyamino)-4-oxo-butyl]-(2,2-dimethylpropionyloxy-methoxy)phosphoryl}oxymethyl 2,2-dimethylpropionat **83**

Hergestellt aus 0,31 g **78** (0,5 mmol) nach **AAV6** mit anschließender Säulenchromatographie über Kieselgel (Elutionsmittel: Diethylether).

Ausbeute: 93 %, farbloses Öl

IR \tilde{v} (NaCl): 3223 cm⁻¹ (N-H), 2977 cm⁻¹ (CH_{aliph.}), 1755 cm⁻¹ (C=O, POM),

1655 cm⁻¹ (C=O, Hydroxam.), 1282, 1250 cm⁻¹ (P=O),

1057, 1026 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃), (ppm): 0.89-1.39 (m, 18H, CH₃), 1.72-2.55

(m, 4H, CHC*H*₂, CH₂C*H*₂), 2.97-3.35 (m, 1H, PCH), 5.29-5.75 (m, 4H, POCH₂), 6.74-7.17 (m, 3H, aromat.), 8.29-10.14 (m, 1H, OH)

¹³C-NMR: (125 MHz, CDCl₃), (ppm): 24.75 (d, ${}^{3}J_{C-P} = 1.3$ Hz, CH₂CH₂),

25.73 (C(CH_3)), 25.76 (C(CH_3)), 29.07 (d, $^2J_{C-P}$ = 12.3 Hz. CH CH_2), 37.69 ($C(CH_3)_3$), 37.73 ($C(CH_3)_3$), 41.46 (d, $^1J_{C-P}$ = 139.4 Hz, PCH), 80.73 (d, $^2J_{C-P}$ = 6.4 Hz, POCH₂), 81.35 (d, $^2J_{C-P}$ = 6.7 Hz, POCH₂), 116.58 (dd, $^2J_{C-F}$ = 16.3 Hz, $^3J_{C-F}$ = 2.0 Hz), 117.08 (dd, $^2J_{C-F}$ = 17.5 Hz, $^3J_{C-F}$ = 6.8 Hz), 124.44, 130.51 (dd, $^3J_{C-F}$ = 2.7 Hz, $^2J_{C-P}$ = 4.2 Hz), 148.02 (dd, $^1J_{C-F}$ = 253.1 Hz, $^2J_{C-F}$ = 16.6 Hz), 149.21 (dd, $^1J_{C-F}$ = 252.2 Hz, $^2J_{C-F}$ = 13.5 Hz, aromat.), 168.44 (C=O, Hydroxam.) 175.99

(C=O, POM), 176.29 (C=O, POM)

³¹P-NMR: (202,5 MHz, CDCl₃), (ppm): 27.78, 28.30

 $C_{22}H_{32}F_2NO_9P$ [523.46]

Ber.[%]: C 50.48 H 6.16 N 2.68 Gef.[%] C 50.67 H 6.33 N 2.42

{[1-(3,4-Difluorophenyl)-4-[hydroxy(methyl)amino]-4-oxo-butyl]-(2,2-dimethylpropionyl-oxymethoxy)phosphoryl}oxymethyl 2,2-dimethylpropionat **84**

Hergestellt aus 0,31 g **79** (0,5 mmol) nach **AAV6** mit anschließender Säulenchromatographie über Kieselgel (Elutionsmittel: Diethylether).

Ausbeute: 90 %, farbloses Öl

IR \tilde{v} (NaCl): 3208 cm⁻¹ (O-H), 3081 (C-H_{aromat.}), 2978 cm⁻¹ (CH_{aliph.}),

1755 cm⁻¹ (C=O, POM), 1622 cm⁻¹ (C=O, Hydroxam.),

1281 cm⁻¹ (P=O), 1058 cm⁻¹ (P-O)

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃), (ppm): 1.12 (s, 9H, C(CH₃)), 1.15 (m, 9H,

 $C(CH_3)$), 2.03-2.19 (m, 1.5H, $CHCH_2$, CH_2CH_2), 2.19-2.34 (m, 1.5H, $CHCH_2$, CH_2CH_2), 2.34-2.52 (m, 0.5H, $CHCH_2$), 2.55-2.78 (m, 0.5H, $CHCH_2$), 3.16 (s, 3H, NCH_3), 3.17-3.32 (m, 1H, PCH). 5.20-5.81 (m, 4H, $POCH_2$), 6.95 (s, 1H), 7.06 (s, 2H, aromat.),

7.96 (s, 0.17H, OH), 8.22 (s, 0.83H, OH)

¹³C-NMR: (125 MHz, CDCl₃), (ppm): 24.72 (CH₂CH₂), 25.74 (C(CH₃)),

25.78 (C(CH_3)), 28.42 (d, ${}^2J_{C-P}$ = 19.3 Hz. CH CH_2), 34.99 (NCH₃), 37.67 ($C(CH_3)_3$), 37.71 ($C(CH_3)_3$), 41.58 (d, ${}^1J_{C-P}$ = 140.6 Hz, PCH), 80.70 (POCH₂), 80.78 (POCH₂), 116.43 (dd, ${}^2J_{C-F}$ = 18.8 Hz, ${}^3J_{C-F}$ = 3.1 Hz), 117.07 (dd, ${}^2J_{C-F}$ = 20.5 Hz, ${}^3J_{C-F}$ = 7.1 Hz), 124.39 (dd, ${}^3J_{C-F}$ = 6.9 Hz), 131.24, 148.81 (dd, ${}^1J_{C-F}$ = 242.7 Hz, ${}^2J_{C-F}$ = 9.7 Hz), 149.15 (dd, ${}^1J_{C-F}$ = 242.9 Hz, ${}^2J_{C-F}$ = 11.1 Hz, aromat.), 171.77 (C=O, Hydroxam.) 175.86 (C=O, POM), 175.95

(C=O, POM)

³¹P-NMR: (202,5 MHz, CDCl₃), (ppm): 27.81, 28.47

 $C_{22}H_{34}F_2NO_9P$ [537.49]

Ber.[%]: C 51.40 H 6.38 N 2.61 Gef.[%] C 51.66 H 6.55 N 2.64

7.8 Untersuchung der Dxr-Enzymhemmung

Die *In vitro* Untersuchung der Hemmwirkung auf das rekombinante *Ec*Dxr-Enzym erfolgte am Center for Integrated Protein Science der Technischen Universität in München in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Groll und Dr. Wolfgang Eisenreich.

Die Untersuchungen am rekombinanten *Pf*Dxr-Enzym wurden am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hamburg im Arbeitskreis von Prof. Dr. Markus Fischer vorgenommen.

7.8.1 Material und Methoden

7.8.1.1 Rekombinante Gewinnung der orthologen Dxr-Enzyme²²⁰

Die rekombinante Gewinnung der *Ec*Dxr wurde nach einer Methode durchgeführt, die bereits von Hecht und Mitarbeitern beschrieben wurde.²²¹

^{**********} GenBank: HQ018930

^{§§§§§§§§} Qiagen (Hilden, Deutschland)

TRIS = Tris(hydroxymethyl)-aminoethan

gewaschen. Anschließend konnte das gewünschte Protein durch Applikation eines Imidazol-Konzentrationsgradienten (20 → 500 mm) eluiert werden. Die gesammelten Fraktionen wurden vereinigt und die Proteinlösung durch Ultrafiltration (molecular weight off = 10 kDa) aufkonzentriert. Für die Entsalzung wurde eine 2,6 cm x 10 cm Gelpermeations-Entsalzungssäule (HiPrep 26/10) - gefüllt mit Sephadex G-25 F - der Firma Amersham verwendet. Die Säule wurde mit 50 mm Tris-HCl-Pufferlösung (pH 7,5), die 10 % (V/V) Glycerol enthielt, äquilibriert und entwickelt. Wie sich herausstellte, stellt die Anwesenheit des Glycerols ein zwingendes Kriterium während der gesamten Aufreinigung des Enzyms dar. Andernfalls fiel das schwerlösliche Protein, das in den bakteriellen Zellen aufgrund seiner schlechten Löslichkeit in Inklusionskörpern auftritt, aus. †††††††† Das aufgereinigte, aber labile plasmodiale Protein, wurde abschließend in einer Pufferlösung, die 50 mM Tris-HCI-Pufferlösung (pH 8,0), 5 mM Dithiothreitol und 10 % (V/V) Glycerol enthält, bei -80 ℃ gelagert.

7.8.1.2 *IC*₅₀-Bestimmung im photometrischen Assay

Die Enzym-Assay-Bestimmungen wurden in 96-well-Platten (Nunc) mit transparentem Boden durchgeführt. Die Assay-Lösungen enthielten ein Gesamtvolumen von 200 µL, das im Falle der Vermessung am plasmodialen Enzym aus 100 mm Tris-HCl-Pufferlösung (pH 7,6), 4 mm MnCl₂, 0,5 mm Dithiothreitol, der rekombinanten 0,5 mM NADPH und 10-30 nM *Pf*Dxr Hemmwertbestimmungen an EcDxr wurden in einer Pufferlösung, die 100 mM Tris-HCI-Pufferlösung (pH 8,0), 10 mm MgCl₂, 1 mm NADPH und 27 nm des rekombinanten Proteins enthielt, durchgeführt.

Für beide Enzymassays wurden von den potenziellen Inhibitoren Verdünnungsreihen (1:2), die den Konzentrationsbereich von 200 um bis 1 nm abdecken, erstellt. Durch Zugabe des Substrats 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat (1 mm) konnte die enzymatische Reaktion gestartet und daraufhin in einem Mikroplatten-Messgerät (PfDxr: Thermo Scientific, Multiscan Spectrum; EcDxr: Molecular Devices, SpectraMax M2) die NADPH-Umsetzung photometrisch bei einer Messwellenlänge von 340 nm verfolgt werden. Der PfDxr-Assay wurde bei Raumtemperatur, der EcDxr-Assay bei 37 °C Umgebungstemperatur durchgeführt. Die gemessenen initialen Umsetzungsraten der enzymatischen Reaktion wurden mithilfe einer

^{†††††††} Persönliche Kommunikation mit Dr. Viktoriya Illarionova aus dem Arbeitskreis Fischer.

nichtlinearen Regressionsmethode durch die Computer-Software Dynafit ausgewertet und hieraus entsprechende IC₅₀- und K_i-Werte errechnet.²⁰²

7.9 Untersuchung der antiplasmodialen Aktivität *in vitro* und *in vivo* sowie der Zytotoxizität

Alle hergestellten Forschungssubstanzen wurden zur Bestimmung ihrer antiplasmodialen Aktivität gg. dem Chloroquin-resistenten *P. falciparum* K1-Stamm und zur Abschätzung ihres zytotoxischen Potenzials an fetalen MRC-5-Zellen untersucht. Die praktische Durchführung der biologischen Testung erfolgte im LMPH (*L*aboratory for *M*icrobiology, *P*arasitology and *H*ygiene, Belgien) in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Louis Maes.

7.9.1 Material und Methoden der *In vitro* Bestimmungen

7.9.1.1 Herstellung der Testplatten

Die Experimente wurden auf 96-well-Platten (Greiner) durchgeführt. Zuerst wurde für alle getesteten Verbindungen unter Verwendung einer programmierbaren Präzisions-Roboterstation (Biomek 2000 der Firma Beckman, USA) eine Verdünnungsreihe (1:4) erstellt, die den Konzentrationsbereich von 64 μg mL⁻¹ bis 0,25 μg mL⁻¹ abdeckt. Auf jeder Platte wurde parallel eine Medium- (0 % Wachstum) sowie eine Negativ-Kontrolle (100 % Wachstum) durchgeführt. Als Positivkontrolle und Referenz wurde auf jeder Platte Chloroquin parallel vermessen. Alle Experimente wurden mindestens in dreifacher Durchführung vorgenommen.

7.9.1.2 *Methodik*

Der Aufbau und die Durchführung des Screenings wurden analog zu der von *Cos und Mitarbeitern* beschriebenen Methodik vorgenommen.²²²

7.9.1.3 In vitro P. f.-Kultur und Wirkstoffassay

Der Chloroquin-resistente K1-Stamm wurde in humanen Erythrozyten (A+) bei 37 ℃ in einer modulierbaren Inkubationskammer unter niedriger O₂-Konzentration kultiviert (Atmosphäre: 3 % O₂, 4 % CO₂, 93 % N₂). Als Kulturmedium wurde RPMI-

Das Prinzip der Malstat-Methode besteht darin, dass *P. falciparum* ein Lactatdehydrogenaseenzym besitzt, welches im Gegensatz zur menschlichen Variante 3-Acetylpyridin-NAD (APAD) als Redox-Kofaktor für die Oxidation von Lactat zu Pyruvat optimal nutzen kann, womit eine selektive Aktivitätsbestimmung gg. dem plasmodialen Enzym möglich wird. Der bei der enzymatischen Umsetzung in äquivalenter Menge entstandene reduzierte Kofaktor APADH (Schema 50) reduziert seinerseits das anwesende NBT zu einem blau gefärbtem Di-Formazan. Durch photometrische Messung bei 655 nm (Biorad 3550-UV microplate reader) wurde quantitativ auf die entstandene Menge des Di-Formazans und ferner auf gewachsene Plasmodien geschlossen. Nach Vergleich mit der gemessenen Absorption der Negativkontrolle (100 % Wachstum) konnte eine prozentuale Wachstumshemmung und ein IC₅₀-Wert der entsprechenden Testverbindung errechnet werden.

