

**Synthese und biologische Evaluation von inversen
 α -substituierten, β -oxa-isosteren Fosmidomycin-
Analoga und Derivaten mit Benzamid-Teilstruktur**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Karin Brücher
aus Essen

Düsseldorf, Mai 2012

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
Korreferent: Prof. Dr. Holger Gohlke

Tag der mündlichen Prüfung: 25.06.2012

MEINER FAMILIE

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von April 2008 bis Mai 2012 am Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Kurz.

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Thomas Kurz, für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die Überlassung des interessanten Promotionsthemas und das mir damit entgegengebrachte Vertrauen sowie für seine wertvollen Anregungen und seine große Hilfs- und Diskussionsbereitschaft herzlich danken.

Bei Herrn Prof. Dr. Holger Gohlke bedanke ich mich herzlich für die Übernahme des Korreferats.

Für die Durchführung der biologischen Untersuchungen danke ich dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Markus Fischer an der Universität Hamburg, den Arbeitskreisen von Herrn Prof. Dr. Wolfgang Eisenreich und Herrn Prof. Dr. Michael Groll an der Technischen Universität München, dem Arbeitskreis von Dr. Benjamin Mordmüller an der Eberhard Karls Universität Tübingen und dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Louis Maes an der Universität Antwerpen. Mein Dank gilt dabei sowohl den Arbeitsgruppenleitern für die Ermöglichung der Kooperation als auch besonders Herrn Dr. Boris Illarionov, Herrn Dr. Tobias Gräwert, Frau Andrea Kunfermann und Frau Dr. Jana Held für die gute, erfolgreiche Zusammenarbeit und die Diskussion zahlreicher biologischer Fragestellungen.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich herzlich für die angenehme, freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und die kompetente Hilfe bei synthetischen, analytischen und technischen Problemen. Dr. Christoph Behrendt gebührt ein besonderer Dank für den Austausch über die chemischen und pharmazeutischen Fragestellungen des gemeinsamen Themengebietes sowie für sein unermüdliches Korrekturlesen. Für ihr fleißiges Korrekturlesen und ihre vielseitige Unterstützung danke ich auch Claudia Lienau und Michael Leven. Bei Petra Stahlke und Krystina Kuna bedanke ich mich für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Synthese von Ausgangsverbindungen. Danke auch an Dr. Miriam Pein, Lukas Spanier, Sarah Konzuch, Dr. Saskia Hähn und Dr. Finn Hansen für die gute Zusammenarbeit und nette Unterhaltungen während gemeinsamer Stunden im Forschungs- oder Praktikumslabor.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Familie für die große Unterstützung, das Verständnis und den Rückhalt in schwierigen Situationen sowie die Motivation und den nötigen Ausgleich zur Arbeit.

Hiermit erkläre ich, dass ich die hier vorgelegte Dissertation eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe und diese in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht habe. Bisher wurden von mir keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 10.05.2012

(Karin Brücher)

Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ACP	Acyl Carrier Protein
ACT	artemisinin based combination therapy
AIDS	acquired immune deficiency syndrome
aliph.	aliphatisch
arom.	aromatisch
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
br.	breit (Spektren)
ca.	circa
CDCl ₃	Chloroform, deuteriert
CDI	1,1'-Carbonyldiimidazol
¹³ C-NMR	carbon nuclear magnetic resonance
CRT	Chloroquin-Resistenz-Transporter
CYP 450	Cytochrom P450
δ	chemische Verschiebung (Spektren)
d	Dublett (Spektren)
DEP	Diethylphosphit
DHFR	Dihydrofolat-Reduktase
DHPS	Dihydropteroat-Synthase
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
DMF	Dimethylformamid
DMSO-d ₆	Dimethylsulfoxid, deuteriert
DNA/DNS	desoxyribonucleic acid/Desoxyribonukleinsäure

DOXP	1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat
Dxr	1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase
Dxs	1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
<i>E. coli, Ec</i>	<i>Escherichia coli</i>
eq	Äquivalentmenge
Et	Ethyl
EtOH	Ethanol
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
EtOAc	Ethylacetat
FACT	fixed-dose artemisinin-based combination therapy
FAB-HRMS	fast atom bombardment high resolution mass spectrometry
FPPIX	Ferriprotoporphyrin IX
GlpT	Glycerol-3-phosphat-Transporter
h	hours = Stunden
HDAC	Histondesacetylase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure
HIV	human immunodeficiency virus
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A
¹ H-NMR	proton nuclear magnetic resonance
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP2	Histidine rich protein 2
HSAB	Hard and Soft Acids and Bases
Hz	Hertz
IC ₅₀	Konzentration, die zu 50 %iger Inhibition führt
Inhib.	Inhibition
IPP	Isopentenylidiphosphat
<i>iPr</i>	<i>iso</i> -Propyl
IPT	intermittent preventive treatment

IR	Infrarot
J	Kopplungskonstante (Spektren)
K_i	Dissoziationskonstante eines Inhibitors
LD ₅₀	Mittlere letale Dosis bezogen auf 50 % der beobachteten Population
LMPH	Laboratory for Microbiology, Parasitology and Hygiene
m	Multiplett (Spektren)
M	Mol pro Liter
Me	Methyl
MeOH	Methanol
MEP	2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat
MIC	minimal inhibitory concentration
MMV	Medicines for Malaria Venture
MRC-5	humane, fetale Lungenfibroblastenzelllinie
MST	mean survival time
<i>M. tuberculosis, Mt</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MVA	Mevalonat
$\tilde{\nu}$	Wellenzahl
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid, reduziert
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat, reduziert
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
NPP	new permeability pathways
n.b.	nicht bestimmt
<i>n</i> Bu	<i>n</i> -Butyl
<i>n</i> -BuLi	<i>n</i> -Butyllithium
<i>P.</i>	<i>Plasmodium</i>
<i>Pf</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>p</i>	<i>para</i> -
PALM	<i>Plasmodium</i> -specific apicoplast protein for liver merozoite formation
PCR	Polymerasekettenreaktion

PDF	Peptiddeformylase
PfEMP	<i>P. falciparum</i> Erythrocyte Membrane Protein-1
PfMDR1	<i>P. falciparum</i> multi drug resistance 1-Transporter
Ph	Phenyl
POM	Pivaloyloxymethyl
ppm	parts per million
q	Quartett (Spektren)
RNA/RNS	ribonucleic acid/Ribonukleinsäure
RP	reversed phase
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
S_N2_t	Nukleophile Substitution über eine tetraedrische Zwischenstufe
<i>Syn.</i>	<i>Synechocystis</i>
t	Triplett (Spektren)
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
TEA	Triethylamin
TEP	Triethylphosphit
<i>tert</i>	<i>tertiär</i>
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Tetramethylsilan
TMSBr	Trimethylsilylbromid
u. a.	unter anderem
WHO	World Health Organization
z. B.	zum Beispiel
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 von der Autorin dieser Arbeit nicht in ausreichender Reinheit gewonnen

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Malaria.....	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Chemotherapie der <i>Malaria tropica</i>	4
1.1.3	Weitere Strategien zur Kontrolle und Prophylaxe von Malaria	13
1.2	Der Apikoplast als Zielstruktur für antiplasmodiale Wirkstoffe.....	14
1.3	Die Mevalonat-unabhängige Isoprenoid-Biosynthese als Angriffspunkt für neue Malariatherapeutika.....	18
1.4	Die DOXP-Reduktoisomerase (Dxr) als Target für Antimalariamittel.....	25
1.5	Der Dxr-Inhibitor Fosmidomycin als neuer Antimalaria-Wirkstoff.....	31
1.6	Bisherige Strukturvariationen an der Leitstruktur Fosmidomycin	33
1.6.1	Molekülregion A: Variation der Hydroxamsäurefunktionalität	34
1.6.2	Molekülregion B: Variation der Phosphonsäurefunktionalität.....	37
1.6.3	Molekülregion C: Variation des Propyl-Spacers.....	40
1.7	Aufgabenstellung	52
2	Fosmidomycin-Analoga mit Benzamid-Teilstruktur.....	54
2.1	Metalloenzyme als pharmazeutische Targets.....	54
2.1.1	Hydroxamsäuren als Metalloenzyminhibitoren	55
2.1.2	Benzamide als potenzielle Metalloenzyminhibitoren	57
2.2	Synthesestrategie der Fosmidomycin-Analoga mit Benzamid-Teilstruktur	59
2.3	Synthese und Eigenschaften der Benzamid-Analoga von Fosmidomycin	60
2.3.1	Synthese der Edukte	61
2.3.2	Synthese der Zielverbindungen.....	63
2.3.3	Spektroskopische Eigenschaften	65
2.4	Untersuchung der biologischen Aktivität	70
3	Inverse α-substituierte, β-oxa-isostere Fosmidomycin-Analoga.....	72
3.1	Die Anwendung des Bioisosterie-Prinzips in der Wirkstoffentwicklung	72
3.2	Synthesestrategie α -substituierter, β -oxa-isosterer Fosmidomycin-Analoga	76
3.3	Synthese und Eigenschaften der β -oxa-isosteren Fosmidomycin-Analoga	79

3.3.1 Syntheseplanung.....	79
3.3.2 Synthese der Edukte	82
3.3.3 Synthese der Zielverbindungen	85
3.3.4 Spektroskopische Eigenschaften	90
3.4 Untersuchung der biologischen Aktivität.....	99
3.4.1 <i>Pf</i> Dxr-Inhibition und antiplasmodiale Aktivität	101
3.4.2 <i>Ec</i> Dxr-Inhibition.....	112
3.4.3 <i>Mt</i> Dxr-Inhibition	114
4 Prodrugs α-substituierter, β-oxa-isosterer Fosmidomycin-Analoga.....	116
4.1 Das Prodrug-Prinzip in der Wirkstoffentwicklung	116
4.1.1 Phosphonsäure-Prodrugs	117
4.1.2 Carbonate und Carbamate als Prodrugs von Hydroxyfunktionalitäten	120
4.2 Synthesestrategie der Prodrugs β-oxa-isosterer Fosmidomycin-Analoga	121
4.3 Synthese und Eigenschaften der Prodrugs	122
4.3.1 Synthese der Prodrugs	122
4.3.2 Spektroskopische Eigenschaften	125
4.4 Untersuchung der biologischen Aktivität.....	127
5 Experimenteller Teil.....	129
5.1 Verzeichnis der Geräte und Analysenmethoden	129
5.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)	130
5.3 Analytische Daten der Verbindungen aus Kapitel 2.....	137
5.4 Analytische Daten der Verbindungen aus Kapitel 3.....	164
5.5 Analytische Daten der Verbindungen aus Kapitel 4.....	247
5.6 Untersuchungen zur <i>in vitro</i>-Aktivität	260
5.6.1 Untersuchung der Dxr-Enzymhemmung	260
5.6.2 Untersuchung der antiplasmodialen Aktivität	261
6 Zusammenfassung	262
7 Summary	268
8 Literaturverzeichnis	274
9 Lebenslauf	303

1 Einleitung

1.1 Malaria

1.1.1 Epidemiologie

Malaria ist weltweit die bedeutendste Infektionskrankheit, von der mit über drei Milliarden Menschen etwa 40 % der Weltbevölkerung bedroht ist. Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation zufolge gab es im Jahr 2010 etwa 216 Millionen Erkrankungen und über 650.000 Todesfälle.¹ Die Krankheit ist in subtropischen und tropischen Regionen Afrikas, Indiens, Südasiens und Südamerikas endemisch (**Abb. 1**). Über 80 % aller Fälle treten in Afrika südlich der Sahara auf, wo Malaria etwa 25 % aller Todesfälle bei Kindern unter fünf Jahren verursacht und eine erhebliche wirtschaftliche Belastung für die betroffenen Länder bedeutet.² Da in Endemiegebieten der Zugang der Bevölkerung zu medizinischer Versorgung aufgrund hoher Kosten und unzureichender Infrastruktur oft erschwert ist,³ kann Malaria gleichermaßen als Ursache und Folge der Armut bezeichnet werden.⁴ Wegen des fehlenden finanziellen Anreizes für die Pharmazeutische Industrie zur Entwicklung neuer Wirkstoffe gilt Malaria neben Tuberkulose und weiteren Infektionskrankheiten als vernachlässigte Krankheit.⁴⁻⁵

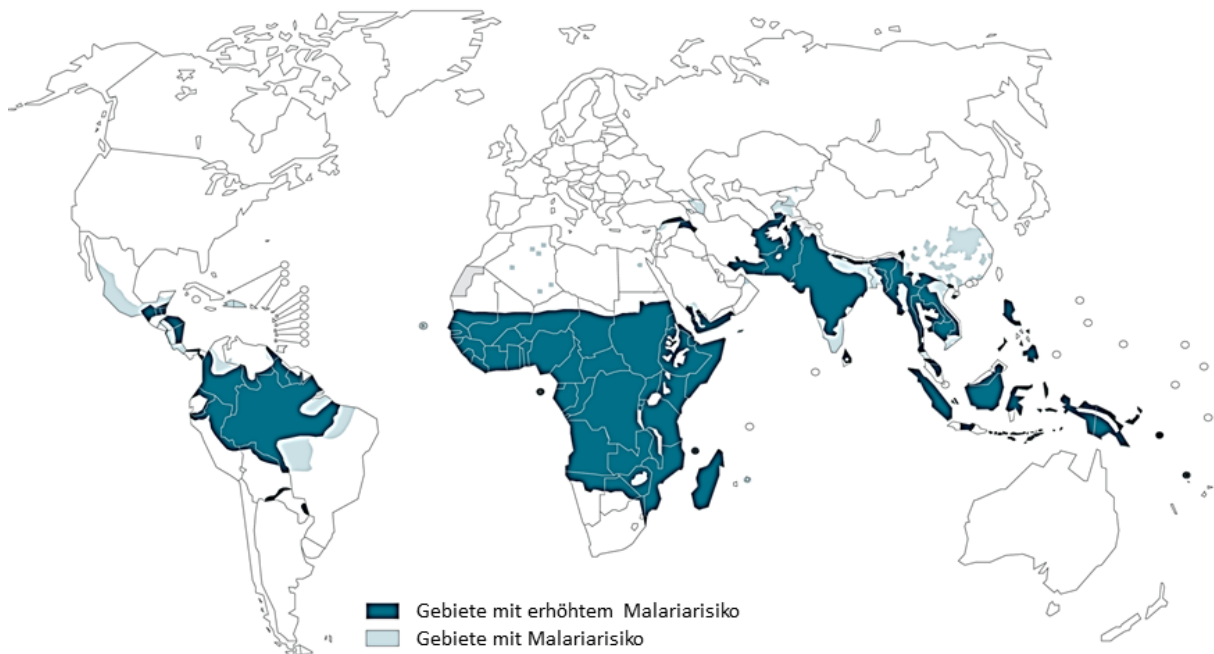


Abb. 1: Malaria-Verbreitungsgebiete 2010 (modifiziert nach WHO, 2011⁶).

Malaria wird durch einzellige Mikroorganismen der Gattung *Plasmodium* ausgelöst, die beim Stich weiblicher Moskitos der Gattung *Anopheles* übertragen werden.⁷ Plasmodien gehören dem Reich der Protozoen und dem Stamm der *Apikomplexa* (Sporentierchen) an, deren Name sich von einem Organell-Komplex am vorderen Zellpol ableitet, den der Parasit zum Eindringen in Wirtszellen nutzt.⁸ Zu den Apikomplexa gehören auch *Toxoplasma* und *Cryptosporidium*, die vor allem Infektionen bei

ungeborenen und Kleinkindern sowie Personen mit geschwächtem Immunsystem auslösen. Andere Apikomplexa wie *Theileria*, *Babesia* und *Eimeria* bedrohen insbesondere die Gesundheit von Haus- und Nutztieren.⁹ Vier der über hundert bekannten Plasmodienarten gelten als humanpathogen: *Plasmodium malariae* (*Malaria quartana*), *Plasmodium vivax* und *Plasmodium ovale* (*Malaria tertiana*) sowie *Plasmodium falciparum* (*Malaria tropica*).^{2, 10} Während Infektionen mit *P. malariae* und *P. ovale* relativ einfach zu therapieren sind und nur selten lebensbedrohliche Komplikationen verursachen, ist *Malaria tropica* potenziell lebensbedrohlich und führt unbehandelt oft zum Tod.¹⁰ Auf die Besonderheiten dieser hauptsächlich in Afrika endemischen Krankheitsform wird an späterer Stelle eingegangen. *P. vivax* verursacht mit jährlich 130–390 Millionen Fällen 25–40 % aller Malaria-Erkrankungen weltweit und ist vorwiegend in Südostasien, im Mittleren Osten und in Südamerika verbreitet.¹¹ Obwohl *P. vivax*-Infektionen in der Regel nicht letal verlaufen, treten in Einzelfällen schwere klinische Symptome mit tödlichen Folgen auf. Allerdings ist auch die unkomplizierte *Malaria vivax* eine erhebliche Belastung für die betroffenen Länder und wurde bezüglich ihrer sozioökonomischen Auswirkungen lange unterschätzt. *P. knowlesi* kommt in Südostasien vor und ist ein Malaria-Erreger bei Affen, dessen Gefährlichkeit bei zoonotischer Übertragung für Menschen erst kürzlich erkannt wurde.¹²

Der Lebenszyklus von Plasmodien verläuft über eine geschlechtliche Vermehrung innerhalb des Vektors und eine ungeschlechtliche Vermehrung innerhalb des Wirts (**Abb. 2**).^{2, 8a, 10} Geschätzte 15–200 Sporozoiten gelangen mit dem Speichel der Mücke in die menschliche Blutbahn (1) und befallen von dort aus innerhalb etwa einer Stunde Hepatozyten (2),¹³ in denen sie für das Immunsystem nur schwer erreichbar sind und sich ungeschlechtlich vermehren (Leberschizogonie). Bei Infektionen mit *P. vivax* und *P. ovale* wandeln sich einige Sporozoiten in Hypnozoiten (4) um, die als Ruheformen in der Leber verbleiben und noch Jahre später zu Rezidiven führen können. Aus jedem Leberschizont entstehen Zehntausende Merozoiten (3), die nach einigen Tagen durch Lyse der Leberzellen in die Blutbahn freigesetzt werden und Erythrozyten befallen (5). In diesen ernähren sie sich unter anderem durch den Abbau von Hämoglobin und entwickeln sich zu Blutschizonten, die nach 4–6 Tagen zerfallen und jeweils 16–32 neue Merozoiten freisetzen (Blutschizogonie). Bei *P. falciparum* zerfallen die Schizonten im Gegensatz zu den anderen Plasmodienarten zeitlich unregelmäßig. Die meisten Merozoiten befallen erneut Erythrozyten, in denen dann wiederum ungeschlechtliche Vermehrungszyklen stattfinden (6). Nach mehreren Lebenszyklen wandelt sich ein kleiner Teil der Merozoiten in geschlechtliche Mikro- und Makrogametozyten um (7), die bei einem erneuten Stich von der Anopheles-Mücke aufgenommen werden (8). Durch die im Darm der Mücke ablaufende geschlechtliche Vermehrung über Zygote, Ookinet und Oozyste entstehen wieder Sporozoiten, die in die Speicheldrüsen der Mücke wandern (9–11). Damit ist der Fortpflanzungszyklus geschlossen. Während die Leberschizogonie vom Patienten unbemerkt bleibt und diagnostisch nicht erfassbar ist, lösen die plasmodialen Blutstadien die klinischen Symptome der Malaria aus. Durch Freisetzung von parasitären Stoffwechselprodukten und Zellbestandteilen beim Zerplatzen der

Wirtszellen erfolgt eine massive Fieberreaktion. Als Begleiterscheinungen treten Kopf- und Gliederschmerzen, Schüttelfrost, Durchfall und Krampfanfälle auf. Die vermehrte Hämolyse führt zu Anämie, die besonders für Kleinkinder und Schwangere eine häufige Todesursache darstellt.¹⁰

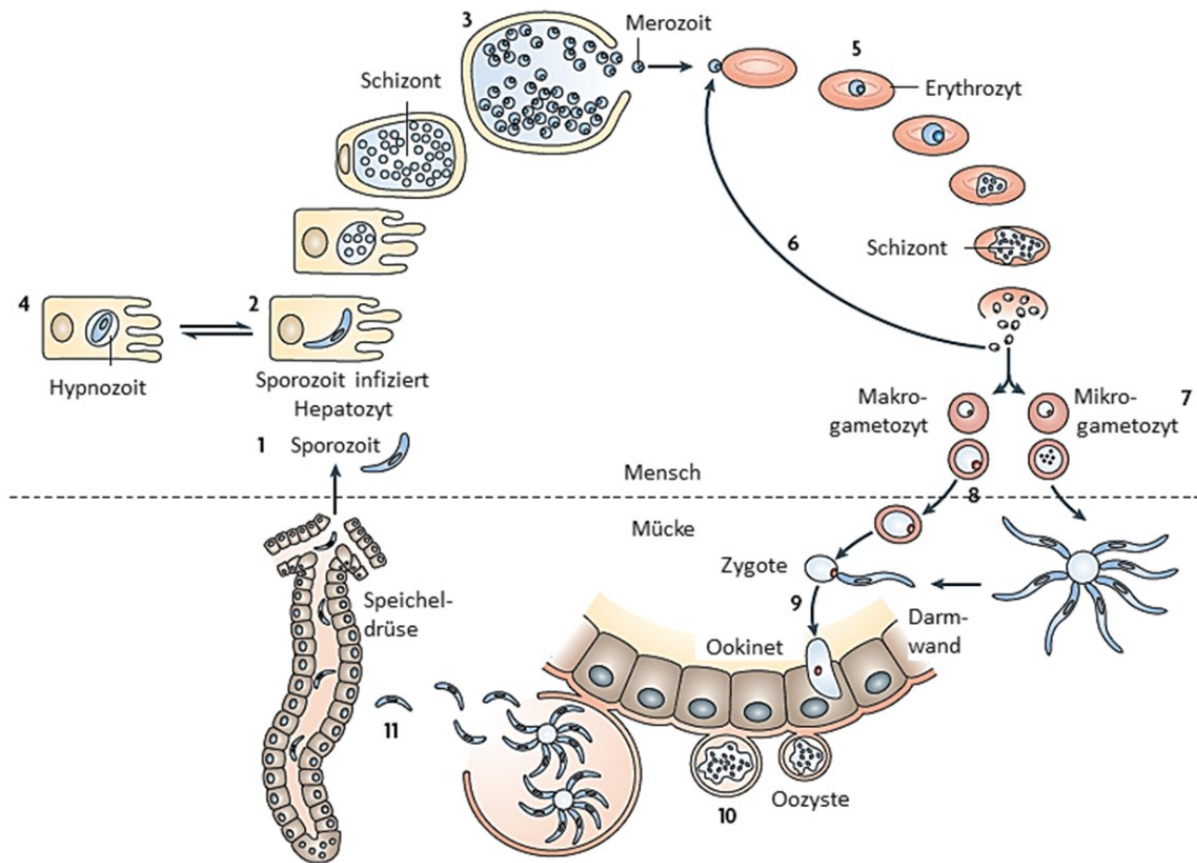


Abb. 2: Lebenszyklus des Malaria-Erregers (modifiziert nach Wells, 2009⁴).

Routinemäßig erfolgt die Malaria-Diagnose über den mikroskopischen Nachweis der Erreger im Blutaussstrich.² Diese einfach durchzuführende Methode erlaubt eine zuverlässige Quantifizierung der Parasiten und eine Kontrolle des Therapieerfolgs. Oft werden Diagnosen jedoch auf Basis der eher unspezifischen Symptomatik gestellt.³ Eine falsch negative Malaria-Diagnose trägt erheblich zur Letalität der Krankheit bei, da eine zeitnahe und effiziente Therapie verhindert wird. Gleiches gilt für fälschlicherweise als Malaria diagnostizierte Erkrankungen.¹⁴ Als Alternative zur mikroskopischen Diagnose werden seit einigen Jahren immunologische Schnelltests entwickelt, für deren Anwendung weder medizinisches Fachpersonal noch spezielle Einrichtungen benötigt werden.³ Mischinfektionen mit mehreren Plasmodien-Spezies bleiben vor allem bei mikroskopischer Untersuchung oft verborgen, da eine Spezies unterhalb der Nachweisgrenze oder nur im Hypnozoitenstadium vorliegen kann und die Arten in frühen Entwicklungsstadien schwer zu unterscheiden sind.¹⁵ Bei Mischinfektionen treten oft Rückfälle während der Rekonvaleszenz auf, die durch die zunächst nicht erkannte Plasmodienart verursacht werden. Durch eine sensitivere, aber aufwändigere Diagnostik mittels PCR-Technik können Mischinfektionen zuverlässiger erkannt werden.

Die Pathogenität der *Malaria tropica* ist in der besonderen Eigenschaft von *P. falciparum* begründet, die Oberfläche befallener Erythrozyten durch Expression des variablen Oberflächenantigens PfEMP1* zu modifizieren.¹⁶ Aufgrund von Wechselwirkungen dieser Oberflächenproteine mit wirtseigenen Endothel-Rezeptoren oder zu anderen Blutzellen sequestrieren infizierte Erythrozyten in Kapillargefäßen. Auf diese Weise entgehen die Erreger der todbringenden Milzpassage.¹⁷ Darüber hinaus können dadurch Perfusionsstörungen bis hin zu Gefäßverschlüssen auftreten. Als Folge entsteht eine Sauerstoff-Unterversorgung des Gewebes, was zur Schädigung bzw. Funktionsstörung von lebenswichtigen Organen führen kann. In schweren Fällen resultiert multiples Organversagen. Beim Befall des Gehirns kommt es zur lebensbedrohlichen zerebralen Malaria, die über Bewusstseinsstörungen und Koma bis zum Tod führen kann. Eine weitere Überlebensstrategie des Parasiten hat sich durch Antigenvariation der plasmodialen Oberflächenproteine entwickelt. Der ständige Wechsel der Aminosäuresequenz führt zur Umgehung der wirtseigenen Immunabwehr. Gleichzeitig kann durch die damit einhergehende Variation der adhäsiven Eigenschaften mit einer Vielzahl von Endothel-Rezeptoren interagiert werden.¹⁸

1.1.2 Chemotherapie der *Malaria tropica*

Im Folgenden wird ein kurzer Überblick über etablierte Malariatherapeutika und Neuentwicklungen gegeben. Der Schwerpunkt liegt, falls bekannt, auf deren Wirkmechanismen, Zielstrukturen und der jeweiligen Toxizitäts- und Resistenzproblematik.

4-Aminochinoline besitzen als gemeinsames Strukturmerkmal an der Aminogruppe in Position 4 des Chinolinrings eine basische Seitenkette und in Position 7 einen Chlorsubstituenten (**Abb. 3**). Die Leitstruktur **Chloroquin** wurde als preisgünstiger und sicherer Arzneistoff zur Malariatherapie und -prophylaxe lange erfolgreich eingesetzt, bis erstmalig in den 1960er Jahren weltweit resistente *P. falciparum*-Stämme entdeckt wurden. Seitdem ist die Bedeutung von Chloroquin zur Behandlung der *Malaria tropica* stark gesunken.²⁵ Der Wirkmechanismus von 4-Aminochinolinen ist noch nicht vollständig geklärt. Der Parasit verdaut während des erythrozytären Stadiums in seiner lysosomalen Nahrungsvakuole Hämoglobin zu kleinen Peptiden, die wiederum im Zytoplasma zum Aufbau parasitärer Proteine genutzt werden. Der Häm-Anteil verbleibt in der Nahrungsvakuole, und wird dort zu Ferriprotoporphyrin IX (FPPIX) oxidiert. Dieses für den Parasiten toxische Abbauprodukt wird durch Umwandlung in Hämozin entgiftet, das sich als mikroskopisch sichtbares „Malariapigment“ ablagert.²⁶ 4-Aminochinoline inhibieren die Häm-Entgiftung durch Bildung stabiler Komplexe mit FPPIX, die möglicherweise über π - π -Wechselwirkungen der planaren aromatischen Systeme zustande kommen (**Abb. 5**).²⁷ Chloroquin inhibiert auch den Glutathion- und Peroxid-vermittelten Abbau von

* PfEMP1 = *P. falciparum* Erythrocyte Membrane Protein-1.

FPPIX.²⁸ Im sauren Milieu der Nahrungsvakuole liegen 4-Aminochinoline zweifach protoniert vor, so dass sie intraparasitär angereichert werden.¹¹

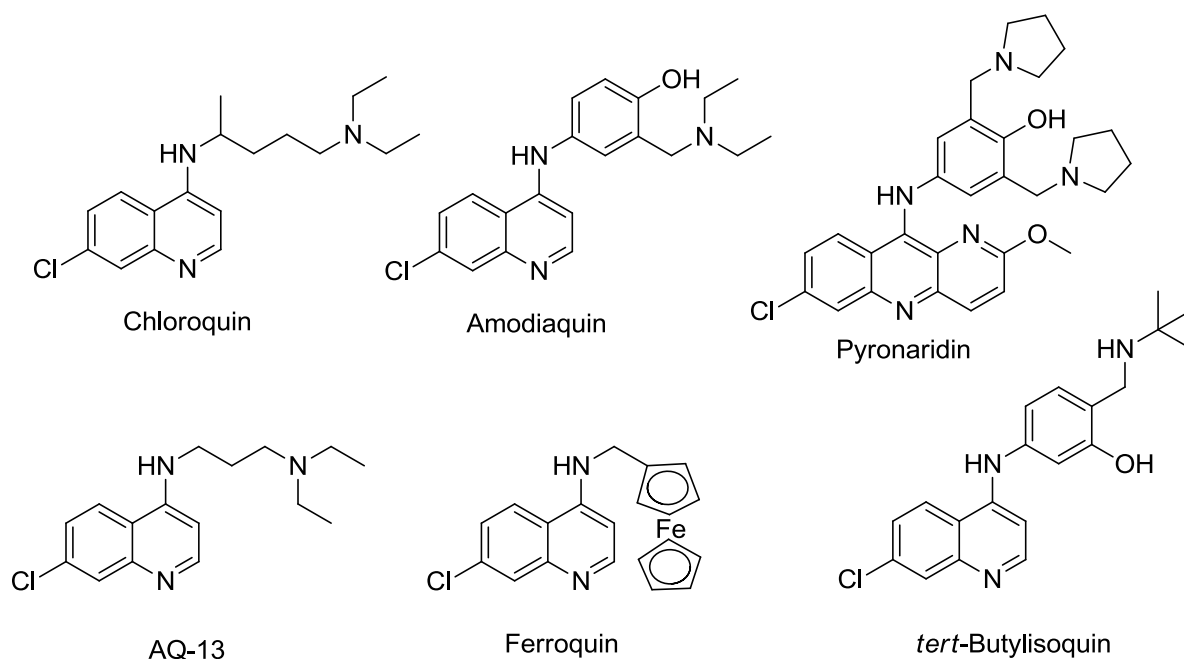


Abb. 3: Strukturformeln von 4-Aminochinolinen in klinischer Anwendung oder Entwicklung.

Eine plasmodiale Resistenz gegen 4-Aminochinoline entsteht durch Mutationen im Gen des Chloroquin-Resistenz-Transporters* (CRT), in deren Folge der Wirkstoff aus der Nahrungsvakuole transportiert wird.²⁹ **Amodiaquin** besitzt im Vergleich zu Chloroquin eine aromatische Seitenkette mit Mannich-Base-analoger Partialstruktur, die vermutlich eine geringere CRT-Affinität zur Folge hat.¹¹ Der Wirkstoff wird in der Leber zu dem aktiven Metaboliten Monodesethyl-Amodiaquin biotransformiert. Amodiaquin kann noch als Reservemittel verwendet werden, wenn Chloroquin aufgrund des genannten Resistenzmechanismus seine Wirkung verloren hat.^{27,30} Problematisch ist die oxidative Biotransformation der 4-Aminophenol-Teilstruktur zum Chinonimin, da durch nachfolgende kovalente Bindung der Metabolite an Leberproteine toxische Konjugate ausgebildet werden können. Außerdem können durch längerfristige Gabe Agranulozytosen entstehen.^{31,32} Aufgrund seiner geringen Produktionskosten wird Amodiaquin bevorzugt in afrikanischen Ländern in Kombinationstherapien eingesetzt.¹¹ **Pyronaridin** enthält ein als Azaacridin modifiziertes Chinolinsystem und besitzt wie Amodiaquin eine 4-Aminophenol-Teilstruktur.²⁴ Diese trägt allerdings zwei Mannich-Base-Seitenketten, welche eine Konjugation des Chinonimin-Metaboliten an Proteine durch sterische Abschirmung hindern sollen. Pyronaridin wird in einer neuentwickelten Kombinationstherapie

* Im CRT-Wildtyp-Protein befindet sich in Position 76 eine Lysin-Seitenkette, die unter den pH-Bedingungen in der Nahrungsvakuole protoniert vorliegt und das ebenfalls positiv geladene, protonierte Chloroquin abstößt. Durch Austausch von Lysin gegen Threonin (K76T-Mutation) wird der Transporter für Chloroquin zugänglich und der Wirkstoff kann entlang des Konzentrationsgefälles aus der Nahrungsvakuole geschleust werden.²⁹

(Pyramax[®]) zusammen mit Artesunat eingesetzt.³³ Derzeit befinden sich mit **AQ-13**, **Ferroquin** und **tert-Butylisoquin** drei strukturell weiterentwickelte 4-Aminochinoline in klinischer Entwicklung.^{34,35}

In die Gruppe der Arylaminoalkohole werden **Chinin** und seine strukturell vereinfachten Analoga zusammengefasst (**Abb. 4**). Gemeinsam haben deren chemische Strukturen ein lipophiles aromatisches System, einen sekundären Alkohol und ein sekundäres oder tertiäres Amin. Ebenso wie die 4-Aminochinoline interferieren Arylaminoalkohole mit dem parasitären Hämoglobinabbau. Der genaue Wirkmechanismus ist allerdings noch nicht bekannt.³⁶ Chinin wird schon seit ca. 1820 zur Malariatherapie eingesetzt und ist noch heute ein wichtiges Antimalariamittel, da die Wasserlöslichkeit des Chinin-Hydrochloridsalzes eine intravenöse Applikation erlaubt. Obwohl nicht mehr von der WHO empfohlen, wird Chinin im „off-label-use“^{*} zur parenteralen Behandlung komplizierter *Malaria tropica* weiterhin eingesetzt.^{11,24} Durch Kombination mit dem Antibiotikum[†] Clindamycin kann die Erfolgsquote der Chinin-Monotherapie noch übertroffen werden. Die Kombination mit dem Antibiotikum Doxycyclin wird sowohl zur intravenösen Therapie komplizierter Malaria als auch zur oralen Therapie unkomplizierter Malaria eingesetzt.¹¹ Wegen seiner kurzen Plasmahalbwertszeit muss Chinin über sieben Tage dreimal täglich eingenommen werden. Nach dreitägiger Anwendung kann es dosisabhängig zentralnervöse Nebenwirkungen wie Schwindel, Ohrensausen, Übelkeit und Kopfschmerzen verursachen. Dieser Symptomkomplex wird unter dem Begriff Cinchonismus zusammengefasst. Potenziell gefährlichere Nebenwirkungen sind eventuell auftretende Herzrhythmusstörungen und Hypoglykämien.¹¹

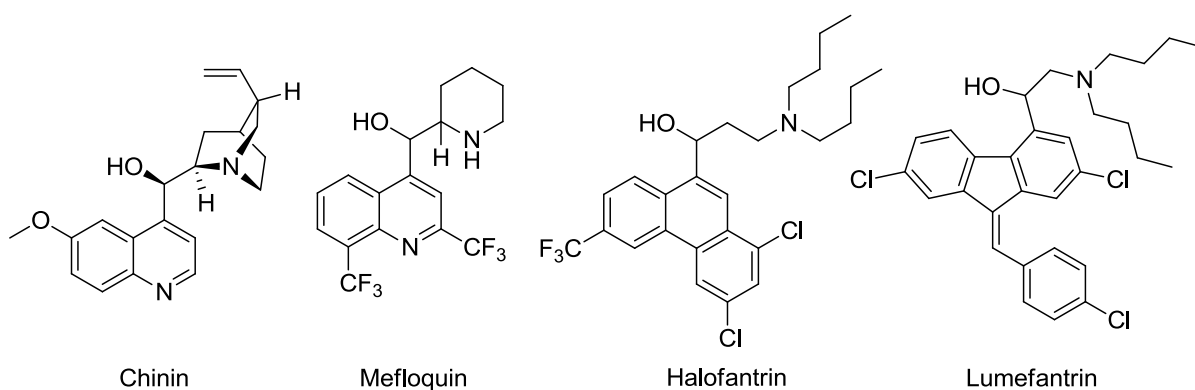


Abb. 4: Zur Malariatherapie eingesetzte Arylaminoalkohole.

Mefloquin (Lariam[®]) ist aufgrund seiner langen Plasmahalbwertszeit besonders gut zur Malariaphylaxe geeignet und wirkt effektiv gegen die meisten Chloroquin-resistenten *P. falciparum*-Stämme.²⁴ Limitiert wird seine therapeutische Anwendung durch mögliche neuropsychiatrische Nebeneffekte.³⁷ **Halofantrin** wirkt ebenfalls gegen Chloroquin-resistente Stämme, wegen des hohen kardialen Arrhythmie-Risikos wurde die Therapiezulassung allerdings in

* Off-label-use: zulassungsüberschreitende Anwendung eines Fertigarzneimittels.

† Der Einsatz von Antibiotika zur Malariatherapie ist Gegenstand von Abschnitt 1.2, Strukturformeln siehe dort.

mehreren Ländern zurückgenommen.³⁸ Das strukturell verwandte **Lumefantrin** ist besser verträglich und wirkt gegen multiresistente Erregerstämme. Die lipophile Substanz, deren Bioverfügbarkeit stark von der Nahrungsaufnahme abhängt, wird als Arzneimittel nur in Kombination mit Artemether eingesetzt.³⁹ Arylaminoalkohole werden über den *PfMDR1* (*P. falciparum* multi drug resistance 1)-Transporter aus dem plasmodialen Zytosol in die Nahrungsvakuole eingeschleust (**Abb. 5**).⁴⁰ Die plasmodiale Resistenzentwicklung gegen Arylaminoalkohole wird mit einer zunehmenden Anzahl an Kopien des *pfmdr1*-Gens in Zusammenhang gebracht.⁴¹

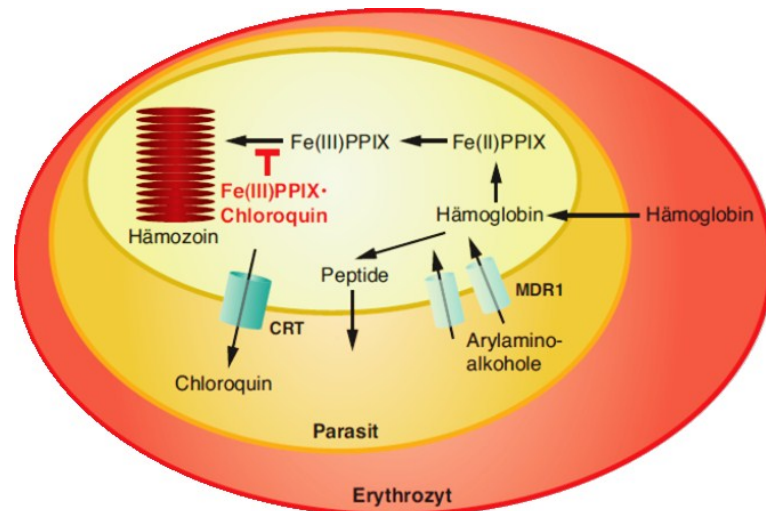


Abb. 5: Wirk- und Transportmechanismen in der parasitären Nahrungsvakuole am Beispiel von Chloroquin und Arylaminoalkoholen (übernommen aus Schlitzer, 2009⁴²).

Der einzige therapeutisch zugelassene Vertreter der Klasse der 8-Aminochinoline, deren Wirkmechanismus weitgehend unbekannt ist,²⁴ ist **Primaquin** (**Abb. 6**). Die Besonderheit von Primaquin besteht in seiner Wirksamkeit gegenüber Hypnozoiten, die eine Elimination der hepatischen Dauerformen von *P. vivax* und *P. ovale* ermöglicht. Daneben wirkt Primaquin auch gewebeschizontozid und gametozid. Gegen erythrozytäre Erregerstadien zeigt der Wirkstoff jedoch nur schwache Aktivität, so dass er nicht zur Therapie akuter Malariafälle geeignet ist. Die bedeutendste Nebenwirkung Primaquins ist eine potenzielle Methämoglobinbildung und im schlimmsten Fall eine lebensbedrohliche Hämolyse bei Personen mit Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel. Dieser genetische Polymorphismus tritt gehäuft bei Bewohnern Afrikas und Asiens auf.⁴³ Das derzeit in Phase IIb/III Klinischer Studien evaluierte **Tafenoquin** ist eine strukturelle Weiterentwicklung Primaquins. Der Wirkstoff zeigt im Vergleich zu Primaquin eine erhöhte blutschizontozide Aktivität.⁴⁴ Tafenoquin ist trotz ähnlicher Nebenwirkungen insgesamt besser verträglich als Primaquin. Darüber hinaus weist der Wirkstoff eine deutlich längere Plasmahalbwertszeit auf, so dass er sich besser für eine prophylaktische Anwendung eignen könnte.^{11,44,45} Bei **NPC-1161B** handelt es sich um ein enantiomerenreines 8-Aminochinolin in der präklinischen Entwicklungsphase, das gegenüber Tafenoquin ein nochmals verbessertes Wirkungs- und Toxizitätsprofil aufweist.⁴⁶

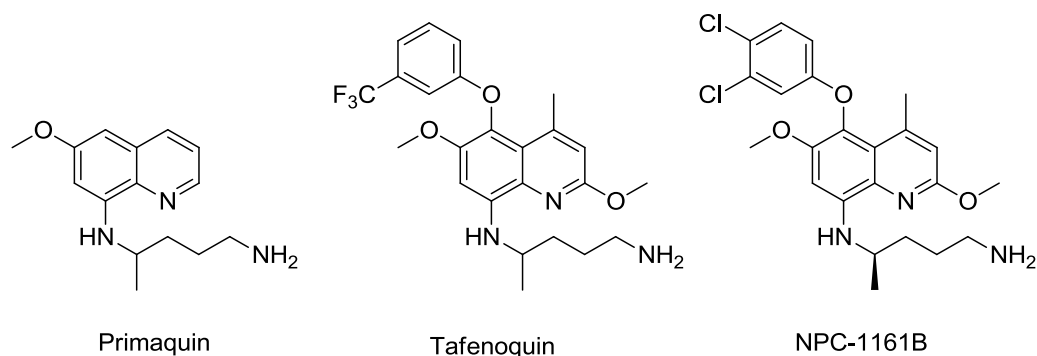


Abb. 6: Drei Vertreter aus der Wirkstoffklasse der 8-Aminochinoline.