^{‡‡‡‡‡‡‡‡} RPMI = "RPMI-1640 ist ein Zellkulturmedium für normale und neoplastische Leukozyten sowie andere humane und tierische Zelltypen. Die Formulierung wurde Mitte der 1960er Jahre von G. E. Moore und Kollegen am Roswell Park Memorial Institute, daher RPMI, entwickelt. Wie fast alle heute gebräuchlichen Zellkulturmedien benutzt RPMI-1640 ein Hydrogencarbonat-Puffersystem und basiert auf einer Lösung von Glukose, Salzen, Aminosäuren und Vitaminen. Als Indikator für den pH-Wert ist weiterhin noch Phenolrot zugesetzt. Zur Kultivierung der meisten Zelltypen muss das Medium mit weiteren Komponenten ergänzt werden, häufig mit Serum, welches den Zellen u. a. Wachstumsfaktoren, Spurenelemente und Hormone wie z. B. Insulin liefert." zitiert aus: http://de.wikipedia.org/wiki/RPMI

Schema 50. LDH-Reaktion zur Bestimmung des plasmodialen Wachstums nach der Malstat-Methode (übernommen und modifiziert nach Pein)²²⁶

7.9.1.4 Zytotoxizitäts-Test an MRC-5-SV2-Zellen

Für den Zytotoxizitäts-Assay wurden 10⁴ der Zellen auf Testplatten, die bereits mit Testsubstanzlösungen verschiedener Konzentration (64, 16, 4, 1 und 0,25 μM) beschickt waren, ausgesät. Nach dreitägiger Inkubation der Testplatten bei 37 °C

^{§§§§§§§§§§ &}quot;Fetales Kälberserum enthält eine Vielzahl von Proteinen, von denen heute noch nicht alle bekannt sind. Unter diesen Proteinen befinden sich auch Wachstumsfaktoren, die für das Kultivieren von Zellen in Zellkulturflaschen notwendig sind. Zwar benötigen nicht alle Zellkulturen fötales Kälberserum, aber insbesondere die Kultur von empfindlichen Zellen (Stammzellen etc.) ist derzeit auf den Zusatz von fetalem Kälberserum angewiesen." zitiert aus: http://de.wikipedia.org/wiki/Fetales_K%C3%A4lberserum

und 5 % CO_2 , wurde die Viabilität der Zellen, nachdem Resazurin für 24 Stunden bei zugesetzt war, fluorimetrisch ($\lambda_{ex}=550$ nm, $\lambda_{ex}=590$ nm, Schema 51) gemessen (GENios Tecan Fluorimeter). Nur lebende Zellen bilden den für die Reduktionsreaktion des Resazurins zu Resurofin notwendigen Kofaktor NADH. Über die quantitative Bestimmung des noch vorhandenen Resazurins konnte rechnerisch auf die Viabilität und entsprechende IC_{50} -Werte der Testsubstanzen geschlossen werden. Eine Substanz wird demnach als zytotoxisch eingestuft, wenn der IC_{50} -Wert geringer als 4 μ M ist.

Schema 51. Umwandlung von Resazurin in Resurofin (übernommen aus Dissertation von M. Pein). 226

7.9.2 Material und Methoden der In vivo Bestimmungen

7.9.2.1 Beschreibung der Versuchstiere und deren künstliche Infektion

In fünf Gruppen wurden jeweils fünf weibliche Schweizer Mäuse (n = 5) mit einem Körpergewicht von durchschnittlich 25 Gramm aufgeteilt. Aufgrund der limitierten Substanzmenge konnten der Fosmidomycin-Gruppe nur vier Versuchstiere zugeordnet werden. Den Mäusen wurde ein infektiöses Inokulum von ungefähr 4 x 10⁸ mit *P. berghei* (gfp-Reporter-Gen, ANKA-Stamm) infizierter Erythrozyten intraperitoneal verabreicht. Während des gesamten Experiments stand den Versuchstieren Trinkwasser und Futter frei zur Verfügung.

7.9.2.2 *Testsubstanz-Formulierungen*

1. Referenz Chloroquin: 12,5 mg/2500 μL DMSO

2. Referenz Fosmidomycin: 60 mg/ 2400 µL PBS

3. Testsubstanz **62**: 151,3 mg/6052 μL DMSO

4. Testsubstanz **70**: 96,5 mg/3860 μL DMSO

7.9.2.3 Behandlungsschema

Die Chloroquin-Gruppe wurde einmal täglich mit 50 μ L der entsprechenden Formulierung behandelt (10 mg/kg KG). Für die Untersuchungsgruppen, die Fosmidomycin und die Testsubstanzen **62** und **70** erhielten, wurden zweimal täglich 40 mg/kg Körpergewicht (KG) der Testsubstanz intraperitoneal verabreicht, zusätzlich wurden peroral 10 mg/kg KG Ritonavir appliziert. Die erste Gabe erfolgte zwei Stunden nach der künstlichen Infektion der Mäuse (= Tag 0) und setzte sich über insgesamt fünf Tage fort. Als Positivkontrolle wurde eine Gruppe einmal täglich mit 50 μ L des Vehikels DMSO intraperitoneal und Ritonavir peroral behandelt.

Aus dieser Aufteilung ergeben sich folgende Untersuchungsgruppen:

G-1: Vehikel-behandelte, infizierte Kontrollgruppe: 50 μ L DMSO + 10 mg/kg KG Ritonavir (n = 5)

G-2: Chloroquin: 10 mg/kg KG in 50 μ L lnokolum i.p. (n = 5)

G-3: Fosmidomycin: 80 mg/kg KG in 50 μL Inokolum i.p. + 10 mg/kg KG Ritonavir p.o. (n = 4)

G-4: **62**: 80 mg/kg KG in 50 μ L Inokolum i.p. + 10 mg/kg KG Ritonavir p.o. (n = 5)

G-5: **70**: 80 mg/kg KG in 50 μ L Inokolum i.p. + 10 mg/kg KG Ritonavir p.o. (n = 5)

7.9.2.4 Evaluationsparameter

Während der gesamten Dauer des Experiments wurden die Versuchstiere hinsichtlich des Auftretens von klinischen Symptomen und unerwünschten Arzneimittelwirkungen beobachtet. Bei schwerwiegenden Symptomen, entweder bedingt durch Toxizität der verabreichten Substanzen oder die Malariaerkrankung, wurden die Versuchstiere eingeschläfert. Die durchschnittliche Überlebenszeit der Versuchstiere jeder Gruppe bis Tag 11 wurde ermittelt und hieraus als erste Bewertungsgröße die mittlere Überlebenszeit (= MST) der Versuchsgruppe abgeleitet. Die MST gilt als sensitiver Parameter zur Beurteilung der Effektivität eines Antimalaria-Wirkstoffs. Darüber hinaus wurde als zweite Bewertungsgröße die Parasitämie der Versuchstiere an Tag 0, 4, 7 und 11 mithilfe von Durchflusszytometrie (10 μ L Blut in 2000 μ L PBS) festgestellt. Die prozentuale

Reduktion im Vergleich zur mit Vehikel behandelten Gruppe G-1 wird als Maß für die Aktivität der untersuchten Wirkstoffe genommen:

An Tag 11 wurden alle Versuchstiere aus Gründen des Tierschutzes eingeschläfert.

8 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Synthese und den biologischen Eigenschaften von inversen Analoga des Naturstoffs Fosmidomycin (Schema 52), der antiplasmodiale Eigenschaften aufweist und sich gegenwärtig in Kombination mit Clindamycin in klinischen Untersuchungen zur Behandlung von unkomplizierter *Malaria tropica* befindet. Die durchgeführten Strukturvariationen basieren auf folgenden Erkenntnissen:

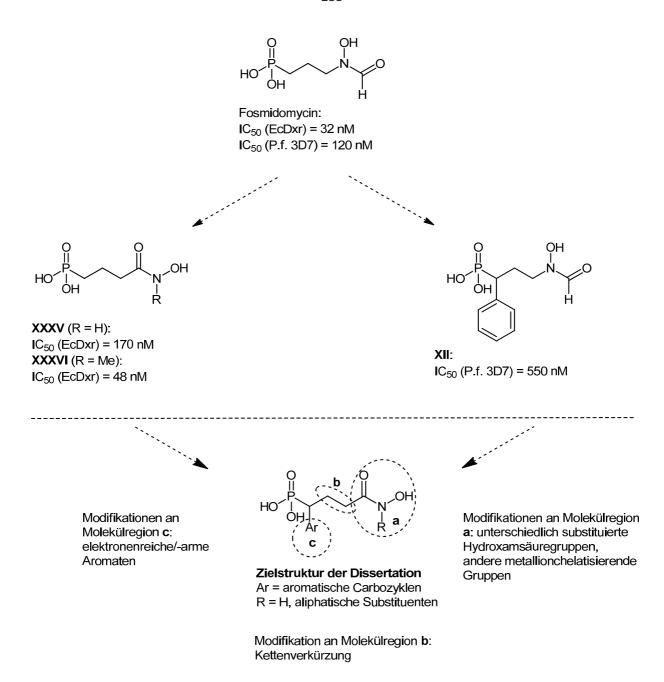
- Rohmers Arbeitsgruppe berichtete 2005 über das im Vergleich zu Fosmidomycin inverse Hydroxamsäureanalogon **XXXVI**, das gg. *Escherichia coli* 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase (*Ec*Dxr) äquipotente inhibitorische Aktivität aufweist (Schema 52).¹⁷⁵
- $Kurz^{166}$ und Van Calenbergh¹⁶⁵ zeigten unabhängig voneinander, dass α -Arylsubstituierte Fosmidomycin-Analoga wie z.B. **XII** sehr gute antiplasmodiale Eigenschaften *in vitro* aufweisen (Schema 52).

Daraus ergibt sich die abgebildete allgemeine Zielstruktur dieser Dissertation. Die Molekülbereiche a, b und c wurden systematisch modifiziert.

Die dargestellten Analoga wurden in kooperierenden Arbeitsgruppen umfassend biologisch evaluiert. Die inhibitorische Aktivität der Zielverbindungen wurde gg. den rekombinant gewonnenen Dxr-Enzymen von *Plasmodium falciparum (Pf*Dxr) und *Escherichia coli (Ec*Dxr) sowie die antiplasmodiale Aktivität im Zellkulturassay gg. dem Chloroquin-resistenten *P. falciparum* K1-Stamm (*P.f.*K1) bestimmt. Darüber hinaus liegen CC₅₀-Werte zur Zytoxizität, die gg. MRC-5 SV2-Zellen ermittelt wurden, vor.

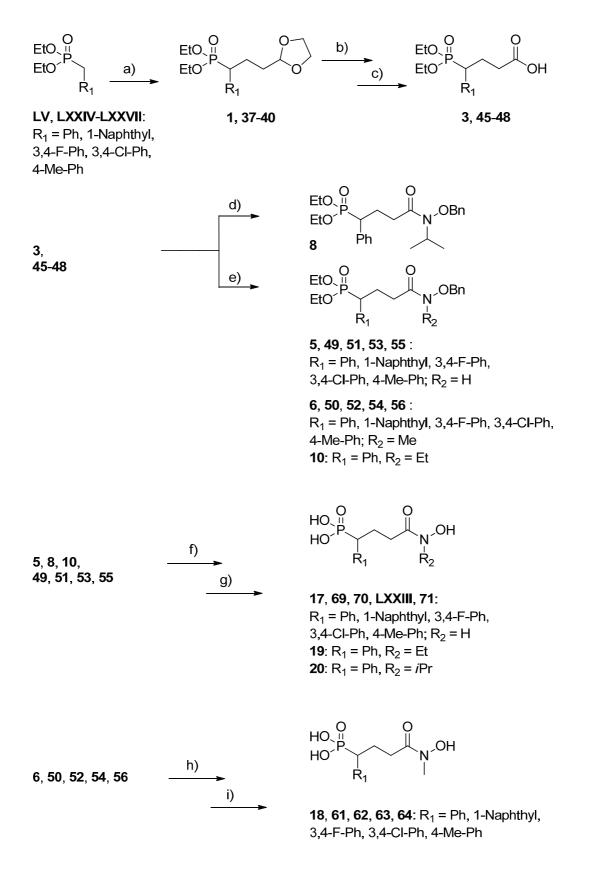
_

siehe auch Pein, M., Dissertationsschrift, Universität Düsseldorf, 2008.



Schema 52. Wichtige Strukturmodifikationen Fosmidomycins vor Beginn der Dissertationsanfertigung und allgemeine Zielstruktur der Dissertation.

Die Synthese der α-Aryl-Fosmidomycin-Analoga, die Modifikationen der inversen Hydroxamsäurefunktion aufweisen, ist in Schema 53 zusammengefasst dargestellt. Ausgehend von den literaturbekannten Arylmethylphosphonaten **LV** und **LXXIV-LXXVII** wurden die Dioxolanderivate (**1, 37-40**) durch *C*-Alkylierung mit 2-(2-Bromoethyl)-1,3-dioxolan erzeugt. Nach sauer katalysierter Hydrolyse entstanden die



Schema 53. Syntheseschritte zur Gewinnung von α-Aryl-substituierten inversen Hydroxamsäure-analoga Fosmidomycins; Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) n-BuLi, 2-(2-Bromoethyl)-1,3-dioxolan, Toluen, -78 °C; b) HCl, Aceton, 50 °C, 3 h; c) SeO₂, H_2O_2 , THF, 65 °C, 4 h; d) 1,1 ′-Carbonyldiimidazol, BnONHR (R = H (**LI**), Me (**LII**), Et (**LIII**)), CH_2CI_2 , RT; e) $C_2O_2CI_2$ /DMF, BnONH-iPr (**LIV**); RT; f) 1) TMSBr, CH_2CI_2 , RT, 24 h; 2) THF/ H_2O , RT, 1 h; 3) DCC, BnOH, Benzen, 80 °C, 4 h; g) H_2 , Pd-C, MeOH, 3 h; h) 1) TMSBr, CH_2CI_2 , RT, 24 h;2) THF/ H_2O , RT, 1 h; i) H_2 , Pd-C, MeOH, 1 h.

korrespondierenden Aldehyde, welche durch Behandlung mit einem Gemisch aus Selendioxid und Wasserstoffperoxid zu den Carbonsäurederivaten (3, 45-48) oxidiert wurden. Die Synthese der *O*-benzylgeschützten Hydroxamsäuren 5-6 und 49-56 gelang durch Reaktion der Carbonsäureverbindungen mit 1,1´-Carbonyldiimidazol und anschließender Zugabe von LI, LII beziehungsweise LIII. 8 entstand durch Reaktion von 3 mit Oxalylchlorid, DMF und LIV in einer Eintopfreaktion. Die Phosphono-hydroxamsäuren 17, 69, 70 und 71 sowie 19 und 20 wurden durch Derivatisierung zu Phosphonsäurebenzylester und anschließender Hydrogenolyse erhalten (Schema 53: f), g)). Das 3,4-Chlorphenyl-Analogon LXXIII war unter den reduktiven Reaktionsbedingungen instabil, da Dehydrohalogenierung eintrat. Die *N*-methylsubstituierten Hydroxamsäureanaloga 18 und 61-64 konnten durch TMSBrunterstützte Hydrolyse der Ethylester (6, 50, 52, 54 und 56) mit anschließender Hydrogenolyse gewonnen werden (Schema 53: h), i)).

Die biologischen Untersuchungen ergaben, dass einige Zielverbindungen *Pf*Dxr im einstellig nanomolaren Bereich hemmen und die inhibitorische Aktivität der Mononatriumsalze der Referenzen Fosmidomycin (Fos-Na) und FR900098 (FR900098-Na) deutlich übertreffen (Tabelle 12).

62 und **70** wurden an *P. berghei*-infizierten Mäusen auf ihre antiplasmodiale Aktivität *in vivo* untersucht. Dabei erwies sich **70** als ähnlich effektiv wie Fosmidomycin und Chloroquin, **62** jedoch zeigte keine relevante antiplasmodiale Aktivität.

Nach Auswertung der Röntgenstruktur der Proteinkristalle des Ternärkomplexes *Ec*Dxr:Mn²⁺:**62** wurde deutlich, dass die inverse Hydroxamsäure in Analogie zu Fosmidomycin als Substratanalogon bindet. Beide Sauerstoffatome der Hydroxamsäurefunktion nehmen an einem oktaedrischen Komplex des bivalenten Metallions im aktiven Zentrum des Zielenzyms teil.²¹⁹

Der Ersatz der inversen Hydroxamsäurefunktion (Molekülregion a) gegen eine Thioester-, Phosphonat-, Carboxylat-, *N*-Hydroxy-Carbamat- und *N*-Hydroxyimidfunktion führten jedoch zu Fosmidomycinanaloga ohne nennenswerte antiplasmodiale Aktivität.

Zielverbindung	<i>Pf</i> Dxr	<i>Ec</i> Dxr	<i>P.f.</i> K1	MRC-5
	IC ₅₀ [μΜ] ^a	IC ₅₀ [μM] ^a	IC ₅₀ [μM] ^{a,b}	IC ₅₀ [μM] ^c
17	0,012 +/- 0,003	0,59 +/- 0,03	3,9 +/- 1,8	>59
18	0,003 +/- 0,0003	0,24 +/- 0,03	0,59 +/- 0,2	>60
19	0,015 +/- 0,002	15 +/- 0,4	1,3 +/- 1,5	>64
20	inaktiv	inaktiv	inaktiv	>64
61	0,009 +/- 0,001	3,8 +/- 0,2	0,97 +/- 0,79	>62
62	0,003 +/- 0,001	0,12 +/- 0,07	0,29 +/- 0,20	>64
63	0,004 +/- 0,001	0,18 +/- 0,02	0,41 +/- 0,25	>64
64	0,014 +/- 0,003	0,28 +/- 0,02	0,14 +/- 0,07	>64
69	0,037 +/- 0,003	7,4 +/- 0,2	2,4 +/- 1,1	>64
70	0,003 +/- 0,001	0,21 +/- 0,02	0,38 +/- 0,17	>64
71	0,187 +/- 0,014	0,69 +/- 0,09	5,7 +/- 0,8	>64
Fos-Na	0,14 +/- 0,02	0,22 +/- 0,01	3,7 +/- 2,5	>62
FR900098-Na	0,015 +/- 0,001	0,13 +/- 0,003	1,2 +/- 1,0	>59

Tabelle 12. In vitro Aktivitätsdaten der inversen Hydroxamsäureanaloga Fosmidomycins der Dissertation; ^aMesswerte +/- Standardabweichung von mindestens 3 unabhängigen Messungen. ^bReplikation von P. falciparum in menschlichen Erythrozyten. ^cZytotoxizitätstest mit MRC-5 Zellen.

Basierend auf den Erkenntnissen, dass Bis-Pivaloyloxymethyl(POM)-Phosphonsäureesterprodrugs von Fosmidomycin-Analoga verbesserte antiplasmodiale Aktivität zeigen, ^{146,147} wurden von ausgewählten Analoga dieser Arbeit (17-20, 62, 70) POM-Prodrugs synthetisiert und biologisch untersucht. Davon erwiesen sich einige *in vitro* als antiplasmodial wirksamer verglichen mit der freien Phosphonsäure.

Die Untersuchungen dieser Dissertation erbrachten folgende Erkenntnisse hinsichtlich der Struktur-Wirkungs-Beziehungen Fosmidomycins.

Sowohl freie als auch *N*-methylsubstituierte Hydroxamsäuren weisen ausgeprägte antiplasmodiale Aktivität *in vitro* auf, während voluminösere Substituenten wie Isopropylgruppen zu Wirkungsverlust führen.

Ein Abstand von drei sp^3 -hybridisierten Kohlenstoffatomen zwischen α -Arylsubstituierter Phosphonsäure- und der inversen Hydroxamsäurefunktion ist essenziell für die antiplasmodiale Aktivität.

Inverse Hydroxamsäureanaloga Fosmidomycins mit einem aromatischen Substituenten in α -Position in Relation zur Phosphonsäuregruppe besitzen eine

bemerkenswerte Präferenz gg. *Pf*Dxr, das um mehrere Größeneinheiten stärker inhibiert wird als *Ec*Dxr.

Sowohl eine 3,4-Dihalogen- als auch eine p-Methyl-Substitution der α -Phenylgruppe in Kombination mit einer inversen Hydroxamsäurefunktion erbringt Verbindungen mit potenter inhibitorischer Aktivität gg. Dxr und ausgeprägten antiplasmodialen Eigenschaften *in vitro*.

In vivo Studien an mit *P. berghei* infizierten Mäusen deuten eine höhere antiplasmodiale Aktivität für freie inverse Hydroxamsäuren an.

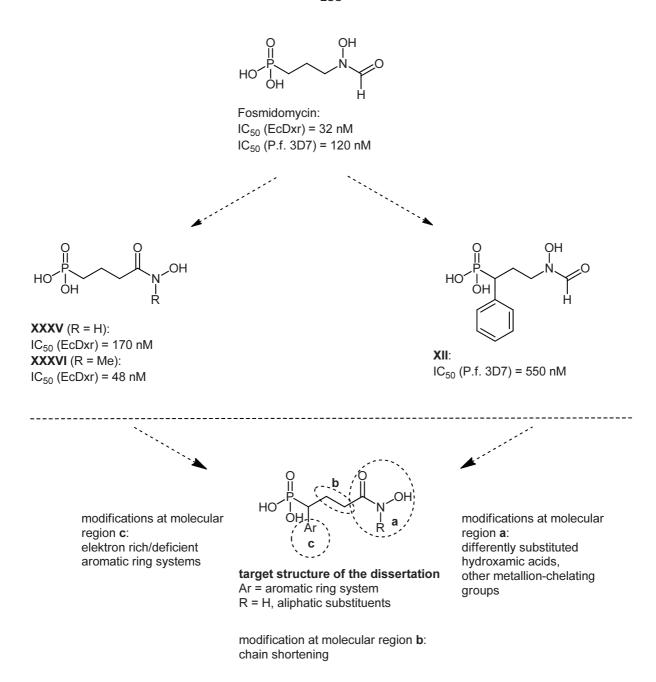
9 Summary

This work deals with the synthesis, analysis and biological activity of reverse hydroxamic acid analogues of the natural product Fosmidomycin (scheme 54), which shows antiplasmodial activity and is currently under clinical investigations for the treatment of uncomplicated *Malaria tropica* in combination with Clindamycin. The conducted structure modifications are mainly based on following scientific findings:

- In 2005 *Rohmer's* working group referred to the reverse hydroxamic acid analogue **XXXVI**, which shows equipotent inhibitory activity against *Escherichia coli* 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (*Ec*Dxr) in comparison with Fosmidomycin (scheme 54)¹⁷⁵.
- $Kurz^{166}$ and Van Calenbergh¹⁶⁵ showed independently from each other, that α -aryl-substituted analogues of Fosmidomycin, e.g. **XII**, exhibit very good antiplasmodial activity *in vitro* (scheme 54).

The outcome of this are the target compounds shown in scheme 54. Molecular parts a, b and c have been modified.

The synthesized compounds have been evaluated in cooperation with other working groups in regard to their biological activity. The latter contains the inhibitory activity against recombinant Dxr enzymes of *Plasmodium falciparum* (*Pf*Dxr) and *Escherichia coli* (*Ec*Dxr) as well as antiplasmodial activity against the Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* strain K1 in the cell culture assay. Furthermore, cytotoxic data, determined against MRC-5 SV2-cells, is described.



scheme 54. Important structure modifications at Fosmidomycin prior to this work and lead structure of this dissertation.

The synthesis of the reverse α -aryl-Fosmidomycin analogues with modifications at the hydroxamic moiety is compendiously diagrammed in scheme 55.

The desired dioxolanes (1, 37-40) were obtained by *C*-alkylation of arylmethylphosphonates LV and LXXIV-LXXVII with 2-(2-bromoethyl)-1,3-dioxolane. Acidic catalyzed hydrolysis afforded the corresponding aldehydes, which were converted into carboxylic acids (3, 45-48) by oxidation with selenium dioxide and hydrogen peroxide. The synthesis of *O*-benzyl-protected hydroxamic acids 5-6 and

49-56 was achieved by 1,1´-carbonyldiimidazole-mediated coupling reactions of the carboxylic acids with **LI**, **LII** or **LIII**. **8** was accessible in a one-pot reaction of **3** with oxalyl chloride, DMF, and **LIV**. The phosphono hydroxamic acids **17**, **69**, **70**, **71** as well as the *N*-ethyl- and *N*-isopropyl-substituted hydroxamic acids **19** and **20** were gained after transesterification reactions to benzyl esters and subsequent hydrogenolysis (scheme 55; f), g)). The 3,4-Cl-phenyl-substituted analogue **LXXIII** was unstable under the reductive reaction conditions considering the emergence of dehydrohalogenation. The *N*-methyl-substituted hydroxamic acids **18** and **61-64** were synthesized by cleavage of ethyl phosphonates **6**, **50**, **52**, **54** and **56** in the presence of TMSBr and subsequent hydrolysis (scheme 55: h), i)).

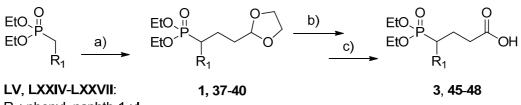
The biological evaluations revealed that some target compounds inhibit *Pf*Dxr in the single-digit nanomolar range and therefore exceed the inhibitory activity of the mono sodium salts of FR900098 and Fosmidomycin by far (table 13).

62 and **70** were further evaluated for their antiplasmodial activity and therapeutic efficacy towards *P. berghei*-infected mice. The *in vivo* efficacy of **70** was similar to that of Fosmidomycin and Chloroquine, whereas **62** had no relevant antiplasmodial activity.

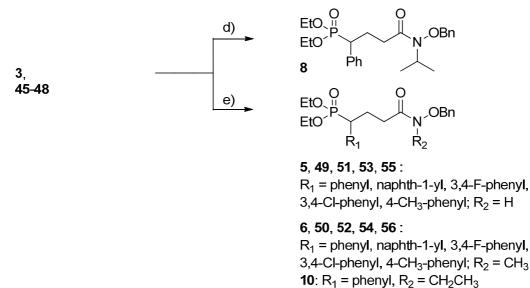
The x-ray analysis of the protein crystal structure of the ternary complex *Ec*Dxr:Mn²⁺: **62** reveals that the reverse hydroxamic acid binds in analogy to Fosmidomycin as a substrate analogue. Both hydroxamic acid oxygen atoms are taking part in an octahedral complex of the catalytic metal ion in the active site of the enzyme.²¹⁹

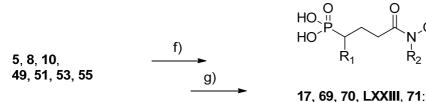
However, replacement of the reverse hydroxamic acid moiety by a thioester, phosphonate, carboxylate, *N*-hydroxy-carbamate or *N*-hydroxyimide function furnished Fosmidomycin analogues without any antiplasmodial activity.

Based on scientific findings, which showed enhanced antiplasmodial activity for Bis-pivaloyloxymethyl(POM)-phosphonic acid ester prodrugs of Fosmidomycin-analogues, ^{146,147} prodrugs of selected analogues (**17-20**, **62**, **70**) of this thesis were synthesized and evaluated biologically. Some prodrugs showed higher antiplasmodial efficacy *in vitro* than their corresponding free phosphonic acids.



R₁: phenyl, naphth-1-yl, 3,4-F-phenyl, 3,4-Cl-phenyl, 4-CH₃-phenyl





 R_1 = phenyl, naphth-1-yl, 3,4-F-phenyl, 3,4-Cl-phenyl, 4-CH₃-phenyl; $R_2 = H$ **19**: R_1 = phenyl, R_2 = CH_2CH_3 **20**: R_1 = phenyl, R_2 = CH(CH₃)₂

scheme 55. Synthesis of α -aryl-substituted reverse hydroxamic acid analogues of Fosmidomycin; reagents and conditions: a) n-buthyllithium, 2-(2-bromoethyl)-1,3-dioxolan, toluene, -78 °C; b) HCl, acetone, 50 °C, 3 h; c) SeO₂, H₂O₂, THF, 65 °C, 4 h; d) 1,1 '-carbonyldiimidazol, BnONHR (R = H(LI)), CH₃ (**LII**), CH₂CH₃ (**LIII**)), CH₂Cl₂, RT; e) C₂O₂Cl₂/DMF, BnONH-CH(CH₃)₂ (**LIV**); RT; f) 1) TMSBr, CH₂Cl₂, RT, 24 h; 2) THF/H₂O, RT, 1 h; 3) DCC, BnOH, benzene, 80 ℃, 4 h; g) H₂, Pd-C, methanol, 3 h; h) 1) TMSBr, CH₂Cl₂, RT, 24 h;2) THF/H₂O, RT, 1 h; i) H₂, Pd-C, methanol, 1 h.²¹⁹

target compound	<i>Pf</i> Dxr	<i>Ec</i> Dxr	P.f.K1	MRC-5
	IC ₅₀ [μM] ^a	IC ₅₀ [μM] ^a	IC ₅₀ [μM] ^{a,b}	IC ₅₀ [μM] ^c
17	0,012 +/- 0,003	0,59 +/- 0,03	3,9 +/- 1,8	>59
18	0,003 +/- 0,0003	0,24 +/- 0,03	0,59 +/- 0,2	>60
19	0,015 +/- 0,002	15 +/- 0,4	1,3 +/- 1,5	>64
20	inactive	inactive	inactive	>64
61	0,009 +/- 0,001	3,8 +/- 0,2	0,97 +/- 0,79	>62
62	0,003 +/- 0,001	0,12 +/- 0,07	0,29 +/- 0,20	>64
63	0,004 +/- 0,001	0,18 +/- 0,02	0,41 +/- 0,25	>64
64	0,014 +/- 0,003	0,28 +/- 0,02	0,14 +/- 0,07	>64
69	0,037 +/- 0,003	7,4 +/- 0,2	2,4 +/- 1,1	>64
70	0,003 +/- 0,001	0,21 +/- 0,02	0,38 +/- 0,17	>64
71	0,187 +/- 0,014	0,69 +/- 0,09	5,7 +/- 0,8	>64
Fos-Na	0,14 +/- 0,02	0,22 +/- 0,01	3,7 +/- 2,5	>62
FR900098-Na	0,015 +/- 0,001	0,13 +/- 0,003	1,2 +/- 1,0	>59

table 13. In vitro activity of reverse hydroxamic acid analogues of this dissertation; ^avalue +/- standard deviation of at least 3 independent measurings. ^breplication of P. falciparum in human erythrocytes. ^ccytotoxicity test with MRC-5 cells.