Artemisinine (**Abb. 7**) sind als schnell wirksame Malariatherapeutika bekannt. Sie verringern die Parasitämie um den Faktor 10^4 pro asexuellen Zyklus. Außerdem sind sie auch gegen geschlechtliche Parasitenstadien aktiv.^{*,47} Die verschiedenen Derivate leiten sich von dem Sesquiterpenlacton **Artemisinin** ab, das schon seit 2000 Jahren in Form von Extrakten des einjährigen Beifußes (*Artemisia annua*) zur Behandlung fieberiger Erkrankungen eingesetzt wird.⁴⁸ Partialsynthetische Artemisinin-Derivate werden zum Beispiel durch Reduktion des Lactons (**Dihydroartemisinin**) und anschließende Alkylierung (**Artemether**, **Arteether/Artemotil**) oder Veresterung der Halbacetalstruktur (**Artesunat**) erhalten. Sie haben im Gegensatz zu Artemisinin eine verbesserte Wasser- oder Fettlöslichkeit. Außerdem weisen die Derivate aufgrund ihrer intensiven Biotransformation im Menschen eine kurze Halbwertszeit auf, weshalb sie meist in Kombination mit länger wirkenden Substanzen eingesetzt werden.^{11,22} Artemisinin-basierte Kombinationstherapien mit fester Dosierung (ACT/FACT) wie zum Beispiel Artemether/Lumefantrin (Riamet®/Coartem®), werden inzwischen als erste Therapieoption zur Behandlung unkomplizierter *Malaria tropica*-Erkrankungen empfohlen.⁴⁹ Deshalb wurde zwischen 2001 und 2007 die Malariatherapie in den meisten Ländern, in denen die Krankheit endemisch ist, von kostengünstigeren Monotherapien auf teurere ACTs umgestellt.^{†,16} Für die antiplasmodiale Wirkung dieser Substanzklasse ist das in der 1,2,4-Trioxan-Teilstruktur enthaltene Endoperoxid essenziell, der Wirkmechanismus von Artemisinin-Derivaten ist allerdings noch ungeklärt.⁴⁷ Bis vor einigen Jahren wurde noch die Theorie akzeptiert, dass durch eine Eisen(II)-vermittelte Endoperoxid-Spaltung in der Nahrungsvakuole Kohlenstoffradikale entstehen, die als unselektive Alkylanzien wirken können.¹¹ Neuerdings wird die spezifische Hemmung einer membranständigen plasmodialen Calcium-ATPase (*Pf*ATP6) angenommen, die Ca^{2+} -Ionen in das endoplasmatische Retikulum transportiert.⁵⁰ Klinisch relevante Resistenzen gegen diese Substanzklasse sind noch nicht bekannt, über eine verminderte Sensitivität wird aus einigen Regionen Südostasiens aber schon berichtet.⁵¹ Im Tierversuch beobachtete neurotoxische und embryotoxische Nebenwirkungen konnten an Menschen bisher nicht bestätigt werden.^{24,52}

* Artemisinine reduzieren zudem die bei *P. falciparum*-Infektionen auftretende Zytoadhärenz.⁴⁷

† Mit etwa 1 \$ pro Behandlung eines Erwachsenen sind ACTs deutlich teurer als z. B. Chloroquin (0,15 \$).³³

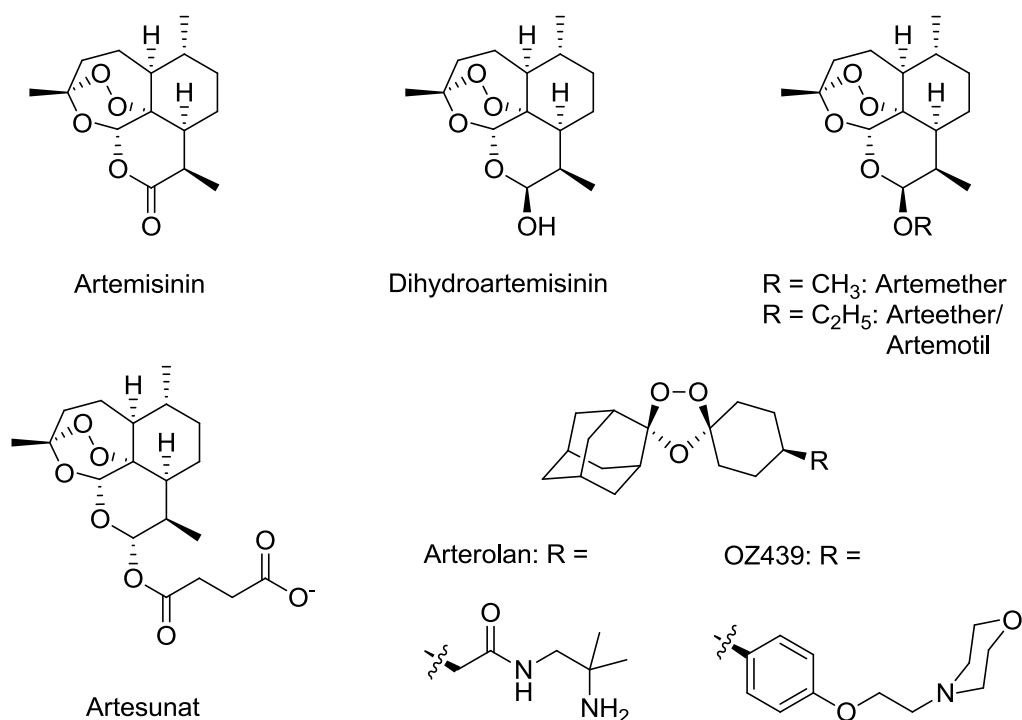


Abb. 7: Artemisinine in klinischer Anwendung oder Entwicklung.

Um die aufwändige Isolation des Naturstoffs Artemisinin zu umgehen und dessen pharmakokinetische Eigenschaften zu optimieren, werden strukturell vereinfachte, vollsynthetische Artemisinin-Derivate entwickelt.⁵³ **Arterolan** ist in Kombination mit dem Bis-Chinolin **Piperaquin*** bereits in die Klinischen Phase III fortgeschritten.⁵⁵ Das derzeit in Klinischer Phase II evaluierte Peroxid **OZ439** zeigt eine vergleichbare Wirksamkeit wie die klinisch verwendeten Artemisinin-Derivate. Zudem besitzt es im Vergleich zu Mefloquin höheres prophylaktisches Potenzial und führte im Tierversuch zu 100 %iger Heilung von Malaria nach nur einmaliger, oraler Gabe.⁵³

Pyrimethymin und Proguanil sind Dihydrofolat-Reduktase (DHFR)-Inhibitoren und hemmen den plasmodialen Folatstoffwechsel (**Abb. 8**).^{56,57} Proguanil wird allerdings erst im menschlichen Organismus durch oxidative Biotransformation in die Wirkform **Cycloguanil** umgesetzt. Der Wirkstoff wird häufig zur Prophylaxe, aber auch in Kombination mit Chloroquin zur Therapie der unkomplizierten *Malaria tropica* eingesetzt.⁴ **Sulfadoxin** und **Dapson** sind Strukturanaloga der 4-Aminobenzoessäure und damit falsche Substrate bzw. kompetitive Inhibitoren der Dihydropteroat-Synthase (DHPS).⁵⁸ Sie zeigen nur eine schwache Antimalaria-Aktivität, wirken aber synergistisch mit DHFR-Inhibitoren und werden ausschließlich in Kombination mit diesen eingesetzt. Das unter dem Handelsnamen Fansidar® bekannte Kombinationspräparat aus Sulfadoxin/Pyrimethamin hat

* Strukturformel von **Piperaquin**: Dieser Wirkstoff wurde 1960 in China entwickelt und wegen Resistenzentwicklung und der Therapieumstellung auf Artemisinin-Derivate nach 1980 kaum noch verwendet. Später zeigte sich jedoch sein gutes Potenzial als Kombinationspartner in ACTs.⁵⁴

mittlerweile in vielen Ländern Chloroquin als erste Therapieoption abgelöst. Trotz des hohen Resistenzrisikos wird Fansidar[®] wegen der geringen Produktionskosten weiterhin eingesetzt.⁵⁹ Das 2003 eingeführte Kombinationspräparat LapDap[®] aus Dapson und **Chlorproguanil*** wurde aufgrund von vermehrt auftretenden Methämoglobinämien bei Patienten mit Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel 2008 aus der Therapiezulassung genommen.⁶⁰ Plasmodiale Resistenzen gegenüber Antifolaten entstehen durch Mehrfachmutationen in den *dhfr*- und *dhps*-Genen, die eine Verminderung der Inhibitor-Affinität zum Zielenzym zur Folge haben.¹¹

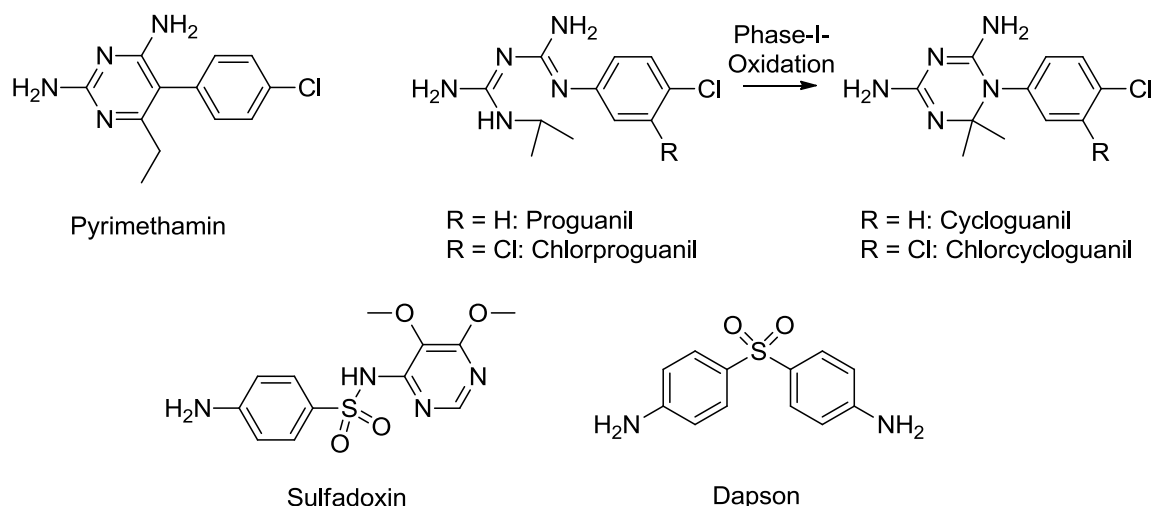


Abb. 8: Beispiele für DHFR- und DHPS-Inhibitoren.

Das Naphthochinon-Derivat **Atovaquon** inhibiert als Ubichinon-Analogon präferenziell die mitochondriale Atmungskette des Parasiten (**Abb. 9**). Durch Bindung an den Cytochrom-bc₁-Komplex wird der Elektronentransport unterbunden, was einen Abfall des mitochondrialen Membranpotenzials und in der Folge ein Absterben des Parasiten bewirkt.⁶¹ Die Monotherapie mit Atovaquon führte rasch zur Selektion resistenter Mutanten. Wird der Arzneistoff zusammen mit Proguanil als Kombinationspräparat Malarone[®] zur Prophylaxe und Therapie unkomplizierter *Malaria tropica* eingesetzt, ist eine synergistische Wirkung zu beobachten.⁶² Da die in Malarone[®] enthaltenen Arzneistoffe auch eine Wirkung auf parasitäre Leberstadien ausüben, ist zur Prophylaxe eine wesentlich kürzere Einnahmedauer dieses Arzneistoffs notwendig. Im Gegensatz zu Medikamenten, die nur gegen plasmodiale Blutstadien wirken und noch über 28 Tage nach Verlassen des Malaria-Endemiegebiets eingenommen werden sollten, reichen bei Malarone[®] 7 Tage aus.

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die wichtigsten derzeit eingesetzten bzw. neuentwickelten Antimalariamittel und ihre *in vitro*-Wirkung auf verschiedene plasmodiale Entwicklungsstadien.⁶³

* Chlorproguanil wird auf dieselbe Weise metabolisiert wie Proguanil und zeigt ein verbessertes Wirkspektrum gegenüber Pyrimethamin- und Proguanil-resistenten Stämmen.⁵⁶

	Blutstadien		Leberstadium	Mückenstadien	
	Blutschizont IC ₅₀ (nM)	Gametozyt ^a	Leberschizont ^b	Ookinet ^c	Oozyste ^d
Endoperoxide					
Artemether	≤ 5	- ^e	+	-	-
Artemison	≤ 5	- ^e	+	-	-
Dihydroartemisinin	≤ 5	- ^e	+	-	+
Artesunat	≤ 5	- ^e	+	-	-
Arterolan	≤ 5	+	-	-	+
OZ439	≤ 5	+	-	-	+
4-Aminochinoline					
Chloroquin	< 20	-	-	-	-
Amodiaquin	< 20	+	-	-	-
Pyronaridin	< 20	+	+	+	-
AQ-13	< 20	-	-	-	-
<i>tert</i> -Butylisoquin	< 20	+	-	-	-
Piperaquin	< 20	-	-	-	-
8-Aminochinoline					
Primaquin	> 400	-	-	-	-
Tafenoquin	> 400	-	-	-	-
NPC-1161B	> 400	+	+	-	+
Antifolate					
Pyrimethamin	< 20	-	+	+	+
Cycloguanil	< 4	-	+	-	-
Arylaminoalkohole					
Mefloquin	≤ 10	+	-	-	+
Lumefantrin	≤ 10	-	-	-	+
Halofantrin	≤ 10	-	-	-	+
Andere					
Atovaquon	< 1	- ^e	+	+	-
Antibiotika					
Doxycyclin	> 1000	-	-	-	n.b.
Clindamycin	+ ^f	n.b.	+ ^f	n.b.	n.b.

^a > 60 % Inhibition bei 10 µM, ^b IC₅₀ < 1 µM, ^c > 80 % Inhib. (10 µM), ^d > 90 % Inhib. (10 µM), ^e bei höheren Konzentrationen zeigen alle Artemisinin-derivate gametozide Wirkung, ^f kein IC₅₀-Wert angegeben.

Tabelle 1: Wirkung von Malariatherapeutika auf plasmodiale Entwicklungsstadien (biologische Daten übernommen aus *Delves, 2012*⁶³, Angaben für Clindamycin aus *Mazier, 2009*⁶⁴).

Unter den wenigen antiplasmodialen Substanzen mit neuartigem Wirkmechanismus, die sich derzeit in klinischer Entwicklung befinden, ist neben **Fosmidomycin** (siehe Abschnitt 1.5) nur die Bis-Thiazoliumverbindung **T3** (SAR97276) erwähnenswert (**Abb. 9**).^{34,65}

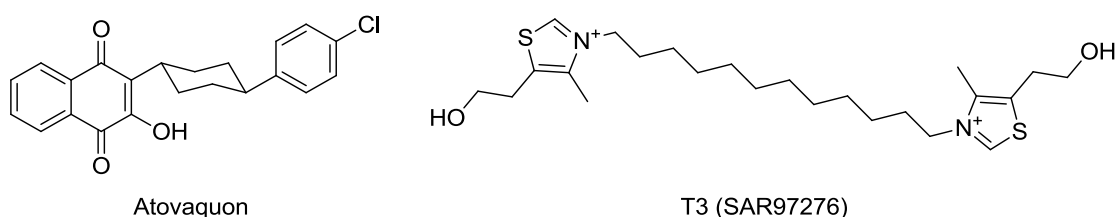


Abb. 9: Strukturformeln von Atovaquon und T3.

T3 ist ein Cholin-Analogon, das die Phospholipid-Biosynthese inhibiert und *in vitro* sehr effektiv das Wachstum von *P. falciparum* hemmt.⁶⁶ Die Wirkung beruht wahrscheinlich auf einer Inhibition der Cholin-Aufnahme oder einer Hemmung von Enzymen des Cholin-Stoffwechselwegs.^{67,68}

Antibiotika wirken auf prokaryotische Zielstrukturen und werden zur Malariaphylaxe oder in Kombinationspräparaten zur Malariatherapie eingesetzt.^{69,70} Bis jetzt sind keine klinisch relevanten Resistenzen von Plasmodien gegenüber dieser Wirkstoffklasse bekannt.²⁴ Ihre Wirkungsmechanismen und Zielstrukturen im Apikoplasten werden in Abschnitt 1.2 behandelt.

Die 1999 gegründete Non-Profit-Organisation *Medicines for Malaria Venture* (MMV) unterstützt die Entwicklung von Antimalariamitteln durch die Vernetzung von derzeit über 170 Partnern aus Industrie, Wissenschaft und Malaria-Endemieländern.* **Abb. 10** zeigt ein von der MMV veröffentlichtes globales Malaria-Portfolio, das den aktuellen Entwicklungsstand neuer Malaria-Medikamente im Rahmen dieser öffentlich-privaten Initiative umfasst.

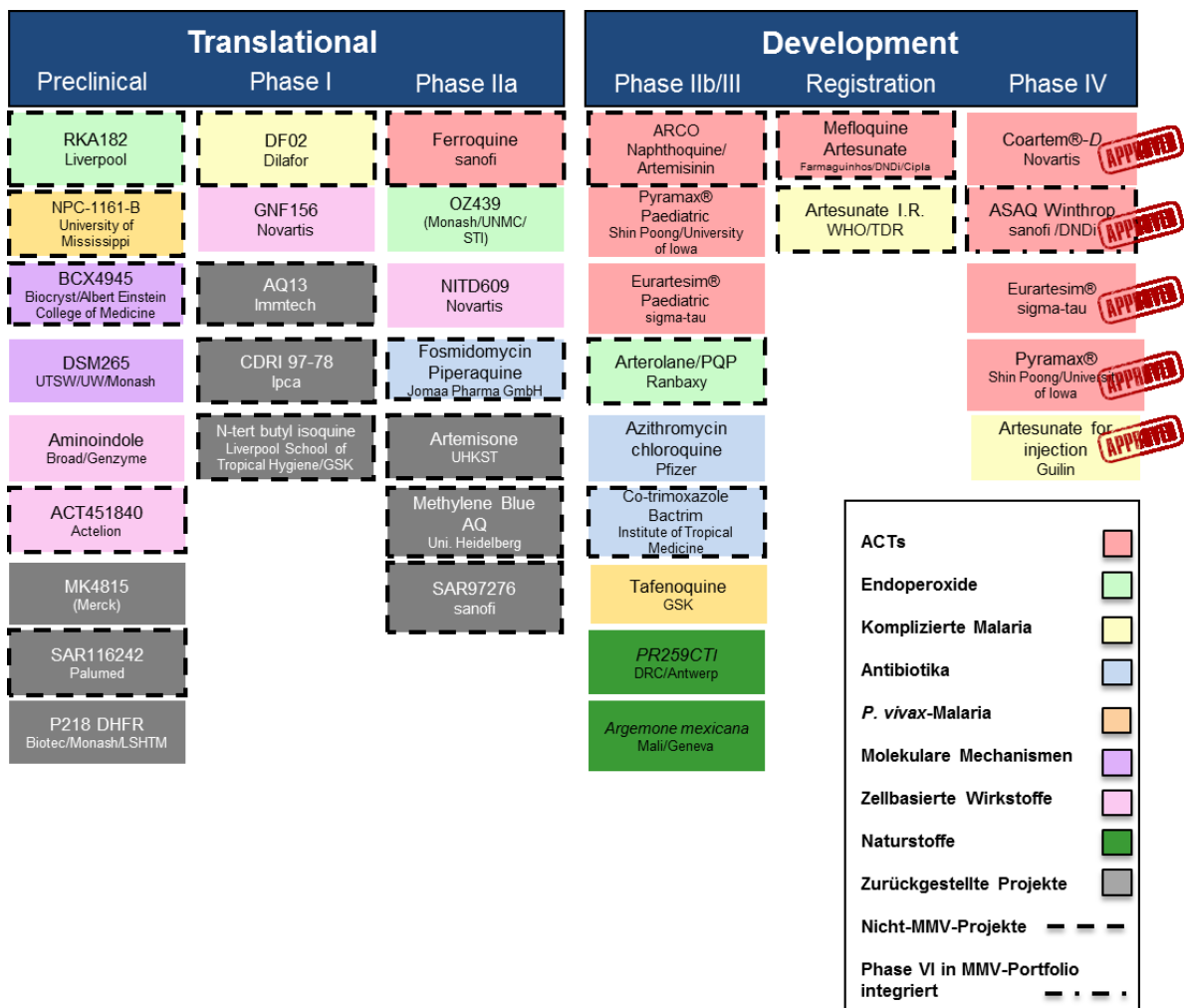


Abb. 10: Übersicht über die aktuellen Entwicklungen neuer Malaria-Medikamente in Kooperation mit der MMV im 1. Quartal 2012, aufgeschlüsselt nach Therapietyp (modifiziert nach MMV, 2012⁷¹).

* <http://www.mmv.org/newsroom/press-kit/boilerplate>.

In der Zulassungsphase befinden sich derzeit die Kombination Mefloquin/Artesunat und eine rektale Artesunat-Form zur Notfalltherapie schwerer Malaria. Coartem® (Artemether/Lumefantrin), ASAQ (Artesunat/Amodiaquin, Coarsucam®), Eurartesim® (Dihydroartemisinin/Piperaquin), Pyramax® (Pyronaridin/Artesunat) und Artesunat zur Injektion sind bereits zugelassen und in klinischer Anwendung (Phase IV). Schon in dieser Übersicht, die keine Entwicklungsprojekte außerhalb der MMV-Initiative enthält,* fällt der überwiegende Anteil an Artemisinin-basierten Therapien auf. Dagegen mangelt es in der fortgeschrittenen Entwicklungsphase an Arzneistoffen mit neuen Wirkmechanismen. Im Hinblick auf die Zunahme plasmodialer Resistenzen erscheint diese Situation bedenklich, zumal eine baldige Verbesserung der Lage nicht in Aussicht steht. Mit dem Ziel der endgültigen Eliminierung von Malaria liegt der Schwerpunkt MMV-geförderter Projekte mittlerweile auf Wirkstoffen bzw. Wirkstoffkombinationen, die außer gegen plasmodiale Blutstadien auch Wirksamkeit gegen Gametozyten und/oder *P. vivax*-Leberstadien zeigen.^{†,34}

Zur Unterstützung der Auffindung neuer Antimalaria-Leitstrukturen veröffentlichte das Pharmaunternehmen *GlaxoSmithKline* im Jahr 2010 die Resultate eines Antimalaria-Screenings von etwa 2 Millionen Substanzen aus der firmeneigenen Substanzbibliothek.⁷² Von den über 13500 antiplasmodial wirksamen Verbindungen werden neben den Strukturformeln auch pharmakologisch relevante Parameter wie Toxizität oder eine hypothetische Zielstruktur angegeben. Eine weitere, bemerkenswerte Initiative ist die „Malaria Box“, eine Sammlung von 400 antiplasmodial aktiven Substanzen, die die MMV interessierten Forschungseinrichtungen kostenfrei zur Verfügung stellt.[‡]

1.1.3 Weitere Strategien zur Kontrolle und Prophylaxe von Malaria

Zur Chemoprophylaxe der Malaria und als Notfallmedikation[§] stehen einige Wirkstoffe zur Verfügung. Diese sind aber meist nur für wohlhabende Reisende aus Industrieländern bezahlbar. Aus diesem Grund und wegen der unzureichenden Infrastruktur sind sie jedoch nicht für die Bevölkerung von Endemiegebieten zugänglich.⁷³ Da keines der klinisch angewendeten Medikamente eine Infektion mit Plasmodien verhindern kann, ist anstatt von Prophylaxe eher von einer Suppressionstherapie zu sprechen.^{11,74} Um besonders gefährdete Personengruppen wie Kleinkinder und Schwangere in Gebieten mit hoher Malaria-Prävalenz zu schützen, wird von der WHO eine intervallartige präventive Behandlung (IPT^{**}) unabhängig vom Vorliegen einer Infektion empfohlen. Für diesen Zweck eignet sich zur Zeit aus Gründen der langen Plasmahalbwertszeit, des günstigen Nutzen-Risiko-Verhältnisses und der einmaligen Verabreichung nur die Kombination Sulfadoxin/Pyrimethamin.¹⁶

* Beispielsweise ist die Entwicklung von Fosmidomycin/Clindamycin (siehe Abschnitt 1.5) nicht aufgeführt.

† Auf die Kombination Fosmidomycin/Piperaquin (Phase IIa) wird ebenfalls in Abschnitt 1.5 eingegangen.

‡ <http://www.mmv.org/achievements-challenges/how-we-make-difference/targeting-eradication>

§ <http://www.mmv.org/malariabox>.

§ z. B. Artemether/Lumefantrin, Atovaquon/Proguanil oder Chinin mit Doxycyclin oder Clindamycin.¹⁶

** IPTp/IPTi = intermittent preventive treatment in pregnancy / for infants.

Bisher ist noch kein Impfstoff gegen Malaria verfügbar. Mit RTS,S/AS01 befindet sich seit 2009 ein Produkt in klinischen Phase III-Untersuchungen, das den parasitären Befall der Leberzellen und damit eine Infektion unterbindet.^{75,76} Erste Studienergebnisse zeigten bei Kindern im Alter von 5–17 Monaten eine Halbierung der Malariafälle während der ersten 12 Monate nach Impfung mit RTS,S/AS01.⁷⁷ Die Zulassung des Impfstoffs ist für 2012 geplant.⁷⁸ Impfstoffe gegen Blutstadien können ähnlich einer natürlich erworbenen Immunität nicht die Infektion verhindern, aber die Parasitämie eindämmen. Derzeit werden in klinischer Phase II ausgewählte Vertreter dieser Klasse untersucht.^{75,78,79} Eine weitere Zukunftsperspektive könnten Impfstoffe bieten, die auch gegen geschlechtliche Parasitenstadien wirken und so die Übertragung der Malaria einschränken können.^{75,80}

Aufgrund des Mangels an Impfstoffen und der zunehmend problematischen Chemotherapie ist die Expositionsprophylaxe für die Kontrolle und Bekämpfung der Malaria umso wichtiger.^{75,78} Die Gefahr einer Plasmodien-Infektion kann durch verschiedene Maßnahmen der Vektorabwehr verringert werden. Dazu gehören das Schlafen in klimatisierten Räumen und der Gebrauch von mit Pyrethroiden (z. B. **Permethrin**, **Abb. 11**) imprägnierten Moskitonetzen. Auch tagsüber kann durch Anwendung von Repellentien wie **DEET** oder **Icaridin** (**Abb. 11**) und das Tragen langer Kleidung die Gefahr von Insektenstichen signifikant verringert werden. In Hochrisikogebieten sind diese Maßnahmen eine notwendige Ergänzung zur Chemoprophylaxe.^{74,81}

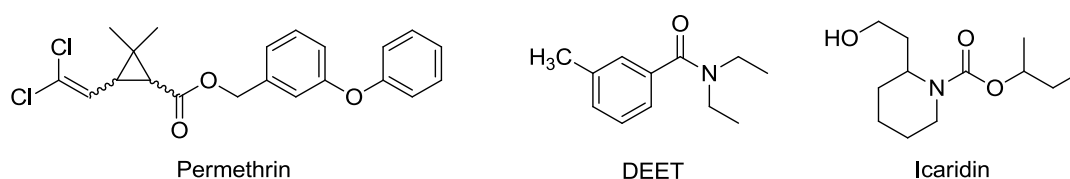


Abb. 11: Strukturformeln insektizider und repellenter Wirkstoffe.

1.2 Der Apikoplast als Zielstruktur für antiplasmodiale Wirkstoffe

In den 1990er Jahren wurden neue plasmodiale Zellstrukturen entdeckt, deren Funktionen noch weitgehend unbekannt sind. Dazu gehört der Apikoplast, dessen Name sich aus seinem Vorkommen in den *Apikomplexa* und seinem *plastidischen* Charakter ableitet.⁸² Apikoplasten sind nicht-photosynthetisch aktive Plastide innerhalb einer eukaryotischen Zelle.^{83,84} Als Herkunftstheorie des Apikoplasten wird die sekundäre Endosymbiose mit einer Rotalge diskutiert, der Ursprung der Organelle bleibt bisher allerdings unbekannt.⁸⁵ Die Entstehungstheorie wird daraus abgeleitet, dass der Apikoplast mehrere – meist vier – Membranen besitzt, welche auf die ursprünglichen Membranen der pro- und eukaryotischen Vorläufer sowie die durch Endosymbiose entstandenen Membranen zurückgeführt werden (**Abb. 12**).^{10,86} Auf dem Apikoplast-Genom sind etwa 50 Proteine für die Selbstreplikation kodiert.⁸⁶⁻⁸⁸ Über 500 Proteine für metabolische Funktionen sind dagegen in der

plasmodialen DNA kodiert und werden mit Hilfe eines *N*-terminalen Signalpeptids posttranslational in den Apikoplasten importiert.^{70,85-87} Die Organelle vermehrt sich durch Mitose und wird bei Teilung der Wirtszelle auf die Tochterzellen verteilt, nach Verlust kann sie nicht neu gebildet werden.^{86,88}

Apikoplasten übernehmen eine Reihe von metabolischen Funktionen und sind für Apikomplexa wie den Malaria-Erreger *P. falciparum* oder den Toxoplasmose-Erreger *Toxoplasma gondii* überlebenswichtig. Während die Apikoplast-Funktionen für die Entwicklung von *P. falciparum* in Leber- und asexuellen Blutstadien essenziell sind, ist noch nicht geklärt, ob dies auch für die geschlechtlichen Entwicklungsstadien zutrifft.⁸⁸ Die Rolle der verschiedenen Stoffwechselwege in Bezug auf die einzelnen Entwicklungsstadien konnte bisher noch nicht vollständig aufgeklärt werden.^{89,90}

McFadden, Roos und Mitarbeiter vermuten, dass der Erreger für die Invasion in neue Wirtszellen spezifische Biosyntheseprodukte des Apikoplasten benötigt.⁹¹ Am Beispiel der Fettsäure-Biosynthese konnte gezeigt werden, dass diese nur im späten Leberstadium von *P. falciparum* essenziell ist.⁹⁰ Kürzlich berichteten Haussig *et al.*, dass in *P. berghei*-Leberstadien die Entwicklung von Merozoiten durch gezielte Inaktivierung eines *Plasmodium*-spezifischen Apikoplast-Proteins (PALM)* gehemmt werden kann, während Blut- und Mückenstadien unbeeinflusst bleiben.⁹² Im Tiermodell wurde gezeigt, dass nach einer vorausgegangenen Infektion mit PALM-defizienten (*palm*⁻) Plasmodien die Entwicklung von Blutstadien aus erneut eingetragenen Sporozoiten verzögert oder verhindert wird. Nach einer künstlichen Infektion mit *palm*⁻-Parasiten waren 6 von 7 Versuchstieren über 100 Tage gegen Reinfektion geschützt, womit sich ein interessanter Ansatz für die Impfstoffentwicklung ergibt.

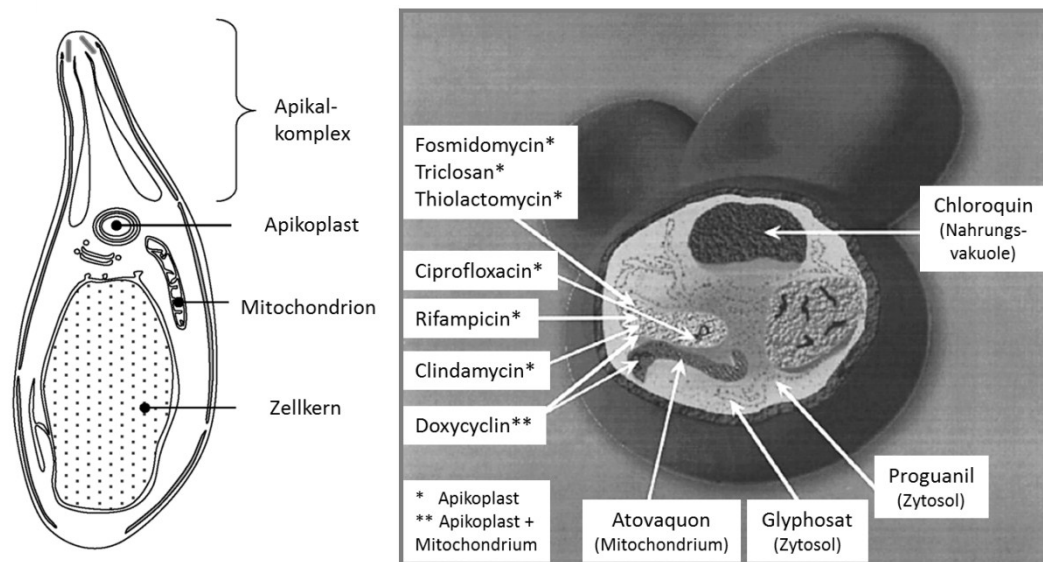


Abb. 12: Links: schematischer Aufbau von *P. falciparum* (modifiziert nach Botté, 2011⁹³). Rechts: Antiplasmodiale Wirkstoffe und ihre Zielstrukturen in parasitären subzellulären Kompartimenten, dargestellt in einem aufgeschnittenen, infizierten Erythrozyten (modifiziert nach Ralph, 2001⁸³).

* PALM = *Plasmodium*-specific apicoplast protein for liver merozoite formation.

Die Stoffwechselwege des Apikoplasten sind prokaryotischer Natur und unterscheiden sich damit grundsätzlich von denen der eukaryotischen Wirtszelle.^{83,94} Schon vor der Entdeckung des Apikoplasten beobachtete man die antiparasitäre Wirkung verschiedener Antibiotika, deren Wirkmechanismus durch die Existenz der genannten Stoffwechselwege erklärbar ist. Die Enzyme Apikoplast-spezifischer Prozesse sind aussichtsreiche Angriffspunkte für die Entwicklung neuer antiparasitärer Wirkstoffe (**Abb. 12**).⁹⁵

Klassische Antibiotika (**Abb. 13**) wirken durch Eingriff in die plastidische prokaryotische DNA-Replikation (z. B. **Ciprofloxacin** als Gyrasehemmer), Transkription (z. B. **Rifampicin** als RNA-Polymerasehemmer) und Translation (beispielsweise durch Tetracycline wie **Doxycyclin**, Makrolide wie **Azithromycin**, Lincosamide wie **Clindamycin** oder das Breitbandantibiotikum **Chloramphenicol**).^{9,70,96}

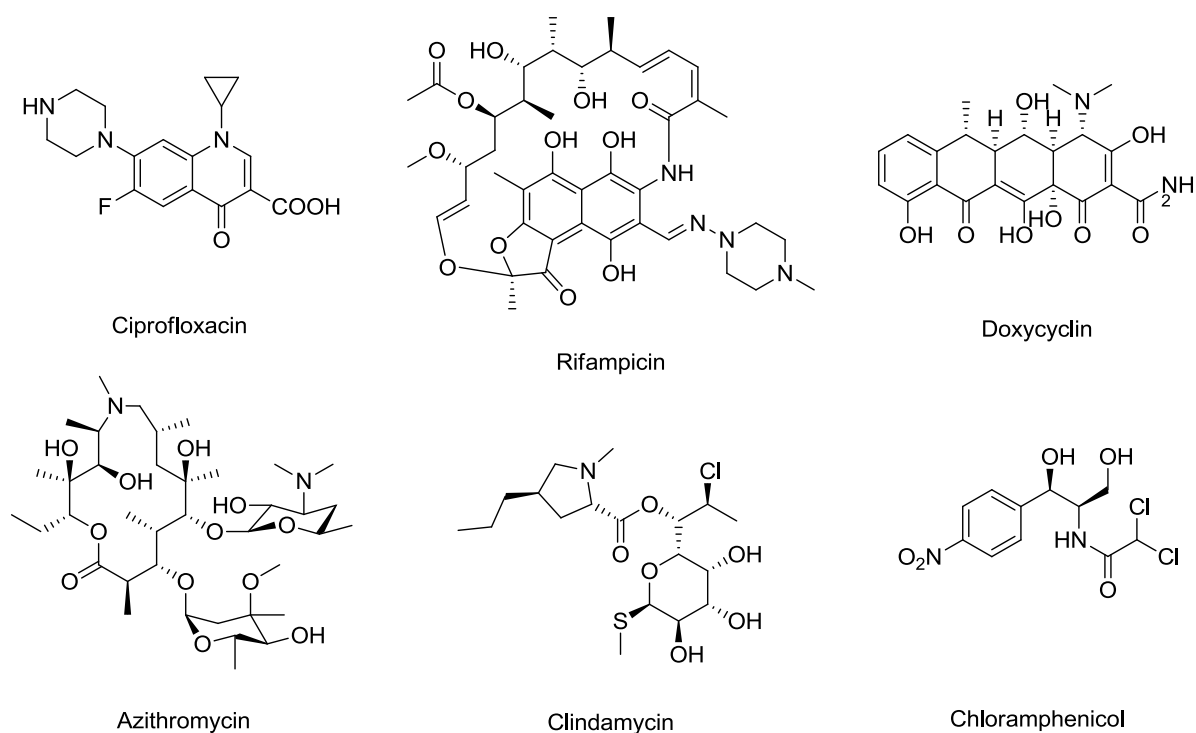


Abb. 13: Strukturformeln verschiedener Antibiotika mit antiplasmodialer Aktivität.

Bei den meisten Antibiotika tritt die Wirkung mit einer zeitlichen Verzögerung ein, die als „delayed kill“- oder „delayed death“-Effekt bezeichnet wird.^{70,97} Im ersten, intrazellulären Vermehrungszyklus bleibt das Parasitenwachstum zunächst unbeeinflusst. Die Erreger sterben erst innerhalb des zweiten Vermehrungszyklus ab, selbst in Abwesenheit von Antibiotika.* Der neuen Parasitengeneration fehlt vermutlich die Fähigkeit, essenzielle Proteine in den Apikoplasten zu importieren. Der Proteintransport des Apikoplasten gilt daher auch als Zielstruktur für neue Wirkstoffe.^{9,89} Der verzögerte Eintritt ihrer antiplasmodialen Wirkung macht Antibiotika für die Behandlung akuter

* Dieser Effekt wird auch bei einer kurzen Behandlungsdauer (2 Stunden) festgestellt, die nur während des ersten Zyklus erfolgt.⁹⁷

Malaria ungeeignet. Deshalb werden sie entweder in Kombination mit schnell wirkenden Mitteln (meist Chinin oder Artesunat) oder aber zur Malariaphylaxe eingesetzt.^{9,11} Der Einsatz von Antibiotika als Kombinationspartner für schneller wirkende Antimalariamittel bietet den Vorteil, dass die Selektion resistenter Stämme vermieden werden kann: Antibiotika töten die Erreger ab, die durch den schneller, aber kürzer wirkenden Kombinationspartner aufgrund einer verringerten Sensitivität nicht erfasst werden.⁷⁰ Auch bakterielle Koinfektionen können bei der Malariatherapie durch eine derartige Wirkstoffkombination mitbehandelt werden. Entsprechendes gilt für bakterielle Infektionen, die aufgrund einer ähnlichen Symptomatik als komplizierte Malaria fehldiagnostiziert werden.^{70,98}

Substanzen, die nicht in die Selbstreplikation des Apikoplasten eingreifen, sondern die Enzyme seiner metabolischen Funktionen inhibieren, zeigen im Gegensatz zu den klassischen Antibiotika eine unmittelbare parasitenabtötende Wirkung. Durch die Inhibition von Biosynthesewegen werden der Apikoplast und damit auch der Parasit von der Versorgung mit essenziellen Metaboliten abgeschnitten.⁸⁹ Zu den metabolischen Prozessen des Apikoplasten, die als Angriffspunkte für antiparasitäre Wirkstoffe genutzt werden könnten, gehören die Biosynthesen von Fettsäuren, Häm und Isoprenoid-Vorläufern.^{*, 9,91} **Triclosan** und **Thiolactomycin** sind Inhibitoren der Typ II-Fettsäurebiosynthese (**Abb. 14**). Das *in vitro* und *in vivo* antiplasmodial aktive Triclosan inhibiert die Enoyl-ACP-Reduktase, während die Zielstruktur des moderat antiplasmodial wirksamen Antibiotikums Thiolactomycins die β -Ketoacyl-ACP-Synthase ist.⁹ Für den nur teilweise im Apikoplast lokalisierten Häm-Biosyntheseweg sind bisher keine spezifischen Inhibitoren bekannt.⁹⁵

Yeh et al. zeigten kürzlich, dass während des erythrozytären Plasmodienstadiums die essenzielle Funktion des Apikoplasten in der Isoprenoid-Biosynthese besteht.⁸⁸ Plasmodien, denen aufgrund von Antibiotika-Behandlung der Apikoplast und damit die Metaboliten Apikoplast-lokalisierter Biosynthesen fehlen, genügt zum Überleben eine externe Versorgung mit Isopentenylidiphosphat.

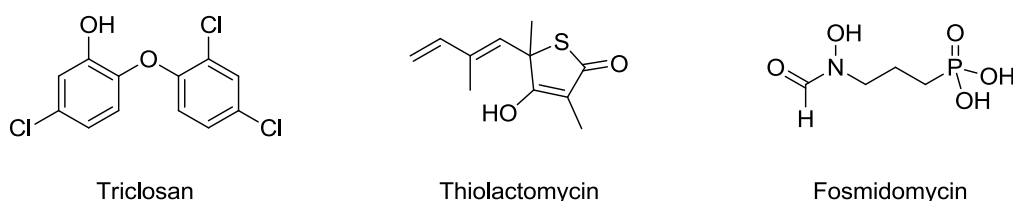


Abb. 14: Inhibitoren der Fettsäure- oder Isoprenoid-Biosynthese des Apikoplasten.

Der einzige Apikoplast-spezifische Wirkstoff, der sich derzeit in der klinischen Entwicklung (Phase II) als Antimalariamittel befindet, ist der Isoprenoid-Biosynthese-Inhibitor **Fosmidomycin** (**Abb. 14**).^{34,91} Die Entdeckung, der Wirkmechanismus und die Weiterentwicklung dieses Wirkstoffs werden in den folgenden Abschnitten vorgestellt.

* Auch die im Apikoplast lokalisierte Peptid-Deformylierung wird als potenzielle Zielstruktur angesehen.⁹ Ein weiterer im Apikoplast lokalisierter Metabolismus ist die Synthese von Eisen-Schwefel-Clustern.⁹¹ Das in **Abb. 12** gezeigte Herbizid Glyphosat greift in die Biosynthese aromatischer Aminosäuren über den Shikimat-Weg ein, der ursprünglich im Apikoplast vermutet wurde, aber im Zytoplast lokalisiert ist.⁸³

1.3 Die Mevalonat-unabhängige Isoprenoid-Biosynthese als Angriffspunkt für neue Malariatherapeutika

Isoprenoide leiten sich vom Grundbaustein **Isopren** ab, bilden mit über 50.000 Mitgliedern eine der größten und strukturell vielseitigsten Naturstoffklassen und üben in allen Lebensformen essenzielle biologische Funktionen aus.⁹⁹ Bekannte Vertreter der Isoprenoide sind neben dem bereits vorgestellten Artemisinin z. B. **Retinol** (Vitamin A₁), **Ubichinone**, Steroide wie **Cholesterol** und das in der Krebstherapie eingesetzte **Paclitaxel** (Taxol®) (Abb. 15).¹⁰⁰

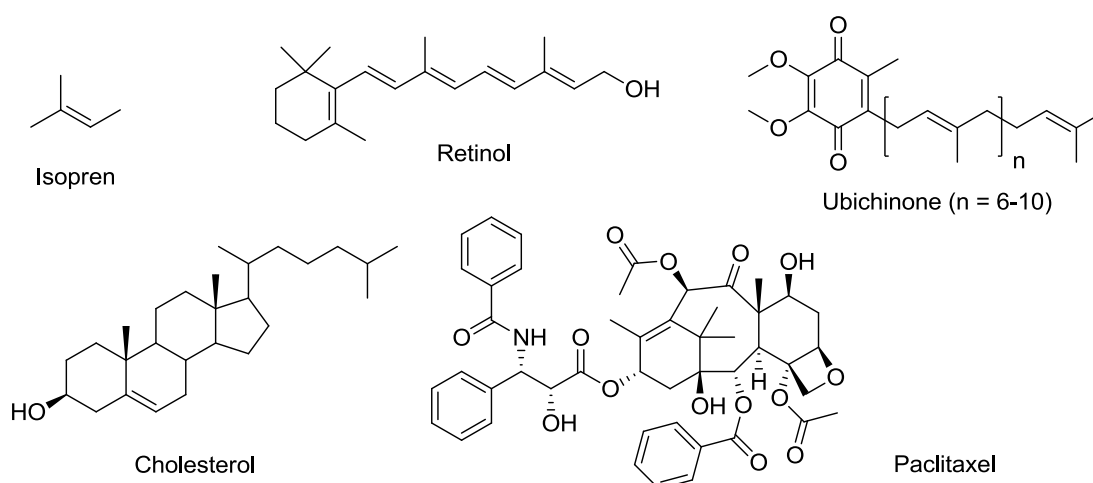


Abb. 15: Beispiele für verschiedene Klassen von Isoprenoiden.

Isoprenoide sind an verschiedensten biologischen Prozessen wie Elektronentransport, Signaltransduktion, Zellwandbiosynthese und Photosynthese beteiligt, weiterhin dienen sie in Pflanzen als Membranstabilisatoren, Wachstums- und Entwicklungsregulatoren und als Duft- oder Abwehrstoffe.^{99,101,102} Universelle Vorläufer aller Isoprenoide sind die C₅-Bausteine **Isopentenylidiphosphat (IPP)** und das Isomer **Dimethylallyldiphosphat (DMAPP)**, die als aktiviertes Isopren betrachtet werden können.¹⁰³ Lange Zeit wurde angenommen, dass die Biosynthese von IPP und DMAPP in allen Organismen ausschließlich über den Mevalonat (MVA)-Weg verläuft, der in den 1950er Jahren von *Bloch*, *Lynen* und *Conforth* aufgeklärt wurde.¹⁰³⁻¹⁰⁵

Mit fortschreitenden Untersuchungen zur Biosynthese von Terpenoiden in Pflanzen und Mikroorganismen stieg die Anzahl der experimentellen Daten, die nicht mit den Erkenntnissen über den MVA-Biosyntheseweg vereinbar waren. So konnte beispielsweise bei *Escherichia coli* kein Einbau von ¹³C-markiertem Acetat in Ubichinon festgestellt werden.¹⁰⁶ Derartige Beobachtungen führten zur Annahme eines weiteren Isoprenoid-Biosynthesewegs.^{100,101,107} Dieser Mevalonat-unabhängige Weg wurde 1993 von *Rohmer und Mitarbeitern* entdeckt. Durch ¹³C-Markierungsexperimente an Polyterpenoiden in *E. coli* und anderen Bakterien konnte der Ursprung der Isopren-Kohlenstoffatome zurückverfolgt werden.¹⁰⁸⁻¹¹⁰ Im Gegensatz zum MVA-Weg, der nur von dem C₂-Grundkörper Acetat ausgeht, beginnt die Mevalonat-unabhängige Biosynthese mit

dem C₂-Baustein **Pyruvat** und dem C₃-Baustein **Glycerinaldehyd-3-phosphat**.¹⁰⁹ In Anlehnung an die Intermediate wird der Biosyntheseweg als **DOXP** (1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat)- bzw. **MEP** (2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat)-Weg bezeichnet, zu Ehren des Entdeckers auch als *Rohmer-Weg*.^{100,111,112} Bis 2002 wurde der MEP-Weg vollständig aufgeklärt.^{102,112}

Der erste Schritt des MEP-Wegs besteht in einer Acyloin-Kondensation von Pyruvat* und D-Glycerinaldehyd-3-phosphat zu DOXP (**Abb. 17**).^{99,112-116} Die Thiaminpyrophosphat-abhängige Reaktion wird durch die **1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase (DOXP-Synthase, Dxs)** katalysiert. DOXP ist nicht nur IPP/DMAPP-Vorläufer, sondern auch Intermediat der Biosynthese der Vitamine B1 und B6.^{112,115,117} Dxs wird durch **Ketoclomazon**, einen aktiven Metaboliten des Herbizids **Clomazon**, inhibiert.¹¹⁸ Ein weiterer Dxs-Inhibitor ist Fluorpyruvat.¹¹⁹ *Smith et al.* zeigten die selektive Dxs-Inhibition durch Alkylacetylphosphonate, die als Pyruvat-Mimetika wirken.¹²⁰

Der zweite Schritt des MEP-Wegs wird durch die **DOXP-Reduktoisomerase** (auch **Dxr**, **IspC** oder **MEP-Synthase** genannt) katalysiert.¹²¹ Er führt von DOXP über eine intramolekulare Umlagerung mit anschließender Reduktion zu MEP und damit zum Aufbau des Isoprenengerüsts (**Abb. 16**). Dxr benötigt als Kofaktoren NADPH[†] und ein zweiwertiges Metallkation[‡] (Mn²⁺, Mg²⁺ oder Co²⁺).^{123,124} Die natürlich vorkommenden Antibiotika **Fosmidomycin** (Fos) und **FR900098** (FR) gehören zu den ersten bekannten Inhibitoren des Enzyms (**Abb. 17**).^{112,123,125}

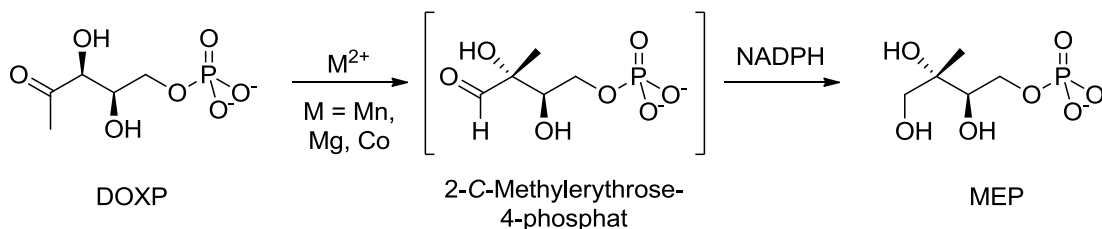


Abb. 16: Dxr-katalysierte Umsetzung von DOXP zu MEP (modifiziert nach *Proteau, 2004*¹²¹).

In drei weiteren Umsetzungen durch die Enzyme **IspD-IspF** wird MEP durch Cytidintriphosphat zu **CDP-ME**[§] aktiviert, durch Adenosintriphosphat zu **CDP-MEP**^{**} phosphoryliert und in ein cyclisches, zweifach hydroxyliertes Diphosphat (**MEcPP**)^{††} umgesetzt.^{126,127} Durch **IspG**- und **IspH**-katalysierte^{‡‡} reduktive Ringöffnung und zweifache Eliminierung von Wasser werden über die Zwischenstufe **HMBPP**^{§§} schließlich IPP und DMAPP gleichzeitig im Verhältnis von etwa 5:1 gebildet.^{102,112} Diesem Schritt ist oft noch eine enzymatisch katalysierte Isomerisierung der Doppelbindung nachgeschaltet, die aber meist nicht essenziell ist.^{99,128}

* Pyruvat nimmt nach Decarboxylierung als Thiamin-aktivierter Acetaldehyd an der Reaktion teil.¹⁰⁸

† NADPH = Nicotinamid-adeninucleotidphosphat (reduzierte Form).

‡ Mit Ca²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Ni²⁺ und Zn²⁺ findet kein Umsatz statt.¹²²

§ CDP-ME = 4-Diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol.

** CDP-MEP = 4-Diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol-2-phosphat.

†† MEcPP = 2-C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat.

‡‡ IspG und IspH sind oxidationsempfindliche, [4Fe-4S]-Cluster enthaltende Proteine.^{99,126}

§§ HMBPP = (E)-4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyldiphosphat.

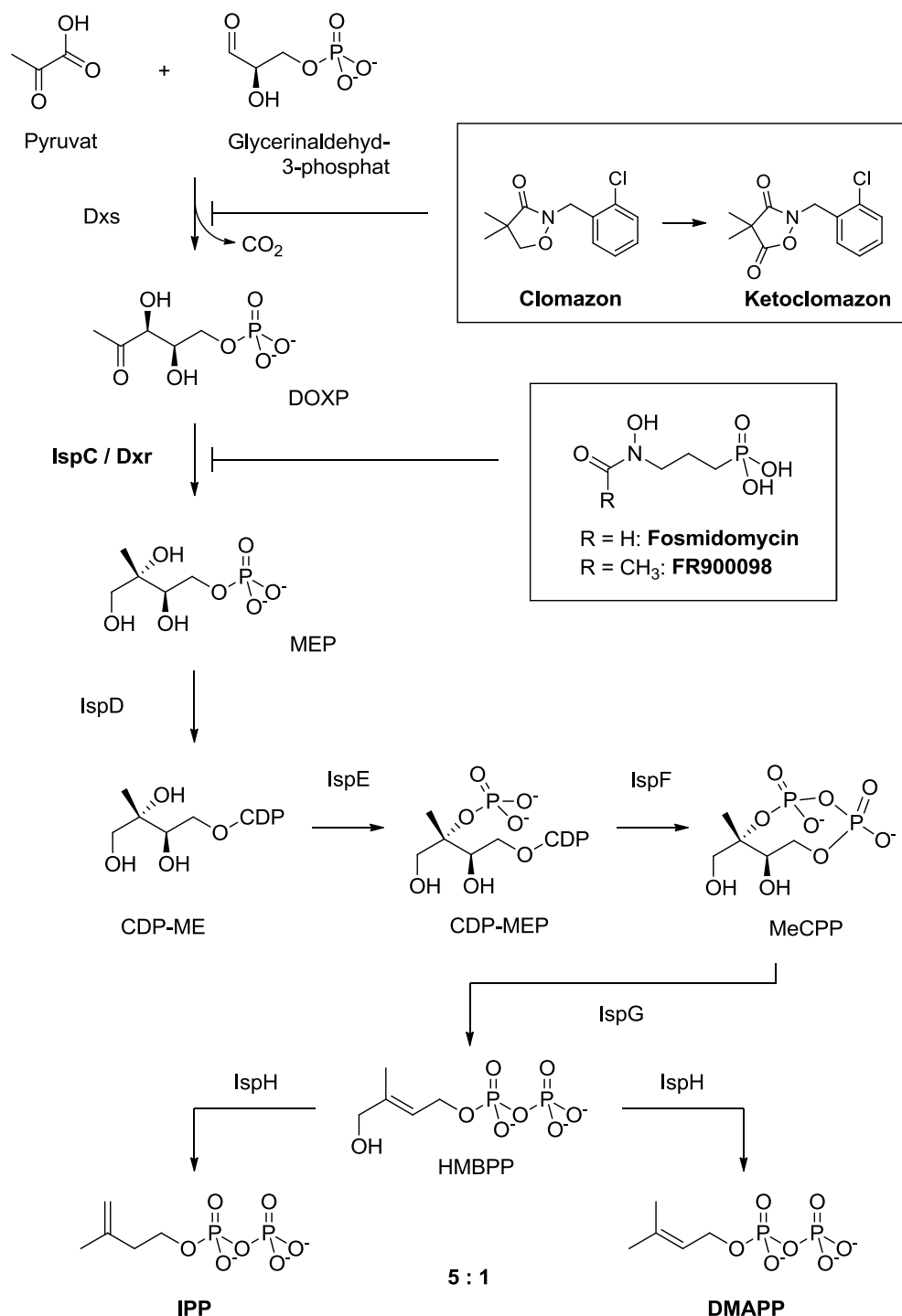


Abb. 17: Mevalonat-unabhängige Isoprenoid-Biosynthese (modifiziert nach Wiesner, 2007¹¹²).

Der Dxr-Inhibitor Fosmidomycin ist bisher der einzige Inhibitor des MEP-Wegs, der sich in fortgeschrittener Entwicklung als Arzneistoff befindet.¹²⁰ Inhibitoren der Enzyme *IspD-IspH* wurden erst in den letzten Jahren gefunden. *Diederich und Mitarbeiter* identifizierten in einem Hochdurchsatzscreening ein Hydroxytriazolopyrimidin als allosterischen *IspD*-Inhibitor, der das Enzym im submikromolaren Konzentrationsbereich inhibiert und eine gute herbizide Aktivität aufweist.¹²⁹ In einem strukturbasierten Ansatz entwickelte die Arbeitsgruppe nichtphosphorylierte

Cytidin-Analoga, die das Enzym *IspE* mit IC_{50} -Werten im niedrigen mikromolaren Konzentrationsbereich inhibieren.¹³⁰⁻¹³² Auf der Grundlage von Kristallstrukturen und Molecular Modelling-Simulationen wurden Cytosin-Derivate und -Analoga auch als *IspF*-Inhibitoren entwickelt.^{133,134} Ein Hochdurchsatzscreening gegenüber *IspF* führte zu einer Thiazolopyrimidin-Leitstruktur mit noch höherem Potenzial.¹³⁵ Die Reaktionsmechanismen von *IspG* und *IspH* wurden erst kürzlich durch *Oldfield und Mitarbeiter* aufgeklärt.^{136,137} Die beiden Biosynthesestufen von MeCPP über HMBPP zu IPP/DMAPP verlaufen diesen Studien zufolge über vergleichbare organometallische Zwischenstufen. Propargyldiphosphat bindet jeweils substratanalog und inhibiert sowohl *IspG* als auch *IspH* im submikromolaren Konzentrationsbereich.

Während der MVA-Weg bei der Mehrheit der Eukaryoten (u. a. in Mensch und Säugetier), in wenigen Bakterien und Parasiten sowie bei Pilzen auftritt, verläuft die Isoprenoid-Biosynthese der meisten Bakterien (**Tabelle 2**), Algen und Apikomplexa über den MEP-Weg. In höheren Pflanzen kommt sowohl der MEP-Weg in den Chloroplasten als auch der MVA-Weg im Zytosol vor.^{102,113,138,139}

Mikroorganismus	Klasse	Infektion/Krankheit
Gram-negative Kokken		
<i>Neisseria spp.</i>	Betaproteobacteria	Meningitis, Gonorrhoe
Gram-positive Stäbchen		
<i>Corynebacterium diphtheria</i>	Actinobacteria	Diphtherie
<i>Mycobacterium spp.</i>	Actinobacteria	Tuberkulose, Lepra
<i>Bacillus anthracis</i>	Bacilli	Milzbrand
<i>Clostridium spp.</i>	Clostridia	Gasbrand, Colitis, Botulismus, Tetanus
Gram-negative Stäbchen		
<i>Bordetella pertussis</i>	Betaproteobacteria	Keuchhusten
<i>Escherichia coli</i>	Gammaproteobacteria	Darmerkrankungen, Harnwegsinfektionen
<i>Salmonella spp.</i>	Gammaproteobacteria	Gastroenteritis, Typhus
<i>Yersinia pestis</i>	Gammaproteobacteria	Lungen- und Beulenpest
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Gammaproteobacteria	Harn- und Atemwegsinfektionen
<i>Shigella dysenteriae</i>	Gammaproteobacteria	Bakterienruhr
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gammaproteobacteria	Wundinfektionen, Sepsis, Lungenentzündung
<i>Haemophilus influenzae</i>	Gammaproteobacteria	Atemwegserkrankungen, Meningitis
<i>Legionella pneumophila</i>	Gammaproteobacteria	Legionärskrankheit
<i>Vibrio cholerae</i>	Gammaproteobacteria	Cholera
<i>Helicobacter pylori</i>	Epsilonproteobacteria	Magenerkrankungen
Chlamydien		
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Chlamydiae	Infektionen der Schleimhäute im Augen-, Atemwegs- und Genitalbereich

Tabelle 2: Beispiele humanpathogener Bakterien, die für den MEP-Weg codierende Gene besitzen (Auszug aus *Testa*, 2003¹⁴⁰).

Die Tatsache, dass im Menschen ausschließlich der MVA-Weg zur Isoprenoid-Biosynthese vorliegt, für die Mehrheit der pathogenen Mikroorganismen jedoch der MEP-Weg als alleinige Isoprenoid-

Quelle überlebenswichtig ist,^{*} macht die Enzyme des MEP-Wegs zu aussichtsreichen Angriffspunkten für neue antibakterielle, antiparasitäre und herbizide Wirkstoffe. Da die Enzyme des MEP-Wegs in verschiedenen Spezies hochkonserviert vorliegen und keine Homologie zu menschlichen Enzymen zeigen, sollten ihre Inhibitoren ein breites Wirkungsspektrum bei geringer Toxizität zeigen.^{102,116,141}

An *P. falciparum* wurden bereits vor der Entdeckung des MEP-Wegs Studien über die Isoprenoid-Biosynthese durchgeführt.¹¹² Dabei wurde festgestellt, dass Inhibitoren der am MVA-Weg beteiligten HMG-CoA-Reduktase das *in vitro*-Wachstum von *P. falciparum* nur in hohen, pharmakologisch nicht relevanten Konzentrationen hemmten, so dass die Anwesenheit eines anderen Biosynthesewegs vermutet wurde.^{125,142} Jomaa und Mitarbeiter konnten 1999 die plasmodiale Dxr klonieren und in erythrozytären Parasitenstadien exprimieren.¹²⁵ Die Aktivität rekombinanter *P. falciparum*-Dxr (= *PfDxr*) wird durch Fosmidomycin ($IC_{50} = 35$ nM) und FR900098 ($IC_{50} = 17$ nM) effektiv gehemmt.¹²⁵ Abhängig von Parasitenstamm sowie Kultivierungs- und Testbedingungen wirkt Fosmidomycin mit IC_{50} -Werten im Bereich von 70–170 nM wachstumshemmend auf verschiedene *P. falciparum*-Stämme,¹⁴³ FR900098 zeigt vergleichbare IC_{50} -Werte (90–170 nM).¹²⁵ Bereits 2004 hatten Cassera *et al.* die meisten Intermediate des MEP-Wegs isoliert und gezeigt, dass der MEP-Weg in allen intraerythrozytären Stadien von *P. falciparum* aktiv ist.¹⁴⁴ Odom und Van Voorhis bestätigten, dass die Dxr für intraerythrozytäre Entwicklungsstadien von *P. falciparum* überlebenswichtig ist.¹⁴¹

Seto und Mitarbeiter exprimierten Dxr in *E. coli* und konnten an Knockout-Mutanten zeigen, dass dieses Enzym auch essenziell für den bakteriellen Organismus ist.^{122,124,145} Fosmidomycin und FR900098 erwiesen sich als starke und spezifische Inhibitoren rekombinanter *E. coli*-Dxr (*EcDxr*).^{†,112,123} Da der Metabolismus von *E. coli* gut bekannt ist, diente das Bakterium als Modell zur mechanistischen Aufklärung des MEP-Wegs und zur strukturbasierten Entwicklung neuer Dxr-Inhibitoren.^{102,116} Die Primärstruktur homologer Dxr-Enzyme liegt hochkonserviert vor, so dass bei allen derselbe katalytische Mechanismus angenommen wird.¹¹² Die Annahme, dass ähnliche Aminosäuresequenzen vergleichbare Enzymstrukturen ausbilden, wurde für die Erstellung dreidimensionaler *PfDxr*-Modelle basierend auf Strukturen homologer Enzyme zugrunde gelegt.^{146,147}

Wie *P. falciparum* und *E. coli* ist auch *Mycobacterium tuberculosis* auf die Isoprenoid-Biosynthese über den MEP-Weg angewiesen.^{148,149} Schätzungen der WHO zufolge[‡] ist ein Drittel der Weltbevölkerung mit dem Tuberkulose-Erreger infiziert, der im Jahr 2009 9,4 Millionen Neuinfektionen verursachte und fast 1,7 Millionen Todesopfer forderte.¹⁵⁰ Besonders in Verbindung mit einer HIV-Infektion ist Tuberkulose problematisch, da das Virus die Entwicklung aktiver Tuberkulose aus einer latenten Infektion begünstigt und so zu 15% der Tuberkuloseausbrüche führt.

^{*} Ungeklärt ist bisher noch, ob Erreger eventuell das in Wirtszellen über den MVA-Weg synthetisierte IPP bzw. DMAPP nutzen können, oder ob sie ausschließlich vom eigenen MEP-Weg abhängig sind.¹⁰¹

[†] Fosmidomycin: IC_{50} (*EcDxr*) = 20–32 nM, FR 900098: IC_{50} (*EcDxr*) = 28 nM.

[‡] <http://www.who.org>.

Andererseits beschleunigt eine Tuberkulose-Infektion die HIV-Replikation und damit die Entwicklung von AIDS, so dass 25% der HIV/AIDS-assoziierten Todesfälle durch Tuberkulose bedingt sind.¹⁵¹ Die Behandlung der Tuberkulose ist langwierig und wird durch multiresistente Erregerstämme beeinträchtigt.^{148,152} Therapie erster Wahl ist eine Kombination aus Isoniazid und Rifampicin, die sechs Monate gegeben und in den ersten zwei Monaten noch durch Pyrazinamid und Ethambutol ergänzt wird. Infektionen mit multiresistenten Erregern erfordern eine längere Therapie mit oft weniger effizienten und toxischeren Wirkstoffen.^{151,153} Die globale Entwicklungs-Pipeline ist in Anbetracht der Notwendigkeit effektiverer Tuberkulosetherapien unzureichend: In klinischer Entwicklung sind neben vier bekannten Arzneistoffen derzeit nur sechs Wirkstoffe, die neuartige chemische Strukturen repräsentieren und speziell gegen Tuberkulose entwickelt wurden.¹⁵³ Auch bei der Tuberkulosetherapie gilt der MEP-Weg als vielversprechender Angriffspunkt für neue Wirkstoffe.¹⁵² *M. tuberculosis* besitzt alle sieben Enzyme des MEP-Wegs, die mykobakterielle DOXP-Reduktoisomerase (=MtDxr) zeigt 39 %ige Sequenzidentität mit der EcDxr.¹⁴⁸

Obwohl Fosmidomycin isolierte MtDxr in einem IC₅₀-Bereich von 0,08–0,31 µM inhibiert,^{*} sind Mykobakterien gegenüber dem Wirkstoff nicht empfindlich.^{150,154} Untersuchungen von *Brown* und *Parish* führten zu dem Ergebnis, dass die Resistenz auf eine fehlende Aufnahme der Substanz in die Zelle zurückgeführt werden kann, andere Mechanismen wie Efflux oder Inaktivierung konnten ausgeschlossen werden.¹⁴⁹ Die mykobakterielle Zellwand stellt für die meisten Antibiotika eine schwer zu durchdringende Barriere dar, die meist nur mit Hilfe von aktiven Transportsystemen überwunden werden kann.¹⁵⁵ Dies gilt insbesondere für hydrophile Wirkstoffe wie Fosmidomycin. In *E. coli* erfolgt der Fosmidomycin-Transport durch die Zellmembran ins Zytosol mittels eines Glycerol-3-phosphat-Transporters (GlpT), dessen Abwesenheit in *E. coli*-Mutanten zur Fosmidomycin-Resistenz führt.¹⁵⁶ In *M. tuberculosis* wurden keine für GlpT-ähnliche Proteine codierende Gene gefunden.¹⁵⁴

Untersuchungen von *Baumeister et al.* zeigen, dass *P. falciparum* eine Erhöhung der Plasmamembran-Permeabilität infizierter Erythrozyten induziert, so dass Fosmidomycin und FR900098 die erste Barriere auf dem Weg zum Zielenzym überwinden und in die Wirtszelle gelangen können.¹⁵⁷⁻¹⁵⁹ Bei nicht infizierten Erythrozyten und in *P. berghei*-infizierten Leberzellen sind diese als NPP (new permeability pathways) bezeichneten Aufnahmewege nicht vorhanden.¹⁵⁸ Die molekularen Mechanismen der NPP sind noch nicht bekannt, sie werden vom Parasiten wahrscheinlich für die Nährstoffzufuhr und Abfuhr von Abbauprodukten benötigt.¹⁵⁷ Die Fosmidomycin-Resistenz von *Toxoplasma gondii* konnte von *Nair et al.* auf das Fehlen eines Transportproteins in der parasitären Plasmamembran zurückgeführt werden, da transgene Toxoplasmen, die das *E. coli*-GlpT-Protein exprimieren, Fosmidomycin-sensitiv sind.⁶⁹ Weiteren Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe zufolge stellt weder die Membran der Wirtszelle noch die Apikoplast-Membran, sondern die Zellmembran von *T. gondii* die entscheidende Barriere für Fosmidomycin dar.⁶⁹ Eine kürzlich vorgestellte Untersuchung

* Für FR900098 wird ein IC₅₀-Wert von 0,16 µM gegenüber MtDxr angegeben.¹⁵⁰

an *Burkholderia cepacia* offenbarte die Ursache deren Fosmidomycin-Resistenz.¹⁶⁰ Diese Bakterien besitzen als einziges Transportsystem für Fosmidomycin einen Glycerol-3-Phosphat-Transporter, der allerdings nur durch Gabe von Glucose-6-Phosphat induziert werden kann. Die erhöhte Aufnahme des Wirkstoffs unter diesen Bedingungen wird aber durch die Hochregulierung einer Effluxpumpe kompensiert, wodurch sich insgesamt eine Fosmidomycin-Resistenz ergibt.

Außer von *E. coli*, *P. falciparum* und *M. tuberculosis* wurde die rekombinante Dxr weiterer Mikroorganismen (u. a. *Zymomonas mobilis*,¹²⁷ *Synechococcus leopoliensis*,¹⁶¹ *Streptomyces coelicolor*,¹⁶² *Pseudomonas aeruginosa*,¹⁶³ *Synechocystis sp.* PCC6803¹⁶⁴) und Pflanzen (z. B. *Menta x piperita*,¹⁶⁵ *Arabidopsis thaliana*,¹⁶⁶ *Zea mays*¹⁶⁷) durch Klonierung der entsprechenden Gene isoliert. **Abb. 18** zeigt einen Aminosäuresequenz-Vergleich der *PfDxr*, *EcDxr* und *MtDxr*.*

In Bakterien der human- und tierpathogenen Art *Brucella abortus* fand die Arbeitsgruppe von *Rodriguez-Concepcion* unter den Enzymen des MEP-Wegs anstelle von Dxr das DRL (Dxr-like)-Enzym. Dieses unterscheidet sich strukturell deutlich von Dxr, übt aber dieselbe Funktion aus und wird ebenfalls durch Fosmidomycin und FR900098 inhibiert.^{171,172}

<i>PfDxr</i>	1	MKKYIYIYFFITITITINDLVINNTSKCVSIERRKNAYINYGIGYNGPDNKITKSRCKRIKLCCKDLIDIGAICKPINV	80
<i>EcDxr</i>	1	MK-----	4
<i>MtDxr</i>	1	MTNSTD-----	15
<i>PfDxr</i>	81	AIFGSTGSIGTINALNIIRECNKIENVFNVKALYV-NKSVNELYEQAREFLPEYLCIHDKSVEELKELVKNIKDYKPIIL	159
<i>EcDxr</i>	5	TILGSTGSIGCSITLDVVRHN---PEHFRVVALVA-GKNVTRMVEQCLEFSRYAVMDDEASAKLLKTMLOQ-QGSRTVEVL	79
<i>MtDxr</i>	16	VVLGSTGSIGTQALQVIADN---PDRFEVVGLAAGGAHLDTLLRQRAQTGVNIAVADEHAAQRVGDIP-----Y	82
<i>PfDxr</i>	160	CGDEGMKEICSSNSIDKIVIGIDSFQGLYSTMYAIMNNKIVALANKESIVSAGFFLKLLNIHKNAKIIPVDSEHSAIFQ	239
<i>EcDxr</i>	80	SGQQAACDMAALEDVDQVMAAIVGAAGLLPTLAIRAGKTIILLANKESLVCGRLFMDAVKQSK-AQLLPVDSEHNAIFQ	158
<i>MtDxr</i>	83	HGSDAATRLVEQTEADVVLNALVGALGLRPTLAALKTGARLALANKESLVAGGSLVLRARPG---QIVPVDSEHSALAQ	159
<i>PfDxr</i>	240	CLDNNKVLKTKCLQDNFS---KINNINKIFLCSSGGPFQNLTMDELKNVISENALKHFKWKGKKITIDSATMMNKGLE	315
<i>EcDxr</i>	159	SLPQPI-----QHNLGYADLEQNGVVSILLTSGGGPFRETPLRDLATMPDQACRHPNWSMGRKISVDSATMMNKGLE	231
<i>MtDxr</i>	160	CLRGGT-----P-----DEVAKLVLTASGGPFGRWSAADLEHVTPEQAGAHPTWSMGPMNTLNSASLVNKGLE	222
<i>PfDxr</i>	316	VIETHFLFDVDYNDIEVIVHKECIHSCVEFIDKSVISQMYYPDMQIPILYSLTWPDRIKTNLKLPLDLAQVSTLIFHKPS	395
<i>EcDxr</i>	232	YIEARWLFNASASQMEVLIHPQSVIHSVMRYQDGSVLAQLGEPDMRTPIAHTMAWPNRVNSGVKPLDFCKLSALTFAAPD	311
<i>MtDxr</i>	223	VIETHLLFGIPYDRIDVVVHPQSIHSMVTFIDGSTIAQASFPDMKLPISLALGWPRRVSGAAAACDFHTASSWEFEPLD	302
<i>PfDxr</i>	396	LEHFFCIKLAYQAGIKGNFYPTVLNASNEIANNLFLNNKIKYFDISSIISQVLESFNSQKVSENSEDLMKQILQIHSWAK	475
<i>EcDxr</i>	312	YDRYPCLKLAMEAFEQQAATTALNAANEITVAFLAQQIRFTDIAALNLSVLEKMDMR--EPQCVD---DVLSDANAR	386
<i>MtDxr</i>	303	TDVFFAVELARQAGVAGGCMTAVYNAANEAAAAFLAGRIGFPAIVGIIADVLHAADQWAVEPATVD---DVLDAQRWAR	379
<i>PfDxr</i>	476	DKATDIYNKHNS-----	488
<i>EcDxr</i>	387	EVARKEVMRLAS-----	398
<i>MtDxr</i>	380	ERAQRAVSGMASVAIASTAKPGAAGRHAHLERS	413

Abb. 18: Sequenzvergleich der Dxr-Enzyme von *P. falciparum*, *E. coli* und *M. tuberculosis*.

* Erstellt mit der Software BLAST¹⁶⁸/COBALT¹⁶⁹ (www.ncbi.nlm.nih.gov), GenBank-Codes: AAD03739 (*PfDxr*), BAA77848 (*EcDxr*), CAA98375 (*MtDxr*).¹⁷⁰

1.4 Die DOXP-Reduktoisomerase (Dxr) als Target für Antimalariamittel

Dxr-Kristallstrukturen waren bis vor Kurzem nur von *E. coli*,¹⁷³⁻¹⁷⁷ *M. tuberculosis*,^{178,179} *Zymomonas mobilis*¹⁸⁰ und *Thermotoga maritima*¹⁸¹ bekannt. Da die instabile *P. falciparum*-Dxr lange Zeit nicht für Kristallisationsversuche zugänglich war,¹⁸² wurden 3D-Homologiemodelle des Enzyms zur Unterstützung der Entwicklung neuer Inhibitoren entwickelt.^{146,147} 2010 berichteten Umeda *et al.* schließlich über eine erfolgreiche Kristallisation der *Pf*Dxr in An- und Abwesenheit eines Inhibitors¹⁸³ und veröffentlichten im letzten Jahr die Ergebnisse von Kristallstrukturanalysen.¹⁸⁴

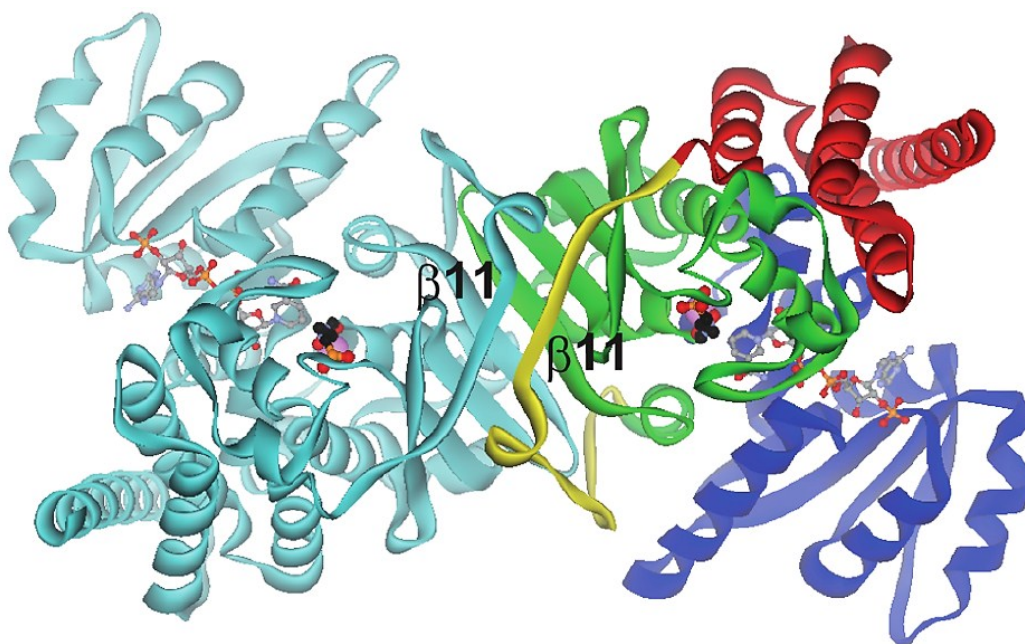


Abb. 19: Kristallstruktur des *Pf*Dxr-Dimers mit gebundenem Fosmidomycin und NADPH (C-Atome schwarz bzw. grau). Die linke Untereinheit ist hellblau eingefärbt, die andere gemäß folgendem Farbschema: NADPH-Bindungsdomäne – blau, katalytische Domäne – grün, Linker – gelb, C-terminale Domäne – rot (übernommen aus Umeda, 2011¹⁸⁴).

Die *Pf*Dxr hat eine Molekularmasse von etwa 47 kDa, enthält in jeder Untereinheit ein NADPH-Molekül und ein zweiwertiges Metallkation und liegt in der aktiven Form (Lys75–Ser488) als Homodimer vor (**Abb. 19**). Ein Monomer besitzt zwei V-förmig angeordnete, ähnlich große Domänen, die N-terminale NADPH-Bindungsdomäne (Aminosäurereste 77–230) und die katalytische Domäne (231–369, **Abb. 20**). Die NADPH-Bindungsdomäne enthält ein typisches Dinukleotid-Bindungsmotiv, das als Rossmann-Faltung* bezeichnet wird. Pro Untereinheit ist ein NADPH-Molekül gebunden. Die katalytische Domäne enthält fünf α -Helices ($\alpha 7$ – $\alpha 11$) und vier β -Faltblätter ($\beta 8$ – $\beta 11$). Die Kernstruktur der Domäne wird von einem viersträngigen β -Faltblatt gebildet, das teilweise offen vorliegt und zum Teil von Helices und Schleifenstrukturen überdeckt wird. Die katalytische Domäne formt einen tiefen Spalt, in dem Metallion und Substrat gebunden werden, und

* Dieses in allen Dxr-Homologe konservierte Motiv ist ebenfalls im N-terminalen Ende der Ketosäure-Reduktoisomerase zu finden, die in die Biosynthese verzweigter Aminosäuren involviert ist.¹²⁴

beinhaltet eine flexible Schleifenregion (291–299), die im Apoenzym eine ungeordnete Struktur besitzt. Eine Linker-Region (370–395) überspannt die offene Seite des katalytischen Zentrums und verbindet die katalytische Domäne mit einer kleinen C-terminalen Domäne (396–486), die aus einem Bündel von vier α -Helices aufgebaut ist ($\alpha 12$ – $\alpha 15$). Die Bildung des aktiven *PfDxr*-Dimers wird hauptsächlich über die in den katalytischen Domänen lokalisierten, viersträngigen $\beta 11$ -Faltblätter beider Monomere vermittelt, die sich zu einer achtsträngigen β -Faltblattstruktur zusammenlagern. Einen weiteren Beitrag zur Dimerisierung liefern die Linker-Regionen beider Untereinheiten durch wechselseitige Interaktionen der von Ser387 bis Phe391 gebildeten, antiparallelen β -Faltblattstrukturen (Ser387–Phe391).

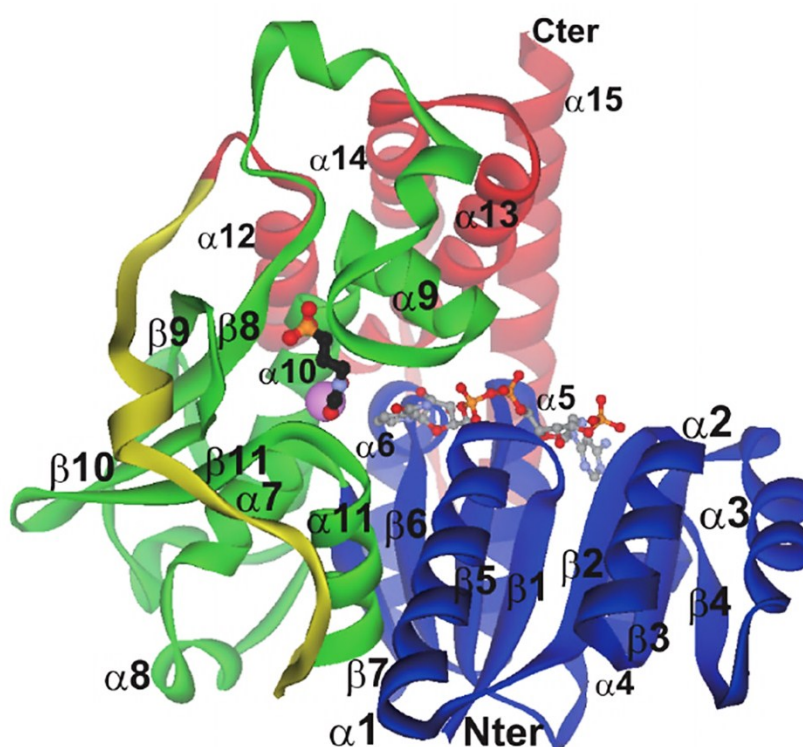


Abb. 20: Untereinheit des quaternären Komplexes aus *PfDxr*, Fosmidomycin, NADPH und Mg^{2+} (Cter/Nter = C-/N-Terminus, Farbschema wie in **Abb. 19**, übernommen aus *Umeda, 2011*¹⁸⁴).

Die Dxr-katalysierte Reaktionsfolge der Umlagerung und Reduktion von DOXP verläuft in Gegenwart von NADPH und einem divalenten Metallkation^{*}.^{114,121,185} Als Zwischenstufe wurde von *Rohmer und Mitarbeitern* 2-C-Methyl-D-erythrose-4-phosphat vorgeschlagen (**Abb. 21**).¹⁸⁶ Das postulierte Intermediat konnte massenspektrometrisch zwar nachgewiesen, aber noch nicht isoliert und weiter charakterisiert werden.⁸⁴ Synthetisches 2-C-Methyl-D-erythrose-4-phosphat wird in Gegenwart von NADPH vom Enzym zu MEP reduziert, die Rückreaktion zu DOXP in Gegenwart von $NADP^+$ findet ebenfalls statt. Das Gleichgewicht liegt unter physiologischen Bedingungen auf der Seite von MEP.¹¹⁴

^{*} Obwohl Dxr eine höhere Affinität zu Co^{2+} und Mn^{2+} zeigt, wird Mg^{2+} aufgrund seines häufigeren Vorkommens *in vivo* als das biologisch relevante Kation angesehen.¹²¹

Für die Umlagerung des Kohlenstoffgerüsts zum Aldehyd-Intermediat werden zwei Mechanismen vorgeschlagen (**Abb. 21**): eine konzertierte α -Ketol-Umlagerung* oder eine Retroaldol/Aldol-Reaktionssequenz.^{114,188,189} Eine Ketol-Umlagerung wird durch eine Deprotonierung der C3-Hydroxygruppe von DOXP eingeleitet, auf die eine 1,2-Umlagerung folgt. Beim Retroaldol/Aldol-Mechanismus führt die Bindungsspaltung zwischen C3 und C4 von DOXP zu einem C₃- und einem C₂-Fragment, welche unter Bildung einer neuen C-C-Bindung rekombinieren. Aufgrund kinetischer Untersuchungen wird die zweite Variante favorisiert, allerdings konnte kein Mechanismus bisher eindeutig bewiesen oder ausgeschlossen werden.^{99,188}

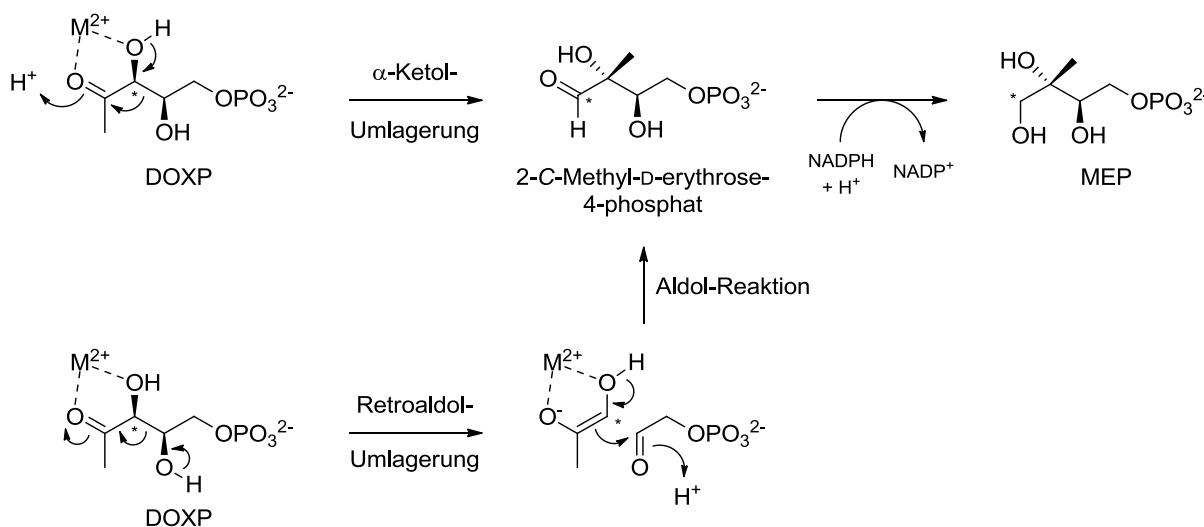


Abb. 21: Mögliche Mechanismen der Dxr-Reaktion (modifiziert nach *Proteau, 2004*¹²¹).