The scientific findings of this thesis offered the following conclusions for Fosmidomycin's structure activity relationships.

Both free and *N*-methyl-substituted hydroxamic acid functions confer high antiplasmodial *in vitro* activity, while larger substituents like isopropyl lead to loss of activity.

A spacer of three sp³-hybridized carbon atoms between α -Aryl-substituted phosphonic and the reverse hydroxamic acid is essential for antiplasmodial activity. Reverse hydroxamic acid analogues of Fosmidomycin with an aromatic substituent in α -position relative to the phosphonic acid function show a remarkable preference for PfDxr, which is inhibited stronger than EcDxr.

The 3,4-dihalogen- and p-methyl-substitution of the α -phenyl moiety in combination with a reverse hydroxamic acid function result in compounds with potent inhibitory activity against Dxr and remarkable *in vitro* antiplasmodial activity.

Preliminary *in vivo* studies with mice infected with *P. berghei* indicate higher antiplasmodial activity for unsubstituted reverse hydroxamic acids.

10 Literaturverzeichnis

- 1. World Health Organization, "World Malaria Report" **2008**. http://www.who.int/malaria/wmr2008/malaria2008.pdf
- 2. Gallup, J. L.; Sachs, J. D. "The economic burden of malaria". *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2001**, *64*, 85-96.
- 3. The World Bank. "World Bank Booster Programme for Malaria Control in Africa". http://siteresources.worldbank.org/EXTAFRBOOPRO/Resources/MALARIAREPORTfinalLOWRES.pdf
- 4. Mendis, K.; Sina, B. J.; Marchesini, P.; Carter, R. "The neglected burden of Plasmodium vivax malaria". *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2001**, *64*, 97-106.
- 5. Price, R. N.; Tjitra, E.; Guerra, C. A.; Yeung, S.; White, N. J.; Anstey, N. M. "Vivax malaria: neglected and not benign". *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2007**, *77*, 79-87.
- 6. Mayxay, M.; Pukrittayakamee, S.; Newton, P. N.; White, N. J. "Mixed-species malaria infections in humans". *Trends Parasitol.* **2004**, *20*, 233-240.
- 7. Roberts, L.; Enserink, M. Malaria. "Did they really say eradication?" *Science* **2007**, *318*, 1544-1545.
- 8. Katritzky, A. R.; Wang, Z. Q.; Slavov, S.; Tsikolia, M.; Dobchev, D.; Akhmedov, N. G.; Hall, C. D.; Bernier, U. R.; Clark, G. G.; Linthicum, K. J. "Synthesis and bioassay of improved mosquito repellents predicted from chemical structure." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 7359-7364.
- 9. MacKinnon, M. J.; Marsh, K. "The selection landscape of malaria parasites". *Science* **2010**, *328*, 866-871.
- 10. Guinovart, C.; Aponte, J. J.; Sacarlal, J.; Aide, P.; Leach, A.; Bassat, Q.; Macete, E.; Dobano, C.; Lievens, M.; Loucq, C.; Ballou, W. R.; Cohen, J.; Alonso, P. L. "Insights into long-lasting protection induced by RTS,S/AS02A malaria vaccine: further results from a phase IIb trial in Mozambican children". PLoS One 2009, 4, e5165; The RTS,S Clinical Trials Partnership "First results of Phase 3 Trial of RTS,S/AS01 Malaria Vaccine in African Children." N Engl J Med 2011, 10.1056/NEJMoa1102287.
- 11. Kappe, S. H.; Vaughan, A. M.; Boddey, J. A.; Cowman, A. F. "That was then but this is now: malaria research in the time of an eradication agenda". *Science* **2010**, *328*, 862-866.
- 12. Rieckmann, K. H. "The chequered history of malaria control: are new and better tools the ultimate answer?" *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **2006**, *100*, 647-662.

- 13. Winstanley, P. A.; Ward, S. A.; Snow, R. W. "Clinical status and implications of antimalarial drug resistance". *Microbes. Infect.* **2002**, *4*, 157-164.
- 14. Ginsburg, H. "Should chloroquine be laid to rest?" *Acta Trop.* **2005**, *96*, 16-23.
- 15. Pradines, B.; Mamfoumbi, M. M.; Tall, A.; Sokhna, C.; Koeck, J. L.; Fusai, T.; Mosnier, J.; Czarnecki, E.; Spiegel, A.; Trape, J. F.; Kombila, M.; Rogier, C. "In vitro activity of tafenoquine against the asexual blood stages of Plasmodium falciparum isolates from Gabon, Senegal, and Djibouti". *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 3225-3226.
- 16. Wells, T. N.; Alonso, P. L.; Gutteridge, W. E. "New medicines to improve control and contribute to the eradication of malaria". *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 879-891.
- 17. Moon, S.; Casas, C. P.; Kindermans, J. M.; de Smet, M.; von Schoen-Angerer, T. "Focusing on Quality Patient Care in the New Global Subsidy for Malaria Medicines". *Plos Medicine* **2009**, *6*, e1000106.
- 18. Noedl, H.; Se, Y.; Schaecher, K.; Smith, B. L.; Socheat, D.; Fukuda, M. M. "Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia". *N. Engl. J. Med.* **2008**, *359*, 2619-2620.
- Dondorp, A. M.; Nosten, F.; Yi, P.; Das, D.; Phyo, A. P.; Tarning, J.; Lwin, K. M.; Ariey, F.; Hanpithakpong, W.; Lee, S. J.; Ringwald, P.; Silamut, K.; Imwong, M.; Chotivanich, K.; Lim, P.; Herdman, T.; An, S. S.; Yeung, S.; Singhasivanon, P.; Day, N. P.; Lindegardh, N.; Socheat, D.; White, N. J. "Artemisinin resistance in Plasmodium falciparum malaria". *N. Engl. J. Med.* 2009, *361*, 455-467.
- 20. Wongsrichanalai, C.; Pickard, A. L.; Wernsdorfer, W. H.; Meshnick, S. R. "Epidemiology of drug-resistant malaria". *Lancet Infect. Dis.* **2002**, *2*, 209-218.
- 21. Schlitzer, M.; Ortmann, R. Feeding the Antimalarial Pipeline. *ChemMedChem* **2010**, *11*, 1837-1840.
- 22. Schlitzer, M. "Medizinische Chemie der Wirkstoffe gegen Malaria. Wirk- und Resistenzmechanismen". *Pharm. Unserer Zeit* **2009**, *38*, 512-520.
- 23. Medicines for Malaria Venture, http://www.mmv.org
- 24. Olliaro, P.; Wells, T. N. "The global portfolio of new antimalarial medicines under development. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2009**, *85*, 584-595.
- 25. Schlitzer, M. "Wirkstoffe gegen Malaria: Was ist in der Pipeline? Wenig Neues im Kampf gegen die Malaria". *Pharm. Unserer Zeit* **2009**, *38*, 522-526.

- 26. Le Roch, K. G.; Johnson, J. R.; Ahiboh, H.; Chung, D. W.; Prudhomme, J.; Plouffe, D.; Henson, K.; Zhou, Y.; Witola, W.; Yates, J. R.; Mamoun, C. B.; Winzeler, E. A.; Vial, H. "A systematic approach to understand the mechanism of action of the bisthiazolium compound T4 on the human malaria parasite, Plasmodium falciparum". *BMC Genomics* **2008**, *9*, 513.
- 27. Wells, T. N.; Poll, E. M. "When is enough enough? The need for a robust pipeline of high-quality antimalarials". *Discov. Med.* **2010**, *9*, 389-398.
- 28. Mazier, D.; Renia, L.; Snounou, G. "A pre-emptive strike against malaria's stealthy hepatic forms". *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 854-864.
- Gamo, F. J.; Sanz, L. M.; Vidal, J.; de Cozar, C.; Alvarez, E.; Lavandera, J. L.; Vanderwall, D. E.; Green, D. V.; Kumar, V.; Hasan, S.; Brown, J. R.; Peishoff, C. E.; Cardon, L. R.; Garcia-Bustos, J. F. "Thousands of chemical starting points for antimalarial lead identification". *Nature* 2010, 465, 305-310.
- 30. Guiguemde, W. A.; Shelat, A. A.; Bouck, D.; Duffy, S.; Crowther, G. J.; Davis, P. H.; Smithson, D. C.; Connelly, M.; Clark, J.; Zhu, F.; Jimenez-Diaz, M. B.; Martinez, M. S.; Wilson, E. B.; Tripathi, A. K.; Gut, J.; Sharlow, E. R.; Bathurst, I.; El Mazouni, F.; Fowble, J. W.; Forquer, I.; McGinley, P. L.; Castro, S.; Angulo-Barturen, I.; Ferrer, S.; Rosenthal, P. J.; Derisi, J. L.; Sullivan, D. J.; Lazo, J. S.; Roos, D. S.; Riscoe, M. K.; Phillips, M. A.; Rathod, P. K.; Van Voorhis, W. C.; Avery, V. M.; Guy, R. K. "Chemical genetics of Plasmodium falciparum". *Nature* 2010, 465, 311-315.
- 31. Zhu, G.; Marchewka, M. J.; Keithly, J. S. "Cryptosporidium parvum appears to lack a plastid genome". *Microbiology* **2000**, *146* (Pt 2), 315-321.
- 32. Wiesner, J.; Reichenberg, A.; Heinrich, S.; Schlitzer, M.; Jomaa, H. "The plastid-like organelle of apicomplexan parasites as drug target". *Curr. Pharm. Des.* **2008**, *14*, 855-871.
- 33. Goodman, C. D.; Su, V.; McFadden, G. I. "The effects of anti-bacterials on the malaria parasite Plasmodium falciparum". *Mol. Biochem. Parasitol.* **2007**, *152*, 181-191.
- 34. Vaughan, A. M.; O'Neill, M. T.; Tarun, A. S.; Camargo, N.; Phuong, T. M.; Aly, A. S.; Cowman, A. F.; Kappe, S. H. "Type II fatty acid synthesis is essential only for malaria parasite late liver stage development". *Cell Microbiol.* **2009**, *11*, 506-520.
- 35. Pradel, G.; Schlitzer, M. "Antibiotics in malaria therapy and their effect on the parasite apicoplast". *Curr. Mol. Med.* **2010**, *10*, 335-349.
- 36. Lim, L.; McFadden, G. I. "The evolution, metabolism and functions of the apicoplast". *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **2010**, *365*, 749-763.

- 37. Ridley, R. G. "Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs". *Nature* **2002**, *415*, 686-693.
- 38. Ralph, S. A.; D'Ombrain, M. C.; McFadden, G. I. "The apicoplast as an antimalarial drug target". *Drug Resist. Updat.* **2001**, *4*, 145-151.
- 39. Ralph, S. A.; van Dooren, G. G.; Waller, R. F.; Crawford, M. J.; Fraunholz, M. J.; Foth, B. J.; Tonkin, C. J.; Roos, D. S.; McFadden, G. I. "Metabolic maps and functions of the Plasmodium falciparum apicoplast". *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 203-216.
- 40. Bloch, K. "Sterol molecule: structure, biosynthesis, and function". *Steroids* **1992,** *57*, 378-383.
- 41. Rohmer, M.; Knani, M.; Simonin, P.; Sutter, B.; Sahm, H. "Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate". *Biochem. J.* **1993**, *295* (Pt 2), 517-524.
- 42. Eisenreich, W.; Schwarz, M.; Cartayrade, A.; Arigoni, D.; Zenk, M. H.; Bacher, A. "The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms". *Chem. Biol.* **1998**, *5*, R221-233.
- 43. Eberl, M.; Hintz, M.; Reichenberg, A.; Kollas, A. K.; Wiesner, J.; Jomaa, H. "Microbial isoprenoid biosynthesis and human gammadelta T cell activation". *FEBS Lett.* **2003**, *544*, 4-10.
- 44. Eberl, M.; Jomaa, H. "A genetic basis for human gammadelta T-cell reactivity towards microbial pathogens". *Trends Immunol.* **2003**, *24*, 407-409.
- 45. Wilding, E. I.; Brown, J. R.; Bryant, A. P.; Chalker, A. F.; Holmes, D. J.; Ingraham, K. A.; Iordanescu, S.; So, C. Y.; Rosenberg, M.; Gwynn, M. N. "Identification, evolution, and essentiality of the mevalonate pathway for isopentenyl diphosphate biosynthesis in gram-positive cocci". *J. Bacteriol.* 2000, 182, 4319-4327.
- a) Rohdich, F.; Zepeck, F.; Adam, P.; Hecht, S.; Kaiser, J.; Laupitz, R.; Gräwert, T.; Amslinger, S.; Eisenreich, W.; Bacher, A.; Arigoni, D. "The deoxyxylulose phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis: studies on the mechanisms of the reactions catalyzed by IspG and IspH protein". *P.N.A.S. U. S. A.* 2003, 100, 1586-1591; b) Lee, M.; Gräwert, T.; Quitterer, F.; Rohdich, F.; Eppinger, J.; Eisenreich, W.; Bacher, A.; Groll, M. "Biosynthesis of Isoprenoids: Crystal Structure of the [4Fe-4S] Cluster Protein IspG". *J Mol. Biol.* 2010, 404, 600-610. c) Wang, W.; Li, J.; Wang, K.; Huang, C.; Zhang, Y. *et al.* "Organometallic mechanism of action and inhibition of the 4Fe-4S isoprenoid biosynthesis protein GcpE (IspG)". *P.N.A.S. U. S. A.* 2010, 107, 11189-11193; d) Wang, W.; Wang, K.; Liu, YL.; No, JH.; Li, J.; *et al.* "Bioorganometallic mechanism of action, and inhibition, of IspH". *P.N.A.S. U. S. A.* 2010, 107, 4522-4527.