Obwohl die Isomerisierung von DOXP keine Redoxreaktion ist und formell kein NADPH benötigt, gibt es Hinweise darauf, dass der Kofaktor für die Substratbindung erforderlich sein könnte. *Rohmer und Mitarbeiter* zeigten, dass sowohl in Abwesenheit von NADPH als auch in Gegenwart des nicht reduzierenden Dihydro-NADPH keine Umlagerung stattfindet.^{111,114} Ausgehend von Untersuchungen an der *EcDxr* wurde ein geordneter Mechanismus[†] vorgeschlagen, bei dem die Bindung von NADPH der Substratbindung vorausgeht und der oxidierte Kofaktor nach der MEP-Freisetzung austritt. Studien an verschiedenen Dxr-Enzymen zufolge wird bei der Reduktion des Intermediates zu MEP das pro-*S*-Hydrid des C-4 von NADPH auf die *Re*-Seite des Aldehyd-Intermediates übertragen (**Abb. 22**).¹⁹⁰⁻¹⁹² Der Reduktionsschritt gilt als treibende Kraft für den Isomerisierungsschritt.¹¹⁴ Es wird angenommen, dass das Metallkation in beiden Reaktionsschritten zur Polarisierung und korrekten Orientierung von Substrat bzw. Intermediat beiträgt.^{188,190}

* Dieser Reaktionsweg entspricht dem Mechanismus der Ketosäure-Reduktoisomerase.¹⁸⁷

† Für *MtDxr* wird ein Random-Mechanismus mit Steady-State-Kinetik vorgeschlagen, der geordnete Mechanismus kann allerdings nicht ausgeschlossen werden.¹⁹⁰

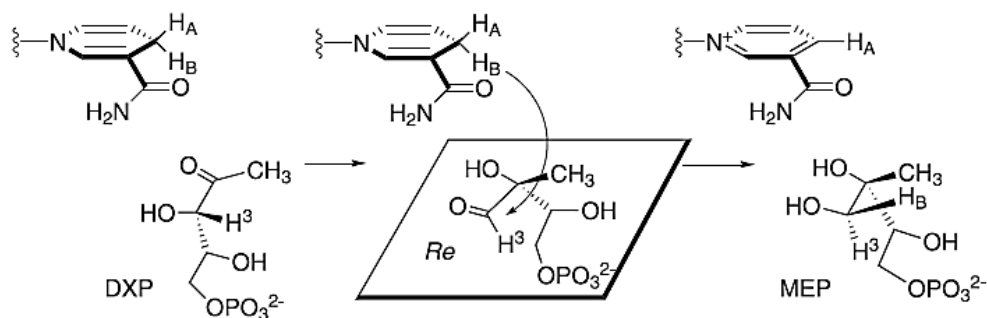


Abb. 22: Stereochemischer Verlauf des Reduktionsschrittes (übernommen aus *Proteau, 2004*¹²¹).

Fosmidomycin ist ein langsamer, stark bindender Dxr-Inhibitor, der kompetitiv gegenüber DOXP und unkompetitiv gegenüber NADPH bindet.¹¹¹ Kinetische Untersuchungen an der *EcDxr* ergaben, dass die Bindung Fosmidomycins in zwei Phasen verläuft, die durch unterschiedliche K_i -Werte gekennzeichnet sind. Auf die Bindung des Inhibitors mit einem initialen K_i -Wert von 215 nM erfolgt eine Konformationsänderung der Dxr in einen Zustand, in dem Fosmidomycin mit einer höheren Affinität bindet (finaler K_i -Wert: 21 nM).¹¹¹

Mittels Kristallstrukturanalysen konnte der Mechanismus der Dxr-Inhibition durch Fosmidomycin bereits am Beispiel der *EcDxr* und *MtDxr* genauer aufgeklärt werden.^{174-176,178,179} Wie *Steinbacher* an einem *EcDxr*-Komplex mit Fosmidomycin und Mn^{2+} zeigen konnte, agiert der Inhibitor als Analogon des Substrats und nicht des Intermediats, wie zuvor vermutet wurde.^{123,174} Die metallchelatisierende Hydroxamsäurefunktionalität imitiert die α -Hydroxyketon-Einheit von DOXP. An Stelle der Phosphatgruppe besitzt Fosmidomycin eine metabolisch wesentlich stabilere Phosphonatgruppe, die substratanaloge Wechselwirkungen eingeht. An den kürzlich von *Umeda et al.* beschriebenen quaternären Komplexen von *PfDxr*, Inhibitor (Fosmidomycin oder FR900098) und Kofaktoren (Mg^{2+} und NADPH) soll der Inhibitionsmechanismus erklärt werden.¹⁸⁴

Durch die Bindung des Inhibitors wird eine Konformationsänderung des Enzyms induziert, bei der sich die NADPH-bindende und die katalytische Domäne aufeinander zu bewegen und so der Spalt zwischen ihnen geschlossen wird. Dabei nimmt die flexible Schleifenregion eine geordnetere Konformation ein und bildet eine Art Deckel über dem aktiven Zentrum des Enzyms, so dass dieses vom Lösungsmittel abgeschirmt wird (**Abb. 23**). Fosmidomycin befindet sich in der aktiven Region der katalytischen Domäne. Dieser Hohlraum enthält je eine Bindungstasche für die Phosphonat- und die Hydroxamsäurefunktionalität und zwischen diesen einen hydrophoben Bereich, in dem das Kohlenstoff-Rückgrat des Inhibitors liegt. Die Phosphonsäurefunktionalität von Fosmidomycin bildet ein Netz von Wasserstoffbrücken mit Ser270, Asn311, zwei Wassermolekülen und dem zur flexiblen Schleife gehörenden His293 aus.

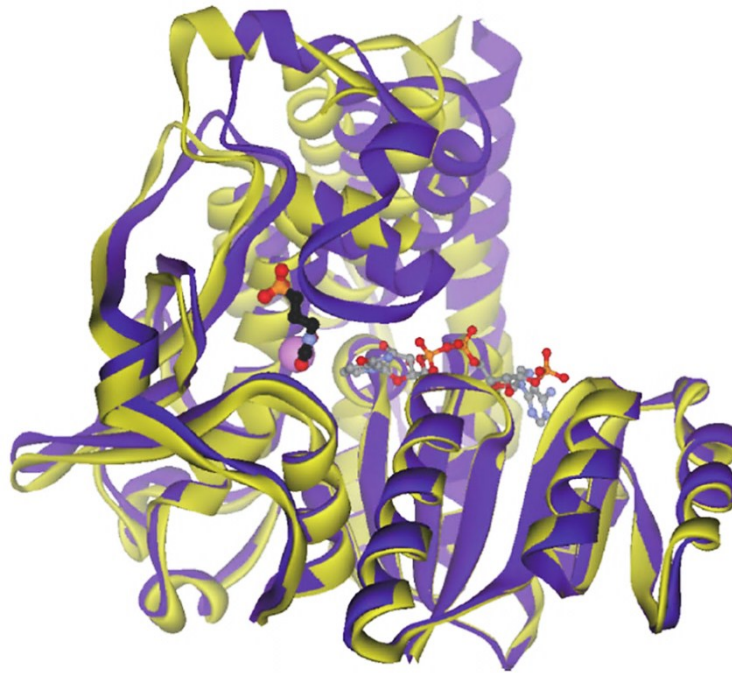


Abb. 23: Vergleich der Kristallstruktur einer *PfDxr*-Untereinheit ohne (gelb) und mit (violett) Fosmidomycin in Anwesenheit von NADPH (Fosmidomycin-Gerüst-atome schwarz, NADPH-Gerüst-atome grau) (übernommen aus Umeda, 2011¹⁸⁴).

Trp296 und Met298, ebenfalls Teil der Schleifenregion, interagieren mit der Propylkette Fosmidomycins über hydrophobe Wechselwirkungen. Die in der geschlossenen Enzymstruktur vergrabenen Aminosäurereste His293, Trp296 und Met298 sind in den Dxr verschiedener Organismen vollständig konserviert,^{*} was ihre Bedeutung für die Substratbindung unterstreicht.

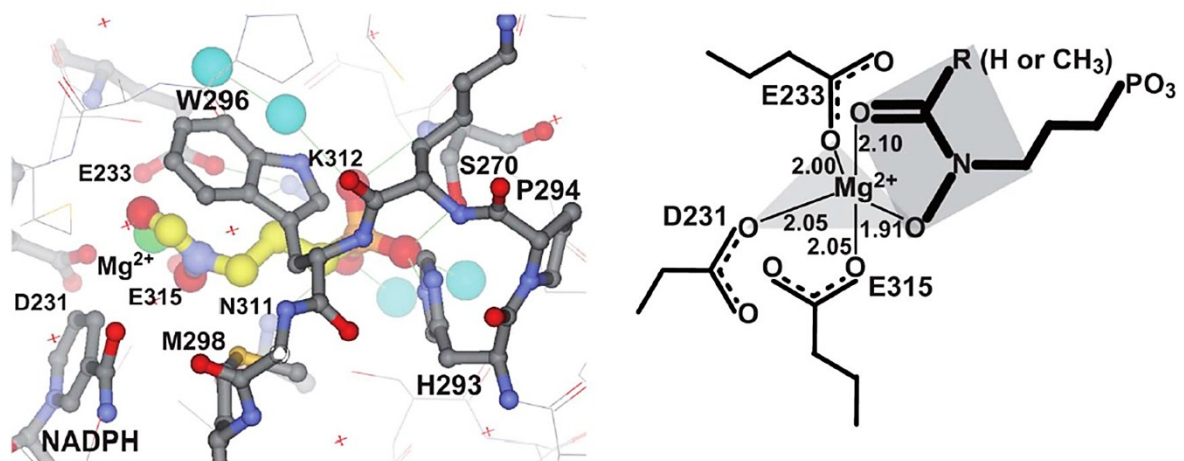


Abb. 24: links: Wechselwirkungen von Fosmidomycin im katalytischen Zentrum der *PfDxr* (C-Atome: gelb, H₂O: blau, Mg²⁺: grün); rechts: Schematische Darstellung der Metallkoordination im quaternären *PfDxr*-Inhibitor-Komplex (übernommen aus Umeda, 2011¹⁸⁴).

^{*} Die Reste Pro294 und Gly299 liegen ebenfalls konserviert vor und scheinen für Struktur und Flexibilität der Schleifenregion wichtig zu sein.¹⁸³

Das Metallkation wird von der Z-konfigurierten, im Bindungszustand deprotonierten Hydroxamsäurefunktionalität und den Aminosäureresten Asp231, Glu233 und Glu315 in einer verzerrt trigonal bipyramidalen Geometrie koordiniert (**Abb. 24**). Die Seitenketten von Asp231 und Glu315 sowie das Sauerstoffatom der *N*-Hydroxygruppe binden in der äquatorialen Ebene, während das Carbonyl-Sauerstoffatom und die Glu315-Seitenkette axiale Liganden sind.

Die Bindung von FR900098 an die *PfDxr* entspricht im Wesentlichen der Bindung von Fosmidomycin (**Abb. 25**). Die Methylgruppe, die das C1-Kohlenstoffatom des natürlichen Substrats initiiert, tritt in hydrophobe Wechselwirkung zu Trp296. Das aktive Zentrum scheint sich dem etwas größeren Molekül durch leichte Drehung des Trp296-Indolrings anzupassen. Diese zusätzliche Interaktion könnte die stärkere Dxr-Inhibition durch FR900098 im Vergleich zu Fosmidomycin bewirken und die für eine Metallchelatisierung erforderliche *cis*-Konformation der Hydroxamsäure zu unterstützen.¹⁸⁴

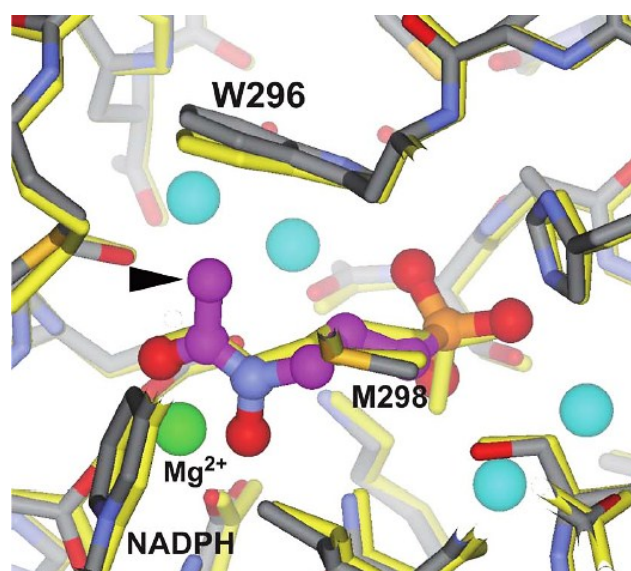


Abb. 25: Bindung von FR900098 im katalytischen Zentrum der *PfDxr* (C-Atome: magenta, H₂O: blau). Der Pfeil markiert die Methylgruppe. Der Dxr-Fosmidomycin-Komplex ist zum Vergleich im Stäbchenmodell gelb dargestellt (übernommen aus *Umeda, 2011*¹⁸⁴).

Kristallstrukturanalysen geben naturgemäß nur „eingefrorene“ Zustände eines dynamischen Moleküls wieder. Der pH-Wert vieler Kristallisationsbedingungen weicht vom normalen, funktionellen Zustand ab, so dass auch Wasserstoffbrücken verändert vorliegen und Metallionen fehlen können.^{121,175} Molekulardynamische Simulationen von Zwischenzuständen und Bewegungen sind in guter Übereinstimmung mit experimentellen Daten möglich, wie *Williams* und *McCammon* an der Bewegung der flexiblen Schleifenregion der *MtDxr* und ihrer Interaktion mit Substrat und Inhibitor demonstrierten.¹⁹³ Die NMR-Analyse gelöster Enzyme kann unter physiologischen Bedingungen erfolgen, ist allerdings bisher auf kleinere Proteine beschränkt. *Englert et al.* konnten an einem *EcDxr*-Komplex mit Inhibitor und Kofaktoren den meisten Aminosäuren NMR-Resonanzsignale zuordnen und eine mit *EcDxr*-Röntgenstrukturen gut übereinstimmende Sekundärstruktur voraussagen.¹⁹⁴

1.5 Der Dxr-Inhibitor Fosmidomycin als neuer Antimalaria-Wirkstoff

Fosmidomycin wurde Ende der 1970er Jahre – etwa 20 Jahre vor Jomaas Entdeckung des MEP-Wegs in *P. falciparum*¹²⁵ – durch *Fujisawa Pharmaceutical Co. Ltd.* (Osaka, Japan) aus *Streptomyces lavendulae* isoliert. Der Wirkstoff war zuvor bereits zur Optimierung von FR900098 synthetisiert worden und zeigt diesem gegenüber eine stärkere antibakterielle Wirkung.¹⁹⁵⁻¹⁹⁸ Die wachstumshemmende Wirkung von Fosmidomycin umfasst die Mehrheit der gram-negativen Bakterien, auch β -Lactam- und andere antibiotikaresistente Stämme (**Tabelle 3**),¹⁹⁹ sowie wenige gram-positive Bakterien. Gegen gram-positive Kokken und anaerobe Bakterien ist Fosmidomycin unwirksam, da hier kein MEP-Weg vorliegt.^{196,200} Fosmidomycin ist mit einem akuten LD₅₀-Wert über 11 mg/kg nicht toxisch, akkumuliert nicht im Serum und wird in unmetabolisierter Form renal eliminiert. Die Bioverfügbarkeit beträgt im Menschen bei peroraler Gabe ca. 30 %, die Plasmahalbwertszeit beträgt 1,87 Stunden.^{*,201,202} Die Plasmaproteinbindung beträgt abhängig von Mensch oder Versuchstier unter 1 % bis maximal 4 %.^{203,204} Fosmidomycin wurde in den 1980er Jahren von *Fujisawa Pharmaceutical Company* als Antibiotikum zur Behandlung von Harnwegsinfektionen bis in die frühe Klinischen Phase II entwickelt. Die Entwicklung wurde jedoch vermutlich wegen der Verfügbarkeit geeigneterer Wirkstoffe zu diesem Zeitpunkt eingestellt.^{202,204,205}

Organismus	Gram-Typ	MEP-Weg	MIC (μ g/mL)
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	+	1–32
<i>Escherichia coli</i>	-	+	16–64
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	+	8–32
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	+	4–32
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	-	-	> 128
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	-	> 128
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	> 128

Tabelle 3: Sensitivität ausgewählter multiresistenter Bakterienstämme gegenüber Fosmidomycin (Auszug aus Davey, 2011¹⁹⁹).

Aufgrund der Hemmung der Carotinoid- und Menachinon-Biosynthese in *Micrococcus luteus* durch Fosmidomycin wurde schon vermutet, dass der Wirkstoff in die Isoprenoid-Biosynthese eingreift.²⁰⁶ Kuzuyama *et al.* zeigten 1998, dass Fosmidomycin spezifisch die DOXP-Reduktoisomerase inhibiert.¹²³ Jomaa *et al.* demonstrierten 1999 die *in vitro*-Hemmwirkung Fosmidomycins auf rekombinante PfDxr und verschiedene *P. falciparum*-Stämme im erythrozytären Entwicklungsstadium. Die *in vivo*-Aktivität Fosmidomycins als Antimalaria-Wirkstoff wurde im Tierversuch durch die vollständige Heilung *Plasmodium vinckei*-infizierter[†] Mäuse bestätigt.^{125,207}

In Klinischen Phase I-Studien wurde Fosmidomycin von Probanden bei ein- oder mehrmaliger Gabe von bis zu 8 g pro Tag gut vertragen, es waren kaum unerwünschte Nebeneffekte zu beobachten.²⁰⁴ In

* Bei intravenöser Applikation ist die Plasmahalbwertszeit mit 1,65 Stunden etwas kürzer.²⁰¹

† *Plasmodium vinckei* ist ein in Nagetieren vorkommender Malariaerreger.

einer von der *Jomaa Pharmaka GmbH* (heute: *Jomaa Pharma*) durchgeführten Phase II-Studie wurden 20 an akuter, unkomplizierter *P. falciparum*-Malaria erkrankte Erwachsene aus Gabun und Thailand über sieben Tage mit Fosmidomycin behandelt.²⁰⁸ Auch hier erwies sich die Anwendung als effizient und sicher.* Die dreimal tägliche, orale Applikation von 1,2 g im Abstand von acht Stunden bewirkte eine schnelle Beseitigung des Fiebers und des Parasitenbefalls innerhalb von etwa zwei Tagen, vergleichbar mit etablierten Antimalariamitteln. In einer Folgestudie in Gabun wurde eine Therapie-Mindestdauer von vier Tagen ermittelt.²⁰⁹ Nach 14 Tagen waren jeweils alle Patienten klinisch und parasitologisch geheilt, nach 28 Tagen traten jedoch Rezidive auf. Daher erschien die Weiterentwicklung einer Fosmidomycin-Monotherapie nicht sinnvoll.²⁰⁸ Als Ursache der Krankheitsrückfälle wird vor allem die ungünstige Pharmakokinetik des Wirkstoffs angesehen.⁹

In vitro- und *in vivo*-Untersuchungen ergaben, dass das Lincosamid-Antibiotikum Clindamycin ein geeigneter Partner für die Malaria-Kombinationstherapie mit Fosmidomycin ist.¹⁴³ Clindamycin hemmt die Apikoplast-Replikation und zeigt den für Antibiotika typischen „delayed death“-Effekt.²¹⁰ Fosmidomycin zeigt dagegen eine sofortige Wirkung im ersten parasitären Zyklus, eliminiert die Parasiten aber nicht vollständig.¹⁴³ Fosmidomycin und Clindamycin haben eine ähnlich kurze Plasmahalbwertszeit, die zwar eine wiederholte Applikation erfordert, aber längere subtherapeutische Konzentrationen verhindert und so der Resistenzbildung vorbeugt. Da Fosmidomycin und der Phosphatester Clindamycins wasserlöslich sind, sind intravenöse Formulierungen zur Behandlung schwerer Krankheitsfälle denkbar.¹⁴³

In klinischen Phase II-Studien an Patienten im Alter von 7–14 Jahren mit asymptomatischer Malaria erwies sich die Kombinationstherapie mit Fosmidomycin und Clindamycin als gut verträglich und in ihrer Effizienz den jeweiligen Monotherapien klar überlegen.²¹¹ Bei Fosmidomycin-Monotherapie und Kombinationstherapie wurde allerdings eine Gametozyten-Induktion beobachtet, die eine erhöhte Übertragungsgefahr resistenter Parasiten zur Folge haben könnte.^{212,213} Eine 100 %ige Heilungsrate nach 28 Tagen wurde nur bei Behandlung mit Clindamycin oder der Wirkstoffkombination erreicht. Die Therapiedauer konnte in einer nachfolgenden Studie bei gleichbleibender Effizienz von zuvor fünf auf drei Tage mit je zweimaliger Medikamentengabe im 12-Stunden-Abstand reduziert werden.²¹² Bei Kindern im Alter von 1–2 Jahren zeigte sich eine geringere Effizienz der Kombinationstherapie.²¹³

Im Jahr 2007 wurde über Studien an erwachsenen Patienten in einem für Multiresistenz bekannten Gebiet in Thailand berichtet, in denen die Behandlung akuter, unkomplizierter *Malaria tropica* mit der Kombinationstherapie erfolgreich und ohne ernste Nebenwirkungen verlief.²¹⁴ Folgestudien zur Optimierung der Therapiedauer und Verlängerung der Dosisintervalle sind allerdings noch erforderlich. Mittlerweile wurden auch erfolgreiche klinische Phase II-Studien mit einer Kombination aus Fosmidomycin und Artesunat an Kindern im Alter von 6–12 Jahren durchgeführt.²¹⁵ Ende 2011

* Vereinzelt wurden leichte gastrointestinale Nebeneffekte beobachtet, die durch die veränderte Darmflora im Zusammenhang mit der Antibiotikabehandlung erklärt werden können.²⁰⁷

sollten im Rahmen einer Kooperation zwischen *Jomaa Pharma* und der MMV Studien in Thailand mit einer Kombination aus Fosmidomycin und Piperaquin (**Abb. 10**, siehe Abschnitt 1.1.2) beginnen.²¹⁶

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Fosmidomycin gut verträglich, aber für die Monotherapie der Malaria ungeeignet ist. Dagegen stellen Kombinationstherapien z. B. mit Clindamycin aussichtsreiche neue Therapieoptionen dar, die aufgrund der ungünstigen pharmakokinetischen Eigenschaften von Fosmidomycin noch optimierungsbedürftig sind. Vor dem Hintergrund der in Abschnitt 1.1.2 vorgestellten Strategie der MMV sollte Fosmidomycin, da es keine relevante Wirkung gegenüber plasmodialen Leber- oder geschlechtlichen Entwicklungsstadien zeigt,⁶³ auch zukünftig nur in Kombination mit Substanzen eingesetzt werden, die gegen weitere plasmodiale Entwicklungsstadien wirken.

1.6 Bisherige Strukturvariationen an der Leitstruktur Fosmidomycin

Um Wirkstoffe mit gegenüber Fosmidomycin verbesserten pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften zu finden, wurden im Vorfeld und während der eigenen Arbeiten von unserer und anderen Arbeitsgruppen bereits umfangreiche Strukturmodifikationen vorgenommen. Die bisher bekannten Struktur-Aktivitäts-Beziehungen sollen im Folgenden erläutert werden. Dazu wird die Leitstruktur in drei Molekülregionen unterteilt, deren Variationen im Einzelnen betrachtet werden. Die Unterteilung wird nach den beiden Pharmakophoren Hydroxamsäure (**A**) und Phosphonsäure (**B**) vorgenommen, die durch den Propyl-Spacer (**C**) verknüpft sind (**Abb. 26**).

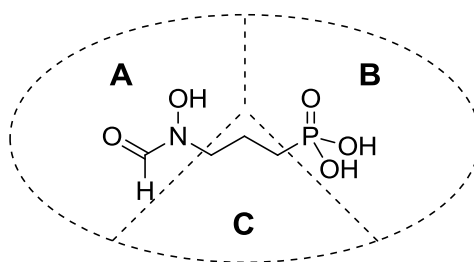
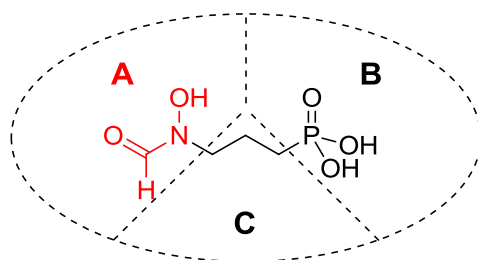


Abb. 26: Einteilung der Leitstruktur Fosmidomycin in drei Molekülregionen.

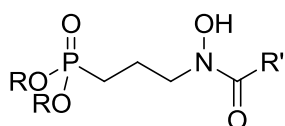
Bei den vielfältigen Strukturmodifikationen ist die Vergleichbarkeit der biologischen Aktivität nicht immer gegeben. In nur wenigen Arbeiten wurden Fosmidomycin-Analoga gegenüber *PfDxr* evaluiert, obwohl sie die Zielstruktur antiplasmodial wirkender Dxr-Inhibitoren ist.^{182,217,218} Da die *EcDxr* stabiler als die *PfDxr* ist und die Aminosäurereste der katalytischen Zentren der Enzyme weitgehend konserviert vorliegen, wurde zunächst von einer guten Übertragbarkeit der *EcDxr*- auf die *PfDxr*-Inhibition ausgegangen. Der direkte Aktivitätsvergleich von Inhibitoren gegenüber *PfDxr* und *EcDxr* zeigt jedoch deutliche Unterschiede in der Größenordnung und Tendenz der IC_{50} -Werte. Auch die unterschiedlichen Sensitivitäten verschiedener *P. falciparum*-Stämme erschweren die Vergleichbarkeit antiplasmodialer Aktivitäten und damit die Ableitung von Struktur-Wirkungsbeziehungen.

1.6.1 Molekülregion A: Variation der Hydroxamsäurefunktionalität



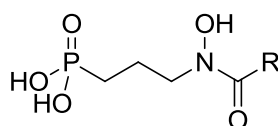
Variation des N-Acylrestes der Hydroxamsäurefunktionalität

Variationen des N-Acylrestes sind in **Abb. 27** dargestellt. Mit dem Ziel der Entwicklung lipophilerer Fosmidomycin-Analoga wurde der Formyl- bzw. Acetylrest von Fosmidomycin durch aliphatische und aromatische Acylreste ersetzt. *Kaula* erhielt durch die Einführung aromatischer Hydroxamsäurereste (Beispiele: **IX**) keine Aktivitätssteigerung gegenüber der Referenz FR900098.²¹⁹



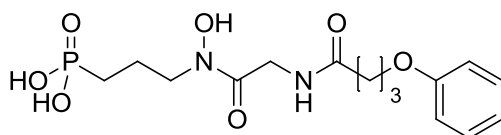
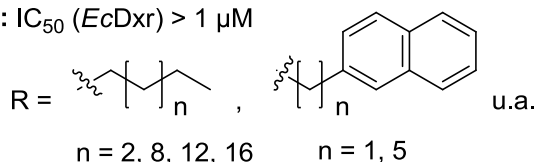
IX: R' = Ph, 1-Naphthyl, 2-Furyl u.a.
Inhib. (*Pf3D7*) bei 10 μ M: 9-62 %
R = Pivaloyloxymethyl (POM)

FR: Inhib. (*Pf3D7*) bei 10 μ M: 65 %



Fos: R = H, IC_{50} (*EcDxr*) = 0.035 μ M

X: IC_{50} (*EcDxr*) > 1 μ M



XI:

IC_{50} (*EcDxr*) = 1.0 μ M,
 IC_{50} (*PfDxr*) = 0.40 μ M

Fos:

IC_{50} (*EcDxr*) = 0.050 μ M
 IC_{50} (*PfDxr*) = 0.032 μ M

FR:

IC_{50} (*EcDxr*) = 0.051 μ M
 IC_{50} (*PfDxr*) = 0.018 μ M

Abb. 27: Variation der N-Acylsubstitution von Fosmidomycin.

Schlitzer und Mitarbeiter erhielten durch die Einführung langkettiger und sterisch anspruchsvoller Acylreste schwächere *EcDxr*-Inhibitoren als Fosmidomycin (Beispiele: **X**, **Abb. 27**).²²⁰ Ähnliche Untersuchungen von *Gießmann et al.* hatten zum Ziel, durch die Verlängerung des Acylrestes zusätzliche Wechselwirkungen innerhalb des aktiven Zentrums zu erschließen.^{182,221} Die Leitstruktur wurde durch die Einführung eines Glycin-Spacers mit volumniösen Acylsubstituenten modifiziert. Die meisten Analoga besitzen gegenüber *EcDxr* und *PfDxr* eine um etwa drei Zehnerpotenzen geringere Hemmwirkung als Fosmidomycin und FR900098. Das 3-phenoxypropylsubstituierte Derivat **XI** ist mit einem IC_{50} -Wert von 0,4 μ M noch der stärkste *PfDxr*-Inhibitor unter diesen Derivaten.

Austausch der funktionellen Gruppe

Auch der Austausch der Hydroxamsäurefunktionalität Fosmidomycins (**Abb. 28**) führte bisher stets zur Aktivitätsminderung oder zum Aktivitätsverlust. *Kurz* erhielt durch Austausch des Hydroxamats gegen eine Hydroxyharnstoffgruppe,²²² die als Hydroxamat der Carbaminsäure betrachtet werden kann und in verschiedenen Metalloenzym-Inhibitoren eingesetzt wird,^{223,224} inaktive Derivate (**I**).

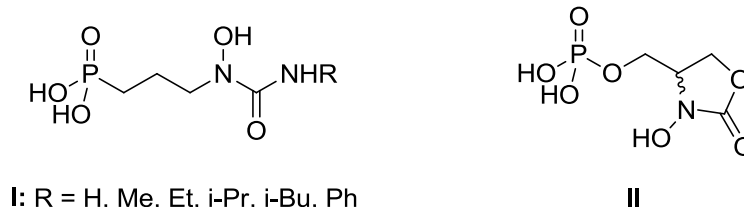


Abb. 28: Austausch der Hydroxamsäurefunktionalität gegen andere chelatisierende Gruppen.

Mercklé et al. synthetisierten der Überlegung zufolge, dass die Rigidisierung eines Inhibitors den ungünstigen entropischen Effekt bei der Bindung an das Enzym verringern sollte, ein cyclisches *N*-Hydroxycarbamat (**II**).^{225,226} Dieses konformativ eingeschränkte *N*-Hydroxy-oxazolidinon-Derivat zeigt jedoch im Gegensatz zu Fosmidomycin nur schwache *EcDxr*-Inhibition, obwohl Modelling- und Docking-Studien eine gute Übereinstimmung der Pharmakophor-Konformationen vorausgesagt hatten. Die Instabilität der Phosphatgruppe könnte ein Grund für die geringe biologische Aktivität von **II** sein.

Überraschenderweise wurden auch Fosmidomycin-Analoga synthetisiert, die in Molekülregion A keine zur Metallkomplexierung geeignete Funktionalität besitzen (**Abb. 29**). *Van der Jeught et al.* synthetisierten Oxazinyll-Derivate, in denen die Hydroxygruppe der Hydroxamsäurefunktionalität in ein Ringsystem eingebaut ist (Beispiele: **III**).²²⁷ Bisher wurden allerdings keine biologischen Daten dieser Verbindungen veröffentlicht.

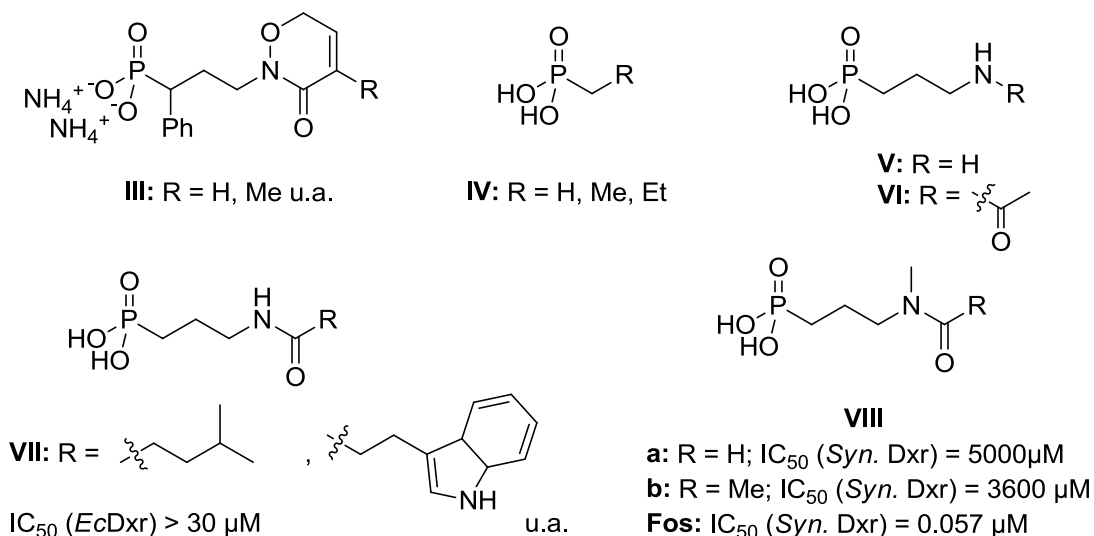


Abb. 29: Fosmidomycin-Analoga mit nicht-chelatisierenden Gruppen.

Verschiedene „fragmentierte“ Fosmidomycin-Analoga, bei denen die Hydroxamsäurefunktionalität entweder komplett fehlt (**IV**) oder auf eine Amino- (**V**) bzw. Acetamidofunktionalität (**VI**) reduziert ist, wurden von *Mercklé et al.* gegenüber der *EcDxr* evaluiert (**Abb. 29**).²²⁵ Diese Fragmente inhibieren die *EcDxr* nur im höheren mikromolaren Konzentrationsbereich. In einer 2008 veröffentlichten Studie wurde die Hydroxamsäure-Einheit ebenfalls durch Amidfunktionalitäten ersetzt, die aber einen größeren Acylrest tragen (Beispiele: **VII**).¹⁸² Diese Analoga zeigen gegenüber der *EcDxr* IC_{50} -Werte über 30 μM . *Woo et al.* untersuchten Fosmidomycin-Derivate auf ihre Aktivität gegenüber *Synechocystis Dxr*.²²⁸ Der Ersatz der metallkomplexierenden Hydroxamsäure- durch eine *N*-Methylacetamid- oder *N*-Methylformamidgruppe (**VIII**) hat hier einen Wirkungsverlust zur Folge.

Inversion der Hydroxamsäurefunktionalität

Retroisosterie bezeichnet die Inversion einer funktionellen Gruppe der Leitstruktur unter Erhalt der Funktionalität²²⁹. Diese Strategie wurde bei Hydroxamsäuren bereits erfolgreich eingesetzt, beispielsweise in der Entwicklung von PDF-Inhibitoren (siehe Abschnitt 3.1).²³⁰ Das Prinzip der Retroisosterie wurde auch erfolgreich bei Fosmidomycin angewendet. *Rohmer et al.* berichteten 2005 über Synthese und biologische Aktivität inverser Hydroxamsäure-Analoga von Fosmidomycin und FR900098 (**Abb. 30**).²³¹

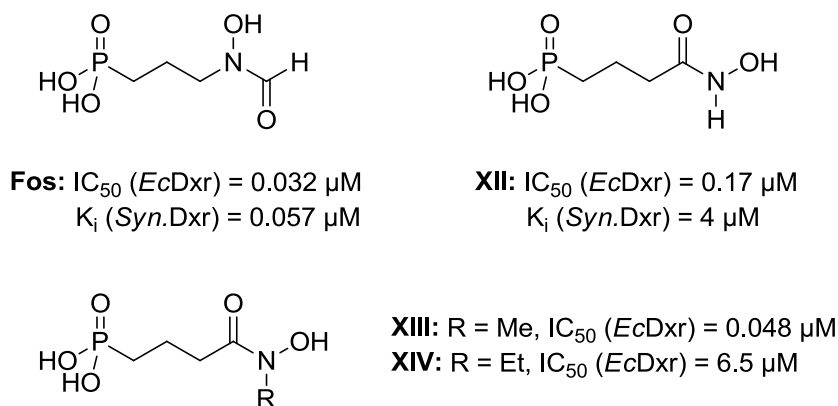


Abb. 30: Inversion der Hydroxamsäurefunktionalität von Fosmidomycin.

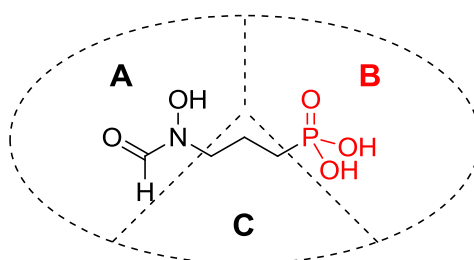
Deren starke *EcDxr*-inhibierende Wirkung bestätigt, dass inverse Derivate in der gleichen Weise zur Metallchelatisierung befähigt sind wie DOXP und Fosmidomycin. Verbindung **XII** hemmt die *EcDxr* schwächer als Fosmidomycin, das Derivat mit *N*-methylierter Hydroxamsäurefunktionalität (**XIII**) besitzt dagegen eine vergleichbare inhibitorische Aktivität. Interessanterweise zeigt diese Substanz auch Wachstumsinhibition gegenüber einem Fosmidomycin- und Fosfomycin-resistenten *E. coli*-Stamm.²³¹ Auch bei inversen Analoga mit verkürzter oder verlängerter Kohlenstoffkette sind jeweils die *N*-methylierten Hydroxamate stärkere *EcDxr*-Inhibitoren als die entsprechenden unsubstituierten

Analoga (siehe Abschnitt 1.6.3). Das *N*-ethylsubstituierte, inverse Fosmidomycin-Analogon **XIV** hemmt die *EcDxr* deutlich schwächer, woraus ein ungünstiger Einfluss des größeren Alkylsubstituenten bei inversen Fosmidomycin-Analoga abgeleitet werden kann.²³² Aufgrund fehlender Inhibitionswerte für *PfDxr* ist die Aussagekraft dieser Untersuchungen im Hinblick auf die antiplasmodiale Aktivität der Verbindungen eingeschränkt.

Gegenüber *Synechocystis* Dxr zeigt das inverse Fosmidomycin-Analogon **XII** mit 4 μ M eine um den Faktor 70 verminderte Inhibition im Vergleich zu Fosmidomycin.²²⁸ Da die an der Fosmidomycin-Bindung beteiligten Aminosäurereste in der *Synechocystis*-Dxr weitgehend denen der *EcDxr* entsprechen, wird die Ursache für den großen Aktivitätsunterschied in dem unterschiedlichen Aufbau der Bindungszentren beider Enzyme vermutet.

Fosmidomycin-Analoga mit inverser Hydroxamsäurefunktionalität, die sich außerdem durch Variation des Propyl-Spacers von Fosmidomycin unterscheiden, werden an späterer Stelle vorgestellt.

1.6.2 Molekülregion B: Variation der Phosphonsäurefunktionalität

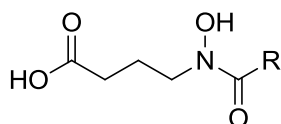


Austausch der funktionellen Gruppe

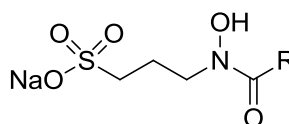
Die Phosphonsäurefunktionalität von Fosmidomycin wird bei der Bindung an die *PfDxr* über ein Netz von Wasserstoffbrückenbindungen in einer spezifischen Bindungstasche verankert. Die Phosphonat-Sauerstoffatome dienen dabei als Wasserstoffbrückenakzeptoren.¹⁷⁴ Die essenzielle Natur der Phosphonsäurefunktionalität zeigte sich in dem von Kurz durchgeführten Austausch gegen eine Carbonsäurefunktionalität in den unterschiedlich substituierten Derivaten **XV** (Abb. 31) der einen Aktivitätsverlust zur Folge hatte.²³³

Um die Nachteile der polaren Phosphonatgruppe zu umgehen und Wirkstoffe mit erhöhter Membrangängigkeit zu entwickeln, wurde die Phosphonsäurefunktionalität von Schlitzer und Mitarbeitern durch andere polare Funktionalitäten ersetzt (Abb. 31).²³⁴ Docking-Studien an der *EcDxr* ließen vermuten, dass diese funktionellen Gruppen ebenfalls zu Wasserstoffbrückenbindungen befähigt sein und durch zusätzliche Alkylsubstituenten eine alternative lipophile Bindungsstelle erschließen könnten. Das Fosmidomycin-Sulfonsäure-Derivat **XVI** sowie unterschiedlich substituierte Sulfone **XVII**, Sulfonamide **XVIII** und Phosphonsäuremonoester (**XIX**) sind *in vitro* gegenüber der

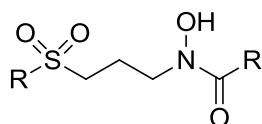
EcDxr und dem *P. falciparum*-Stamm Dd2 im Vergleich zu Fosmidomycin und FR900098 allerdings nur schwach aktiv oder inaktiv. Das wirksamste Derivat dieser Serie (**XIX**, R = Phenylethyl) besitzt 9-18fach höhere IC_{50} -Werte als die beiden Referenzsubstanzen. Für die effiziente Bindung eines Inhibitors an die *EcDxr* ist die zweifach negative Ladung demnach essenziell, der Affinitätsverlust bei verminderter oder fehlender Ladung kann nur in sehr geringem Maße durch zusätzliche lipophile Wechselwirkungen kompensiert werden.²³⁴



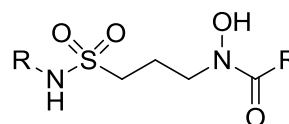
XV: R = H, Me, Et, i-Pr, t-Butyl, Ph u.a.



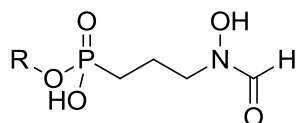
XVI: IC_{50} (*EcDxr*) = 23 μ M



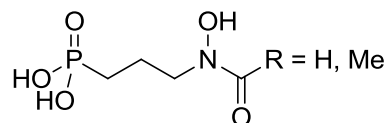
XVII: R = Me, Et, n-Pr, n-Bu, Bn, Phenylethyl
 IC_{50} (*EcDxr*) > 30 μ M



XVIII: R = H, Me, Et, n-Pr, n-Bu
 IC_{50} (*EcDxr*) > 30 μ M



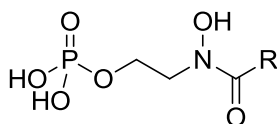
XIX: R = Me, Et, n-Pr, n-Bu, i-Bu, Phenylethyl, 1-/2-Naphthylethyl
 IC_{50} (*EcDxr*) = 0.49 - 50 μ M
 IC_{50} (*PfDd2*) = 4.96 - > 10 μ M



Fos: IC_{50} (*EcDxr*) = 0.035 μ M
 IC_{50} (*PfDd2*) = 0.57 μ M
FR: IC_{50} (*EcDxr*) = 0.035 μ M
 IC_{50} (*PfDd2*) = 0.27 μ M

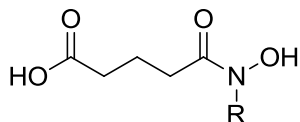
Abb. 31: Austausch der Phosphonsäurefunktionalität von Fosmidomycin.

Proteau und Mitarbeiter untersuchten die inhibierende Wirkung von Fosmidomycin-Analoga mit modifizierter Phosphonsäurefunktionalität auf rekombinante *Synechocystis* Dxr (**Abb. 32**).²²⁸ Während Carbonsäure- (**XV**) und Sulfonamid-Derivate (**XVII**, R = H) inaktiv sind, inhibieren die Phosphorsäure-Analoga von Fosmidomycin und FR900098, **Fosfoxacin** und **XX**, das Enzym jeweils deutlich stärker als Fosmidomycin. Monophosphat-Ester sind allerdings aufgrund ihrer metabolischen Instabilität als Arzneistoffe problematisch. *Zinglé et al.* untersuchten inverse Fosmidomycin- und FR900098-Derivate, die an Stelle der Phosphon- mit einer Carbon- (**XXI**) oder Sulfonsäurefunktion (**XXII**) ausgestattet sind.²³² Gegenüber rekombinanter *EcDxr* ist ein drastischer Wirkungsverlust festzustellen, der auf geringere Ladung, abweichende Geometrie oder Anzahl und Art der möglichen Wasserstoffbrückenbindungen zurückgeführt werden könnte.²³²



Fosfoxacin: R = H; K_i (Syn.Dxr) = 0.019 μ M

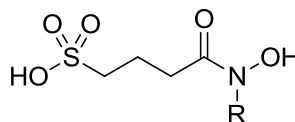
XX: R = Me; K_i (Syn.Dxr) = 0.002 μ M



XXI

a: R = H; IC_{50} (EcDxr) = 720 μ M

b: R = Me; IC_{50} (EcDxr) = 25 μ M



XXII

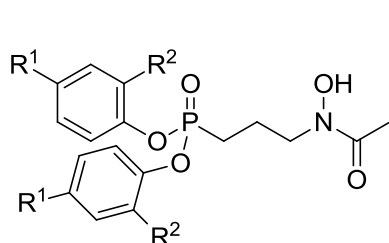
a: R = H; IC_{50} (EcDxr) = 1000 μ M

b: R = Me; IC_{50} (EcDxr) = 48 μ M

Abb. 32: Phosphorsäure-Derivate und inverse Fosmidomycin-Analoga.

Entwicklung von Phosphonsäure-Prodrugs

Fosmidomycin und FR900098 sind im *P. vinckei*-Mausmodell nach oraler Gabe deutlich geringer antiplasmodial wirksam als nach intraperitonealer Injektion. 2001 wurden von Jomaa und Mitarbeitern FR900098-Prodrugs (**XXIII**) untersucht, in denen die Phosphonsäurefunktionalität als Diarylester „maskiert“ wurde (**Abb. 33**, links).²³⁵

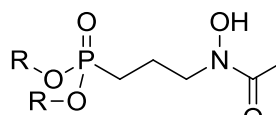


XXIII

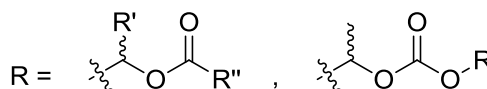
a: R_1 = H, R_2 = H

b: R_1 = H, R_2 = Me

c: R_1 = OMe, R_2 = H



FR900098: R = H



XXIV

R' = H, Me
 R'' = Me, Et, t-Bu,
 $C_{15}H_{31}$, Ph

XXV

R = Me, Et

FR900098:

IC_{50} (EcDxr) = 0.050 μ M

IC_{50} (PfDd2) = 0.893 μ M

XXIVa (R' = H, R'' = tBu):

IC_{50} (EcDxr) > 30 μ M

IC_{50} (PfDd2) = 0.272 μ M

XXIVb (R' = Me, R'' = Me):

IC_{50} (EcDxr) > 30 μ M

IC_{50} (PfDd2) = 0.174 μ M

FR900098:

MIC (*MtH37Rv*) > 500 μ g/mL

XXIVa: (R' = H, R'' = tBu):

MIC (*MtH37Rv*) = 50-100 μ g/mL

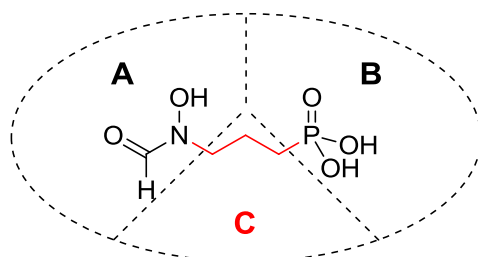
XXIVc (R' = H, R'' = Ph):

MIC (*MtH37Rv*) = 25-100 μ g/mL

Abb. 33: Phosphonsäure-Prodrugs von FR900098.

Diese Derivate zeigten im Mausmodell bei peroraler Applikation eine verbesserte antiplasmodiale Wirksamkeit als FR900098. Da Arylester-Prodrugs wegen der Freisetzung von Phenolen jedoch toxikologisch problematisch sind, wurden alternativ Acyloxyalkylester-Prodrugs (Beispiele: **XXIV**) und Alkyloxycarbonyloxyalkylester-Prodrugs (**XXV**) von FR900098 entwickelt (**Abb. 33**, rechts).²³⁶⁻²³⁸ Die exemplarischen Inhibitionswerte zeigen die verbesserte antiplasmodiale *in vitro*-Aktivität der Prodrugs **XXIVa** und **b** im Vergleich zu FR900098.²³⁸ Bis-Pivaloyloxymethyl (POM)-Prodrugs (analog **XXIVa**) wurden bei der Variation des Alkyl-Spacers von Fosmidomycin durch *Kurz* und *Schlüter* anstelle freier Phosphonsäuren als nicht-hygroscopische Testsubstanzen eingesetzt.²³⁹⁻²⁴³ Kürzlich wurden von *Dowd und Mitarbeitern* einige Prodrugs vom Typ **XXIV** gegenüber verschiedenen Gram-positiven und -negativen Bakterien evaluiert.²⁴⁴ Dabei zeigten besonders **XXIVa** und das in dieser Arbeit erstmals beschriebene Prodrug **XXIVc** eine im Vergleich zu Fosmidomycin und FR900098 deutlich gesteigerte Wachstumsinhibition des *M. tuberculosis*-Stamms H37Rv. Die Derivate von **XXIVa** und **c** mit verzweigter Methylenbrücke ($R' = \text{Me}$) zeigten geringere Aktivität.

1.6.3 Molekülregion C: Variation des Propyl-Spacers

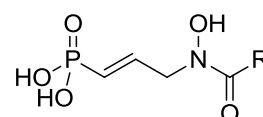
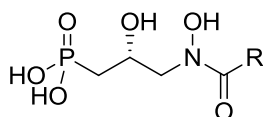


Während Hydroxamsäure- und Phosphonsäurefunktionalität für die Dxr-hemmende Wirkung aller Fosmidomycin-Analoga unverzichtbar sind und ihr Austausch bisher stets zum Wirkungsverlust führte, können Modifikationen des Spacers zu wirksameren Inhibitoren als Fosmidomycin führen.

Neben Fosmidomycin wurden aus *Streptomyces* FR900098 und weitere Strukturanaloga isoliert und charakterisiert (**Abb. 34**).^{197,198,245,246} **FR33289** zeigt im Vergleich zu FR900098 geringere antibakterielle Wirksamkeit,²⁴⁶ inhibiert rekombinante *PfDxr* allerdings gleich effektiv.²⁴⁷ Entsprechendes gilt für den Vergleich der antibakteriellen und *PfDxr*-hemmenden Aktivität von Fosmidomycin und **Hydroxyfosmidomycin**.^{246,247} Das Propenyl-Analogon **FR32863** besitzt eine mit Fosmidomycin vergleichbare antibakterielle Wirkung,^{197,246} für diese Verbindung liegen allerdings keine Daten zur Dxr-Inhibition vor. Das synthetisch hergestellte **XXVI** zeigt weniger als 50 % der *EcDxr*-hemmenden Aktivität Fosmidomycins und ein geringeres antibakterielles Wirkspektrum.^{221,246}

Die Arbeitsgruppe von *Rohmer* untersuchte die optimale Kettenlänge Fosmidomycin-analoger Dxr-Inhibitoren an Derivaten mit inverser Hydroxamsäurefunktionalität (**Abb. 34**).²³² Während bei

inversen Derivaten mit um ein Kohlenstoffatom verlängertem Spacer (**XXVII**) die Hemmwirkung auf die *EcDxr* nur auf etwa 40–60 % sinkt, sind die Analoga **XXVIII** mit entsprechend verkürzter Kette schwach aktiv bzw. inaktiv. Der verlängerte Spacer scheint eine effiziente Bindung des Inhibitors zu verhindern, während eine Verkürzung des Spacers dazu führt, dass entweder nur die Phosphonsäure- oder die Hydroxamsäurefunktion im aktiven Zentrum der Dxr binden kann.²³²

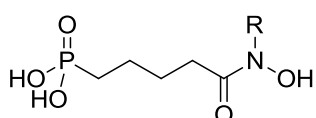


Hydroxy-Fos: R = H, IC_{50} (*PfDxr*) = 41 nM, **Fos:** IC_{50} (*PfDxr*) = 36 nM

FR33289: R = Me, IC_{50} (*PfDxr*) = 16 nM, **FR900098:** IC_{50} (*PfDxr*) = 15 nM

FR32863: R = H

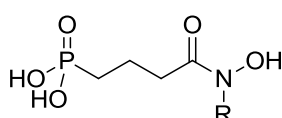
XXVI: R = Me



XXVII

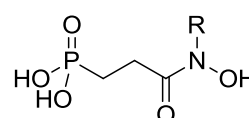
R = H; IC_{50} (*EcDxr*) = 0.27 μ M

R = Me; IC_{50} (*EcDxr*) = 0.11 μ M



XII: R = H; IC_{50} (*EcDxr*) = 0.17 μ M

XIII: R = Me; IC_{50} (*EcDxr*) = 0.049 μ M



XXVIII

R = H; IC_{50} (*EcDxr*) = 1000 μ M

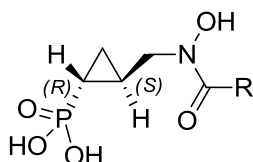
R = Me; IC_{50} (*EcDxr*) = 19 μ M

Abb. 34: Naturstoffe und inverse Fosmidomycin-Analoga mit modifiziertem Spacer.

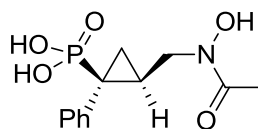
Zur Untersuchung von Struktur-Aktivitätsbeziehungen in der Spacer-Region synthetisierten *Devreux et al.* Cyclopropyl-Analoga (**XXIX**), in denen die Rotationsfreiheit der Kohlenstoffkette eingeschränkt und dadurch die räumliche Anordnung der Pharmakophore festgelegt ist (**Abb. 35**).²⁴⁸ Die biologischen Untersuchungen zeigten für das *N*-acetylsubstituierte, *trans*-konfigurierte (1*R*, 2*S*)-Cyclopropyl-Derivat (**XXIXb**) sowohl gegenüber der *EcDxr* als auch den *P. falciparum*-Stämmen Dd2 und 3D7 eine mit Fosmidomycin vergleichbare inhibitorische Aktivität. Cyclopropyl-Analoga mit verkürztem oder verlängertem *N*-Acylrest (**XXIXa,c**) haben eine geringere enzym- oder wachstumsinhibierende Aktivität, ebenso das α -phenylsubstituierte *cis*-Cyclopropyl-Derivat **XXX**.²⁴⁸

An den von *Haemers et al.* vorgestellten, konformativ noch weiter eingeschränkten Analoga mit Cyclopentyl-Strukturelement (**XXXI**) bestätigt sich die Beobachtung, dass die wirksameren Isomere eine *trans*-Konformation der Ringsubstituenten zueinander besitzen (**Abb. 35**).²⁴⁹ Im Gegensatz zu den Cyclopropyl-Analoga sind die *N*-Formyl-Derivate von **XXXI** inhibitorisch aktiver als die *N*-Acetyl-Derivate. Auch die von *Kaula* synthetisierten Cyclopentyl-Derivate **XXXII** sind gegenüber *P. falciparum* schwächer wirksam als das FR900098-Prodrug **FR-POM** (**Abb. 35**).²¹⁹

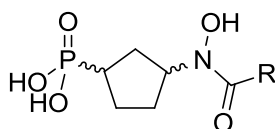
Kurz und Mitarbeiter synthetisierten Bis-POM-Prodrugs aromatischer Fosmidomycin-Analoga (**XXXIII**), in denen die α - und β -Kohlenstoffatome des Spacers Teil eines Phenylkerns sind (**Abb. 35**).²⁴³ Mit dieser Modifikation ist ein erheblicher Wirkungsverlust verbunden. Die Wachstumshemmung des *P. falciparum* 3D7-Stammes durch diese Derivate ist im Vergleich zu den entsprechenden Prodrugs der Referenzverbindungen **Fos-POM** und **FR-POM** geringer.²⁴³

**XXIX**

- a:** R = H IC_{50} (*EcDxr*) = 0.313 μ M
 IC_{50} (*Pf3D7*) = 2.1 μ M
 IC_{50} (*PfDd2*) = 2.0 μ M
b: R = Me IC_{50} (*EcDxr*) = 0.050 μ M
 IC_{50} (*Pf3D7*) = 0.32 μ M
 IC_{50} (*PfDd2*) = 0.48 μ M
c: R = H IC_{50} (*EcDxr*) > 3.0 μ M

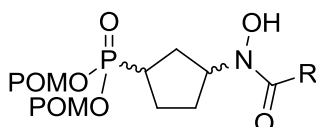
**XXX:** IC_{50} (*EcDxr*) > 30 μ M

- Fos:** IC_{50} (*EcDxr*) = 0.048 μ M
 IC_{50} (*Pf3D7*) = 0.40 μ M
 IC_{50} (*PfDd2*) = 0.48 μ M
FR: IC_{50} (*EcDxr*) = 0.058 μ M
 IC_{50} (*Pf3D7*) = 0.24 μ M
 IC_{50} (*PfDd2*) = 0.28 μ M

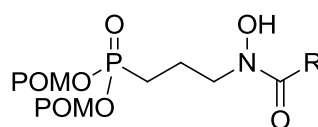
**XXXI**

- a:** *trans*, R = H IC_{50} (*EcDxr*) = 0.20 μ M
b: *trans*, R = Me IC_{50} (*EcDxr*) = 2.3 μ M
c: *cis*, R = H IC_{50} (*EcDxr*) = 2.3 μ M
d: *cis*, R = Me IC_{50} (*EcDxr*) = 12 μ M

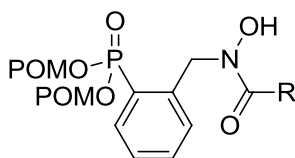
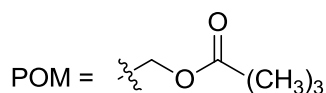
- Fos:** IC_{50} (*EcDxr*) = 0.029 μ M
FR: IC_{50} (*EcDxr*) = 0.035 μ M

**XXXII**

trans, *cis*, R = H, Me
 Wachstumshemmung
 (*Pf3D7*) bei 10 μ M:
 14-18%
FR-POM: 65%



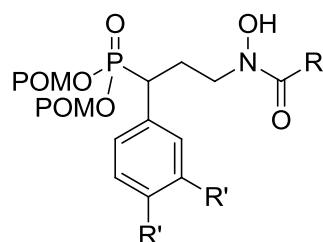
Fos-POM: R = H
FR-POM: R = Me

**XXXIII**

- R = H, Me, Bn; IC_{50} (*Pf3D7*) = 47-61 μ M
Fos-POM: IC_{50} (*Pf3D7*) = 2.1 μ M
FR-POM: IC_{50} (*Pf3D7*) = 0.4 μ M

Abb. 35: Konformativ eingeschränkte Fosmidomycin-Analoga.

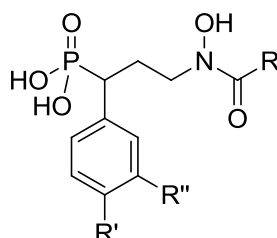
Die aromatische Substitution des Propyl-Spacers in α -Position zur Phosphonsäurefunktionalität führte zu den lange Zeit wirksamsten bekannten Fosmidomycin-Derivaten. Die Arbeitsgruppe von Kurz stellte bereits 2005 Bis-POM-Prodrugs α -arylsubstituierter Fosmidomycin-Derivate (**XXXIV**) vor, die im Vergleich zu dem Fosmidomycin-Prodrug (Fos-POM) antiplasmodial deutlich aktiver sind (**Abb. 36**).^{239,250}

**XXXIV**

a: R = R' = H	IC ₅₀ (Pf3D7) = 0.6 μM
b: R = Me, R' = H	IC ₅₀ (Pf3D7) = 0.7 μM
c: R = H, R' = F	IC ₅₀ (Pf3D7) = 0.3 μM
Fos-POM:	IC ₅₀ (Pf3D7) = 2.1 μM
FR-POM:	IC ₅₀ (Pf3D7) = 0.4 μM

Abb. 36: Prodrugs von α -arylsubstituierten Fosmidomycin-Derivaten.

Diese Ergebnisse wurden von *Van Calenberghs* Arbeitsgruppe an einer Serie von α -arylsubstituierten Fosmidomycin-Analoga bestätigt (Beispiele: **XXXV**, **Abb. 37**).^{249,251} Um die Auswirkungen hydrophober, elektronischer und sterischer Eigenschaften des Arylsubstituenten zu untersuchen, wurden gemäß der Methode von *Topliss* verschiedene Substituenten in *meta*- und *para*-Position des Phenylkerns eingeführt.^{252,253}

**XXXV**

a: R = H, R' = OMe, R'' = H	IC ₅₀ (EcDxr) = 0.156 μM	IC ₅₀ (PfDd2) = 0.20 μM
b: R = H, R' = Cl, R'' = Cl	IC ₅₀ (EcDxr) = 0.059 μM	IC ₅₀ (PfDd2) = 0.028 μM
c: R = H, R' = CN, R'' = H	IC ₅₀ (EcDxr) = 0.054 μM	IC ₅₀ (PfDd2) = 0.27 μM
d: R = Me, R' = H, R'' = H	IC ₅₀ (EcDxr) = 0.311 μM	IC ₅₀ (PfDd2) = 0.35 μM
f: R = Me, R' = OMe, R'' = H	IC ₅₀ (EcDxr) = 0.459 μM	IC ₅₀ (PfDd2) = 0.27 μM
h: R = Me, R' = Cl, R'' = Cl	IC ₅₀ (EcDxr) = 0.119 μM	IC ₅₀ (PfDd2) = 0.09 μM
i: R = Me, R' = CN, R'' = H	IC ₅₀ (EcDxr) = 0.119 μM	IC ₅₀ (PfDd2) = 0.27 μM
Fos:	IC ₅₀ (EcDxr) = 0.030 μM	IC ₅₀ (PfDd2) = 0.36 μM
FR:	IC ₅₀ (EcDxr) = 0.030 μM	IC ₅₀ (PfDd2) = 0.18 μM

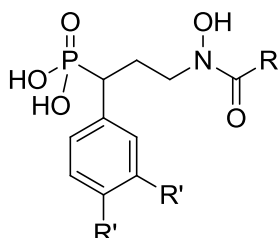
Abb. 37: Weitere α -arylsubstituierte Fosmidomycin-Analoga.*

Alle α -arylsubstituierten Fosmidomycin-Derivate zeigen zwar gegenüber der *EcDxr* um den Faktor 2–15 erhöhte IC₅₀-Werte im Vergleich zu Fosmidomycin, sind diesem aber in der Wachstumshemmung von *P. falciparum* Dd2 und 3D7 deutlich überlegen.[†] Die *N*-formylsubstituierten Verbindungen sind aktiver als die entsprechenden *N*-Acetyl-Derivate. Wie die Ergebnisse von *Kurz* bereits gezeigt hatten, wirkt sich auch hier eine elektronenziehende Substitution des Aromaten günstig auf die antiplasmodiale Aktivität aus (**XXXIVc**, **XXXVb**). Die gute antiplasmodiale Wirksamkeit der später veröffentlichten α -4-Cyanophenyl-Derivate **XXXVc** und **i** bestätigt diesen Zusammenhang.²⁵⁴

* **XXXVc** und **i** wurden als Bisammoniumphosphonate hergestellt.

† Zur besseren Übersichtlichkeit sind nur die IC₅₀-Werte für die *PfDd2*-Inhibition gezeigt, die Aktivitäten der Verbindungen gegenüber 3D7 zeigen vergleichbare Tendenzen.

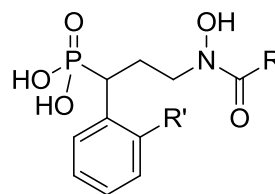
α -Arylsubstituierte Fosmidomycin-Analoga wurden kürzlich von *Andaloussi, Henriksson et al.* auf ihre inhibitorische Aktivität gegenüber *MtDxr* untersucht. In einer 2011 veröffentlichten Arbeit wurde gezeigt, dass die bereits vorgestellten dichlorphenylsubstituierten Verbindungen **XXXVb** und **h** die bisher stärksten Fosmidomycin-analogen Inhibitoren dieses Enzyms sind, während das ebenfalls bekannte α -Phenyl-Analogon von FR900098 (**XXXVd**) *MtDxr* schwächer inhibiert (**Abb. 38**).²⁵⁵

**XXXV**

b: R = H, R' = Cl IC_{50} (*MtDxr*) = 0.15 μ M
d: R = Me, R' = H IC_{50} (*MtDxr*) = 7.4 μ M
h: R = Me, R' = Cl IC_{50} (*MtDxr*) = 0.7 μ M

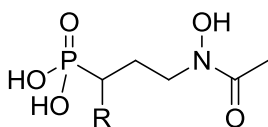
Fos: IC_{50} (*MtDxr*) = 0.08 μ M

FR: IC_{50} (*MtDxr*) = 0.16 μ M

**XXXVI**

a: R = H, R' = Br IC_{50} (*MtDxr*) = 5.6 μ M
b: R = Me, R' = Br IC_{50} (*MtDxr*) = 210 μ M
c: R = Me, R' = Me IC_{50} (*MtDxr*) = 205 μ M

XXXVIa-c: MIC (*MtH37Rv*) > 32 μ g/mL

**XXXVII**

a: IC_{50} (*MtDxr*) = 1.5 μ M
b: IC_{50} (*MtDxr*) = 4.1 μ M
c: IC_{50} (*MtDxr*) = 0.8 μ M
d: IC_{50} (*MtDxr*) = 27.3 μ M

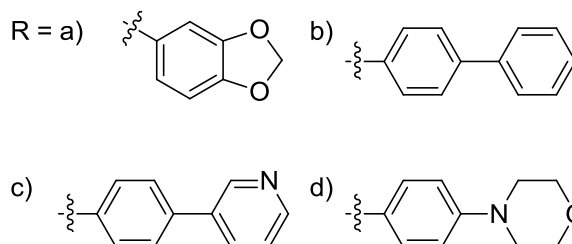


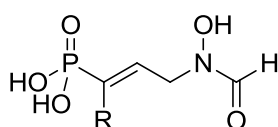
Abb. 38: α -Arylsubstituierte Fosmidomycin-Analoga als *MtDxr*-Inhibitoren.

Auf der Basis von *MtDxr*-Kristallstrukturen wurden α -arylsubstituierte Fosmidomycin-Analoga synthetisiert, die durch eine *ortho*-Substitution des Phenylkerns eine dem aktiven Zentrum der *MtDxr* benachbarte Bindungstasche adressieren sollten (Beispiele: **XXXVI**, **Abb. 38**).¹⁷⁹ Diese Strategie führte jedoch nicht zu einer Verbesserung der *MtDxr*-Inhibition. Während für das Fosmidomycin-Analogon **XXXVIa** noch ein IC_{50} -Wert von 5,6 μ M gemessen wurde, sind die anderen Derivate mit IC_{50} -Werten im dreistelligen mikromolaren Bereich inaktiv. Gegenüber dem *M. tuberculosis*-Stamm H37Rv zeigt keine der Testverbindungen Wachstumsinhibition (MIC > 32 μ g/mL).

Wie bereits angemerkt wurde, wird die fehlende Aktivität Fosmidomycins gegenüber *M. tuberculosis* darauf zurückgeführt, dass dieser polare Wirkstoff die mykobakterielle Zellwand nicht durchdringt. Lipophilere Derivate könnten möglicherweise eine verbesserte Wirkung zeigen. Vor diesem Hintergrund wurde in einer Folgestudie der oben genannten Arbeitsgruppe die inhibitorische Aktivität

von Fosmidomycin-Analoga mit verschiedenen Arylsubstituenten (Beispiele: **XXXVII**, **Abb. 38**) gegenüber *MtDxr* evaluiert.¹⁵⁰ Die Untersuchungen zeigten, dass das Enzym eine große Bandbreite aromatischer Substituenten toleriert. Dies ist vermutlich auf die geringen Wechselwirkungen der Aromatenregion mit dem Enzym zurückzuführen. Die Fosmidomycin-Analoga zeigen gegenüber **XXXVI** schon deutlich verbesserte *MtDxr*-Inhibition, über eine Evaluation der *M. tuberculosis*-Wachstumshemmung wird jedoch in dieser Studie nicht berichtet.

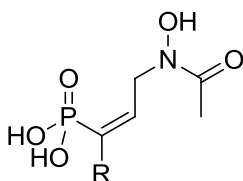
Devreux et al. berichteten 2007 über die Synthese und biologische Evaluation α -arylsubstituierter, α,β -ungesättigter Fosmidomycin-Analoga (Beispiele: **XXVIII** und **XXIV**, **Abb. 39**).²⁵⁶ Durch Rigidisierung des Spacers sollte über den Vergleich der *E*- und *Z*-Isomere die bevorzugte Enzym-Bindungskonformation aufgeklärt werden. Im Gegensatz zum Cyclopropyl-Analogon **XXIXb** sind die α,β -ungesättigten Verbindungen sowohl in *E*- (**XXXVIII**) als auch in *Z*-Konformation (**XXXIX**) gegenüber der *EcDxr* im Vergleich zu Fosmidomycin und FR900098 nur schwach aktiv.



XXXVIII*

a: R = Ph	IC ₅₀ (<i>EcDxr</i>) = 5.7 μ M
b: R = 3,4-diCl-Ph	IC ₅₀ (<i>EcDxr</i>) = 5.5 μ M
c: R = Br	IC ₅₀ (<i>EcDxr</i>) = 0.45 μ M

(*Bis-Ammoniumphosphonat)



XXXIX

R = Ph, 3-/4-Nitrophenyl, 2-/3-Thienyl	IC ₅₀ (<i>EcDxr</i>) > 30 μ M
--	--

Fos:	IC ₅₀ (<i>EcDxr</i>) = 0.034 μ M
FR:	IC ₅₀ (<i>EcDxr</i>) = 0.032 μ M

Abb. 39: α,β -ungesättigte Fosmidomycin-Derivate.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Doppelbindung durch Einschränkung der Rotation in beiden Fällen eine für die Enzymbindung ungünstige Stellung der Pharmakophore zueinander erzeugt. Das aus einer Synthese-Zwischenstufe gewonnene α -Brom-Analogon **XXXVIIIc** zeigt eine deutlich höhere Aktivität als die aromatischen Analoga **XXXVIIIa** und **b**, die vermutlich auf die günstige, elektronenziehende Wirkung des Halogens zurückzuführen ist.²⁵⁶

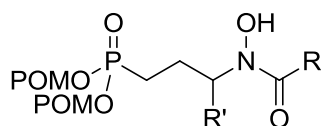
Kurz und Mitarbeiter untersuchten α -alkylsubstituierte Bis-POM-Prodrugs von Fosmidomycin und FR900098 auf ihre Wachstumshemmung von *P. falciparum* (Beispiele: **XL**, **Abb. 40**).²³⁹ Eine α -Methylsubstitution (**XLa** und **b**) konnte unter Aktivitätserhalt vorgenommen werden, während die Einführung größerer Substituenten in α -Position (**XLc**) oder die α -Dimethylierung (**XLd**) einen Wirkungsverlust zur Folge hatten. Der Austausch des α -Methyl- gegen einen α -Hydroxymethyl-Substituenten (**XLe**) ergab Prodrugs mit deutlich verminderter inhibitorischer Aktivität.²³⁹

a: R = H, R' = Me, R'' = H	Inhib. <i>Pf3D7</i> (25μM) = 97 % IC ₅₀ (<i>Pf3D7</i>) = 0.7 μM
b: R = Me, R' = Me, R'' = H	Inhib. <i>Pf3D7</i> (25μM) = 97 %, IC ₅₀ (<i>Pf3D7</i>) = 0.7 μM
c: R = H, R' = Et, R'' = H	Inhib. <i>Pf3D7</i> (25μM) = 57 %
d: R = H, R' = Me, R'' = Me	Inhib. <i>Pf3D7</i> (25μM) = 12 %
e: R = H, R' = CH ₂ OH, R'' = H	IC ₅₀ (<i>Pf3D7</i>) = 3.7 μM

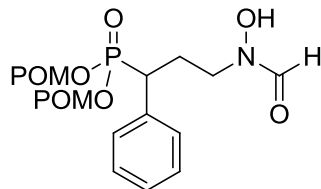
C(=O)N(O)CC(C1=CC=C(C=C1)C()C(*)C)C(=O)OP(=O)(OP(=O)(O)O)OP(=O)(O)O

a: R = H, R' = H Inhib. *Pf*3D7 (10μM) = 58 %
b: R = H, R' = Cl Inhib. *Pf*3D7 (10μM) = 76 %
c: R = Me, R' = Cl Inhib. *Pf*3D7 (10μM) = 23 %

a: R = H, R' = H Inhib. *Pf*3D7 (10μM) = 42 %
b: R = Me, R' = H Inhib. *Pf*3D7 (10μM) = 13 %



Inhib. *Pf*3D7 (100μM) = 26-60%



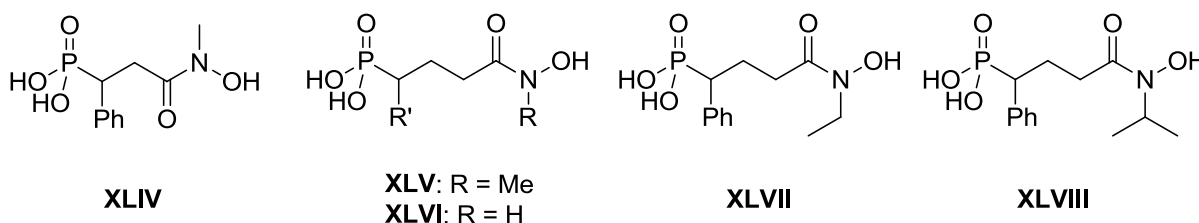
XXXIVa: IC₅₀ (*Pf*3D7) = 3.7 μM
Inhib. *Pf*3D7 (10μM) = 89 %

Fos-POM: IC₅₀ (*Pf*3D7) = 2.1 μM
Inhib. *Pf*3D7 (10μM) = 83 %

FR-POM: IC₅₀ (*Pf*3D7) = 0.7 μM
Inhib. *Pf*3D7 (10μM) = 96 %

Die α -Substitution des Propyl-Spacers von Fosmidomycin wurde im Folgenden auf Aralkylreste erweitert (Beispiele: **XLI**, **Abb. 40**).²⁴⁰ **XLIIb** ist das gegenüber *P. falciparum* inhibitorisch aktivste arylmethylsubstituierte Fosmidomycin-Analogon.²⁴⁰ Wird ein Arylmethyl-Substituent in α -Position noch toleriert, tritt bei der Verlängerung der Alkylkette um ein weiteres Kohlenstoffatom ein deutlicher Wirkungsverlust ein. Die von *Kurz et al.* vorgestellten α -phenylethylsubstituierten Prodrugs **XLII** zeigen im Vergleich zum α -Phenyl-Analogon **XXXIVa** eine reduzierte Aktivität (**Abb. 40**).²⁴¹ Um weitere Struktur-Aktivitäts-Beziehungen aufzuklären, wurden γ -substituierte Prodrugs (**XLIII**) synthetisiert und auf ihre Wachstumshemmung gegenüber *P. falciparum* untersucht.²⁴² Im Vergleich mit dem Bis-POM-Prodrug von α -Phenyl-Fosmidomycin (**XXXIVa**) zeigten diese Derivate bei einer Konzentration von 100 μ M nur 26–60 % Wachstumsinhibition (**Abb. 40**). Die γ -Substitution führt wahrscheinlich zu einer sterischen Hinderung der Metallkomplexierung im aktiven Dxr-Zentrum.²⁴²

Im Jahr 2010 wurden von *Behrendt et al.* inverse, α -phenylsubstituierte Fosmidomycin-Analoga mit unterschiedlicher Kettenlänge und Substitution des Hydroxamsäure-Stickstoffatoms vorgestellt (**Abb. 41**).²¹⁷ Die verschiedenen Derivate wurden auf ihre Hemmwirkung gegenüber den DOXP-Reduktoisomerasen von *P. falciparum* und *E. coli* sowie ihre antiplasmodiale Aktivität gegenüber dem multiresistenten *P. falciparum*-Stamm K1 untersucht.

**XLV**

a: R' = Ph	IC ₅₀ (<i>PfDxr</i>) = 0.003 μ M	IC ₅₀ (<i>EcDxr</i>) = 0.24 μ M	IC ₅₀ (<i>PfK1</i>) = 0.59 μ M
b: R' = 1-Naphthyl	IC ₅₀ (<i>PfDxr</i>) = 0.009 μ M	IC ₅₀ (<i>EcDxr</i>) = 3.8 μ M	IC ₅₀ (<i>PfK1</i>) = 0.97 μ M
c: R' = 3,4-diF-Ph	IC ₅₀ (<i>PfDxr</i>) = 0.003 μ M	IC ₅₀ (<i>EcDxr</i>) = 0.12 μ M	IC ₅₀ (<i>PfK1</i>) = 0.29 μ M
d: R' = 3,4-diCl-Ph	IC ₅₀ (<i>PfDxr</i>) = 0.004 μ M	IC ₅₀ (<i>EcDxr</i>) = 0.18 μ M	IC ₅₀ (<i>PfK1</i>) = 0.41 μ M

XLVI

a: R' = Ph	IC ₅₀ (<i>PfDxr</i>) = 0.012 μ M	IC ₅₀ (<i>EcDxr</i>) = 0.59 μ M	IC ₅₀ (<i>PfK1</i>) = 3.9 μ M
b: R' = 1-Naphthyl	IC ₅₀ (<i>PfDxr</i>) = 0.037 μ M	IC ₅₀ (<i>EcDxr</i>) = 7.4 μ M	IC ₅₀ (<i>PfK1</i>) = 2.4 μ M
c: R' = 3,4-diF-Ph	IC ₅₀ (<i>PfDxr</i>) = 0.003 μ M	IC ₅₀ (<i>EcDxr</i>) = 0.21 μ M	IC ₅₀ (<i>PfK1</i>) = 0.38 μ M

XLVII:	IC ₅₀ (<i>PfDxr</i>) = 0.015 μ M	IC ₅₀ (<i>EcDxr</i>) = 15 μ M	IC ₅₀ (<i>PfK1</i>) = 1.3 μ M
---------------	---	--	--

Fos:	IC ₅₀ (<i>PfDxr</i>) = 0.144 μ M	IC ₅₀ (<i>EcDxr</i>) = 0.22 μ M	IC ₅₀ (<i>PfK1</i>) = 3.7 μ M
-------------	---	--	--

XLIV, XLVIII:	inaktiv gegenüber <i>PfDxr</i> , <i>EcDxr</i> und <i>PfK1</i>		
----------------------	---	--	--

Abb. 41: α -arylsubstituierte, inverse Fosmidomycin-Analoga.

Das *N*-methylsubstituierte, kettenverkürzte Analogon **XLIV** zeigt weder im Enzym- noch im Zellkulturassay inhibitorische Aktivität. Dagegen ist das *N*-methylierte inverse Analogon **XLVa** ein hochpotenter *PfDxr*-Inhibitor und inhibiert das Enzym mit einem IC₅₀-Wert von nur 3 nM. Die *EcDxr*-Inhibition durch **XLVa** ist um zwei Zehnerpotenzen schwächer und mit derjenigen Fosmidomycins vergleichbar.* In der Wachstumsinhibition des *P. falciparum*-Stamms K1 übertrifft **XLVa** Fosmidomycin dagegen deutlich. Das Analogon **XLVIa** mit freier Hydroxamsäure-Funktionalität inhibiert die *PfDxr* schwächer als **XLVa**, aber um den Faktor 10 stärker als Fosmidomycin. Die *EcDxr*-Inhibition durch **XLVIa** ist im Vergleich zu Fosmidomycin niedriger, während die antiplasmodiale Aktivität vergleichbar ist.²¹⁷

In einer 2011 publizierten Folgearbeit wurden weitere Inhibitoren dieses Typs vorgestellt, bei denen der aromatische α -Substituent und der Hydroxamsäure-Substituent variiert wurden.²¹⁸ **XLVb,d** und

* Anders als Fosmidomycin und FR900098 bewirken **XLVa** und **XLVIa** keine Inhibition des rekombinanten DRL-Enzyms von *Brucella abortus*.¹⁷²

XLVIc besitzen elektronenziehende Halogensubstituenten und hemmen die *PfDxr* mit IC_{50} -Werten von 3–4 nM so effektiv wie **XLVa**, sind gegenüber der *EcDxr* und dem *P. falciparum*-Stamm K1 jedoch noch aktiver. Demnach ist auch bei inversen Fosmidomycin-Analoga eine elektronenziehende aromatische Substitution aktivitätssteigernd.²⁵¹ Interessanterweise toleriert die *PfDxr* auch einen sterisch anspruchsvollen 1-Naphthylsubstituenten in α -Position: **XLVb** und **XLVIb** zeigen *PfDxr*-Inhibition im niedrigen nanomolaren Bereich, *EcDxr*-Inhibition und *PfK1*-Wachstumshemmung sind jedoch schwächer ausgeprägt als bei den anderen arylsubstituierten Derivaten (Ausnahme: **XLVIa**). Auch hier wirken *N*-Methylderivate stärker als freie Hydroxamsäuren. Größere *N*-Substituenten verringern die antiplasmodiale und Dxr-hemmende Aktivität (vergleiche **XLVa**, **XLVII** und **XLVIII**).

XLVc und **XLVIc** wurden im *P. berghei*-Mausmodell evaluiert. In diesen Versuchen zeigte die freie Hydroxamsäure **XLVIc** eine mit Chloroquin vergleichbare *in vivo*-Aktivität, während **XLVc** keine nennenswerte Aktivität aufweist.²¹⁸ **Abb. 42** zeigt eine Kaplan-Meier-Analyse²⁵⁷ der mit **XLVc**, **XLVIc**, Fosmidomycin und Chloroquin durchgeführten *in vivo*-Experimente.

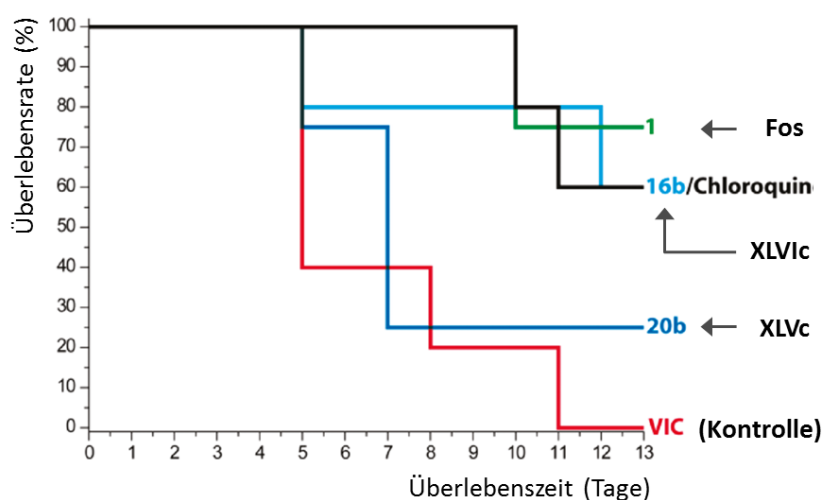


Abb. 42: Kaplan-Meier-Analyse der *in vivo*-Experimente an künstlich mit *P. berghei*-infizierten Mäusen (modifiziert nach Behrendt, 2011²¹⁸).

Mittels Röntgenkristallstrukturanalyse konnte exemplarisch der Bindungsmodus von **XLVc** an die *EcDxr* aufgeklärt werden (**Abb. 43**). Die Wechselwirkungen der Pharmakophore mit dem aktiven *EcDxr*-Zentrum und die oktaedrische Metallkoordination sind weitgehend analog zu Fosmidomycin. Wegen des sterisch anspruchsvollen Phenylsubstituenten kann die flexible Schleife allerdings keine geschlossene Konformation einnehmen. Die Kristallstruktur lässt hydrophobe Wechselwirkungen des *N*-Methylsubstituenten mit dem Difluorphenylrest und dem Kohlenstoffrückgrat des Inhibitors erkennen. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie der *EcDxr* und *PfDxr* wird ein gleichartiger Bindungsmechanismus von Inhibitoren dieses Strukturtyps an die *PfDxr* angenommen.

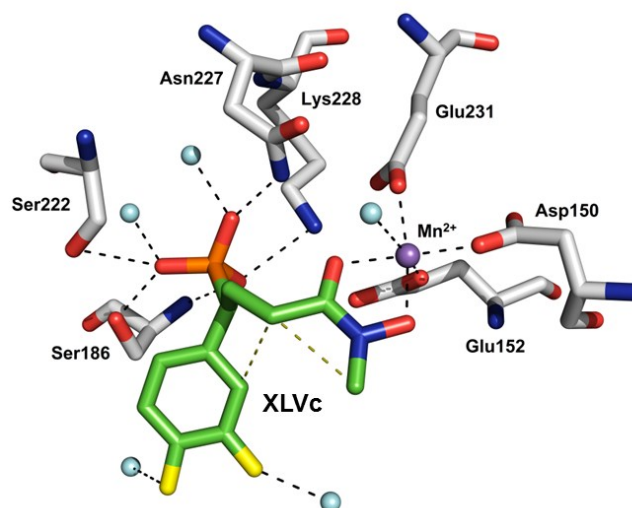
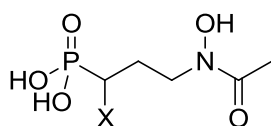


Abb. 43: Darstellung des katalytischen *EcDxr*-Zentrums mit gebundenem Inhibitor **XLVc**. Die schwarzen gestrichelten Linien stellen die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der *EcDxr*, den Liganden und Wassermolekülen (blau) dar. Die grünen gestrichelten Linien zeigen intramolekulare van der Waals-Wechselwirkungen zwischen der *N*-Methylgruppe, dem α -Arylsubstituenten und den Methylengruppen von **XLVc** (Grafik erstellt mit PyMOL* aus der PDB-Datei 3R0I).