- 47. Testa, C. A.; Brown, M. J. "The methylerythritol phosphate pathway and its significance as a novel drug target". *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2003**, *4*, 248-259.
- 48. Singh, N.; Cheve, G.; Avery, M. A.; McCurdy, C. R. "Targeting the methyl erythritol phosphate (MEP) pathway for novel antimalarial, antibacterial and herbicidal drug discovery: inhibition of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (DXR) enzyme". *Curr. Pharm. Des.* **2007**, *13*, 1161-1177.
- 49. Schwartzbach, S. D.; Osafune, T.; Loffelhardt, W. "Protein import into cyanelles and complex chloroplasts". *Plant Molecular Biology* **1998**, *38*, 247-263.
- 50. Jomaa, H.; Wiesner, J.; Sanderbrand, S.; Altincicek, B.; Weidemeyer, C.; Hintz, M.; Turbachova, I.; Eberl, M.; Zeidler, J.; Lichtenthaler, H. K.; Soldati, D.; Beck, E. "Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs". *Science* **1999**, *285*, 1573-1576.
- 51. El-Sayed, N. M.; Myler, P. J.; Blandin, G.; Berriman, M.; Crabtree, J.; Aggarwal, G.; Caler, E.; Renauld, H.; Worthey, E. A.; Hertz-Fowler, C.; Ghedin, E.; Peacock, C.; Bartholomeu, D. C.; Haas, B. J.; Tran, A. N.; Wortman, J. R.; Alsmark, U. C.; Angiuoli, S.; Anupama, A.; Badger, J.; Bringaud, F.; Cadag, E.; Carlton, J. M.; Cerqueira, G. C.; Creasy, T.; Delcher, A. L.; Djikeng, A.; Embley, T. M.; Hauser, C.; Ivens, A. C.; Kummerfeld, S. K.; Pereira-Leal, J. B.; Nilsson, D.; Peterson, J.; Salzberg, S. L.; Shallom, J.; Silva, J. C.; Sundaram, J.; Westenberger, S.; White, O.; Melville, S. E.; Donelson, J. E.; Andersson, B.; Stuart, K. D.; Hall, N. "Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. Science 2005, 309, 404-409.
- 52. Rodriguez-Concepcion, M. "The MEP pathway: a new target for the development of herbicides, antibiotics and antimalarial drugs". *Curr. Pharm. Des.* **2004**, *10*, 2391-2400.
- 53. Vial, H. J. "Isoprenoid Biosynthesis and drug targeting in the Apicomplexa". *Parasitology today* **2000**, *16*, 140-141.
- 54. Zeidler, J.; Schwender, J.; Mueller, C.; Lichtenthaler, H. K. "The non-mevalonate isoprenoid biosynthesis of plants as a test system for drugs against malaria and pathogenic bacteria". *Biochem. Soc. Trans.* **2000**, *28*, 796-798.
- 55. Matsue, Y.; Mizuno, H.; Tomita, T.; Asami, T.; Nishiyama, M.; Kuzuyama, T. "The herbicide ketoclomazone inhibits 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase in the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway and shows antibacterial activity against Haemophilus influenzae". *J. Antibiot. (Tokyo)* **2010**, *63*, 583-588.

- 56. Wiesner, J.; Jomaa, H. "Isoprenoid biosynthesis of the apicoplast as drug target". *Curr. Drug Targets* **2007**, *8*, 3-13.
- 57. Kuzuyama, T.; Shimizu, T.; Takahashi, S.; Seto, H. "Fosmidomycin, a specific inhibitor of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase in the nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis". *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 7913-7916.
- 58. Hirsch, A. K. H.; Lauw, S.; Gersbach, P.; Schweizer, W. B.; Rohdich, F.; Eisenreich, W.; Bacher, A.; Diederich, F. "Nonphosphate inhibitors of IspE protein, a kinase in the non-mevalonate pathway for isoprenoid biosynthesis and a potential target for antirnalarial therapy". *ChemMedChem* **2007**, *2*, 806-810.
- 59. Crane, C. M.; Kaiser, J.; Ramsden, N. L.; Lauw, S.; Rohdich, F.; Eisenreich, W.; Hunter, W. N.; Bacher, A.; Diederich, F. "Fluorescent inhibitors for IspF, an enzyme in the non-mevalonate pathway for isoprenoid biosynthesis and a potential target for antimalarial therapy". *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, *45*, 1069-1074.
- 60. Baumgartner, C.; Eberle, C.; Diederich, F.; Lauw, S.; Rohdich, F.; Eisenreich, W.; Barber, A. "Structure-based design and synthesis of the first weak non-phosphate inhibitors for IspF, an enzyme in the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis". *Helvetica Chimica Acta* **2007**, *90*, 1043-1068.
- 61. Geist, J. G.; Lauw, S.; Illarionova, V.; Illarionov, B.; Fischer, M.; Grawert, T.; Rohdich, F.; Eisenreich, W.; Kaiser, J.; Groll, M.; Scheurer, C.; Wittlin, S.; Alonso-Gomez, J. L.; Schweizer, W. B.; Bacher, A.; Diederich, F. "Thiazolopyrimidine Inhibitors of 2-Methylerythritol 2,4-Cyclodiphosphate Synthase (IspF) from Mycobacterium tuberculosis and Plasmodium falciparum". *ChemMedChem* **2010**, *5*, 1092-1101.
- 62. Singh, N.; Cheve, G.; Avery, M. A.; McCurdy, C. R. "Targeting the methyl erythritol phosphate (MEP) pathway for novel antimalarial, antibacterial and herbicidal drug discovery: Inhibition of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (DXR) enzyme". *Cur. Pharm. Des.* **2007**, *13*, 1161-1177.
- 63. Cassera, M. B.; Gozzo, F. C.; D'Alexandri, F. L.; Merino, E. F.; del Portillo, H. A.; Peres, V. J.; Almeida, I. C.; Eberlin, M. N.; Wunderlich, G.; Wiesner, J.; Jomaa, H.; Kimura, E. A.; Katzin, A. M. "The methylerythritol phosphate pathway is functionally active in all intraerythrocytic stages of Plasmodium falciparum". *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 51749-51759.
- 64. Koppisch, A. T.; Fox, D. T.; Blagg, B. S.; Poulter, C. D. "E. coli MEP synthase: steady-state kinetic analysis and substrate binding". *Biochemistry* **2002**, *41*, 236-243.

- 65. Jawaid, S.; Seidle, H.; Zhou, W.; Abdirahman, H.; Abadeer, M.; Hix, J. H.; van Hoek, M. L.; Couch, R. D. "Kinetic characterization and phosphoregulation of the Francisella tularensis 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (MEP synthase)". *PLoS One* **2009**, *4*, e8288.
- 66. Argyrou, A.; Blanchard, J. S. "Kinetic and chemical mechanism of Mycobacterium tuberculosis 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate isomeroreductase". *Biochemistry* **2004**, *43*, 4375-4384.
- 67. Altincicek, B.; Hintz, M.; Sanderbrand, S.; Wiesner, J.; Beck, E.; Jomaa, H. "Tools for discovery of inhibitors of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) synthase and DXP reductoisomerase: an approach with enzymes from the pathogenic bacterium Pseudomonas aeruginosa". *FEMS Microbiol. Lett.* **2000**, 190, 329-333.
- 68. Cane, D. E.; Chow, C.; Lillo, A.; Kang, I. "Molecular cloning, expression and characterization of the first three genes in the mevalonate-independent isoprenoid pathway in Streptomyces coelicolor". *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 1467-1477.
- 69. Miller, B.; Heuser, T.; Zimmer, W. "Functional involvement of a deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase gene harboring locus of Synechococcus leopoliensis in isoprenoid biosynthesis". *FEBS Lett.* **2000**, 481, 221-226.
- 70. Yin, X. H.; Proteau, P. J. "Characterization of native and histidine-tagged deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase from the cyanobacterium Synechocystis sp PCC6803". *BBA-Proteins and Proteomics* **2003**, *1652*, 75-81.
- 71. Takenoya, M.; Ohtaki, A.; Noguchi, K.; Endo, K.; Sasaki, Y.; Ohsawa, K.; Yajima, S.; Yohda, M. "Crystal structure of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase from the hyperthermophile Thermotoga maritima for insights into the coordination of conformational changes and an inhibitor binding". *J. Struct. Biol.* **2010**, *170*, 532-539.
- 72. Grolle, S.; Bringer-Meyer, S.; Sahm, H. "Isolation of the Dxr gene of Zymomonas mobilis and characterization of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase". *FEMS Microbiol. Lett.* **2000**, *191*, 131-137.
- 73. Schwender, J.; Müller, C.; Zeidler, J.; Lichtenthaler, H. K. "Cloning and heterologous expression of a cDNA encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase of Arabidopsis thaliana". *FEBS Lett.* **1999**, *455*, 140-144.
- 74. Veau, B.; Courtois, M.; Oudin, A.; Chenieux, J. C.; Rideau, M.; Clastre, M. "Cloning and expression of cDNAs encoding two enzymes of the MEP pathway in Catharanthus roseus". *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1517*, 159-163.

- 75. Rodriguez-Concepcion, M.; Ahumada, I.; Diez-Juez, E.; Sauret-Gueto, S.; Lois, L. M.; Gallego, F.; Carretero-Paulet, L.; Campos, N.; Boronat, A. "1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase and plastid isoprenoid biosynthesis during tomato fruit ripening". *Plant J.* **2001**, *27*, 213-222.
- 76. Lange, B. M.; Croteau, R. "Isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway in plants: cloning and heterologous expression of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from peppermint". *Arch. Biochem. Biophys.* **1999**, *365*, 170-174.
- 77. Hans, J.; Hause, B.; Strack, D.; Walter, M. H. "Cloning, characterization, and immunolocalization of a mycorrhiza-inducible 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase in arbuscule-containing cells of maize". *Plant Physiol.* **2004**, *134*, 614-624.
- 78. Hoeffler, J. F.; Hemmerlin, A.; Grosdemange-Billiard, C.; Bach, T. J.; Rohmer, M. "Isoprenoid biosynthesis in higher plants and in Escherichia coli: on the branching in the methylerythritol phosphate pathway and the independent biosynthesis of isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate". *Biochem J* **2002**, *366*, 573-583.
- 79. Hoeffler, J. F.; Tritsch, D.; Grosdemange-Billiard, C.; Rohmer, M. "Isoprenoid biosynthesis via the methylerythritol phosphate pathway. Mechanistic investigations of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase". *Eur. J. Biochem.* **2002**, 269, 4446-4457.
- 80. Takahashi, S.; Kuzuyama, T.; Watanabe, H.; Seto, H. A "1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis". *P.N.A.S. U. S. A.* **1998**, *95*, 9879-9884.
- 81. Proteau, P. J. "1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase: an overview". *Bioorg. Chem.* **2004**, *32*, 483-493.
- 82. Radykewicz, T.; Rohdich, F.; Wungsintaweekul, J.; Herz, S.; Kis, K.; Eisenreich, W.; Bacher, A.; Zenk, M. H.; Arigoni, D. "Biosynthesis of terpenoids: 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from Escherichia coli is a class B dehydrogenase". *FEBS Lett.* **2000**, *465*, 157-160.
- 83. Wong, U.; Cox, R. J. "The chemical mechanism of D-1-deoxyxylulose-5-phosphate reductoisomerase from Escherichia coli". *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4926-4929.
- 84. Thibodeaux, C. J.; Liu, H. W. "Unraveling the Mechanisms of Isoprenoid Biosynthetic Enzymes: Mechanistic Studies of the Early Stage Enzymes". *Chimia* **2009**, *63*, 334-339.

- 85. Reuter, K.; Sanderbrand, S.; Jomaa, H.; Wiesner, J.; Steinbrecher, I.; Beck, E.; Hintz, M.; Klebe, G.; Stubbs, M. T. "Crystal structure of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase, a crucial enzyme in the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis". *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 5378-5384.
- 86. Yajima, S.; Hara, K.; Sanders, J. M.; Yin, F.; Ohsawa, K.; Wiesner, J.; Jomaa, H.; Oldfield, E. "Crystallographic structures of two bisphosphonate:1-deoxyxylulose-5-phosphate reductoisomerase complexes". *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10824-10825.
- 87. Yajima, S.; Hara, K.; Iino, D.; Sasaki, Y.; Kuzuyama, T.; Ohsawa, K.; Seto, H. "Structure of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase in a quaternary complex with a magnesium ion, NADPH and the antimalarial drug fosmidomycin". *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2007**, *63*, 466-470.
- 88. Steinbacher, S.; Kaiser, J.; Eisenreich, W.; Huber, R.; Bacher, A.; Rohdich, F. "Structural basis of fosmidomycin action revealed by the complex with 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate synthase (IspC) Implications for the catalytic mechanism and anti-malaria drug development". *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 18401-18407.
- 89. Mac Sweeney, A.; Lange, R.; Fernandes, R. P.; Schulz, H.; Dale, G. E.; Douangamath, A.; Proteau, P. J.; Oefner, C. "The crystal structure of E.coli 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase in a ternary complex with the antimalarial compound fosmidomycin and NADPH reveals a tight-binding closed enzyme conformation". *J. Mol. Biol.* **2005**, *345*, 115-127.
- 90. Ricagno, S.; Grolle, S.; Bringer-Meyer, S.; Sahm, H.; Lindqvist, Y.; Schneider, G. "Crystal structure of 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from Zymomonas mobilis at 1.9 Å resolution". *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1698*, 37-44.
- 91. Henriksson, L. M.; Bjorkelid, C.; Mowbray, S. L.; Unge, T. "The 1.9 angstrom resolution structure of Mycobacterium tuberculosis 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, a potential drug target". *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Cryst.* **2006**, *62*, 807-813.
- 92. Henriksson, L. M.; Unge, T.; Carlsson, J.; Aqvist, J.; Mowbray, S. L.; Jones, T. A. "Structures of Mycobacterium tuberculosis 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase provide new insights into catalysis". *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 19905-19916.
- 93. Wiesner, J.; Jomaa, H. "Isoprenoid biosynthesis of the apicoplast as drug target". *Current Drug Targets* **2007**, *8*, 3-13.

- 94. Yajima, S.; Nonaka, T.; Kuzuyama, T.; Seto, H.; Ohsawa, K. "Crystal structure of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase complexed with cofactors: implications of a flexible loop movement upon substrate binding". *J. Biochem.* **2002**, *131*, 313-317.
- 95. Kuzuyama, T.; Takahashi, S.; Takagi, M.; Seto, H. "Characterization of 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, an enzyme involved in i sopentenyl diphosphate biosynthesis, and identification of its catalytic amino acid residues". *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 19928-19932.
- 96. Steinbacher, S.; Kaiser, J.; Eisenreich, W.; Huber, R.; Bacher, A.; Rohdich, F. "Structural basis of fosmidomycin action revealed by the complex with 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate synthase (IspC). Implications for the catalytic mechanism and anti-malaria drug development". *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 18401-18407.
- 97. Mac Sweeney, A.; Lange, R.; Fernandes, R. P. M.; Schulz, H.; Dale, G. E.; Douangamath, A.; Proteau, P. J.; Oefner, C. "The crystal structure of E. coli 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase in a ternary complex with the antimalarial compound fosmidomycin and NADPH reveals a tight-binding closed enzyme conformation". *J. Mol. Biol.* **2005**, *345*, 115-127.
- 98. Englert, N. E.; Richter, C.; Wiesner, J.; Hintz, M.; Jomaa, H.; Schwalbe, H. "NMR Studies of DOXP Reductoisomerase and its Inhibitor Complex". *ChemBioChem* **2011**, *12*, 468-476.
- 99. Buetow, L.; Brown, A. C.; Parish, T.; Hunter, W. N. "The structure of Mycobacteria 2C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphate synthase, an essential enzyme, provides a platform for drug discovery". *BMC Struct. Biol.* **2007**, *7*, 68.
- 100. Brown, A. C.; Parish, T. "Dxr is essential in Mycobacterium tuberculosis and fosmidomycin resistance is due to a lack of uptake". *BMC Microbiol.* **2008**, *8*, 78.
- 101. Eoh, H.; Brown, A. C.; Buetow, L.; Hunter, W. N.; Parish, T.; Kaur, D.; Brennan, P. J.; Crick, D. C. "Characterization of the Mycobacterium tuberculosis 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol synthase: potential for drug development". J. Bacteriol. 2007, 189, 8922-8927.
- 102. Henriksson, L. M.; Unge, T.; Carlsson, J.; Aqvist, J.; Mowbray, S. L.; Jones, T. A. "Structures of Mycobacterium tuberculosis 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase provide new insights into catalysis". *J. Biol. Chem.* 2007, 282, 19905-19916.

- 103. Dhiman, R. K.; Schaeffer, M. L.; Bailey, A. M.; Testa, C. A.; Scherman, H.; Crick, D. C. "1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (IspC) from Mycobacterium tuberculosis: towards understanding mycobacterial resistance to fosmidomycin". *J. Bacteriol.* 2005, 187, 8395-8402.
- 104. Williams, S. L.; Andrew McCammon, J. "Conformational dynamics of the flexible catalytic loop in Mycobacterium tuberculosis 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase". *Chem. Biol. Drug. Des.* **2009**, *73*, 26-38.
- 105. Umeda, T.; Tanaka, N.; Kusakabe, Y.; Nakanishi, M.; Kitade, Y.; Nakamura, K. T. "Crystallization and preliminary X-ray crystallographic study of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase from Plasmodium falciparum". *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Comm.* 2010, 66, 330-332.
- 106. Giessmann, D.; Heidler, P.; Haemers, T.; Van Calenbergh, S.; Reichenberg, A.; Jomaa, H.; Weidemeyer, C.; Sanderbrand, S.; Wiesner, J.; Link, A. "Towards new antimalarial drugs: synthesis of non-hydrolyzable phosphate mimics as feed for a predictive QSAR study on 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase inhibitors". *Chem. Biodivers.* 2008, 5, 643-656.
- 107. Singh, N.; Cheve, G.; Avery, M. A.; McCurdy, C. R. "Comparative protein modeling of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase enzyme from Plasmodium falciparum: A potential target for antimalarial drug discovery". *J. Chem. Inf. Model.* **2006**, *46*, 1360-1370.
- 108. Kaiser, J.; Yassin, M.; Prakash, S.; Safi, N.; Agami, M.; Lauw, S.; Ostrozhenkova, E.; Bacher, A.; Rohdich, F.; Eisenreich, W.; Safi, J.; Golan-Goldhirsh, A. "Anti-malarial drug targets: Screening for inhibitors of 2C-methyl-D-erythritol 4-phosphate synthase (IspC protein) in Mediterranean plants". *Phytomedicine* 2007, 14, 242-249.
- 109. Goble, J. L.; Adendorff, M. R.; de Beer, T. A. P.; Stephens, L. L.; Blatch, G. L. "The Malarial Drug Target Plasmodium falciparum 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase (PfDXR): Development of a 3-D Model for Identification of Novel, Structural and Functional Features and for Inhibitor Screening". *Protein Pept. Lett.* 2010, 17, 109-120.
- 110. Merckle, L.; de Andres-Gomez, A.; Dick, B.; Cox, R. J.; Godfrey, C. R. "A fragment-based approach to understanding inhibition of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase". *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1866-1874.
- 111. Okuhara, M.; Kuroda, Y.; Goto, T.; Okamoto, M.; Terano, H.; Kohsaka, M.; Aoki, H.; Imanaka, H. "Studies on new phosphonic acid antibiotics. III. Isolation and characterization of FR-31564, FR-32863 and FR-33289". *J. Antibiot.* (Tokyo) 1980, 33, 24-28.

- 112. Kamiya, T.; Hemmi, K.; Takeno, H.; Hashimoto, M. "Studies on Phosphonic Acid Antibiotics .1. Structure and Synthesis of 3-(N-Acetyl-N-Hydroxyamino)Propylphosphonic Acid (Fr-900098) and Its N-Formyl Analog (Fr-31564)". *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 95-98.
- 113. Shigi, Y. "Inhibition of bacterial isoprenoid synthesis by fosmidomycin, a phosphonic acid-containing antibiotic". *J. Antimicrob. Chemother.* **1989**, *24*, 131-145.
- 114. Kamuro, Y. K., T.; Kakiuchi, T. US Patent 4846872 **1989**.
- 115. Neu, H. C.; Kamimura, T. "In vitro and in vivo antibacterial activity of FR-31564, a phosphonic acid antimicrobial agent". *Antimicrob. Agents Chemother.* **1981**, *19*, 1013-1023.
- 116. Neu, H. C.; Kamimura, T. "Synergy of fosmidomycin (FR-31564) and other antimicrobial agents". *Antimicrob. Agents Chemother.* **1982**, *22*, 560-563.
- 117. Mine, Y.; Kamimura, T.; Nonoyama, S.; Nishida, M.; Goto, S.; Kuwahara, S. "In vitro and in vivo antibacterial activities of FR-31564, a new phosphonic acid antibiotic". *J. Antibiot. (Tokyo)* **1980**, *33*, 36-43.
- 118. Kuemmerle, H. P.; Murakawa, T.; Sakamoto, H.; Sato, N.; Konishi, T.; De Santis, F. "Fosmidomycin, a new phosphonic acid antibiotic. Part II: 1. Human pharmacokinetics. 2. Preliminary early phase IIa clinical studies". *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* **1985**, *23*, 521-528.
- 119. Murakawa, T.; Sakamoto, H.; Fukada, S.; Konishi, T.; Nishida, M. "Pharmacokinetics of fosmidomycin, a new phosphonic acid antibiotic". *Antimicrob. Agents Chemother.* **1982**, *21*, 224-230.
- 120. Kuemmerle, H. P.; Murakawa, T.; Soneoka, K.; Konishi, T. "Fosmidomycin: a new phosphonic acid antibiotic. Part I: Phase I tolerance studies". *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* **1985**, *23*, 515-520.
- 121. Tsuchiya, T.; Ishibashi, K.; Terakawa, M.; Nishiyama, M.; Itoh, N.; Noguchi, H. "Pharmacokinetics and metabolism of fosmidomycin, a new phosphonic acid, in rats and dogs". *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **1982**, *7*, 59-64.
- 122. Dhiman, R. K.; Schaeffer, M. L.; Bailey, A. M.; Testa, C. A.; Scherman, H.; Crick, D. C. "1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (IspC) from Mycobacterium tuberculosis: towards understanding mycobacterial resistance to fosmidomycin". *J. Bacteriol.* 2005, 187, 8395-8402.
- 123. Sakamoto, Y.; Furukawa, S.; Ogihara, H.; Yamasaki, M. "Fosmidomycin resistance in adenylate cyclase deficient (cya) mutants of Escherichia coli". *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2003**, 67, 2030-3.

- 124. Fujisaki, S.; Ohnuma, S.; Horiuchi, T.; Takahashi, I.; Tsukui, S.; Nishimura, Y.; Nishino, T.; Kitabatake, M.; Inokuchi, H. "Cloning of a gene from Escherichia coli that confers resistance to fosmidomycin as a consequence of amplification". *Gene* **1996**, *175*, 83-87.
- 125. Sangari, F. J.; Perez-Gil, J.; Carretero-Paulet, L.; Garcia-Lobo, J. M.; Rodriguez-Concepcion, M. "A new family of enzymes catalyzing the first committed step of the methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria". *PNAS U.S.A.* **2010**, *107*, 14081-14086.
- 126. Clastre, M.; Goubard, A.; Prel, A.; Mincheva, Z.; Viaud-Massuart, M. C.; Bout, D.; Rideau, M.; Velge-Roussel, F.; Laurent, F. "The methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in coccidia: presence and sensitivity to fosmidomycin". *Exp. Parasitol.* **2007**, *116*, 375-384.
- 127. Moreno, S. N. J.; Li, Z. H. "Targeting the isoprenoid pathway of Toxoplasma gondii". *Expert Opin. Ther. Targets* **2008**, *12*, 253-263.
- 128. Lizundia, R.; Werling, D.; Langsley, G.; Ralph, S. A. "Theileria apicoplast as a target for chemotherapy". *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 1213-1217.
- 129. Fleige, T.; Limenitakis, J.; Soldati-Favre, D. "Apicoplast: keep it or leave it". *Microbes Infect.* **2010**, *12*, 253-262;
- a) Baumeister, S.; Winterberg, M.; Duranton, C.; Huber, S. M.; Lang, F.; Kirk, K.; Lingelbach, K. "Evidence for the involvement of Plasmodium falciparum proteins in the formation of new permeability pathways in the erythrocyte membrane". *Mol. Microbiol.* 2006, 60, 493-504; b) Baumeister, S.; Wiesner, J.; Reichenberg, A.; Hintz, M.; Bietz, S.; Harb, O. S.; Roos, D. S.; Kordes, M.; Friesen, J.; Matuschewski, K.; Lingelbach, K.; Jomaa, H.; Seeber, F. "Fosmidomycin Uptake into *Plasmodium* and *Babesia*-Infected Erythrocytes is Facilitated by Parasite-Induced New Permeability Pathways". *PLoS one* 2011, 6 (5), e19334, 1-12.
- 131. Lell, B.; Ruangweerayut, R.; Wiesner, J.; Missinou, M. A.; Schindler, A.; Baranek, T.; Hintz, M.; Hutchinson, D.; Jomaa, H.; Kremsner, P. G. "Fosmidomycin, a novel chemotherapeutic agent for malaria". *Antimicrob Agents Chemother.* **2003**, *47*, 735-738.
- 132. Wiesner, J.; Henschker, D.; Hutchinson, D. B.; Beck, E.; Jomaa, H. "In vitro and in vivo synergy of fosmidomycin, a novel antimalarial drug, with clindamycin". *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 2889-2894.
- 133. Chaijaroenkul, W.; Pruktal, P.; Muhamad, P.; Na-Bangchang, K. "Assessment of in vitro antimalarial interactions between dihydroartemisinin and fosmidomycin". *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* **2007**, *38*, 791-795.

- 134. Borrmann, S.; Adegnika, A. A.; Matsiegui, P. B.; Issifou, S.; Schindler, A.; Mawili-Mboumba, D. P.; Baranek, T.; Wiesner, J.; Jomaa, H.; Kremsner, P. G. "Fosmidomycin-clindamycin for Plasmodium falciparum Infections in African children". *J. Infect. Dis.* 2004, 189, 901-908.
- 135. Borrmann, S.; Issifou, S.; Esser, G.; Adegnika, A. A.; Ramharter, M.; Matsiegui, P. B.; Oyakhirome, S.; Mawili-Mboumba, D. P.; Missinou, M. A.; Kun, J. F.; Jomaa, H.; Kremsner, P. G. "Fosmidomycin-clindamycin for the treatment of Plasmodium falciparum malaria". *J. Infect. Dis.* 2004, 190, 1534-1540.
- 136. Borrmann, S.; Lundgren, I.; Oyakhirome, S.; Impouma, B.; Matsiegui, P. B.; Adegnika, A. A.; Issifou, S.; Kun, J. F.; Hutchinson, D.; Wiesner, J.; Jomaa, H.; Kremsner, P. G. "Fosmidomycin plus clindamycin for treatment of pediatric patients aged 1 to 14 years with Plasmodium falciparum malaria". *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 2713-2718.
- 137. Borrmann, S.; Adegnika, A. A.; Moussavou, F.; Oyakhirome, S.; Esser, G.; Matsiegui, P. B.; Ramharter, M.; Lundgren, I.; Kombila, M.; Issifou, S.; Hutchinson, D.; Wiesner, J.; Jomaa, H.; Kremsner, P. G. "Short-course regimens of artesunate-fosmidomycin in treatment of uncomplicated Plasmodium falciparum malaria". *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005, 49, 3749-3754.
- 138. Hemmi, K.; Takeno, H.; Hashimoto, M.; Kamiya, T. "Studies on phosphonic acid antibiotics. IV. Synthesis and antibacterial activity of analogs of 3-(N-acetyl-N-hydroxyamino)-propylphosphonic acid (FR-900098)". *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1982**, *30*, 111-118.
- 139. Perruchon, J.; Ortmann, R.; Altenkamper, M.; Silber, K.; Wiesner, J.; Jomaa, H.; Klebe, G.; Schlitzer, M. "Studies addressing the importance of charge in the binding of fosmidomycin-like molecules to deoxyxylulosephosphate reductoisomerase". *ChemMedChem* **2008**, *3*, 1232-1241.
- Zingle, C.; Kuntz, L.; Tritsch, D.; Grosdemange-Billiard, C.; Rohmer, M. 140. "Isoprenoid Biosynthesis via the Methylerythritol Phosphate Pathway: Structural Variations around Phosphonate Anchor and Spacer Fosmidomycin, Potent Inhibitor Deoxyxylulose Phosphate а of Reductoisomerase". J. Org. Chem. 2010, 75, 3203-3207.
- 141. Kurz, T.; Geffken, D.; Wackendorff, C. "Carboxylic acid analogues of fosmidomycin". *Z. Naturforsch. Sect. B* **2003**, *58*, 457-461.
- 142. Woo, Y. H.; Fernandes, R. P. M.; Proteau, P. J. "Evaluation of fosmidomycin analogs as inhibitors of the Synechocystis sp PCC6803 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase". *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 2375-2385.