Wie bereits anhand verschiedener Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen festgestellt wurde, ist eine zweifach deprotonierte Phosphonsäurefunktionalität essenziell für die ausgeprägte Wirksamkeit eines Dxr-Inhibitors. Die gute Aktivität von α -3,4-Dichlorphenyl-Fosmidomycin (**XXXVb**) ist vermutlich neben der Lipophilie des Moleküls auch auf den elektronenziehenden Effekt des Aromaten zurückzuführen, der eine Erniedrigung des zweiten pK_s -Wertes der Phosphonsäure bewirkt. Um diesen Effekt auch bei aliphatischen Fosmidomycin-Analoga zu erhalten, wurden von *Verbrugghen et al.* α -halogensubstituierte FR900098-Analoga synthetisiert (**XLIX** und **L**, **Abb. 44**).²⁵⁸ In der 2010 veröffentlichten Studie konnte gezeigt werden, dass α -halogenierte Analoga *in vitro* gegenüber dem multiresistenten *P. falciparum*-Stamm K1 inhibitorisch wirksamer sind als Fosmidomycin und FR900098. Die gute Aktivität von **XXXVb** kann durch die aliphatischen Derivate *in vitro* nicht übertroffen werden. Im *in vivo*-Modell mit *P. berghei*-infizierten Mäusen führte die Behandlung mit **XLIXb** und **L** allerdings zu einer höheren mittleren Überlebensdauer[†] als mit FR900098, während **XXXVb** trotz des vielversprechenden *in vitro*-Potenzials keine signifikante Aktivität zeigte.²⁵⁸

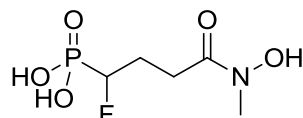
* The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3 Schrödinger, LLC.

† MST = mean survival time.

**XLIX****XLIX**

a: X = Cl IC_{50} (PfK1) = 0.30 μ M
b: X = F IC_{50} (PfK1) = 0.29 μ M, MST = 15.8

L: IC_{50} (PfK1) = 0.31 μ M, MST = 11.7

**L**

zum Vergleich:

XXXVb: IC_{50} (PfK1) = 0.16 μ M, MST = 7.0

Fos: IC_{50} (PfK1) = 1.73 μ M, MST = 11.5

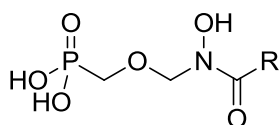
FR: IC_{50} (PfK1) = 0.42 μ M, MST = 10.8

(*MST = Mittlere Überlebensdauer in Tagen)

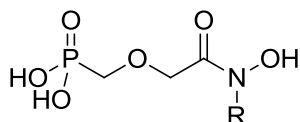
Abb. 44: α -halogenierte FR900098-Analoga.

Im Hinblick auf die Bedeutung der zweifach deprotonierten Phosphonsäurefunktionalität für die Enzyminhibition wurde von *Haemers et al.* 2008 ein neuartiger Typ von Fosmidomycin-Analoga entwickelt.²⁵⁹ Fosfoxacin, das Phosphat-Analogon von Fosmidomycin, und das Phosphat-Analogon von FR900098 inhibieren rekombinante *Synechocystis* Dxr deutlich stärker als Fosmidomycin, was unter anderem auf die höhere Acidität von Phosphorsäuren im Vergleich zu Phosphonsäuren zurückgeführt wird.²²⁸ Um die Deprotonierung der Phosphonsäure- und/oder der Hydroxamsäurefunktionalität zu unterstützen, wurden bei Fosmidomycin und FR900098 die β -Methylengruppen gegen ein isosteres Sauerstoffatom ausgetauscht (**LIIa** und **b**, **Abb. 45**). Als inverse Hydroxamsäure-Analoga wurden zusätzlich die β -Oxa-Isostere **LIIa** und **b** sowie die entsprechenden γ -Oxa-Isostere **LIIIa** und **b** synthetisiert. Letztere sollen durch das Sauerstoffatom die Hydroxygruppe am C4 des Substrates imitieren, welche durch Wasserstoffbrückenbildung zur Enzymbindung beiträgt.

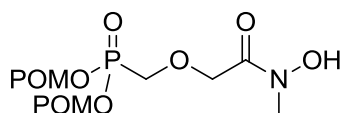
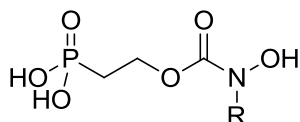
Untersuchungen an rekombinanter *EcDxr* zeigten, dass das β -Oxa-Isoster **LIIb** und die dazu inverse Hydroxamsäure **LIIb** im direkten Vergleich eine etwas höhere inhibitorische Aktivität zeigen als das von *Rohmer* synthetisierte, *N*-methylierte inverse Fosmidomycin-Analogon **XIII** (in dieser Arbeit: IC_{50} (*EcDxr*) = 0,097 μ M). Sie sind jedoch geringfügig schwächer aktiv als Fosmidomycin und FR900098. **LIIb** und **LIIb** übertreffen dagegen in ihrer *P. falciparum*-Wachstumshemmung Fosmidomycin und sogar FR900098, das *in vitro* bislang die aktivste Verbindung war. Vor *Behrendts* Entwicklung der inversen, α -arylsubstituierten Fosmidomycin-Analoga^{217,218} war **LIIb** das erste bekannte Analogon mit verbesserter antiplasmodialer Aktivität *in vitro* gegenüber Fosmidomycin und FR900098. Das β -Oxa-Isoster **LIIa** zeigt eine 12–14fach verminderte Enzym- und Wachstumshemmung gegenüber der *EcDxr* bzw. *P. falciparum* 3D7, die *EcDxr*-Inhibition durch das inverse **LIIa** ist noch geringer. Die antiplasmodiale Aktivität des instabilen Oxa-Isosters **LIIb** konnte durch die Derivatisierung zum Bis-POM-Prodrug **LIII** um den Faktor 5 gesteigert werden. Die inversen γ -Oxa-Isostere **LIV** zeigen hingegen bei einer Konzentration von 3 μ M keine Inhibition der *EcDxr* und wurden deshalb gegenüber *P. falciparum* 3D7 nicht evaluiert.²⁵⁹

**LI**

a: R = H IC_{50} (*EcDxr*) = 1.11 μ M, IC_{50} (*Pf3D7*) = 4.9 μ M
b: R = Me IC_{50} (*EcDxr*) = 0.087 μ M, IC_{50} (*Pf3D7*) = 0.36 μ M

**LII**

a: R = H IC_{50} (*EcDxr*) > 3 μ M
b: R = Me IC_{50} (*EcDxr*) = 0.072 μ M, IC_{50} (*Pf3D7*) = 0.24 μ M

**LIII:** IC_{50} (*Pf3D7*) = 0.051 μ M**LIV**

a: R = H IC_{50} (*EcDxr*) > 3 μ M
b: R = Me IC_{50} (*EcDxr*) > 3 μ M

Fos: IC_{50} (*EcDxr*) = 0.054 μ M, IC_{50} (*Pf3D7*) = 1.20 μ M
FR: IC_{50} (*EcDxr*) = 0.062 μ M, IC_{50} (*Pf3D7*) = 0.43 μ M

Abb. 45: β - und γ -Oxa-Isostere von Fosmidomycin und FR900098.

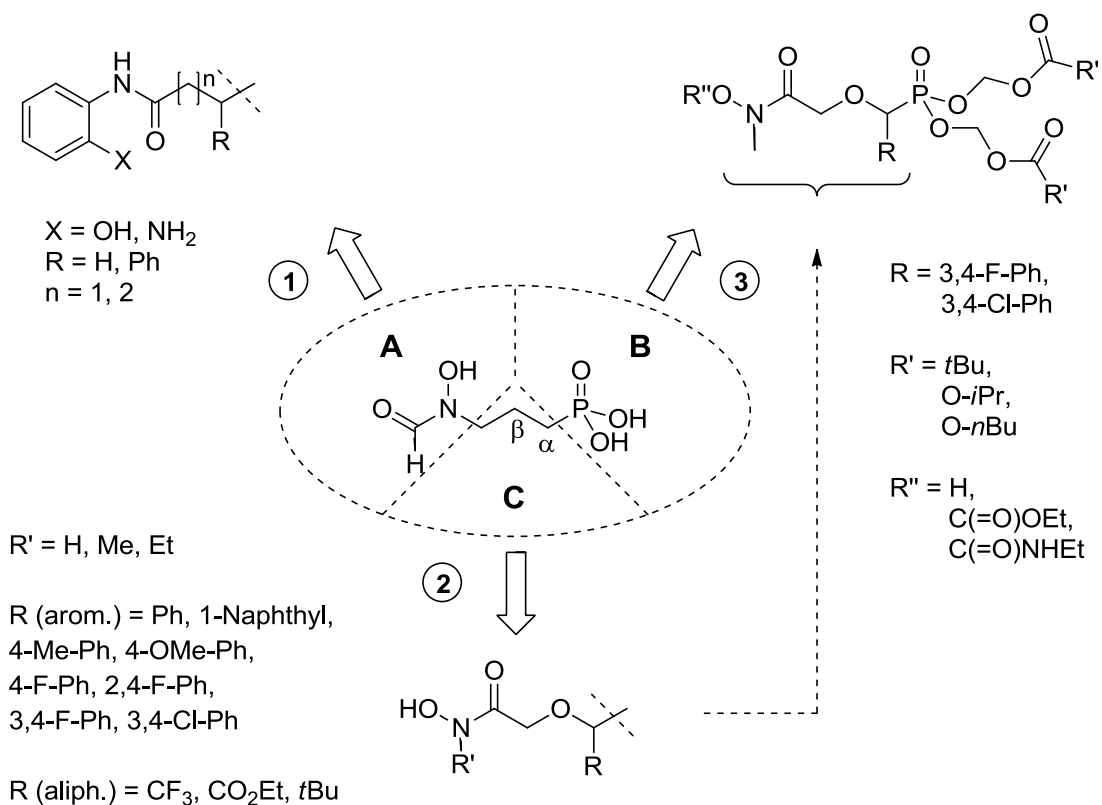
Bei allen bisher untersuchten, am Propyl-Spacer einfach substituierten Fosmidomycin-Analoga handelt es sich um racemische Gemische. Für den Fall, dass der Substituent der Propylkette direkte Wechselwirkungen zum Enzym eingeht oder stereoselektiv Wasser verdrängt, kann eine höhere Aktivität eines der beiden Enantiomere angenommen werden.

1.7 Aufgabenstellung

Die im Rahmen dieser Arbeit geplanten Strukturvariationen von Fosmidomycin sollten alle drei Molekülregionen umfassen, wobei die Variationen der funktionellen Gruppen meist mit einer strukturellen Veränderung des Spacers verbunden wurden (**Schema 1**). An dieser Stelle wird nur ein allgemeiner Überblick über die geplanten Fosmidomycin-Derivate gegeben, da die Entwicklungen der einzelnen Zielstrukturen in den betreffenden Kapiteln detaillierter beschrieben werden.

1. Zunächst sollte die Molekülregion A von Fosmidomycin durch Austausch der Hydroxamsäurefunktionalität gegen eine bei Fosmidomycin-Analoga bisher noch nicht beschriebene *ortho*-Hydroxy- oder *ortho*-Aminobenzamid-Struktur variiert werden. Vor Beginn der eigenen Arbeiten waren bereits Metalloenzyminhibitoren bekannt, bei denen die Hydroxamsäurefunktionalität in Benzamid-Derivaten erfolgreich gegen die genannten Strukturelemente ausgetauscht wurde. Dieses Konzept sollte auf Fosmidomycin übertragen werden. Durch Variation von Länge und Substitution des Spacers (Molekülregion C) sollte eine erste Optimierung der neuen Benzamid-Leitstruktur erreicht werden.
2. Vor Beginn der eigenen Arbeiten wurden β -Oxa-Analoga Fosmidomycins beschrieben, die in ihrer antiplasmodialen *in vitro*-Aktivität Fosmidomycin und FR900098 übertreffen. Daher sollte im Hauptteil dieser Arbeit der Spacer (C) modifiziert werden, indem die zur Phosphonsäurefunktionalität β -ständige Methylengruppe gegen ein Sauerstoffatom ausgetauscht wurde. Durch die eigene Arbeitsgruppe war bereits zu Beginn der Dissertation auch das gute antiplasmodiale Potenzial inverser, α -arylsubstituierter Fosmidomycin-Analoga gezeigt worden. Um die Vorteile beider Strukturvariationen zu kombinieren, sollte die Inversion der Hydroxamsäurefunktionalität (A) zusammen mit der Substitution des Spacers (C) in α -Position zur Phosphonsäurefunktionalität in Form von neuartigen β -Oxa-Isosteren Fosmidomycins zur Anwendung kommen.
3. Im dritten Teil der Arbeit sollten die antiplasmodial aktivsten Fosmidomycin-Analoga aus Teil 2 in Form verschiedener Phosphonsäureester-Prodrugs derivatisiert werden (Molekülregion B). An einem ausgewählten Prodrug sollte zudem die inverse Hydroxamsäurefunktionalität (A) derivatisiert werden, um einen neuartigen Typ von lipophilen Doppelster-Prodrugs zu erhalten, der zuvor im Arbeitskreis für inverse Fosmidomycin-Analoga entwickelt worden war.

Alle Fosmidomycin-Derivate sollten auf ihre inhibitorische Aktivität gegenüber den DOXP-Reduktoisomerasen von *P. falciparum*, *E. coli* und *M. tuberculosis* und ihre antiplasmodiale Wirkung gegenüber verschiedenen *P. falciparum*-Laborstämmen untersucht werden.



Schema 1: Im Rahmen der Dissertation geplante Strukturvariationen von Fosmidomycin.

2 Fosmidomycin-Analoga mit Benzamid-Teilstruktur

2.1 Metalloenzyme als pharmazeutische Targets

Etwa ein Drittel aller bekannten Enzyme enthalten Metallionen als Kofaktoren und werden daher unter dem Begriff Metalloenzyme zusammengefasst. Sie kommen in allen Lebewesen vor, üben vielfältige metabolische Funktionen aus und gehören zu den bisher am intensivsten untersuchten Enzymklassen.^{260,261} Viele Metalloenzyme sind therapeutische Zielstrukturen für die Behandlung von kardiovaskulären, neurodegenerativen, entzündlichen Erkrankungen, Krebserkrankungen oder Infektionskrankheiten.^{260,262} Diese Enzymklasse eignet sich besonders für eine struktur- und mechanismusbasierte Entwicklung synthetischer Inhibitoren: Das Metallion kann als eine Art molekularer „Anker“ genutzt werden, über den Substratanaloga, die mit einer metallkomplexierenden Funktionalität versehen sind, gezielt im katalytischen Zentrum binden sollen.^{260,263} Als erstes Beispiel für ein derartiges strukturbasiertes Inhibitor-Design gilt die Entwicklung des ACE-Hemmers Captopril im Jahr 1975.^{261,264,265} Neben der im Einleitungskapitel vorgestellten DOXP-Reduktoisomerase sollen hier zwei weitere Metalloproteine vorgestellt werden, für die Hydroxamsäuren als Inhibitoren bekannt sind. Strukturabwandlungen dieser Hydroxamsäuren können als Vorlage für die Entwicklung neuartiger, Fosmidomycin-analoger Dxr-Inhibitoren dienen (siehe Abschnitte 2.1.2 und 3.1).

Histondesacetylasen (HDAC) enthalten ein zweiwertiges Zinkkation als Kofaktor. Bisher sind 18 Subtypen bekannt, die in die Klassen I bis IV eingeteilt werden. Die spezifischen Funktionen der einzelnen Isoformen sind erst teilweise bekannt. HDACs regulieren die Chromatinstruktur durch epigenetische Modifikationen, indem sie den Acetylrest *N*-terminaler Lysinreste an Histonproteinen* abspalten. Die Zugänglichkeit der DNA für Transkriptionsfaktoren und damit die Gentranskription werden durch diesen Prozess erschwert.^{266,267} Die Fehlregulation des Acetylierungsgleichgewichts wird mit der Entstehung bestimmter Krebsarten und neurodegenerativer Erkrankungen in Zusammenhang gebracht.²⁶⁶ HDAC-Inhibitoren werden als Krebstherapeutika eingesetzt, da sie gezielt die Proliferation von Tumorzellen stoppen können, während sie gegenüber Zellen, die sich nicht in Teilung befinden, nur eine geringe Toxizität zeigen.²⁶⁸ Ob Isoform-spezifische HDAC-Inhibitoren Vorteile gegenüber unselektiven Inhibitoren besitzen, ist noch nicht bekannt.²⁶⁹⁻²⁷¹

Die Peptiddeformylase (PDF) enthält ein katalytisches Eisen(II)-Ion und übernimmt eine essenzielle Funktion in der bakteriellen Proteinbiosynthese, da sie die Formylgruppe am *N*-Terminus des naszierenden Proteins abspaltet. Im menschlichen Organismus ist PDF nicht essenziell.^{272,273} PDF-Inhibitoren gelten als potenzielle neue Antibiotika mit einem neuartigen Wirkmechanismus, die eine Überwindung bestehender Resistenzen ermöglichen könnten.^{272,274} Einige PDF-Inhibitoren werden im Zusammenhang mit dem Bioisosterie-Konzept in Abschnitt 3.1 vorgestellt.

* Auch Nicht-Histonproteine sind Substrate von HDACs, beispielsweise Transkriptionsfaktoren oder Proteine, die das Zytoskelett stabilisieren oder an nukleären Transportvorgängen beteiligt sind.²⁶⁶

2.1.1 Hydroxamsäuren als Metalloenzyminhibitoren

Wie bereits in Abschnitt 1.4 beschrieben, ist die Hydroxamsäurefunktionalität des Dxr-Inhibitors Fosmidomycin für dessen Bindung an das Enzym essenziell, da sie das zweiwertige Metallkation im aktiven Zentrum zu chelatisieren vermag. Die vor über 100 Jahren von *Lossen* entdeckten Hydroxamsäuren sind wegen ihrer ausgeprägten Fähigkeit zur Metallkomplexierung auch unter den Inhibitoren anderer Metalloenzyme zahlreich vertreten.²⁷⁵

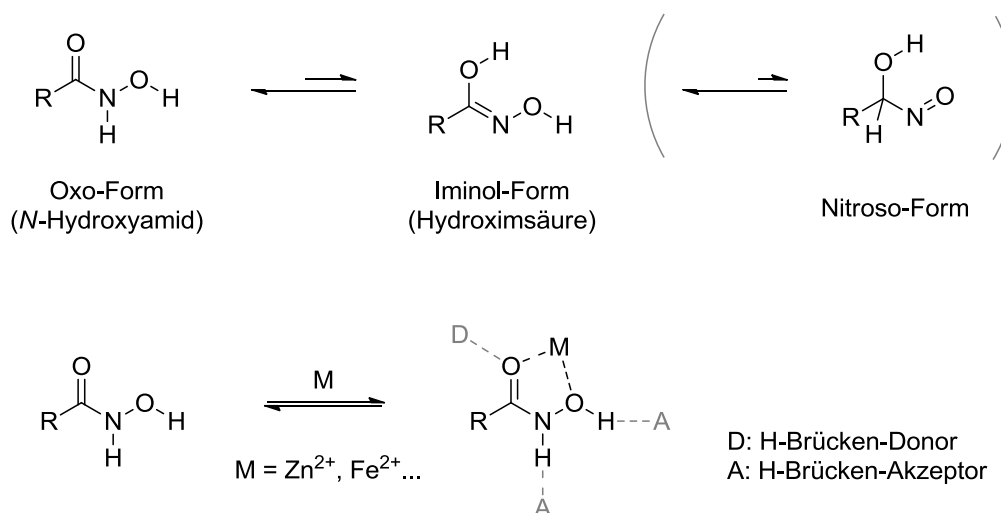


Abb. 46: oben: Hydroxamsäure-Tautomere (dargestellt ist jeweils das *Z*-Isomer), unten: Metallkomplexierung und mögliche Wasserstoffbrückenbindungen in der Oxo-Form.

Die Hydroxamsäure-Gruppe liegt überwiegend in zwei tautomeren Formen vor, die als Oxo- und Iminol-Form bezeichnet werden (**Abb. 46**). Experimentellen Untersuchungen und theoretischen Berechnungen zufolge ist die Oxo-Form stabiler als die Iminol-Form, während die ebenfalls mögliche, in der Literatur allerdings selten erwähnte Nitroso-Form am instabilsten ist. Oxo- und Iminol-Form können jeweils in *E*- und *Z*-Konformation vorliegen. Hydroxamsäuren reagieren schwach sauer und besitzen abhängig von Lösungsmittel und molekularer Umgebung einen pK_s -Wert von etwa 9.²⁷⁶⁻²⁷⁸ Sowohl *N*- als auch *O*-Anionen konnten nachgewiesen werden, es ist aber noch nicht geklärt, ob Hydroxamsäuren im wässrigen Medium eher NH - oder OH -acide sind.²⁷⁹ Wie an Acetohydroxamsäure durch *ab initio*-Berechnungen und NMR-, spektrophotometrische und potentiometrische Messungen festgestellt werden konnte, erfolgt die Deprotonierung freier Hydroxamsäuren bevorzugt aus der Oxo-Form an der NH -Gruppe.²⁷⁸ Andere Autoren favorisieren auf Basis von *ab initio*-Berechnungen für wässriges Medium die Dissoziation der OH -Bindung auf Grund der höheren Stabilität des *O*-Anions im Vergleich zum *N*-Anion.²⁸⁰

Hydroxamsäuren binden Metalle meist als zweizählige Liganden in der *Z*-Konformation und bilden fünfgliedrige Chelatkomplexe aus, bei denen das Metallion von dem Carbonyl- und dem Hydroxamat-Sauerstoffatom koordiniert wird. Die Hydroxamsäurefunktionalität besitzt zusätzliche Möglichkeiten zum Aufbau von Wasserstoffbrückenbindungen, beispielweise mit den Aminosäureresten von

Enzymen (**Abb. 46**).²⁸¹⁻²⁸³ Hydroxamsäuren können unter physiologischen Bedingungen, insbesondere katalysiert durch Esterasen im Blutplasma zu den korrespondierenden Carbonsäuren hydrolysiert werden. Damit wird die Verteilung des Wirkstoffs nachteilig beeinflusst und die Wirkung vermindert, da Carbonsäuren gegenüber der Zielstruktur in der Regel deutlich geringere Aktivität zeigen. Ein weiteres Problem könnte die Toxizität des Hydrolyseproduktes Hydroxylamin sein.²⁸⁴ Die Hydrolyseempfindlichkeit einiger Hydroxamsäuren kann im positiven Sinne für die Entwicklung von Prodrugs auch genutzt werden. Eine Studie über die Plasmastabilität von Hydroxamsäuren zeigte, dass die Plasmahalbwertszeit mit abnehmender Elektrophilie der Carbonylgruppe und zunehmender sterischer Abschirmung der Hydroxamsäurefunktionalität ansteigt.²⁸⁴ Weitere Metabolisierungswege für Hydroxamsäuren sind zum Beispiel *O*-Glucuronidierung²⁸⁵ und *O*-Sulfatierung.²⁸⁶

Therapeutisch werden Hydroxamsäuren wie beispielsweise der Naturstoff **Deferoxamin** (**Abb. 47**) schon seit den 1960er Jahren als Antidot bei Eisenintoxikation eingesetzt. Durch oktaedrische Koordination von Eisen(III)-Ionen mittels dreier Hydroxamatgruppen entstehen stabile, wasserlösliche Komplexe. Ein weiteres Anwendungsbeispiel sind Siderophore, bei denen es sich um niedermolekulare Hydroxamsäuren handelt, die in Bakterien den aktiven Eisentransport durch Zellmembranen übernehmen. Als Biokonjugate mit Antibiotika können Siderophore als sogenannte „Trojanische Pferde“ zum Einschleusen von Wirkstoffen in Bakterien genutzt werden, um eine höhere Bioverfügbarkeit zu erreichen und membranassoziierte Resistenzmechanismen zu überwinden.^{281,287,288} Die hohe Metallionen-Affinität der Hydroxamsäuren ist neben der pharmazeutischen Anwendung auch Grundlage analytischer Bestimmungsmethoden, zum Beispiel in Form des purpurfarbenen Komplexes von Hydroxamsäuren mit dreiwertigen Eisenkationen.²⁷⁶

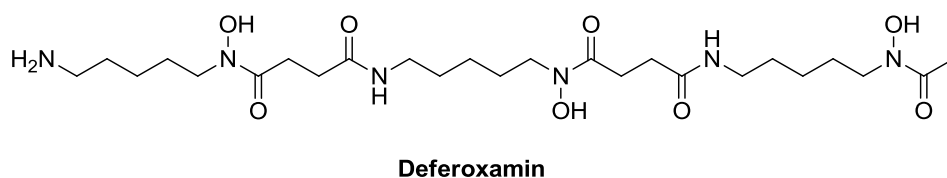


Abb. 47: Beispiel für einen therapeutisch eingesetzten Chelatbildner.

Viele bekannte HDAC-Inhibitoren besitzen eine Hydroxamsäurefunktionalität als Zink-komplexierende Gruppe (**Abb. 48**).²⁸⁹ Im Jahr 1990 wurde die HDAC-inhibierende Wirkung des Naturstoffs **Trichostatin A** (TSA) entdeckt, dessen Weiterentwicklung allerdings an seiner ungünstigen Pharmakokinetik scheiterte.^{266,290} Das 1998 entwickelte **Vorinostat** (SAHA = Suberoylanilid-Hydroxamsäure) ist ein TSA-analoger HDAC-Inhibitor, durch den in verschiedenen Zelltypen Wachstumsstopp, Differenzierung und Apoptose induziert wird.²⁹¹ Mittels Kristallstrukturanalyse konnte der Bindungsmodus von TSA und SAHA als Strukturanaloga der acetylierten Lysin-Seitenkette aufgeklärt werden.²⁹² Im Oktober 2006 wurde mit Vorinostat (Zolinza®) der erste Wirkstoff aus der Klasse der HDAC-Inhibitoren zur Behandlung des kutanen T-Zell-Lymphoms in den USA zugelassen.²⁶⁶

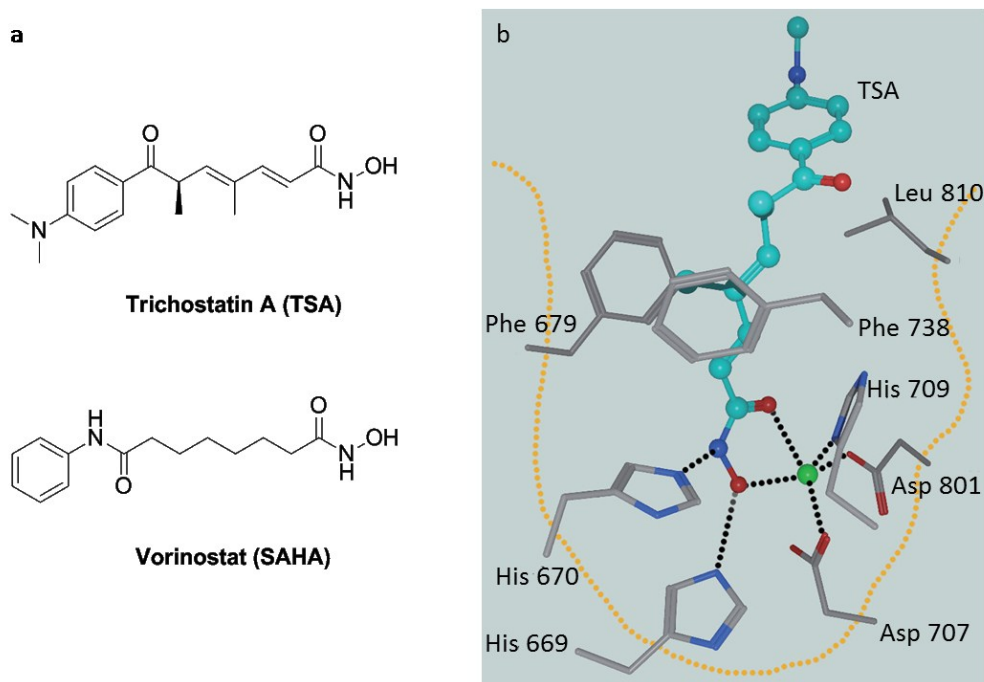


Abb. 48: a) HDAC-Inhibitoren TSA und SAHA, b) Bindung von TSA im katalytischen Zentrum der HDAC 7 (modifiziert übernommen aus *Heinke, 2010*²⁶⁶).

2.1.2 Benzamide als potenzielle Metalloenzymhhibitoren

Der erste Vertreter der HDAC-Inhibitoren aus der Gruppe der Benzamide wurde mit dem Wirkstoff **Dinalin** entdeckt, der in präklinischen Untersuchungen gute Antitumoraktivität zeigte (**Abb. 49**).²⁶⁶ Der zunächst unbekannte Wirkmechanismus dieser Substanzklasse konnte an dem ebenfalls zytostatisch wirksamen Metaboliten **CI-994** (*N*-Acetyldinalin) auf eine HDAC-Inhibition zurückgeführt werden.^{293,294} Das von *Saito et al.* 1999 vorgestellte TSA-Analogon **Entinostat** (**MS 275**, **Abb. 49**) ist eine Weiterentwicklung von *N*-Acetyldinalin und wird derzeit in Kombinations- und Monotherapie in klinischen Phase I- und Phase II-Studien untersucht.^{266,295,296} Obwohl Vorinostat und *N*-Acetyldinalin *in vitro* aktiver sind, zeigt MS-275 *in vivo* nach oraler Applikation eine höhere Wirksamkeit.²⁹⁷ Entinostat und *N*-Acetyldinalin inhibieren im Gegensatz zu dem unspezifisch hemmenden Vorinostat bestimmte HDAC-Isoformen der Klasse HDAC1.^{298,299}

Das *ortho*-Hydroxybenzamid-Analogon von Entinostat (**LV**, **Abb. 49**) zeigt eine ähnlich ausgeprägte HDAC-Inhibition, während in *ortho*-Position unsubstituierte und *meta*- und *para*-substituierte Benzamide inaktiv sind.²⁹⁶ Auch die *ortho*-Amino- und *ortho*-Hydroxybenzamid-Analoga von Vorinostat (**PAOA** = Pimeloylanilid-*ortho*-aminoanilid und **MC1863**) weisen *in vitro* ähnliche Aktivitäten und Wirkungsspektren auf wie Entinostat.³⁰⁰

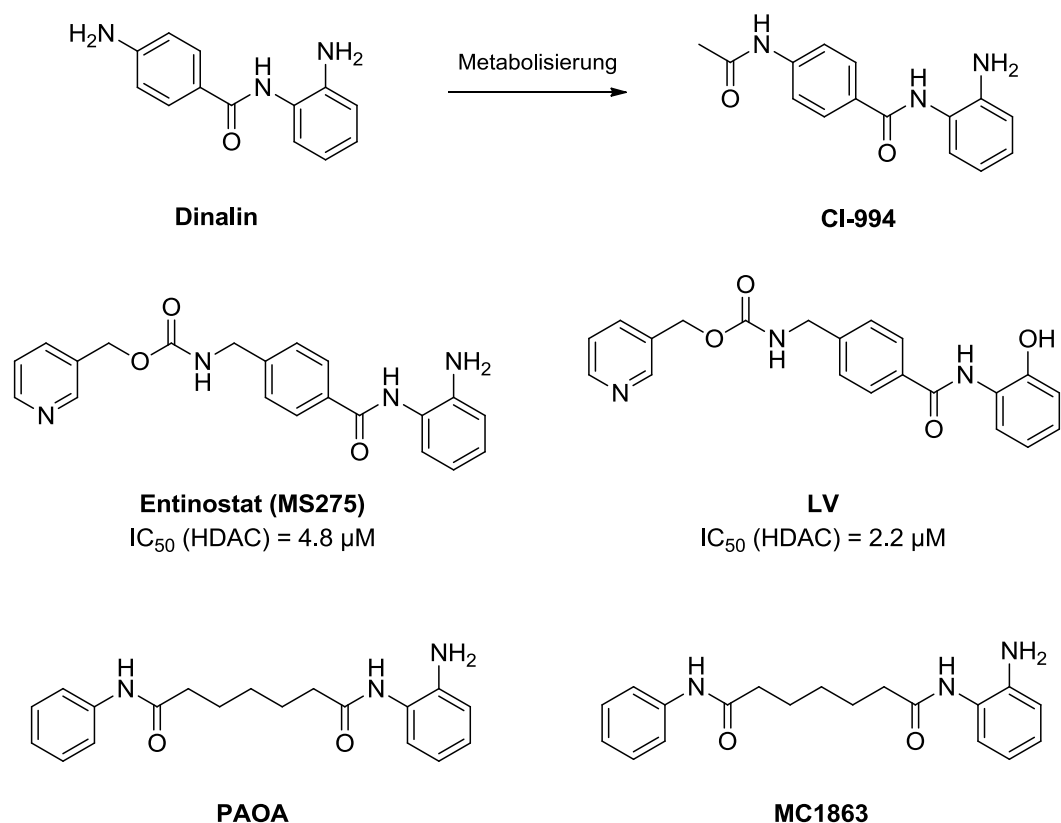
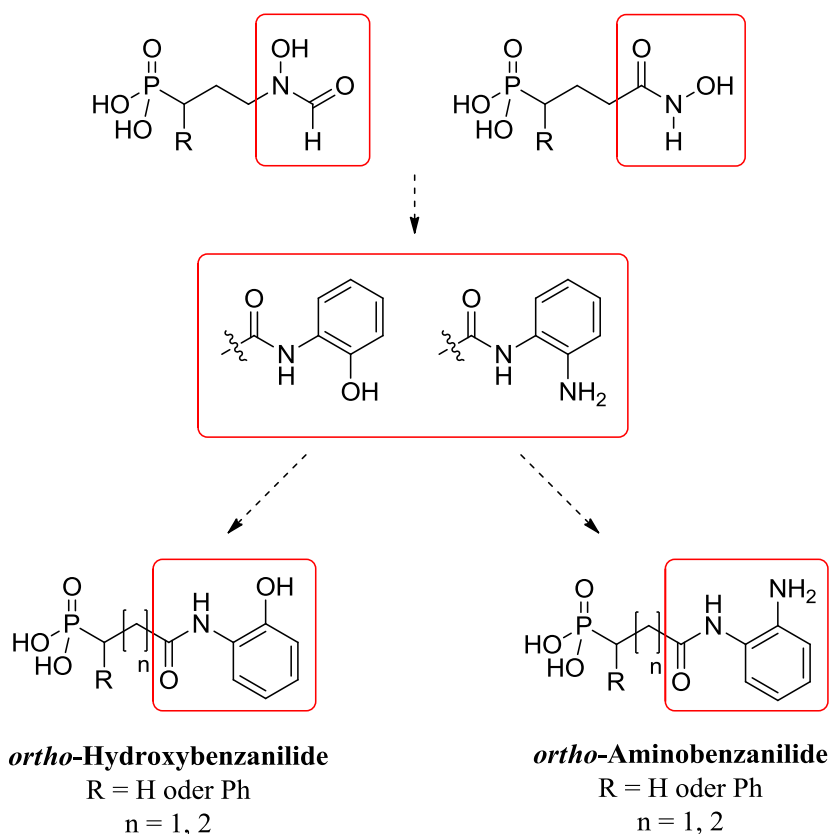


Abb. 49: HDAC-Inhibitoren mit Benzamid-Strukturelement.

Die Tatsache, dass ein *ortho*-Amino- oder *ortho*-Hydroxysubstituent essenziell für die Wirkung der Benzamide ist, wurde durch eine mögliche Chelatisierung des katalytischen Zink-Ions durch dieses Strukturelement begründet.³⁰¹ Die spezifische Interaktion mit dem Enzym könnte aber auch durch Wasserstoffbrücken oder andere Wechselwirkungen dieser Substituenten mit dem Zielenzym hervorgerufen oder begünstigt werden.^{296,301} Die durch Struktur-Aktivitäts-Beziehungen und Docking-Studien unterstützte Hypothese, dass das *ortho*-substituierte Benzanilid als Zink-bindendes Motiv fungiert,³⁰² konnte – beispielsweise durch Kristallstrukturanalysen – bisher nicht bewiesen werden.²⁶⁶

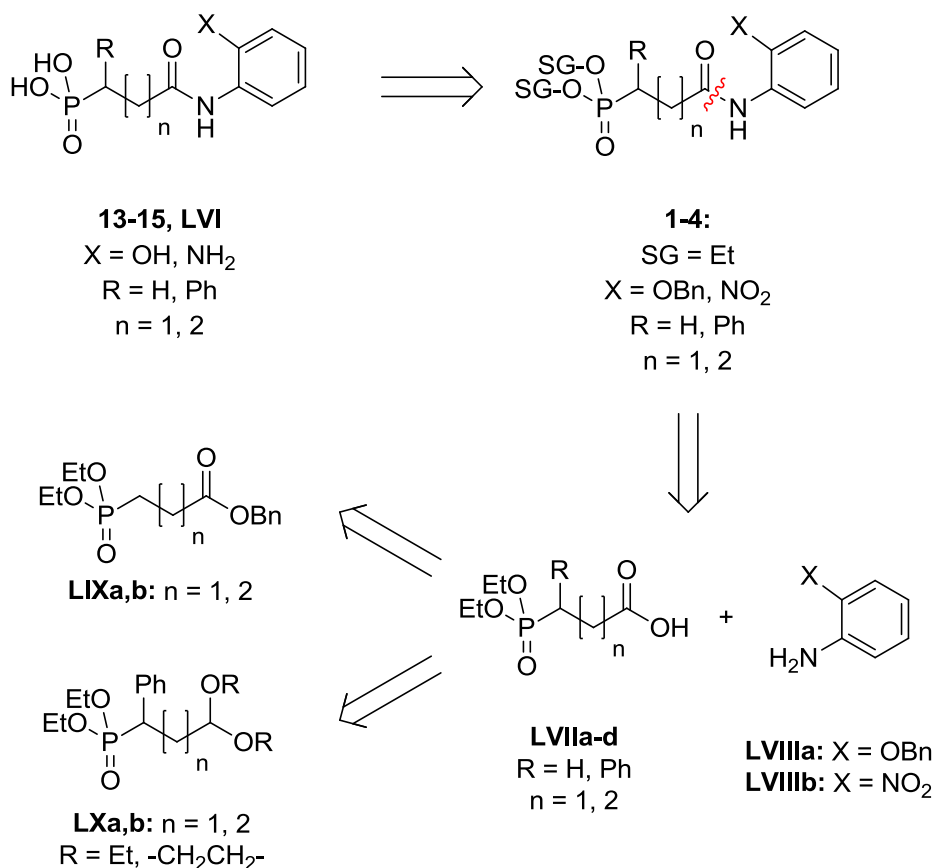
2.2 Synthesestrategie der Fosmidomycin-Analoga mit Benzamid-Teilstruktur

Es sollte überprüft werden, ob das Benzamid-Strukturmotiv der in Abschnitt 2.1.2 beschriebenen HDAC-Inhibitoren zur Entwicklung wirksamer Fosmidomycin-Analoga geeignet ist. Dazu sollte die Hydroxamsäurefunktionalität von Fosmidomycin sowohl durch ein *ortho*-hydroxy- als auch ein *ortho*-aminosubstituiertes Benzanilid ersetzt werden. Diese Strukturelemente können als vinyloge Hydroxamsäure bzw. vinyloges Hydrazid betrachtet werden. Die aromatischen Komponenten Anilin und Phenol sind wie Hydroxamsäuren und Hydrazide harte Lewis-Basen. Gemäß dem HSAB-Prinzip sollten die *ortho*-substituierten Benzanilide also ein gutes Komplexierungsvermögen für harte Lewis-Säuren wie Mg^{2+} - oder Mn^{2+} -Ionen besitzen.^{303,304} Die durch den Austausch des metallkomplexierenden Pharmakophors zu erwartende höhere Lipophilie der Fosmidomycin-Analoga könnte sich zudem günstig auf ihre Bioverfügbarkeit auswirken. In Verbindung mit dem Austausch des Pharmakophors sollte auch die Länge des Propyl-Spacers variiert werden, um den optimalen Abstand der Benzamid-Teilstruktur zur Phosphonsäurefunktionalität zu ermitteln. Auch die bei Fosmidomycin-Analoga bereits erfolgreich eingesetzte Phenylsubstitution in α -Position relativ zur Phosphonsäurefunktionalität sollte in den geplanten Zielstrukturen berücksichtigt werden. **Schema 2** zeigt einen Überblick über die geplanten Strukturvariationen.



Schema 2: Variation der metallkomplexierenden Funktionalität und des Spacers von Fosmidomycin.

2.3 Synthese und Eigenschaften der Benzamid-Analoga von Fosmidomycin



Schema 3: Retrosynthetische Überlegungen zur Gewinnung der Zielverbindungen **13-15** und **LVI**.

Retrosynthetisch lassen sich die Zielstrukturen **13-15** und **LVI** durch eine Spaltung der Amidbindung zerlegen, so dass sich als einfachster Syntheseweg die Kupplung von Carbonsäuren mit *ortho*-substituierten Anilinen anbietet (**Schema 3**). Durch die nachfolgend erläuterte Schutzgruppenstrategie ergeben sich die Vorstufen **1-4**, aus denen die Zielverbindungen freigesetzt werden können.

Die Phosphonocarbonsäuren **LVII** sind literaturbekannt und aus halogenierten Carbonsäuren oder Aldehyden durch Substitutions- oder Additionsreaktionen mit einem nukleophilen Phosphonsäure-Synthon zugänglich (**Schema 5-7**). Da die Carbonsäurefunktionalität für derartige Verknüpfungen maskiert sein muss, liegen die Verbindungen **LVII** zunächst in Form der Benzylester **LIX** und der als *O,O*-Acetal geschützten Aldehyd-Vorstufen **LX** vor (**Schema 3**).