- 143. Woo, Y. H.; Fernandes, R. P.; Proteau, P. J. "Evaluation of fosmidomycin analogs as inhibitors of the Synechocystis sp. PCC6803 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase". *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 2375-2385.
- 144. Hirsch, A. K.; Fischer, F. R.; Diederich, F. "Phosphate recognition in structural biology". *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2007**, *46*, 338-352.
- 145. Erion, S. J. H. a. M. D. "Prodrugs of Phosphates and Phosphonates". *J. Med. Chem.* **2007**, *51*, 2328-2345.
- 146. Ortmann, R.; Wiesner, J.; Reichenberg, A.; Henschker, D.; Beck, E.; Jomaa, H.; Schlitzer, M. "Alkoxycarbonyloxyethyl ester prodrugs of FR900098 with improved in vivo antimalarial activity". *Arch. Pharm. (Weinheim)* **2005**, *338*, 305-314.
- 147. Ortmann, R.; Wiesner, J.; Reichenberg, A.; Henschker, D.; Beck, E.; Jomaa, H.; Schlitzer, M. "Acyloxyalkyl ester prodrugs of FR900098 with improved in vivo anti-malarial activity". *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 2163-2166.
- 148. Brass, E. P. "Pivalate-generating prodrugs and carnitine homeostasis in man". *Pharmacol. Rev.* **2002**, *54*, 589-598.
- 149. Wiesner, J.; Ortmann, R.; Jomaa, H.; Schlitzer, M. "Double ester prodrugs of FR900098 display enhanced in-vitro antimalarial activity". *Arch. Pharm.* (Weinheim) **2007**, *340*, 667-669.
- 150. Fox, D. T.; Poulter, C. D. "Mechanistic studies with 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate synthase from Escherichia coli". *Biochemistry* **2005**, *44*, 8360-8368.
- 151. Fox, D. T.; Poulter, C. D. "Synthesis and evaluation of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphoric acid analogues as alternate substrates for methylerythritol phosphate synthase". *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 1978-1985.
- 152. Proteau, P. J.; Woo, Y. H.; Williamson, R. T.; Phaosiri, C. "Stereochemistry of the reduction step mediated by recombinant 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate isomeroreductase". *Org. Lett.* **1999**, *1*, 921-923.
- 153. Atadja, P. W. "HDAC inhibitors and cancer therapy". *Prog. Drug Res.* **2011**, *67*, 175-195.
- 154. Phaosiri, C.; Proteau, P. J. "Substrate analogs for the investigation of deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase inhibition: synthesis and evaluation". *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 5309-5312.

- 155. Meyer, O.; Grosdemange-Billiard, C.; Tritsch, D.; Rohmer, M. "Isoprenoid biosynthesis via the MEP pathway. Synthesis of (3,4)-3,4-dihydroxy-5-oxohexylphosphonic acid, an isosteric analogue of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate, the substrate of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reducto-isomerase". *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 4367-4372.
- 156. Klebe, G. *Wirkstoffdesign*. 2nd ed.; Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, **2009**.
- 157. Kaula, U. "Synthese und Antimalaria-Aktivität von Fosmidomycin-Derivaten". Dissertationsschrift; Universität Hamburg, **2005**.
- 158. Kurz, T.; Schlüter, K.; Pein, M.; Behrendt, C.; Bergmann, B.; Walter, R. D. "Conformationally restrained aromatic analogues of fosmidomycin and FR900098". *Arch. Pharm. (Weinheim)* **2007**, *340*, 339-344.
- 159. Kurz, T. "Von der Synthese und Reaktivität 4-funktionalisierter Oxazolidin-2-one, Imidazolidin-2-one und anellierter 4-Hydroxyimino-oxazin-2-one zur Strukturmodifikation des Antibiotikums Fosmidomycin". Habilitationsschrift, Universität Hamburg, **2006**.
- 160. Devreux, V.; Wiesner, J.; Goeman, J. L.; Van der Eycken, J.; Jomaa, H.; Van Calenbergh, S. "Synthesis and biological evaluation of cyclopropyl analogues of fosmidomycin as potent Plasmodium falciparum growth inhibitors". *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 2656-2660.
- 161. Kurz, T.; Behrendt, C.; Pein, M.; Kaula, U.; Bergmann, B.; Walter, R. D. "Gamma-Substituted bis(pivaloyloxymethyl)ester analogues of fosmidomycin and FR900098". *Arch. Pharm. (Weinheim)* **2007**, *340*, 661-666.
- 162. Silber, K.; Heidler, P.; Kurz, T.; Klebe, G. "AFMoC enhances predictivity of 3D QSAR: a case study with DOXP-reductoisomerase". *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 3547-3563.
- 163. Nieschalk, J.; Batsanov, A. S.; O´Hagan, D.; Howard, J. A. K. "Synthesis of monofluoro- and difluoro- methylenephosphonate analogues of sn-glycerol-3-phosphate as substrates for glycerol-3-phosphate dehydrogenase and the X-ray structure of the fluoromethylenephosphonate moiety". *Tetrahedron* 1996, 52, 165-176.
- 164. Verbrugghen, T.; Cos, P.; Maes, L.; Van Calenbergh, S. "Synthesis and Evaluation of alpha-Halogenated Analogues of 3-(Acetylhydroxyamino)-propylphosphonic Acid (FR900098) as Antimalarials". *J. Med. Chem.* **2010**, *75*, 3203-3207.

- 165. a) Haemers, T.; Wiesner, J.; Van Poecke, S.; Goeman, J.; Henschker, D.; Beck, E.; Jomaa, H.; Van Calenbergh, S. "Synthesis of alpha-substituted fosmidomycin analogues as highly potent Plasmodium falciparum growth inhibitors". *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006, 16, 1888-1891. b) Devreux, V.; Wiesner, J.; Jomaa, H.; Rozenski, J.; Van der Eycken, J.; Van Calenbergh, S. "Divergent Strategy for the Synthesis of alpha-Aryl-Substituted Fosmidomycin Analogues". *J. Org. Chem.* 2007, 72, 3783-3789.
- 166. Kurz, T.; Schlüter, K.; Kaula, U.; Bergmann, B.; Walter, R. D.; Geffken, D. "Synthesis and antimalarial activity of chain substituted pivaloyloxymethyl ester analogues of Fosmidomycin and FR900098". *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 5121-5135.
- 167. Schlüter, K.; Walter, R. D.; Bergmann, B.; Kurz, T. "Arylmethyl substituted derivatives of Fosmidomycin: Synthesis and antimalarial activity". *Eur. J. Med. Chem.* **2006**, *41*, 1385-1397.
- 168. Haemers, T.; Wiesner, J.; Busson, R.; Jomaa, H.; Van Calenbergh, S. "Synthesis of alpha-aryl-substituted and conformationally restricted fosmidomycin analogues as promising antimalarials". *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, *17*, 3856-3863.
- 169. a) Deng, L. E., K.; Kato, M.; Cheng, G.; Yajima, S.; Song, Y. "Structures of 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase/Lipophilic Phosphonat Complexes". *Med. Chem. Lett.* 2011, 2, 165-170. b) Deng, L.; Sundriyal, S.; Rubio, V.; Shi, Z.-z.; Song, Y. "Coordination Chemistry Based Approach to Lipophilic Inhibitors of 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate Reductoisomerase". *ACS J. Med. Chem. Lett.* 2009, *52*, 6539-6542.
- 170. Haemers, T.; Wiesner, J.; Giessmann, D.; Verbrugghen, T.; Hillaert, U.; Ortmann, R.; Jomaa, H.; Link, A.; Schlitzer, M.; Van Calenbergh, S. "Synthesis of beta- and gamma-oxa isosteres of fosmidomycin and FR900098 as antimalarial candidates". *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 3361-3371.
- 171. Kurz, T.; Geffken, D.; Wackendorff, C. "Hydroxyurea analogues of fosmidomycin". *Z. Naturforsch. Sect. B* **2003**, *58*, 106-110.
- 172. Courtois, M.; Mincheva, Z.; Andreu, F.; Rideau, M.; Viaud-Massuard, M. C. "Synthesis and biological evaluation with plant cells of new fosmidomycin analogues containing a benzoxazolone or oxazolopyridinone ring". *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2004**, *19*, 559-565.
- 173. Deng, L. S.; Sundriyal, S.; Rubio, V.; Shi, Z. Z.; Song, Y. C. "Coordination Chemistry Based Approach to Lipophilic Inhibitors of 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate Reductoisomerase". *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 6539-6542.

- 174. Ortmann, R.; Wiesner, J.; Silber, K.; Klebe, G.; Jomaa, H.; Schlitzer, M. "Novel deoxyxylulosephosphate-reductoisomerase inhibitors: fosmidomycin derivatives with spacious acyl residues". *Arch. Pharm. (Weinheim)* **2007**, *340*, 483-490.
- 175. Kuntz, L.; Tritsch, D.; Grosdemange-Billiard, C.; Hemmerlin, A.; Willem, A.; Bach, T. J.; Rohmer, M. "Isoprenoid biosynthesis as a target for antibacterial and antiparasitic drugs: phosphonohydroxamic acids as inhibitors of deoxyxylulose phosphate reducto-isomerase". *Biochem. J.* **2005**, *386*, 127-135.
- 176. Walker, J. R.; Poulter, C. D. "Synthesis and evaluation of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate analogues as chelation-based inhibitors of methylerythritol phosphate synthase". *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 9955-9959.
- 177. Wong, A.; Munos, J. W.; Devasthali, V.; Johnson, K. A.; Liu, H. W. "Study of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase: Synthesis and evaluation of fluorinated substrate analogues". *Org. Lett.* **2004**, *6*, 3625-3628.
- 178. Jacobsen, F. E.; Lewis, J. A.; Cohen, S. M. "The design of inhibitors for medicinally relevant metalloproteins". *ChemMedChem* **2007**, *2*, 152-171.
- 179. Coussens, L. M.; Fingleton, B.; Matrisian, L. M. "Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations". *Science* **2002**, *295*, 2387-2392.
- 180. Flipo, M.; Charton, J.; Hocine, A.; Dassonneville, S.; Deprez, B.; Deprez-Poulain, R. "Hydroxamates: Relationships between Structure and Plasma Stability". *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 6790-6802.
- 181. Puerta, D. T.; Cohen, S. M. "A bioinorganic perspective on matrix metalloproteinase inhibition". *Curr. Top. Med. Chem.* **2004**, *4*, 1551-1573.
- 182. Vugts, D. J.; Koningstein, M. M.; Schmitz, R. F.; de Kanter, F. J.; Groen, M. B.; Orru, R. V. "Multicomponent synthesis of dihydropyrimidines and thiazines". *Chemistry* **2006**, *12*, 7178-7189.
- 183. Kurz, T.; Schlüter, K.; Kaula, U.; Bergmann, B.; Walter, R. D.; Geffken, D. "Synthesis and antimalarial activity of chain substituted pivaloyloxymethyl ester analogues of Fosmidomycin and FR900098". *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 5121-35.
- 184. a) McKenna, C. E.; Higa, M. T.; Cheung, N. H.; Mckenna, M. C. "Facile Dealkylation of Phosphonic Acid Dialkyl Esters by Bromotrimethylsilane". *Tetrahedron Lett.* 1977, 18, 155-158; b) Kumar, G. D. K.; Saenz, D.; Lokesh, G.L.; Natarajan, A. "Microwave-assisted cleavage of phosphate, phosphonate and phosphoramide esters". *Tetrahedron Lett.* 2006, 47, 6281-6284. c) Conibear, A. C.; Lobb, K. A.; Kaye, P. T. "³¹P NMR kinetic study

- of the tandem cleavage of phosphonate esters by bromotrimethylsilane". *Tetrahedron* **2010**, *66*, 8446-8449.
- 185. Elhaddadi, M.; Jacquier, R.; Gastal, F.; Petrus, C.; Petrus, F. "A Convenient Synthesis of Alkyl and Dialkyl 1-Benzyloxyamino Alkyl Phosphonates and Phosphinates". *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.* **1990**, *54*, 143-150.
- 186. Mathias, L. J. "Esterification and Alkylation Reactions Employing Isoureas". *Synthesis* **1979**, 561-576.
- 187. Harvey, R. G. "Reactions of Triethyl Phosphite with Activated Olefins". *Tetrahedron* **1966**, *22*, 2561-2573.
- 188. Brzaszcz, M.; Kloc, K.; Maposah, M.; Mlochowski, J. "Selenium(IV) oxide catalyzed oxidation of aldehydes to carboxylic acids with hydrogen peroxide". *Synth. Commun.* **2000**, *30*, 4425-4434.
- 189. Krasavin, M.; Shkavrov, S.; Kravchenko, D. "Preparation and chemical behavior of 2-(tert-butoxycarbonyl)amino-3-bromomethyl pyridine, a novel alkylating agent". *Synth. Commun.* **2006**, *36*, 181-186.
- 190. Lima, L. M.; Barreiro, E. J. "Bioisosterism: a useful strategy for molecular modification and drug design". *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 23-49.
- 191. Smith, H. K.; Beckett, R. P.; Clements, J. M.; Doel, S.; East, S. P.; Launchbury, S. B.; Pratt, L. M.; Spavold, Z. M.; Thomas, W.; Todd, R. S.; Whittaker, M. "Structure-activity relationships of the peptide deformylase inhibitor BB-3497: modification of the metal binding group". *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2002, *12*, 3595-3599.
- 192. Yang, K.; Lou, B. "Molecular diversity of hydroxamic acids: part I. Solutionand solid-phase synthesis". *Mini Rev. Med. Chem.* **2003**, *3*, 349-360.
- 193. Staab, H. A. "Synthesen mit heterocyclischen Amiden (Azoliden)". *Angew. Chem. Int. Ed.* **1962**, 351-367.
- 194. Gabriel, S. "Zur Kenntnis des Homo-*o*-phthalimids". *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **1887**, *20*, 1198-1205.
- 195. Wild, J., Goetz, N., Will, W., Kohler, R.-D., Plath, P. "Process for preparing Osubstituted hydroxylamines". DE 3615473 A1, **1988**.
- 196. Ramasamy, K., Olsen, R. K., Emery, T. "*N*-Methylation of *O*-benzyl-alpha-*N*-(alkoxycarbonyl)-alpha-amino acid hydroxamate derivatives" *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 5438-5441.
- 197. Massaro, A.; Mordini, A.; Reginato, G.; Russo, F.; Taddei, M. "Microwave-assisted transformation of esters into hydroxamic acids". *Synthesis* **2007**, *20*, 3201-3204.