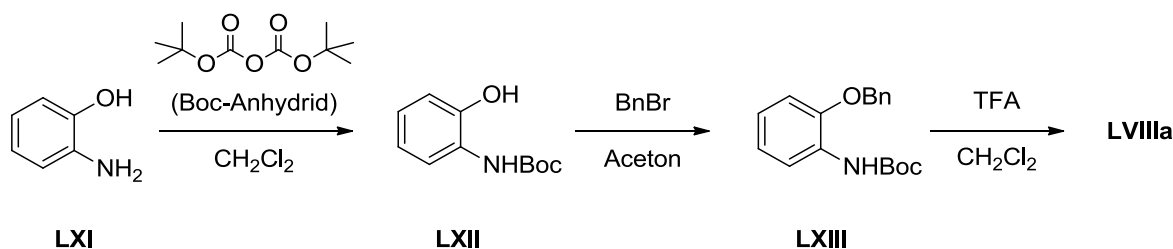
Um Nebenreaktionen bei der Amidkupplung zu vermeiden, sollten die funktionellen Gruppen der aromatischen *ortho*-Position zunächst in geschützter Form vorliegen. Kommerziell erhältliches 2-Nitroanilin (**LVIIIb**) wurde als ein geeignetes Syntheseäquivalent für das 1,2-Phenylendiamin-Synthon ausgewählt, da die Nitrogruppe die Kupplungsreaktion nicht stört und anschließend zu einer Aminogruppe reduziert werden kann.^{305,306} Die Synthese der *ortho*-hydroxysubstituierten Benzamide

sollte von 2-Benzylloxylanilin (**LVIIIa**) ausgehen, da der Benzylether nach erfolgter Amidkupplung hydrogenolytisch gespalten werden kann.³⁰⁷

Die Phosphonsäurefunktionalität der Zielverbindungen **13-15** und **LVI** muss ebenfalls schon zu Beginn der Synthesesequenz in geschützter Form vorliegen, damit selektive Kupplungsreaktionen ablaufen können. Daher wurden die unter milden Reaktionsbedingungen hydrolysierbaren Phosphonsäurediethylester als Edukte gewählt.^{308,309}

2.3.1 Synthese der Edukte

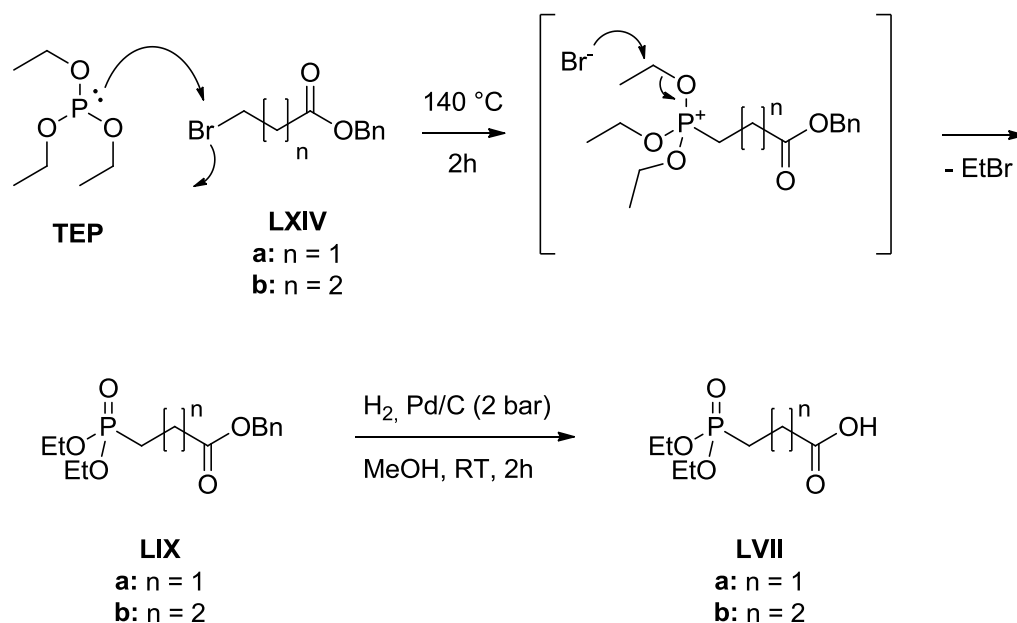
Die Herstellung von 2-Benzylloxylanilin (**LVIIIa**) erfolgte nach einer Literaturvorschrift ausgehend von 2-Aminophenol **LXI** in drei Stufen (**Schema 4**).³¹⁰ Zunächst wurde die Aminofunktionalität mit einer *tert*-Butyloxycarbonyl (Boc)-Gruppe geschützt, indem **LXI** mit Di-*tert*-butyldicarbonat (Boc-Anhydrid) in Dichlormethan zu **LXII** umgesetzt wurde. **LXII** wurde in Aceton gelöst und mit Benzylbromid zu **LXIII** alkyliert. Anschließend wurde die Boc-Schutzgruppe von **LXIII** durch Behandlung mit Trifluoressigsäure in Dichlormethan abgespalten. **LVIIIa** wurde als freie Base oder in Form des Trifluoracetats – in diesem Fall zusammen mit einer äquivalenten Menge an Base – zur Weiterreaktion (**Schema 8**) eingesetzt.



Schema 4: Synthese von **LVIIIa** ausgehend von **LXI**.

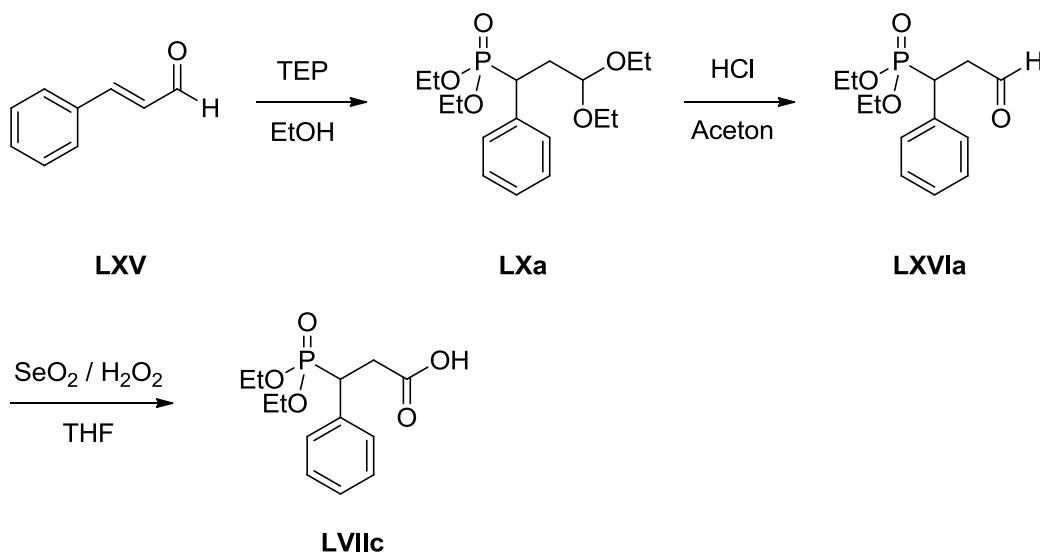
Die Benzylester **LIXa** und **b** wurden ausgehend von den Benzylestern* der 3-Brompropionsäure und 4-Brombutansäure (**LXIVa** und **b**) in einer Michaelis-Arbusov-Reaktion unter mehrstündigem Erhitzen in Gegenwart eines Überschusses an Triethylphosphit (TEP) erhalten (**Schema 5**).³¹¹⁻³¹³ Die Rohprodukte wurden durch fraktionierende Vakuumdestillation oder Säulenchromatographie gereinigt, anschließend erfolgte eine Palladium-katalysierte Hydrogenolyse der Benzylester **LIXa** und **b** zu den freien Carbonsäuren **LVIIa** und **b**.³¹⁴

* 3-Brompropion- und 4-Brombutansäurebenzylester (**LXXIIa** und **b**) wurden aus den entsprechenden Säurechloriden durch Umsetzung mit Benzylalkohol und Triethylamin hergestellt.



Schema 5: Synthese der Phosphonocarbonsäuren **LVIIa** und **b**.

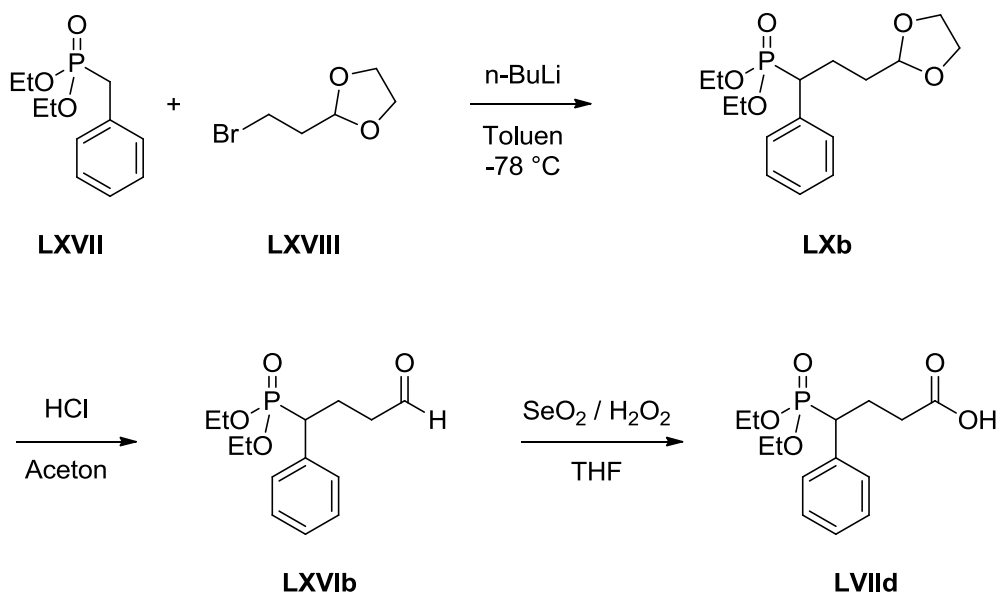
Für die Herstellung der Carbonsäure **LVIIc** wurde Zimtaldehyd (**LXV**) mit Triethylphosphit und Ethanol unter Erwärmung zur Reaktion gebracht (**Schema 6**). Das Diethylacetal **LXa** wurde ohne weitere Reinigung durch Rühren in verdünnter Salzsäure hydrolysiert. Der resultierende Aldehyd **LXVIa** wurde destillativ oder chromatographisch gereinigt.²¹⁹ Die Carbonsäure **LVIIc** wurde schließlich durch Oxidation von **LXVIa** mit Selendioxyd und Wasserstoffperoxyd nach mehrstündigem Erhitzen unter Rückfluss erhalten.³¹⁵



Schema 6: Synthese der β -Phosphonocarbonsäure **LVIIc**.

Zur Synthese der Carbonsäure **LVIIId** wurde Diethylbenzylphosphit (**LXVII**) zunächst in Gegenwart von *n*-Butyllithium bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter Schutzgasatmosphäre mit dem als 1,3-Dioxolan geschützten 4-Brompropionaldehyd **LXVIII** alkyliert (**Schema 7**).²¹⁷ Die anschließende saure Hydrolyse des

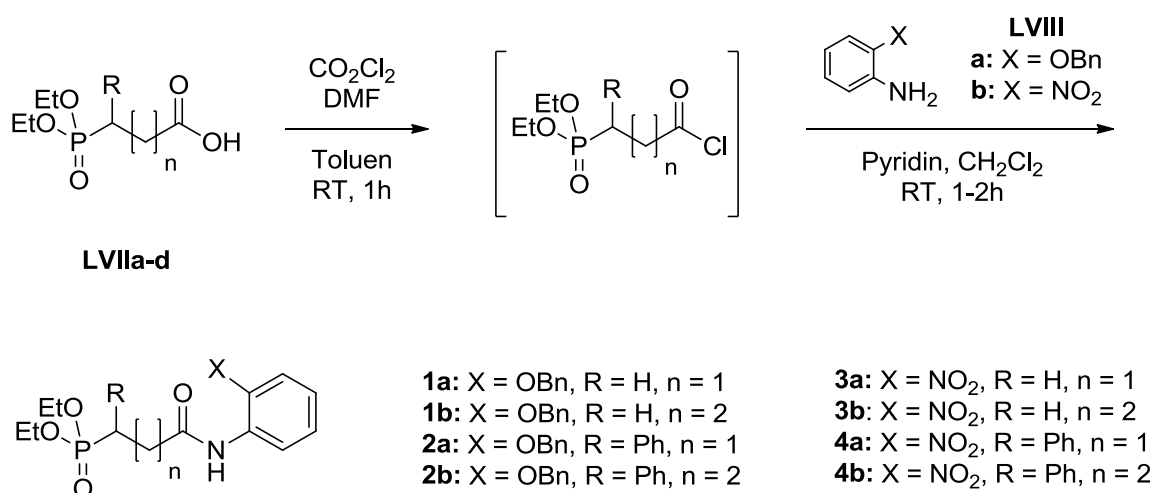
Acetals **LXb** zum Aldehyd **LXVIb** und dessen Oxidation zur **LVIIId** erfolgte wie zuvor bei Verbindung **LVIIc** beschrieben.^{219,315}



Schema 7: Synthese der γ -Phosphonocarbonsäure **LVIIId**.

2.3.2 Synthese der Zielverbindungen

Zur Herstellung der Benzamide **1-4** wurden die Carbonsäuren **LVIIa-d** in Anlehnung an Literaturvorschriften zunächst in trockenem Toluol gelöst und mit Oxalylchlorid in Gegenwart von Dimethylformamid zu Säurechloriden aktiviert (**Schema 8**).^{296,316} Eine konventionelle Herstellung der Säurechloride durch Aktivierung mit Thionylchlorid gelang dagegen nicht.

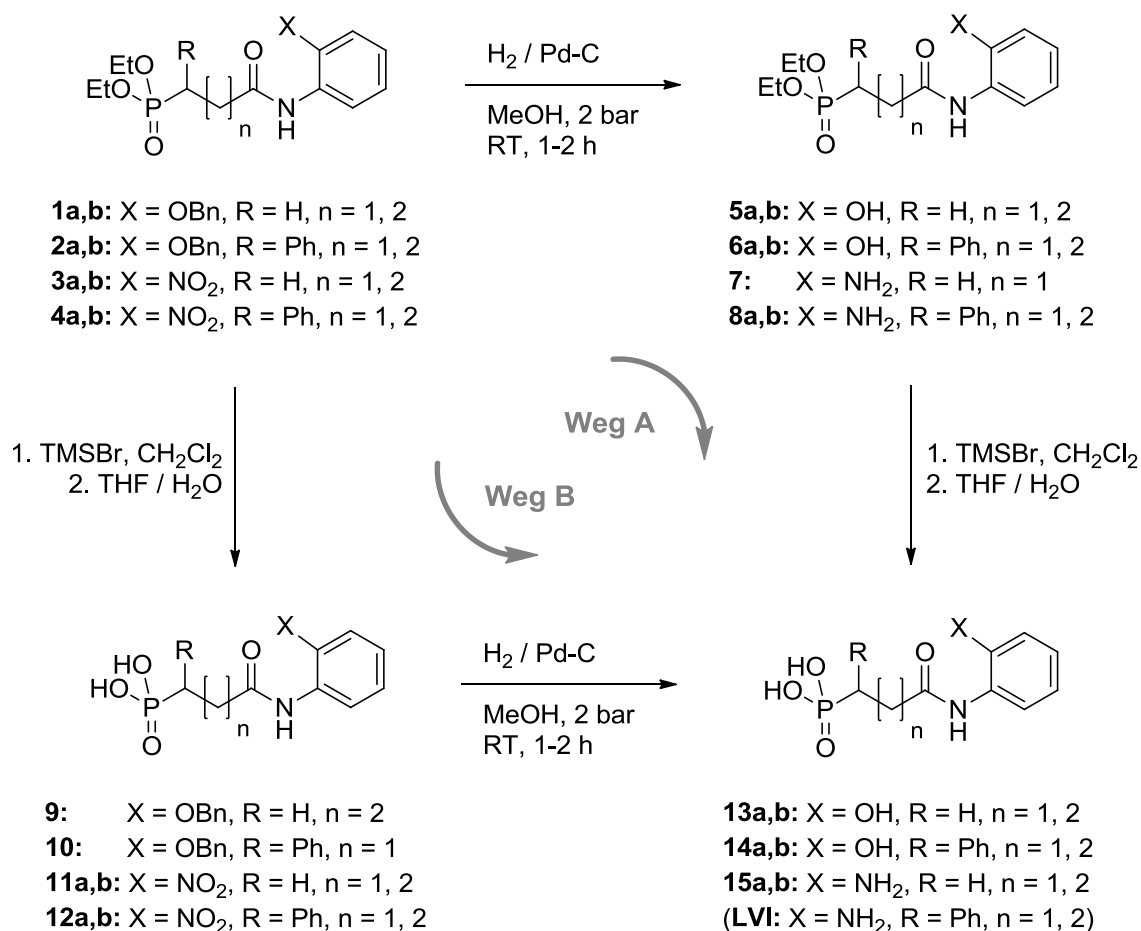


Schema 8: Umsetzung der Carbonsäuren **LVII** zu den Benzamiden **1-4**.

Sobald die vollständige Umsetzung der Carbonsäuren infrarotspektroskopisch nachweisbar war, wurden die Säurechloride durch Einengen am Rotationsverdampfer isoliert und sofort mit den *ortho*-

substituierten Anilin-Derivaten **LVIIIa,b** in Gegenwart von Pyridin in einer Lösung von wasserfreiem Dichlormethan umgesetzt. Die Benzanilide **1a,b-4a,b** wurden in mäßigen bis exzellenten Ausbeuten von 50–96 % erhalten und durch Umkristallisation oder Chromatographie gereinigt.

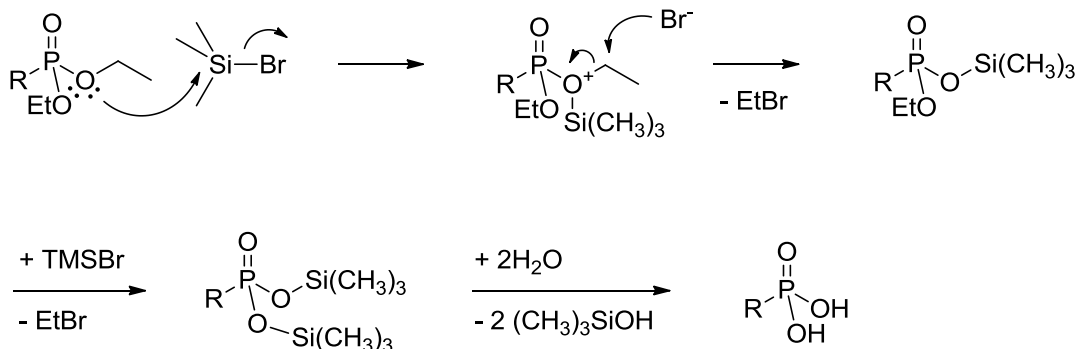
Die Schutzgruppen wurden je nach Substanzeigenschaften in unterschiedlicher Reihenfolge abgespalten (**Schema 9**). Aus der Überlegung heraus, dass freie Phosphonsäuren wegen ihrer hohen Polarität für eine chromatographische Reinigung an Kieselgel nicht geeignet sind, sollte die Hydrolyse der Phosphonsäurediethylester erst zum Ende der Synthesesequenz stattfinden. Die geschützten Benzamide sollten zunächst durch palladiumkatalysierte Hydrogenolyse bzw. Reduktion in die Phenol- und Anilin-Derivate überführt werden (**Schema 9**, Weg A)



Schema 9: Synthese der Zielverbindungen **13-15**.

Zur Gewinnung der Anilin- und Phenol-Derivate **5a,b**, **6a,b**, **7** und **8a,b** wurden die geschützten Benzamide **1a,b**, **2a,b**, **3** und **4a,b** in Methanol unter einem Wasserstoffüberdruck von 2 bar umgesetzt. Aus Verbindung **3b** konnte das gewünschte Produkt durch Reduktion nicht erhalten werden. Die Amine und Phenole **5b**, **7** und **8a, b** waren nicht kristallisierbar und konnten trotz wiederholter Chromatographie nicht analysenrein erhalten werden. Die Schutzgruppenabspaltung gelang jedoch in umgekehrter Reihenfolge (Weg B) und führte zunächst zu den Phosphonsäuren **9**, **10**, **11a,b** und **12a,b**, die umkristallisiert und zum großen Teil analysenrein erhalten werden konnten.

Zur Überführung der Diethylphosphonate **1b**, **2a**, **3a,b** und **4a,b** in die freien Phosphonsäuren wurden diese unter wasserfreien Reaktionsbedingungen mit einem Überschuss von Trimethylsilylbromid (TMSBr) behandelt. Die TMSBr-vermittelte Desalkylierung von Phosphonsäuredialkylestern verläuft nach einem der Arbusov-Reaktion ähnlichen Mechanismus (**Schema 10**).³⁰⁸ Die intermediären Bistrimethylsilylester wurden nach Einengen des Reaktionsgemisches in Tetrahydrofuran gelöst und durch Zugabe weniger Tropfen Wasser zu den freien Phosphonsäuren hydrolysiert.



Schema 10: Vorgeschlagener Mechanismus der TMSBr-vermittelten Desalkylierung von Diethylphosphonaten.

Die Reinigung der Phosphonsäuren **9-12** konnte nicht nach einem einheitlichen Verfahren stattfinden, da sich die Löslichkeiten der Produkte zu sehr voneinander unterscheiden. Während einige Verbindungen nach Zugabe eines lipophilen Lösungsmittels spontan kristallisierten, konnten andere nur durch Waschen mit verdünnter, wässriger Salzsäurelösung unter erheblichem Ausbeuteverlust gereinigt werden.

Die *ortho*-Hydroxybenzamide **13a** und **b** sowie **14b** wurden in analysenreiner Qualität erhalten, die einzige nicht kristallisierbare Verbindung **14a** zeigt eine HPLC-Reinheit von über 90 %. Die *ortho*-Aminobenzamide **15** und **LVI** besitzen aufgrund ihres zwitterionischen Charakters eine sehr geringe Löslichkeit, die die Isolierung der Zielverbindungen erschwert. Während die Verbindungen **15a** und **b** noch aus Wasser umkristallisiert werden konnten und laut HPLC-Analyse eine 99%ige Reinheit zeigen, fielen die Zielverbindungen **LVI** als untrennbare Produktgemische an, die für biologische Untersuchungen nicht geeignet sind.

2.3.3 Spektroskopische Eigenschaften

NMR-Spektroskopische Eigenschaften

Am Beispiel ausgewählter ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren sollen einige charakteristische Eigenschaften der Fosmidomycin-Analoga vom Benzamid-Typ aufgezeigt werden, die wegen ähnlicher Strukturelemente teilweise auch auf die oxasteren Analoga im folgenden Kapitel zutreffen.

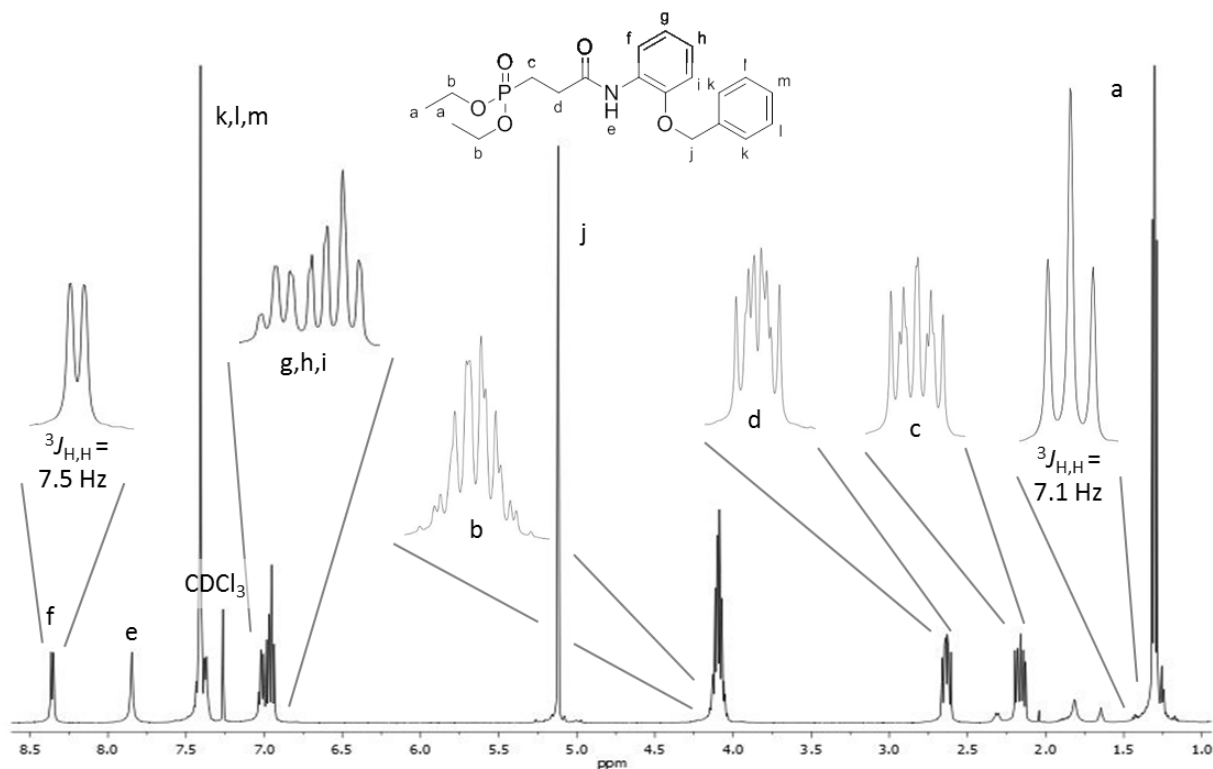


Abb. 50: ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **1a** in CDCl_3 .

Abb. 50 zeigt das ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **1a**. Die Signale der beiden chemisch und magnetisch äquivalenten Methylgruppen **a** erscheinen durch die $^3J_{\text{H,H}}$ -Kopplung mit der benachbarten Methylengruppe **b** als Triplet. Da die Methylen-Protonen **b** nicht nur mit den Methyl-Protonen **a** koppeln, sondern auch eine heteronukleare Kopplung zu ^{31}P zeigen, erzeugen sie an Stelle eines Quartetts ein nicht vollständig aufgelöstes Multiplettsignal. Die Signale der Methylengruppen **c** und **d** erfahren durch die Überlagerung von $^3J_{\text{H,H}}$ -Kopplungen mit $^1J_{\text{H,P}}$ - bzw. $^2J_{\text{H,P}}$ -Kopplungen ebenfalls eine Multiplett-Aufspaltung. Die Resonanzsignale der aromatischen Protonen sind als zwei Gruppen von Multipletts und ein einzelnes, deutlich tieffeldverschobenes Signal zu erkennen. Dieses Dublett kann entweder dem aromatischen Proton **f** oder dem dazu *para*-ständigen Proton **i** zugeordnet werden, da das Aufspaltungsmuster eine 3J -Kopplung zu einem Proton zeigt. Unterstützt durch Abschätzung der chemischen Verschiebung von **f** und **i** mittels Inkrementsystem³¹⁷ und Simulation (ChemNMR, CambridgeSoft) wird das Signal dem Proton **f** zugeordnet. Das amidische Proton **e** erzeugt ein durch intermolekularen Austausch verbreitertes Singulett zwischen 7 und 8 ppm.

Abb. 51 zeigt eine Gegenüberstellung der aliphatischen Resonanzsignale von Verbindung **3b** und **2a**. Bei dem kettenverlängerten Analogon **3b** ist zu erkennen, dass sich die Reichweite der ^{31}P -Kopplung in beide Richtungen des Kohlenstoffgerüsts nur über drei Bindungen bis zu den Protonen **b**, **c** und **d** erstreckt. Die Methylengruppe **e** ist so weit vom Phosphor entfernt, dass das Resonanzsignal nicht mehr vom Phosphorkern beeinflusst wird und durch die $^3J_{\text{H,H}}$ -Kopplung zur benachbarten Methylengruppe als scharfes Triplet erscheint.

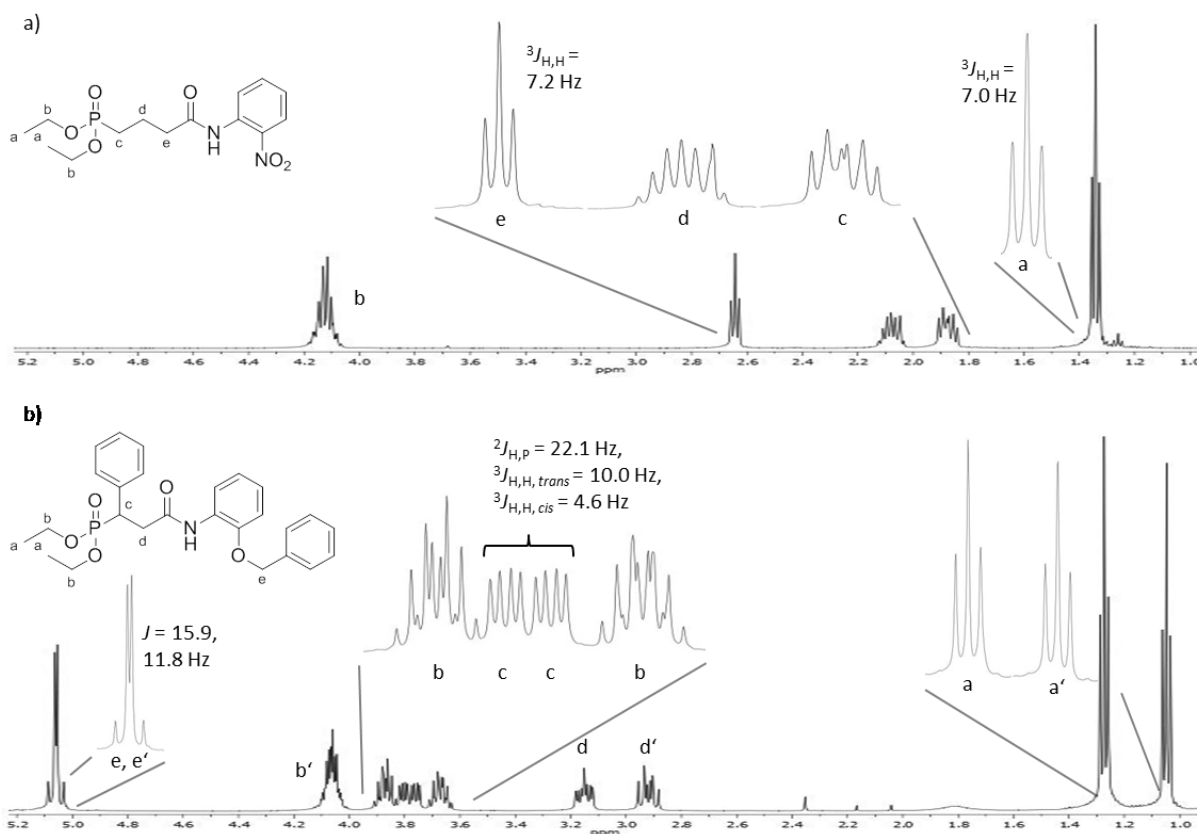


Abb. 51: Ausschnitte aus den ^1H -NMR-Spektren der Verbindungen **3b** (a) und **2a** (b) in CDCl_3 .

Durch die Einführung des Phenylsubstituenten in Nachbarstellung zum Phosphonsäureester entsteht in Verbindung **2a** ein Chiralitätszentrum. Die beiden Ethoxygruppen (**a**,**b**) sowie die Methylengruppen **d** und **e** von **2a** sind durch Diastereotopie chemisch und magnetisch nicht mehr äquivalent. Die Methylgruppen **a** und **a'** erscheinen als zwei getrennte Triplets und die Protonen der diastereotopen Methylengruppe **d** und **d'** bilden ein AB-System, welches durch Kopplungen zum Methin-Proton **c** und zum Phosphor komplexer aufgespalten wird. Das durch **c** hervorgerufene Resonanzsignal bildet ein dreifaches Dublett, dessen Aufspaltung durch die 2J -Kopplung mit ^{31}P und jeweils eine vicinale H,H -Kopplung zu **d** und **d'** ($^3J_{\text{H,H}}(\text{trans}) > ^3J_{\text{H,H}}(\text{cis})$) erzeugt wird. Die diastereotopen Methylengruppen **b** und **b'** sind in Form von drei Signalgruppen zu erkennen. Eine Methylengruppe bildet das zu tieferem Feld hin verschobene Multiplett oberhalb von 4 ppm, während das Multiplett-Signal der anderen Methylengruppe in zwei voneinander getrennte, jeweils einem Proton entsprechende Bereiche aufgespalten ist. Diese zusätzliche Aufspaltung in Form eines AB-Systems könnte auf Anisotropieeffekte durch die Phenylgruppe zurückgeführt werden, in deren räumlicher Nähe sich eine der Ethoxygruppen befindet.* Die Protonen **e** und **e'** der benzyliischen Methylengruppe erzeugen ebenfalls das Resonanzsignal eines AB-Systems. Diese Aufspaltung könnte durch den Einfluss des Chiralitätszentrums und eine eingeschränkte Rotationsfreiheit der Benzylgruppe bedingt

* In dem in Abschnitt 4.3.2 besprochenen ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **33** ist ein vergleichbares AB-Aufspaltungsmuster einer der zum Phosphor β -ständigen Methylengruppen deutlich zu erkennen, da die $^3J_{\text{H,P}}$ -Kopplungen nicht von $^3J_{\text{H,H}}$ -Kopplungen überlagert werden.

sein. Wegen fehlender Nahkopplungen erscheint das Signal von **e/e'** im Gegensatz zu den anderen AB-Systemen als scharf aufgelöstes, doppeltes Dublett.

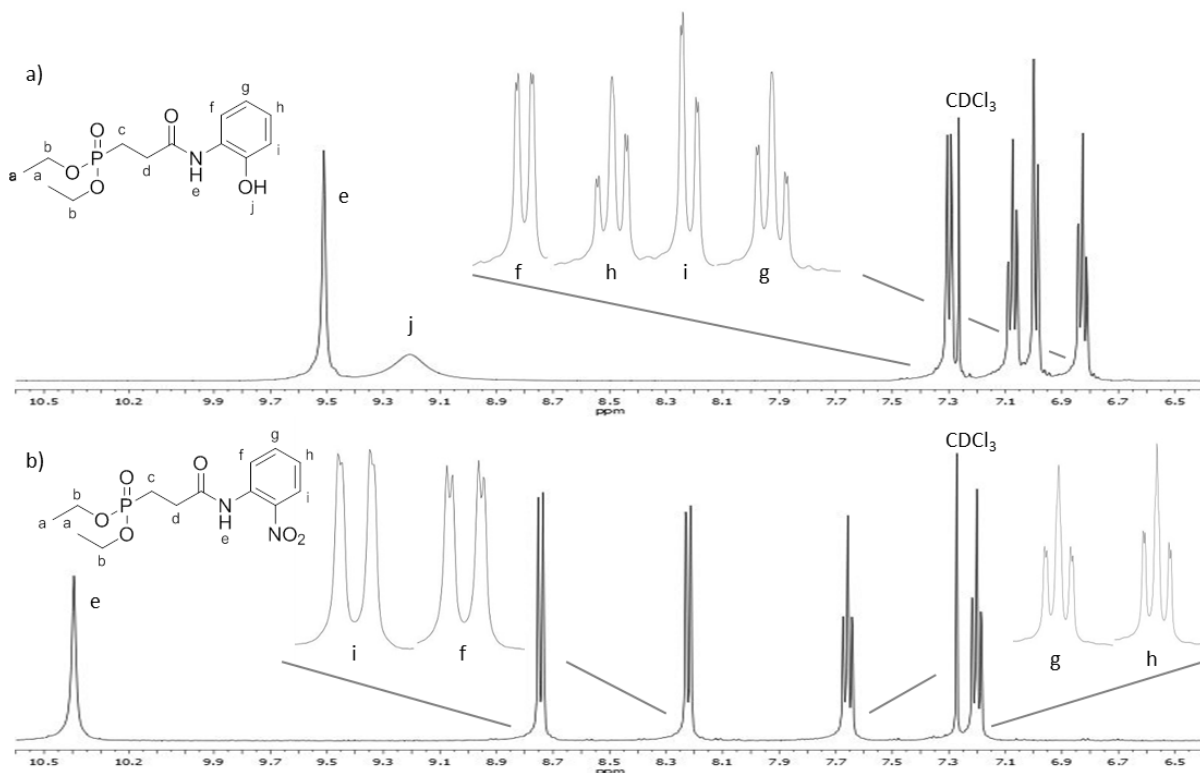


Abb. 52: Ausschnitte aus den ^1H -NMR-Spektren der Verbindungen **5a** (a) und **3a** (b) in CDCl_3 .

Abb. 52 zeigt Ausschnitte aus den ^1H -NMR-Spektren der Verbindungen **5a** und **3a** im Bereich von 6–11 ppm. Die aromatischen Protonen der Benzamide bilden durch die unsymmetrische *ortho*-Substitution bedingt jeweils ABCD-Spinsysteme. Die Signale der Protonen **g** und **h** erscheinen durch 3J -Kopplungen zu zwei verschiedenen benachbarten Protonen und die $^4J_{\text{H,H}}$ -Kopplung zum jeweils übernächsten Proton entweder als doppelte Triplets oder als dreifache Dubletts, während die Protonen **e** und **h** durch die Anwesenheit je einer $^3J_{\text{H,H}}$ - und einer $^4J_{\text{H,H}}$ -Kopplung doppelte Dubletts zeigen. Die Signale der NH- und OH-Gruppen sind an ihrer Form und relativen Lage deutlich zu unterscheiden. Das OH-Signal im Spektrum der Verbindung **5a** ist sehr viel breiter und erscheint hochfeldverschoben gegenüber den amidischen NH-Signale von **5a** und **3a**, die im Bereich von etwa 8 – 10 ppm liegen.

Stellvertretend für die Fosmidomycin-Derivate mit Benzamid-Teilstruktur ist in **Abb. 53** das ^{13}C -NMR-Spektrum der Verbindung **4b** dargestellt. Die Resonanzsignale der aliphatischen Kohlenstoffatome werden durch die heteronukleare Kopplung zu ^{31}P jeweils in Dubletts aufgespalten. Dies gilt in gleicher Weise für die Signale des α -Phenyl-Substituenten, während keine Fernkopplungen zu den weiter entfernten Kohlenstoffatomen (Carbonylgruppe **f** und **k-p** des 2-Nitroanilins) sichtbar sind. Die Dubletts der Kohlenstoffatome **a/a'** und **b/b'** sind durch die Diastereotopie der Ethoxygruppen verdoppelt. Mit 138,2 Hz ist die 1J -Kopplung des Methin-Kohlenstoffs **c** zu dem benachbarten Phosphoratom besonders stark ausgeprägt. In Übereinstimmung mit Literaturdaten für Diethyalkylphosphonate³¹⁸ wird für die $^2J_{\text{C,P}}$ -Kopplungskonstante des Signals **d** ein deutlich kleinerer

Wert gefunden als für die $^3J_{C,P}$ -Kopplungskonstante des Dubletts **e**. Die Resonanzsignale **g-j** des Phenylrestes können durch Vergleich der chemischen Verschiebungen und $J_{C,P}$ -Kopplungskonstanten mit Literaturwerten für Diethylbenzylphosphonate eindeutig zugeordnet werden.³¹⁸

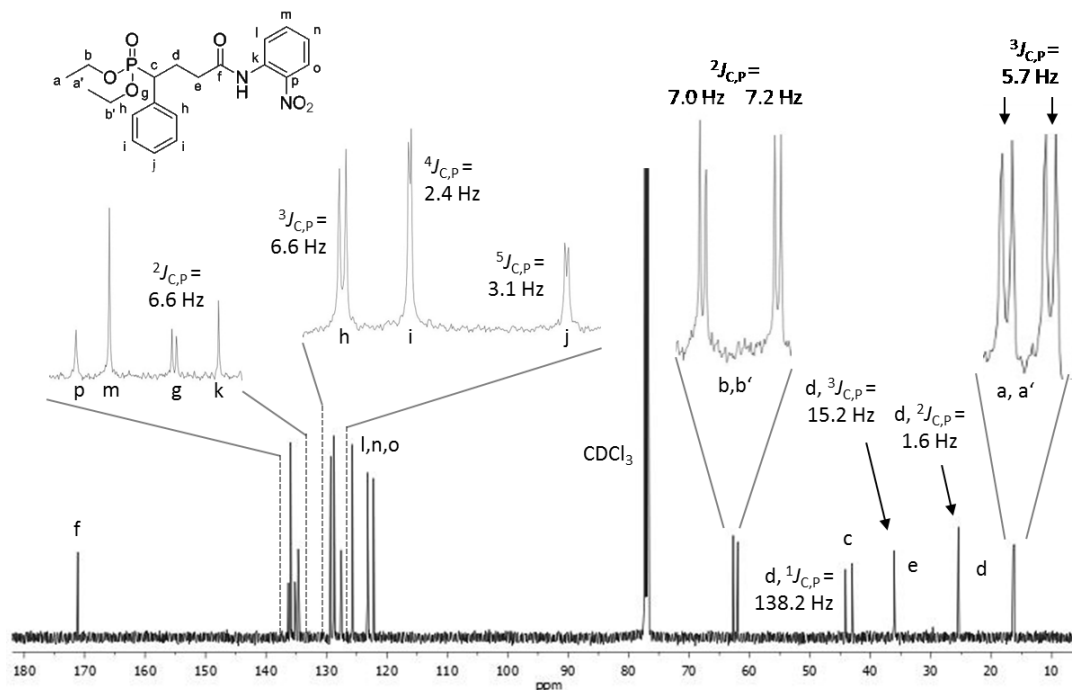


Abb. 53: ^{13}C -NMR-Spektrum der Verbindung **4b** in CDCl_3 .

IR-Spektroskopische Eigenschaften

Abb. 54 zeigt stellvertretend für die Fosmidomycin-Analoga vom Benzamid-Typ das IR-Spektrum der Verbindung **13a**. Die scharfe Absorptionsbande bei 3385 cm^{-1} stammt von einer N-H-Valenzschwingung der Amidfunktionalität*. Die Absorptionsbanden aromatischer und aliphatischer C-H-Bindungen werden durch eine breite Bande mit Maximum bei 3233 cm^{-1} überlagert, die durch die O-H-Valenzschwingungen der Hydroxygruppen verursacht wird. Charakteristisch für monosubstituierte Amide sind die beiden intensiven Absorptionsbanden bei 1664 und 1541 cm^{-1} . Bei der ersten der genannten Banden (Amid I) handelt es sich um die C=O-Valenzschwingung der Carbonylgruppe, während die zweite Bande (1541 cm^{-1} , Amid II) einer C-N-H-Deformationsschwingung zugeordnet wird. Im Fingerprint-Bereich des IR-Spektrums treten zwei ausgeprägte Absorptionsbanden der Phosphonsäuregruppe auf. Die Valenzschwingung der P=O-Doppelbindung erzeugt die Absorptionsbande bei 1197 cm^{-1} , während die zu niedrigen Wellenzahlen hin verschobene intensive Bande bei 1003 cm^{-1} den P-O-Valenzschwingungen der beiden Einfachbindungen zugeordnet werden kann.

* Bei N-monosubstituierten Amiden werden oft zwei N-H-Absorptionsbanden beobachtet. Im IR-Spektrum von Verbindung **13a** ist eine dieser beiden Amid-Banden vermutlich von der breiten O-H-Bande überlagert.