- 198. a) Durham, T. B.; Miller, M. J. "An enantioselective synthesis of differentially protected erythro-alpha, beta-diamino acids and its application to the synthesis of an analogue of rhodopeptin B5". *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 35-42; b) Gissot, A.; Volonterio, A.; Zanda, M. "One-step synthesis of O-benzyl hydroxamates from unactivated aliphatic and aromatic esters". *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 6925-6928.
- 199. Brown, D. A.; Glass, W. K.; Mageswaran, R.; Mohammed, S. A. "H-1 and C-13 NMR-Studies of Isomerism in Hydroxamic Acids". *Magn. Reson. Chem.* **1991**, *29*, 40-45.
- 200. Brown, D. A.; Glass, W. K.; Mageswaran, R.; Girmay, B. "Cis-Trans Isomerism in Monoalkylhydroxamic Acids by H-1, C-13 and N-15 NMR-Spectroscopy". *Magn. Reson. Chem.* **1988**, *26*, 970-973.
- 201. Fitzpatrick, N. J.; Mageswaran, R. "Theoretical-Study of Hydroxamic Acids". *Polyhedron* **1989**, *8*, 2255-2263.
- 202. Kuzmic, P. "Program DYNAFIT for the analysis of enzyme kinetic data: Application to HIV proteinase". *Analyt. Biochem.* **1996**, *237*, 260-273.
- 203. Matveeva, E. V.; Odinets, I. L.; Kozlov, V. A.; Shaplov, A. S.; Mastryukova, T. A. "Ionic-liquid-promoted Michaelis-Arbuzov rearrangement". *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 7645-7648.
- 204. Lion, C. J.; Matthews, C. S.; Stevens, M. F. G.; Westwell, A. D. "Synthesis, antitumor evaluation, and apoptosis-inducing activity of hydroxylated (E)-stilbenes". *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1292-1295.
- 205. Lion, C. J.; Vasselin, D. A.; Schwalbe, C. H.; Matthews, C. S.; Stevens, M. F. G.; Westwell, A. D. "Novel reaction products from the hypervalent iodine oxidation of hydroxylated stilbenes and isoflavones". *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 3996-4001.
- 206. Schlüter, K. "Prodrugs von Fosmidomycin-Derivaten". Dissertation Universität Hamburg **2006**.
- 207. Ernst, L. "C-13 Nmr-Spectroscopy of Diethyl Alkyl-Phosphonates and Benzyl-Phosphonates Study of Phosphorus-Carbon Spin-Spin Coupling-Constants over One to 7 Bonds". *Org. Magn. Reson.* **1977**, *9*, 35-43.
- 208. Bauer, L.; Exner, O. "Chemistry of Hydroxamic Acids and N-Hydroxyimides". *Angew. Chem. Int. Ed.* **1974**, *13*, 376-384.
- 209. Hang, J. Q.; Rajendran, S.; Yang, Y. L.; Li, Y.; In, P. W. K.; Overton, H.; Parkes, K. E. B.; Cammack, N.; Martin, J. A.; Klumpp, K. "Activity of the isolated HIV RNase H domain and specific inhibition by N-hydroxyimides". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004, *317*, 321-329.

- 210. Sun, W.; Pertzev, A.; Nicholson, A. W. "Catalytic mechanism of Escherichia coli ribonuclease III: kinetic and inhibitor evidence for the involvement of two magnesium ions in RNA phosphodiester hydrolysis". *Nucleic Acids Research* **2005,** *33*, 807-815.
- 211. Klumpp, K.; Hang, J. Q.; Rajendran, S.; Yang, Y. L.; Derosier, A.; In, P. W. K.; Overton, H.; Parkes, K. E. B.; Cammack, N.; Martin, J. A. "Two-metal ion mechanism of RNA cleavage by HIV RNase H and mechanism-based design of selective HIV RNase H inhibitors". *Nucleic Acids Res.* 2003, *31*, 6852-6859.
- 212. Tang, J.; Maddali, K.; Dreis, C. D.; Sham, Y. Y.; Vince, R.; Pommier, Y.; Wang, Z. "*N*-3 Hydroxylation of Pyrimidine-2,4-diones yields dual inhibitors of HIV Reverse Transcriptase and Integrase". *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, *2*(1), 63-67.
- 213. Grobler, J. A.; Stillmock, K.; Hu, B. H.; Witmer, M.; Felock, P.; Espeseth, A. S.; Wolfe, A.; Egbertson, M.; Bourgeois, M.; Melamed, J.; Wai, J. S.; Young, S.; Vacca, J.; Hazuda, D. J. "Diketo acid inhibitor mechanism and HIV-1 integrase: Implications for metal binding in the active site of phosphotransferase enzymes". PNAS U.S.A. 2002, 99, 6661-6666.
- 214. Cherest, M.; Lusinchi, X. A Novel "Electrophilic *N*-Amidation Via Electron Deficient Complexes Action of Ferric-Chloride on *N*-Acetyloxyamides". *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 715-718.
- 215. Dardonville, C.; Rinaldi, E.; Barrett, M. P.; Brun, R.; Gilbert, I. H.; Hanau, S. "Selective inhibition of Trypanosoma brucei 6-phosphogluconate dehydrogenase by high-energy intermediate and transition-state analogues". *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 3427-3437.
- 216. Fields, E. K. "The Synthesis of Esters of Substituted Amino Phosphonic Acids1a". *J. Amer. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 1528-1531.
- 217. Reichenberg, A.; Wiesner, J.; Weidemeyer, C.; Dreiseidler, E.; Sanderbrand, S.; Altincicek, B.; Beck, E.; Schlitzer, M.; Jomaa, H. "Diaryl ester prodrugs of FR900098 with improved in vivo antimalarial activity". *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 833-835.
- 218. Kaplan, E. L.; Meier, P. "Nonparametric-Estimation from Incomplete Observations". *J. Amer. Stat. Ass.* **1958**, *53*, 457-481.
- 219. a) Behrendt, C. T., Kunfermann, A., Illarionova, V., Matheeussen, A., Gräwert, T., Groll, M., Rohdich, F., Bacher, A., Eisenreich, W., Fischer, M., Maes, L., Kurz, T. "Synthesis and Antiplasmodial Activity of Highly Active Reverse Analogues of the Antimalarial Drug Candidate Fosmidmycin." *ChemMedChem* 2010, 5, 1673-1676; b) Behrendt, C. T., Kunfermann, A., Illarionova, Matheeussen, A., Pein, M. K., Gräwert, T., Bacher, A., Eisenreich, W.,

- Illarionov, B., Fischer, M., Maes, L., Groll, M., Kurz, T. "Reverse Fosmidomycin Derivatives against the Antimalarial Drug Target IspC (Dxr)" *J. Med. Chem.* **2011**, *54*(*19*), 6796-6802.
- 220. Kurz, T.; Geffken, D.; Kaula, U. (BioAgency AG), DE 10356410 and WO 2005048715, **2005**.
- 221. Hecht, S.; Wungsintaweekul, J.; Rohdich, F.; Kis, K.; Radykewicz, T.; Schuhr, C. A.; Eisenreich, W.; Richter, G.; Bacher, A. "Biosynthesis of terpenoids: Efficient multistep biotransformation procedures affording isotope-labeled 2C-methyl-D-erythritol 4-phosphate using recombinant 2C-methyl-D-erythritol 4-phosphate synthase". J. Org. Chem. 2001, 66, 7770-7775.
- 222. Cos, P.; Vlietinck, A. J.; Berghe, D. V.; Maes, L. "Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'". *J. Ethnopharmacol.* **2006**, *106*, 290-302.
- 223. Moore, G. E.; Gerner, R. E.; Franklin, H. A. "Culture of normal human leukocytes. *JAMA* **1967**, *199*, 519-524.
- 224. Makler, M. T.; Ries, J. M.; Williams, J. A.; Bancroft, J. E.; Piper, R. C.; Gibbins, B. L.; Hinrichs, D. J. "Parasite lactate dehydrogenase as an assay for Plasmodium falciparum drug sensitivity". *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1993**, *48*, 739-741.
- 225. Storhoff, D. T., D. "Stabilisierung von Tetrazoliumsalzen in einem Reagenz". DE 69327242 T2, **1994**.
- 226. Pein, M. "Synthese und antiparasitäre Eigenschaften von *N*-(Benzyloxy)-*N*′-(3-hydroxypyridin-2-yl)harnstoffen". Dissertationsschrift Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, **2008**.
- 227. Umeda, T.; Tanaka, N.; Kusakabe, Y.; Nakasnishi, M.; Kitade, Y.; Nakamura, K. T. "Molecular basis of fosmidomycin's action on the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Nature Scientific Reports* **2011**, *1* , doi:10.1038/srep00009
- 228. Yeh, E.; DeRisi, J. L. "Chemical Rescue of Malaria Parasites Lackingan Apicoplast Defines Organelle Function in Blood-Stage Plasmodium falciparum. *PLoS Biology* **2011**, volume 9, *8*, e1001138.

11 Anhang

11.1 Gefahrenmerkmale und Sicherheitsratschläge

Nachfolgend sind für die wichtigsten in dieser Arbeit verwendeten Reagenzien und Lösungsmittel Gefahrensymbole und Sicherheitsratschläge nach Anhang I der Richtlinie 67/548/EWG aufgeführt.

Es bleibt zu beachten, dass für die meisten im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen keine Daten im Sinne des Chemikaliengesetzes über die toxikologischen Eigenschaften vorliegen. Weil es nicht auszuschließen ist, dass ein Gefahrenpotential von ihnen ausgeht, sind sie mit der für gefährliche Chemikalien üblichen Vorsicht zu handhaben.

Lösungsmittel	Gefahrensymbole	Sicherheitsratschläge
Aceton	F, X _i	9-16-26
Acetonitril	F, X _n	16-36/37
Benzen	F, T	53-45
Diethylether	F+, X _n	12-19-22-66-67
Dichlormethan	X_n	23-24/25-36/37
N,N-Dimethylformamid	Т	53-45
Dimethylsulfoxid-d6	X_{i}	36/37/38
Éthanol	F	7-16
Ethylacetat	F, X _i	16-26-33
n-Hexan	F, X _n , N	9-16-29-33-36/37-61-62
Methanol	F, T	7-16-36/37-45
Propan-2-ol	F, X _i	7-16-24/25-26
Tetrahydrofuran	F, X _i	16-29-33
Toluen	F, X _n	16-25-29-33
Trichlormethan	X _n	36/37

Tabelle 11. Gefahrensymbole und Sicherheitsratschläge der verwendeten Lösungsmittel

Reagenz	Gefahrensymbol	Sicherheitsratschläge
Alpha-Bromtoluol	X_{i}	39
Ammoniumchlorid		
Benzylalkohol	X_n	22
2-(2-Bromoethyl)-1,3-dioxolan	X_n	26
Bromotrimethylsilan	X_i	26-37
n-Butyllithium	С	8-16-26-36/37/39-45
(1.6M in n-Hexan)		
Calciumhydrid	F, C, N	7/8-16-26-36/37/39-45-61
1,1´-Carbonyldiimidazol	F	7/8-24/25-43
3,4-Chlorbenzylchlorid	С	26-36/37/39-45
Chloromethylpivalat	С	26-36/37/39-45
1,2-Dibromethan	С	16-26-36/37/39-45
Dicyclohexancarbodiimid	T, N	53-45-61
Di- <i>tert</i> -butyl-dicarbonat	Т	24-26-37/39-45
Eisen(III)chlorid	F, T+	7-26-28A-33-36/37/39-45
Essigsäureanhydrid	С	26-27-36/37/38
Ethylchlorformiat	С	26-36/37/39-45
3,4-Fluor-benzylbromid	С	8-20-23-26-30-36/37/39-45

V/ NI	00.00.00/07/00.04
***	22-26-36/37/39-61
X_n	23-26-36/37/39-45
Т	36/37-38-45
X_n	26-37/39
F, X _n	9-16-23-26-33-36/37/39
F, T+, N	16-26-28-36/37/39-45-60
С	26-36/37/39-45
F	7/8-24/25-43
С	Keine
Т	26-36/37/39-45
F, X _n	26-28
С	26-45
T, N	20/21-28-45-60-61
С	26-30-45
X_{i}	24-37-61
С	9-26-27-28-45-61
F+	9-16-33
O, C	3-28-36/39-45
	F, X _n F, T+, N C F C T F, X _n C T, N C X _i C F+

Tabelle 14. Gefahrensymbole und Sicherheitsratschläge der verwendeten Reagenzien

11.2 Lebenslauf

Christoph Timon Behrendt

geboren 25.04.1981

in Hamburg

1987-1991	Grundschule Am Weiher, Hamburg	
1991-1996	Helene-Lange-Gymnasium, Hamburg	
1996-2000	Freiherr-vom-Stein-Gymnasium, Oldenburg/Holstein	
Sommer 2000	Allgemeine Hochschulreife - Abitur	
Herbst 2000 - Sommer 2001	Zivildienst bei der Vereinigung Pestalozzi, Hamburg	
Oktober 2001 - April 2006	Grund- und Hauptstudium der Pharmazie am Institut der Pharmazie, Universität Hamburg	
dazwischen:		
April-Juli 2004	Forschungsaufenthalt in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Anthony Manning im University College Dublin, Irland	
Mai 2006 - November 2006	Pharmaziepraktikum in der Sonnen-Apotheke Duvenstedt, Hamburg	
November 2006 - Mai 2007	Pharmaziepraktikum in der Abteilung Pharmazeutische Chemie am Institut der Pharmazie an der Universität Hamburg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas Kurz	
Juni 2007	Dritter und letzter Prüfungsabschnitt der Pharmazeutischen Prüfung gemäß der Approbationsordnung für Apotheker;	
	Approbation zum Apotheker	
Juni 2007 - September 2007	Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung Pharmazeutische Chemie am Institut für Pharmazie an der Universität Hamburg	
	Anfertigung einer Dissertation in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Thomas Kurz	
Oktober 2007 - März 2011	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf	
	Anfertigung einer Dissertation in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Thomas Kurz	
30.6.2011	Kauf der Sonnen-Apotheke Duvenstedt in Hamburg	