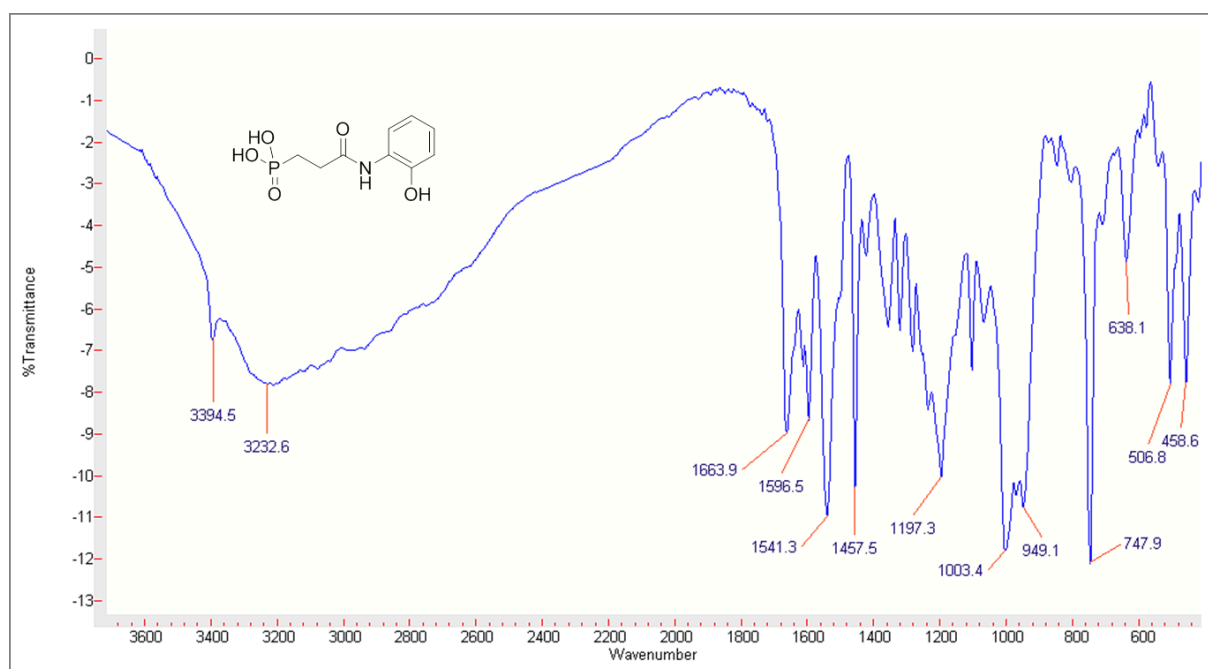


Abb. 54: IR-Spektrum der Verbindung **13a** (KBr-Pressling).

2.4 Untersuchung der biologischen Aktivität

Die Fosmidomycin-Analoga **13-15** (**Abb. 55**) wurden durch Kooperationspartner auf ihre enzymhemmende Aktivität gegenüber *PfDxr*, *EcDxr* und *MtDxr* untersucht. Parallel dazu wurde die antiplasmodiale *in vitro*-Aktivität gegenüber dem multiresistenten *P. falciparum* K1-Stamm evaluiert. Im MRC-5-Assay erfolgte zusätzlich eine Bestimmung der Zytotoxizität. **Tabelle 4** zeigt die Ergebnisse der biologischen Untersuchungen.

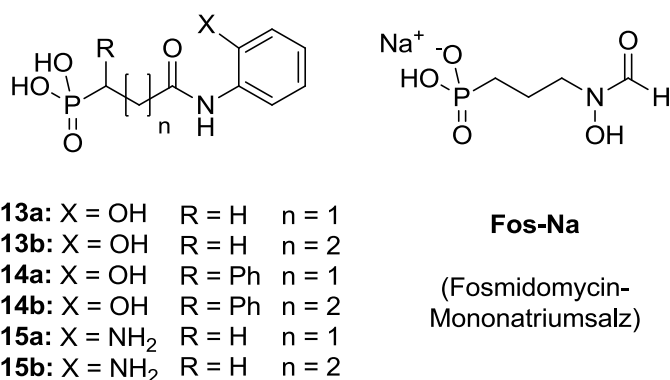


Abb. 55: Übersicht der in Kapitel 2 vorgestellten Zielverbindungen.

Verbindung	Enzymassay*			Zellkulturassay†	
	<i>Pf</i> Dxr IC ₅₀ (μM)	<i>Ec</i> Dxr IC ₅₀ (μM)	<i>Mt</i> Dxr IC ₅₀ (μM)	<i>P.f.</i> K1 IC ₅₀ (μM)	MRC-5 IC ₅₀ (μM)
13a	> 300	> 500	> 500	> 64	> 64
13b	> 300	44 +/- 10	41 +/- 9	> 64	> 64
14a	> 300	> 500	> 500	> 64	> 64
14b	> 300	> 500	> 500	> 64	> 64
15a	> 300	> 500	> 500	> 64	> 64
15b	> 300	> 500	> 500	> 64	> 64
Fos-Na	0.16 +/- 0.02	0.12 +/- 0.01	0.23 +/- 0.01	3.7 +/- 2.5	> 62

Tabelle 4: *In vitro*-Aktivitäten der Fosmidomycin-Analoga **13-15**.

Interpretation der biologischen Daten

Die Benzamid-Analoga zeigen weder in Enzym- noch in Zellkultur-Assays inhibitorische Aktivität. Einzig für die Verbindung **13b** wurden mit 40-50 μM IC₅₀-Werte unterhalb von 500 μM gegenüber *Ec*Dxr und *Mt*Dxr erhalten. Diese Substanz kristallisiert allerdings in der wässrigen Lösung des Testsystems bei höheren Konzentrationen aus.[‡] Die Inhibitionskurve von **13b** gegenüber *Mt*Dxr fällt im hohen Konzentrationsbereich zu stark ab, um mit dem einfachen Hemmmodell interpretiert zu werden. Im MRC-5-Zellkulturassay, der als Modell für Zytotoxizität herangezogen wird,³²¹ zeigte keine der Verbindungen **13-15** Wachstumsinhibition bei Konzentrationen unterhalb 64 μM. Aus der fehlenden biologischen Aktivität der Inhibitoren **13-15** lässt sich schließen, dass die *ortho*-funktionalisierte Benzamid-Teilstruktur als alternative metallbindende Gruppe für eine effektive Bindung an die DOXP-Reduktoisomerasen von *P. falciparum*, *E. coli* und *M. tuberculosis* ungeeignet ist. Wie in früheren Studien (siehe Abschnitt 1.6.1) führt der Austausch der Hydroxamsäurefunktionalität Fosmidomycins hier zum Wirkungsverlust. Auch durch Variation der Länge und Substitution des Propyl-Spacers konnten keine Fosmidomycin-Analoga mit Dxr-hemmender und antiplasmodialer Aktivität erhalten werden.

* Mittelwerte +/- Standardabweichung berechnet durch nichtlineare Regression aus 7–13 Messpunkten.^{319,320}

† Mittelwerte +/- Standardabweichung berechnet aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, Werte für Fosmidomycin übernommen aus Behrendt, 2010.²¹⁷

‡ Ein Teil des Enzyms wird möglicherweise mit ausgefällt, so dass durch eine Abnahme der Enzymkonzentration im Assay eine Inhibition vorgetäuscht wird.

3 Inverse α -substituierte, β -oxa-isostere Fosmidomycin-Analoga

3.1 Die Anwendung des Bioisosterie-Prinzips in der Wirkstoffentwicklung

Das Bioisosterie-Prinzip ist eine wichtige Strategie der Medizinischen Chemie zur Weiterentwicklung von Leitstrukturen.^{229,322,323} Seine Grundlagen und einige beispielhafte Anwendungen sollen im folgenden Abschnitt vorgestellt werden.

Atome, Ionen und Moleküle, die die gleiche Anzahl und Anordnung von Valenzelektronen besitzen, werden als Isostere bezeichnet. Dieses im Jahr 1919 von *Langmuir* erstmals formulierte³²⁴ und später durch *Grimm* (1925)³²⁵ und *Erlenmeyer* (1932)³²⁶ erweiterte Prinzip lässt sich zum Beispiel auf das ähnliche chemische Verhalten von Halogenen und Pseudohalogenen oder kleiner Moleküle wie CO₂ und N₂O anwenden. Basierend auf dem Isosterie-Prinzip wurden die Eigenschaften von Ketenen in Analogie zu Diazomethan noch vor ihrer Entdeckung vorausgesagt.³²² Der *Grimm*'sche Hydridverschiebungssatz besagt, dass ein Atom durch die Aufnahme eines Wasserstoffatoms zu einem isoelektrischen Pseudoatom wird, welches dieselben physikalischen Eigenschaften wie das im Periodensystem rechts benachbarte Atom annimmt. So sind zum Beispiel das Fluoratom, die OH-Gruppe, die Amino- und die Methylgruppe Isostere, und ein bivalentes Sauerstoffatom ist isoster zu einer NH- und einer CH₂-Einheit (**Tabelle 5**).³²³

Monovalent (Substituenten)	Divalent (Brückenglieder, Ringeinheiten)	Trivalent	Tetravalent
—H, —F, —Cl, —Br, —I	—O—, —S—	=N—	=C=, =N ⁺ =
—OH, —SH	—NH—	=CH—	
—NH ₂ , —PH ₂ —CH ₃	—CH ₂ —		

Tabelle 5: Isostere Atome und Gruppen (modifiziert nach *Lima*, 2005²²⁹).

Der Begriff „Bioisosterie“ umfasst laut *Friedmann* und *Thornber* einen weiteren Bereich.^{327,328} Nach der heute allgemein akzeptierten Definition sind Bioisostere Verbindungen oder Strukturelemente, die im weitesten Sinne der Definition von Isosteren (bezüglich struktureller, chemischer und physikalischer Ähnlichkeit) entsprechen und gleichartige biologische Aktivität besitzen. Damit weicht der Gebrauch des Begriffs „Isosterie“ im medizinisch-chemischen Kontext oft deutlich von der ursprünglichen Bedeutung ab.³²²

Die Motivation, durch die Anwendung des Bioisosterie-Prinzips neue Wirkstoffe zu finden, beruht auf verschiedensten Gründen.^{229,323,329} So steht beispielsweise eine Erhöhung der Aktivität oder Selektivität gegenüber bestimmten Zielstrukturen in Verbindung mit einer Reduktion von Toxizität im Vordergrund. In anderen Fällen wird eine Optimierung physikochemischer und pharmakokinetischer Parameter von Wirkstoffen angestrebt, zum Beispiel durch Erhöhung der Löslichkeit oder der metabolischen Stabilität. Nicht zuletzt spielen im Hinblick auf Automatisierung die Rationalität von Synthesen oder im Zusammenhang mit Patentfragen die finanziellen Aspekte eine wichtige Rolle.³²³ Damit die Eigenschaften von Leitstrukturen durch bioisostere Variationen zielgerichtet optimiert werden können, sollten Pharmakophor, Wirkmechanismus, Metabolisierung und der Zusammenhang bestimmter Strukturelemente mit physikochemischen Parametern möglichst genau bekannt sein.²²⁹

Bioisostere werden nach *Burger* in die zwei Kategorien „klassisch“ und „nicht-klassisch“ eingeteilt.³³⁰ Der Begriff klassische Bioisosterie umfasst mono-, di- und trivalente Atome oder Gruppen, tetrasubstituierte Atome und Ringäquivalente. Unter nicht-klassischer Bioisosterie versteht man den Austausch funktioneller Gruppen, die Inversion einer Funktionalität (Retroisosterie) und den gegenseitigen Austausch cyclischer und acyclischer Strukturelemente.²²⁹ Im Folgenden sollen einige Anwendungsbeispiele des Bioisosterie-Konzepts in der Arzneistoffentwicklung vorgestellt werden.

Als Beispiel für den Austausch bivalenter Gruppen, der auch in der vorliegenden Arbeit Anwendung findet, soll an dieser Stelle die CH_2/O -Isosterie besprochen werden. Die Methylengruppe und eine bivalente Sauerstoffbrücke besitzen ähnliche Bindungslängen und –winkel. Die Sauerstoffbrücke unterscheidet sich jedoch von der Methylengruppe durch einen kleineren Van-der-Waals-Radius sowie eine höhere Elektronegativität und Polarität.³²⁹ Die Entwicklung von Prostacyclin-Mimetika zeigt zwei Effekte des CH_2/O -Austauschs (**Abb. 56**).

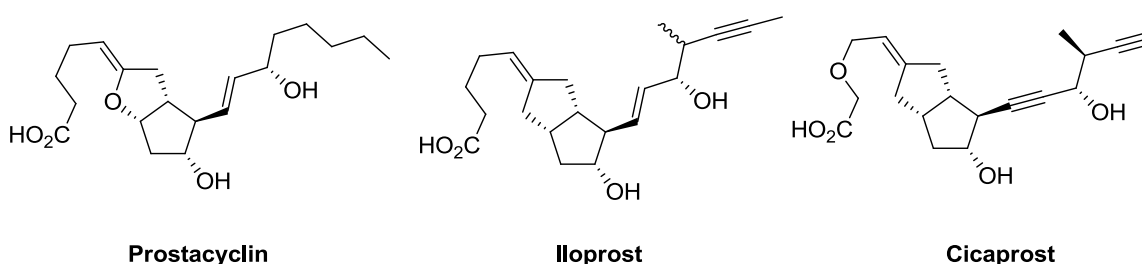


Abb. 56: Wirkstoffbeispiele für die Anwendung der CH_2/O -Bioisosterie.

Die hydrolyseempfindliche Enoether-Einheit der Leitstruktur **Prostacyclin** ist durch CH_2/O -Austausch in dem Mimetikum **Iloprost** nicht mehr vorhanden. Durch Austausch der zur Carboxylgruppe β -ständigen Methylengruppe gegen ein Sauerstoffatom wurde die durch β -Oxidation der Carbonsäurekette bedingte geringe Halbwertszeit von Iloprost bei **Cicaprost** um das Zwei- bis Dreifache verlängert. Die bioisosteren Abwandlungen gingen jeweils mit einer Modifikation der β -Seitenkette einher, die zum Aktivitätserhalt notwendig war.³²⁹

Ein weiteres Beispiel von CH_2/O -Isosterie ist die Abwandlung von Monophosphaten in Phosphonsäuren, die gegenüber Phosphatasen metabolisch stabiler sind.³³¹ Die Phosphat/Phosphonat-Bioisosterie wird bei der Entwicklung antiviraler Nukleotidanaloga (z. B. des Nukleosidphosphonats **Cidofovir** als acyclisches **dCMP**-Analogon)* genutzt (**Abb. 57**).³³²

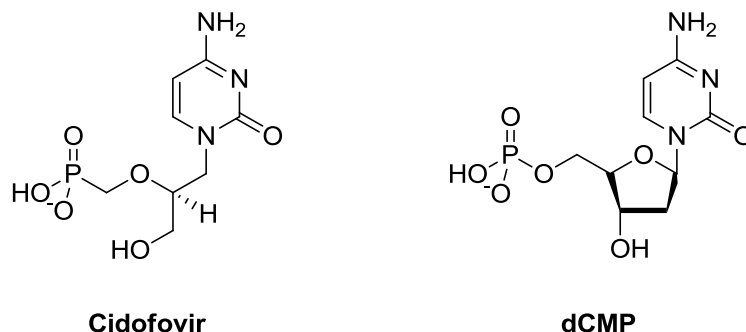


Abb. 57: CH_2/O -Bioisosterie am Beispiel eines Nukleotidanalogs.

Auch der Einsatz von Fluor als Wasserstoff-Bioisoster ist in der Wirkstoffentwicklung weit verbreitet.^{329,333,334} Der erste fluorierte Arzneistoff wurde 1957 zugelassen, heute stellen fluorierte Verbindungen etwa 20 % aller Arzneistoffe dar. Während der sterische Anspruch von Fluor und Wasserstoff nahezu gleich ist, verursacht der Austausch beider Atome eine starke Verschiebung der Elektronenverteilung. Durch den bioisosteren H/F-Austausch kann beispielsweise die metabolische Stabilität eines Wirkstoffs erhöht werden. Die C-F-Bindung ist unter den meisten biologischen Bedingungen chemisch inert. Dies wird bei der Fluorierung von Aromaten in *para*-Position genutzt, die durch CYP450-Enzyme bevorzugt angegriffen wird. Die Elektronegativität von Fluor führt auch zu einer Verstärkung benachbarter C-F-, C-O- und C-C-Bindungen. Der Austausch von Wasserstoff gegen Fluor erhöht in der Regel die Lipophilie einer Substanz und beeinflusst den pK_s -Wert benachbarter funktioneller Gruppen.^{329,333} Zudem kann die Affinität eines Wirkstoffs zum Enzym erhöht werden, da Fluor zwar ein schlechter Wasserstoffbrückenakzeptor ist, das hohe Dipolmoment der C-F-Bindung jedoch polare Wechselwirkungen ermöglicht.³³³ Auf vergleichbare Weise kann die polarisierte C-F-Bindung auch die Gesamtkonformation eines Moleküls beeinflussen.³²⁹

Die Anwendung des Retroisosterie-Konzepts als Beispiel der nichtklassischen Bioisosterie wurde schon im Zusammenhang mit den Strukturmodifikationen von Fosmidomycin beschrieben und soll hier an der Entwicklung von PDF-Inhibitoren verdeutlicht werden. Der erste bekannte PDF-Inhibitor war das 1962 isolierte Naturstoff-Antibiotikum **Actinonin** (**Abb. 58**).³³⁵ Da dieser Wirkstoff aufgrund ungünstiger pharmakokinetischer Eigenschaften nur *in vitro* antibakterielle Aktivität zeigt, wurden ausgehend von dieser Leitstruktur neue Inhibitoren mit *in vivo*-Potenzial entwickelt.²⁷⁴ In Struktur-Wirkungs-Untersuchungen zeigte der Austausch der Hydroxamsäurefunktionalität gegen andere

* dCMP = Desoxycytidinmonophosphat.

metallbindende Gruppen, dass außer Hydroxamsäuren nur die dazu inversen *N*-Formylhydroxylamine ausreichende PDF-Hemmung und antibakterielle Aktivität besitzen.

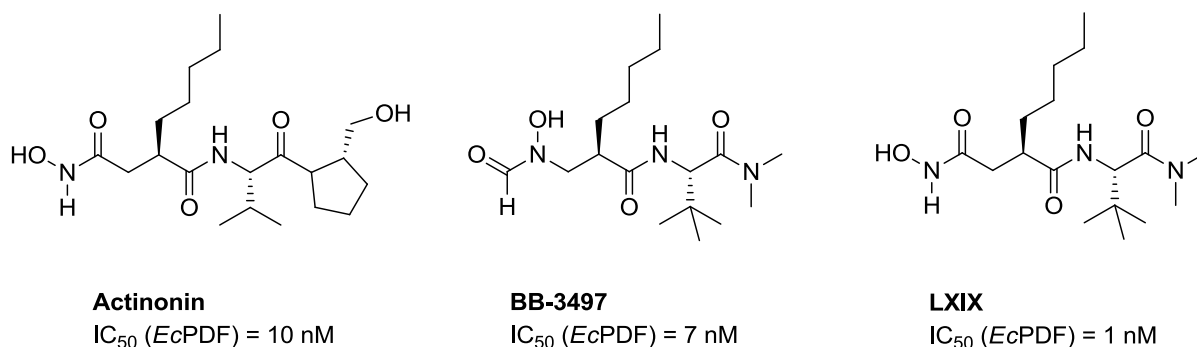


Abb. 58: Retroisosterie am Beispiel Hydroxamsäure-basierter PDF-Inhibitoren.

Durch die Inversion der Hydroxamsäurefunktionalität wurde der im Vergleich zu **BB-3497** siebenfach stärkere PDF-Inhibitor **LXIX** erhalten.²⁸² Basierend auf Kristallstrukturanalysen von **BB-3497** im Komplex mit der *E. coli*-Peptiddeformylase wurde für **LXIX** ein ähnlicher Bindungsmodus postuliert (**Abb. 59**). Bei der im gebundenen Zustand deprotonierten Hydroxamsäurefunktionalität sind im Vergleich zur *N*-Formylgruppe zwei zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen denkbar (zu Glu133 und Gly45). Dadurch könnte die höhere inhibitorische Aktivität von **LXIX** erklärt werden.

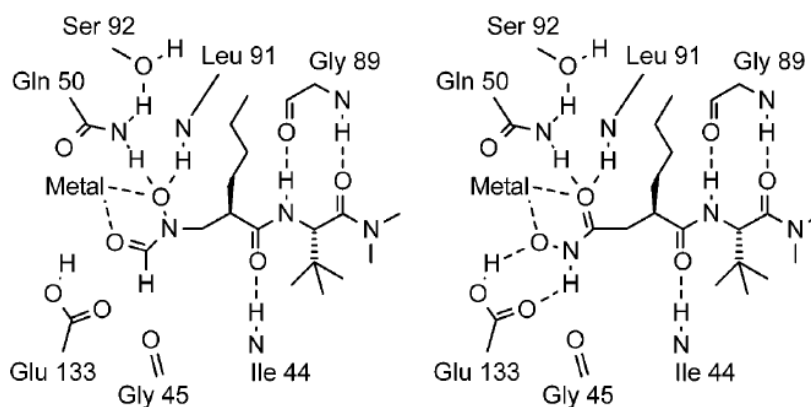


Abb. 59: Bindungsmodus von **BB-3497** (links) im Komplex mit *E. coli*-PDF und postulierter Bindungsmodus des stärkeren Inhibitors **LXIX** (rechts) (übernommen aus Smith, 2002²⁸²).

Das Retroisosterie-Konzept wird häufig auch in der Peptidchemie eingesetzt, da Retropeptide enzymatisch stabiler sind als Peptide. Die Inversion der Amidbindung kann sich jedoch negativ auf die biologische Aktivität auswirken, wenn dieses Strukturelement für die Bindung an Enzym bzw. Rezeptor entscheidend ist.³²²

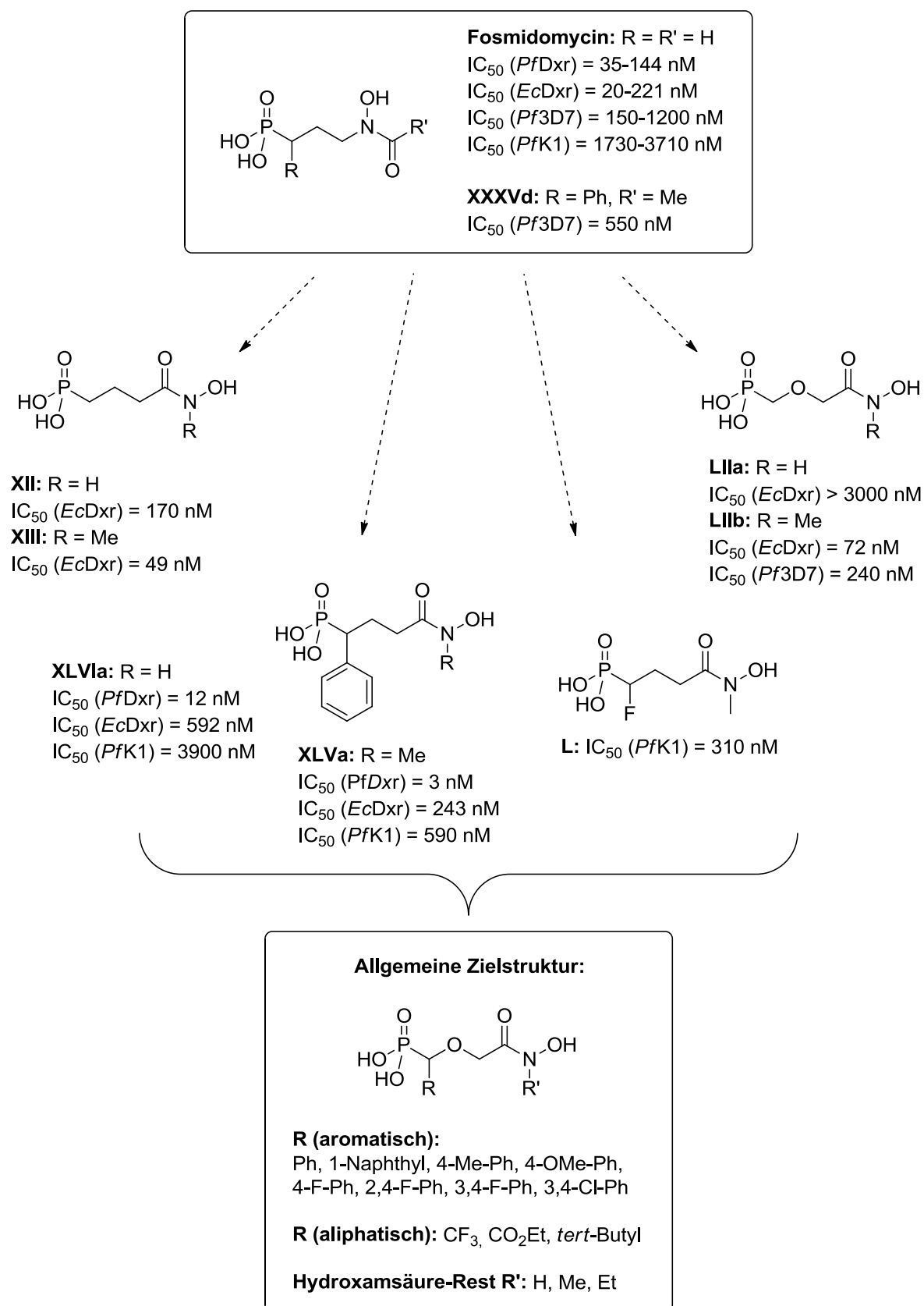
3.2 Synthesestrategie α -substituierter, β -oxa-isosterer Fosmidomycin-Analoga

Im Vorfeld der eigenen Arbeiten wurden an dem Wirkstoff Fosmidomycin bioisostere Variationen unternommen, durch die sich sowohl die enzymhemmende als auch die antiplasmodiale *in vitro*-Aktivität steigern ließ. Ausgehend vom Forschungsstand zu Beginn der Dissertation wurde eine Zielstruktur entwickelt, in der mehrere dieser Strukturvariationen in einem Wirkstoffmolekül kombiniert werden (**Schema 11**). Einige neuere Erkenntnisse über Struktur-Aktivitäts-Beziehungen wurden im Verlauf der Arbeiten in die Syntheseplanung einbezogen. Diese Überlegungen werden im Folgenden vorgestellt.

Die Arbeitsgruppe von Rohmer fand schon 2005, dass eine Inversion der Hydroxamsäurefunktionalität unter Aktivitätserhalt gegenüber *EcDxr* möglich ist.²³¹ Durch *N*-Methylsubstitution konnte die *EcDxr*-Inhibition inverser Analoga noch gesteigert werden (**XII** und **XIII**).

Mit den von Behrendt durchgeführten und 2010 publizierten Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen konnte durch die eigene Arbeitsgruppe erstmals gezeigt werden, dass inverse Fosmidomycin-Analoga auch die plasmodiale Dxr deutlich stärker inhibieren als Fosmidomycin (**XLVa** und **XLVIa**).²¹⁷ Eine *N*-Methylsubstitution der Hydroxamsäurefunktionalität wirkt sich zudem positiv auf die enzymhemmende und antiplasmodiale *in vitro*-Aktivität aus. Die Einführung eines lipophilen aromatischen Substituenten in α -Position zur Phosphonsäurefunktionalität, die sich bereits bei anderen Fosmidomycin-Analoga als vorteilhaft erwiesen hatte (**XXXVd**), führte zu einem neuartigen Strukturtyp mit selektiver *PfDxr*-Hemmung. Der Inhibitor **XLVa** ist zusammen mit dem α -3,4-difluorphenylsubstituierten Analogon **XLVc** (siehe Abschnitt 1.6.3) der stärkste bisher bekannte *PfDxr*-Inhibitor.²¹⁸

Van Calenbergh und Mitarbeiter veröffentlichten 2008 eine Studie, in der die Auswirkung des isosteren Austauschs einer Methylengruppe im Propyl-Spacer von Fosmidomycin gegen ein Sauerstoffatom untersucht wird.²⁵⁹ Eine zweifache Deprotonierung der Phosphonsäurefunktionalität ist essenziell für die Dxr-inhibierende Wirkung Fosmidomycins.^{228,232} Die deutlich acideren Monophosphate sind jedoch für den Einsatz in Wirkstoffen *in vivo* nicht ausreichend stabil. Daher sollte die Acidität der Phosphonsäurefunktionalität und damit die Dxr-hemmende Aktivität Fosmidomycins durch Einführung eines elektronenziehenden, bivalenten Sauerstoffatoms im Abstand von 2 oder 3 Bindungen zum Phosphor erhöht werden. Ein potenzieller Beitrag des Sauerstoffatoms zur Bindungsaffinität β -oxasterer Analoga an die *PfDxr* wird von den Autoren in der Ausbildung einer zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindung zum Enzym gesehen. Der antiplasmodial wirksamste Vertreter der oxasteren Fosmidomycin-Analoga **LIIf** zeichnet sich durch eine β -Oxa-Substitution des Spacers sowie eine inverse, *N*-methylierte Hydroxamsäurefunktionalität aus. Die freie Hydroxamsäure **LIIfa** zeigt dagegen unterhalb einer Konzentration von 3 μ M keine enzymhemmende Aktivität.



Schema 11: Entwicklung der Zielstruktur β -oxasterer, inverser Fosmidomycin-Analoga.*

* Die für Fosmidomycin angegebenen IC_{50} -Werte umfassen den gesamten Bereich der Referenzwerte aus den hier zitierten Arbeiten.

In einer Publikation von *Van Calenberghs* Arbeitsgruppe aus dem Jahr 2010 wird ein ähnlicher Ansatz vorgestellt.²⁵⁸ Monofluormethylenphosphonsäuren sind wegen ähnlicher zweiter pK_s -Werte geeignete Organophosphat-Mimetika.³³⁶ Es wurden α -halogenierte Analoga synthetisiert, deren elektronegative Halogensubstituenten die Acidität der Phosphonsäurefunktionalität erhöhen sollten. Die gute *in vitro*- und *in vivo*-Aktivität des fluorierten Analogons **L** zeigt, dass auch bei halogenierten Derivaten eine Hydroxamat-Inversion unter Aktivitätserhalt möglich ist.

Die in **Schema 11** dargestellte Zielstruktur leitet sich von Fosmidomycin durch Inversion der Hydroxamsäurefunktionalität, Substitution in α -Position und isosteren CH_2/O -Austausch in β -Position des Propyl-Spacers ab. An α -phenylsubstituierten Analoga ($R' = Ph$) sollte der Einfluss der *N*-Substitution auf die Dxr-Inhibition untersucht werden. Die Einführung unterschiedlicher Aryl-Substituenten bei optimaler *N*-Substitution sollte daraufhin weitere Erkenntnisse über sterische und elektronische Effekte liefern. Mit der Einführung aliphatischer α -Substituenten wurde an die Studien über α -halogenierte Fosmidomycin-Derivate von *Van Calenbergh* angeknüpft. Bereits 2006 hatten *Kurz et al.* gezeigt, dass die Einführung kleiner α -Alkylsubstituenten die antiplasmodiale Aktivität Fosmidomycins steigern kann. Die Einführung kleiner, elektronenziehender Alkylsubstituenten und eines sterisch anspruchsvolleren, elektronenschiebenden *tert*-Butylsubstituenten in α -Position sollte weiterführende Struktur-Aktivitäts-Beziehungen innerhalb der Spacer-Region erschließen.

Eine durch den kooperierenden Arbeitskreis von *Prof. M. Fischer* durchgeführte Docking-Studie zeigt, dass die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke des β -Sauerstoffatoms zu der 2,9 Å entfernten γ -Hydroxygruppe des *Pf*Dxr-Serinrestes 306 möglich ist (**Abb. 60**).*

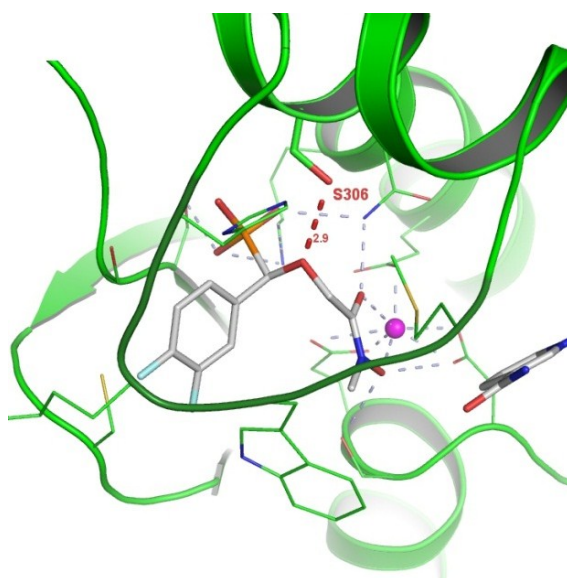


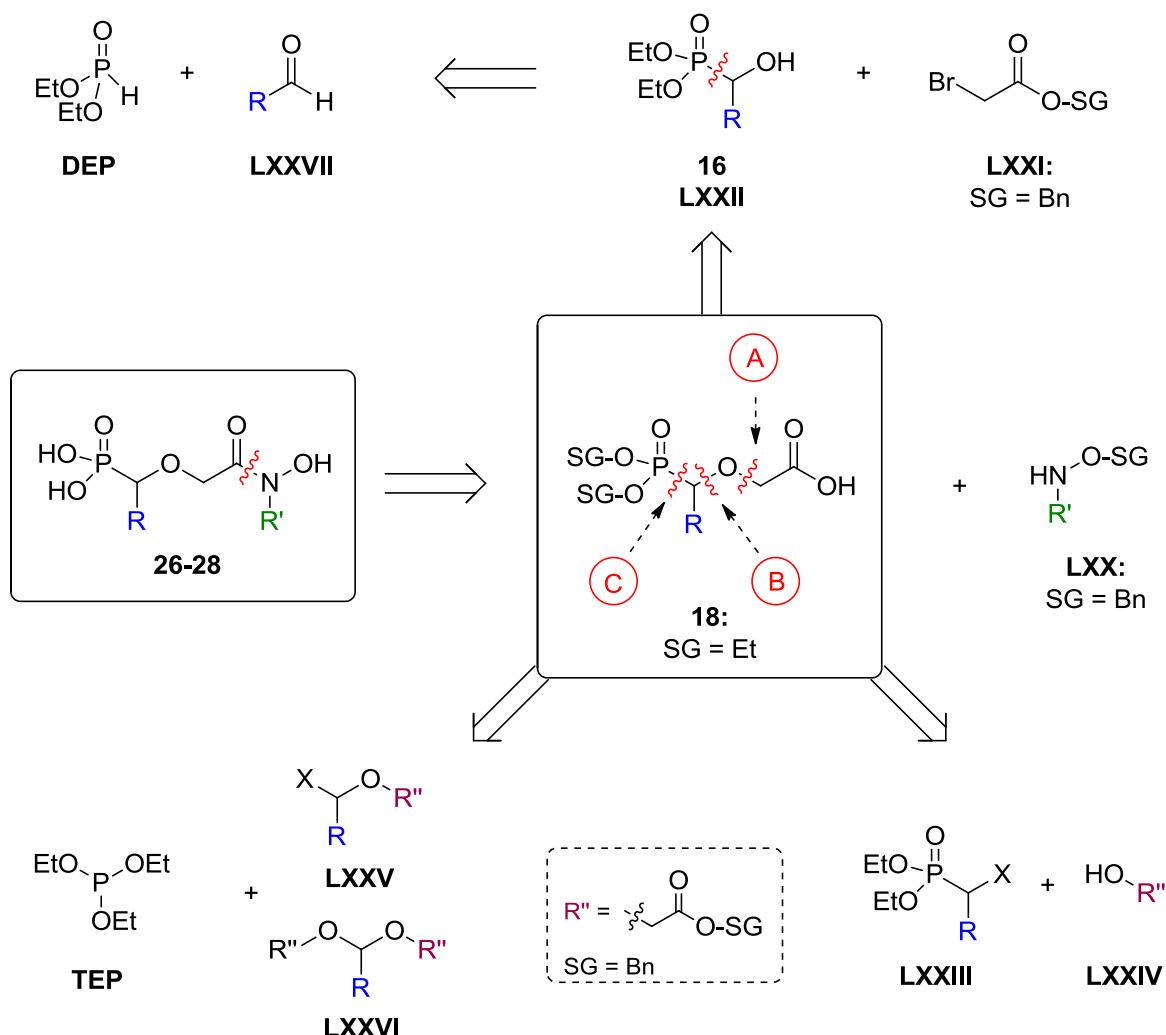
Abb. 60: Darstellung des katalytischen Zentrums der *Pf*Dxr im Komplex mit **27g** (C-Atome: grau) und Metallion (violett). Gestrichelte Linien zeigen mögliche Enzym-Inhibitor-Wechselwirkungen.

* Die Atomkoordinaten für **27g** wurden aus der Kristallstruktur des Carba-Analogons **XLVc** im Komplex mit der *Ec*Dxr (3R0I) übernommen, die β -Methylengruppe von **XLVc** wurde durch Sauerstoff ersetzt. In der *Pf*Dxr-Struktur 3AU9 wurde Fosmidomycin durch **27g** ersetzt, die Struktur wurde mit SYBYLX2.0 minimiert.

3.3 Synthese und Eigenschaften der β -oxa-isosteren Fosmidomycin-Analoga

3.3.1 Syntheseplanung

Die Zielstrukturen **26-28** lassen sich retrosynthetisch in die Carbonsäuren **18** und die Hydroxylamine **LXX** zerlegen und sollten durch *N*-Acylierungen der Hydroxylamine über S_N2_t -Additions-Eliminierungsreaktionen zugänglich sein (**Schema 12**). Die Acylierung des unsubstituierten Hydroxylamins erfolgt zwar thermodynamisch kontrolliert meist am Stickstoff,²⁷⁶ bei *N*-substituierten Derivaten ist diese Regioselektivität allerdings weniger stark ausgeprägt.³³⁷ Um eine *O*-Acylierung zu verhindern, muss die Hydroxygruppe geschützt werden. Dazu sollte die bereits in vorherigen Synthesen bewährte Benzylschutzgruppe eingesetzt werden, die sich im späteren Syntheseverlauf durch katalytische Hydrogenolyse leicht und in hohen Ausbeuten abspalten lässt.³³⁸



Schema 12: Retrosynthetische Überlegungen zur Herstellung der Fosmidomycin-Analoga **26-28** (SG = Schutzgruppe, X = Abgangsgruppe).

Zur Acylierung von *O*-substituierten Hydroxylaminen können in Analogie zur Amid- bzw. Peptidsynthese Carbonsäurechloride, -ester oder -anhydride eingesetzt werden.^{248,339-341} Eine Alternative stellt die Kondensation von Carbonsäuren mit Hydroxylaminen unter Verwendung von Kupplungsreagenzien dar. Dazu können Phosgen-Analoga wie **CDI**^{*}, Carbodiimide wie **EDC**[†] oder Benzotriazol-basierte Reagenzien wie **BOP**[‡] verwendet werden (**Abb. 61**).³⁴²⁻³⁴⁴

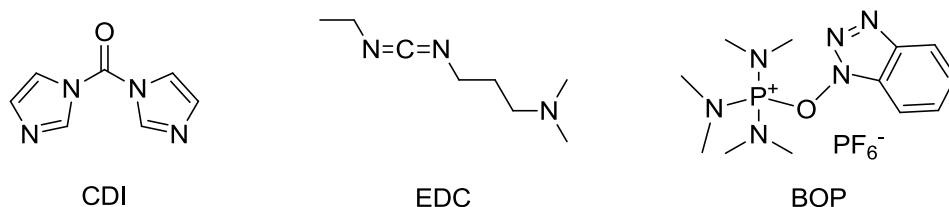


Abb. 61: Kupplungsreagenzien zur Synthese von Hydroxamsäuren aus Carbonsäuren.

Die Phosphonocarbonsäuren mit der allgemeinen Strukturformel **18** lassen sich retrosynthetisch in α -halogensubstituierte aliphatische Carbonsäuren und α -Hydroxymethanphosphonsäuren zerlegen (**A**, siehe **Schema 12**). Die Carbonsäurefunktionalität sollte als Benzylester geschützt werden. Bromessigsäurebenzylester **LXXI** ist preisgünstig erhältlich und die Benzylschutzgruppe kann durch katalytische Hydrogenolyse in hoher Ausbeute entfernt werden.^{345,346} Als Phosphonsäure-Schutzgruppe wurde wie in den zuvor beschriebenen Synthesen der Phosphonsäurediethylester gewählt. Diese Schutzgruppe ist orthogonal zum Benzylester abspaltbar und kann, wie bereits erwähnt, durch eine TMSBr-vermittelte Desalkylierung unter schonenden Bedingungen entfernt werden.^{308,309} Literaturbekannte (**LXXII**) und bisher noch nicht beschriebene α -Hydroxyphosphonate (**16**) wurden als Ausgangsmaterialien gewählt.

Umgekehrt ist auch eine retrosynthetische Spaltung der anderen C-O-Einfachbindung möglich (**B**, siehe **Schema 12**), die zu einem α -Halogenphosphonat (**LXXIII**) als elektrophilem Synthon und einer α -Hydroxycarbonsäure (**LXXIV**) als nukleophilem Synthon führt.

Eine Spaltung der Kohlenstoff-Phosphor-Bindung als erster Retrosyntheseschritt ist ebenfalls denkbar (**C**, **Schema 12**). Diese führt zu einem nukleophilen Phosphonsäurefragment, das in Form von Triethylphosphit zur Synthese eingesetzt werden könnte. Das elektrophile Fragment hätte in diesem Fall allerdings eine kompliziertere Struktur, die zusätzlichen Syntheseaufwand erfordern würde. In der Literatur wurde beispielsweise die Michaelis-Arbusov-Reaktion von Triethylphosphit mit α -halogenierten Ethern (**LXXV**) gefunden, die aus Aldehyd, Alkohol und Chlorwasserstoff oder im Falle der aromatischen Vertreter aus Benzaldehyd-Dialkylacetalen mit Acetylchlorid erhältlich sind.³⁴⁷

* CDI = 1,1'-Carbonyldiimidazol.

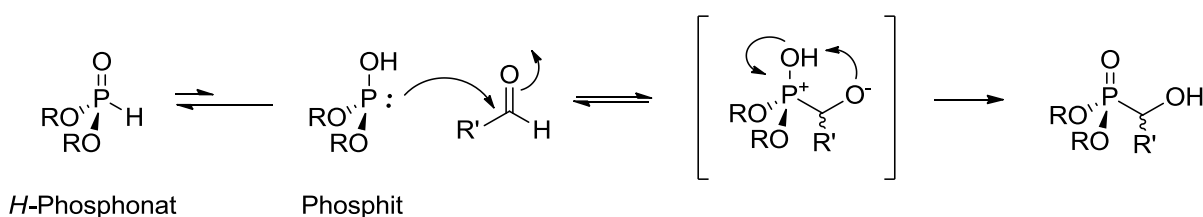
† EDC = 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid.

‡ BOP = Benzotriazol-1-yloxytris-(dimethylamino-)phosphoniumhexafluorophosphat.

Auch die direkte Umsetzung von Triethylphosphit oder Diethyl(trimethylsilyl)phosphit mit Benzaldehyd-Acetalen (**LXXVI**) in Gegenwart von Lewis-Säuren ist beschrieben, für größere Alkylreste (R'') aber ebenfalls nicht praktikabel.^{348,349}

Die erste der genannten Strategien (**A**) ist für die eigenen Synthesen am aussichtsreichsten, da die α -Hydroxyphosphonate **16** und **LXXII** eine *P,O*-Acetal-Teilstruktur enthalten. Die Struktur kann durch retrosynthetische Spaltungen in der Reihenfolge 1. **A**, 2. **C** in drei Komponenten zerlegt werden, deren zentraler Baustein ein Aldehyd ist. Durch Umsetzung eines Dialkylphosphits (z. B. Diethylphosphit, **DEP**) mit den Aldehyden **LXXVII** können in einer Pudovik-Reaktion gleichzeitig der Alkyl- bzw. Arylsubstituent und die Hydroxygruppe in α -Position relativ zur Phosphonsäurefunktionalität eingeführt werden.^{350,351} Alternativ kann die Synthese von α -Hydroxyphosphonaten durch eine Umsetzung von Trialkylphosphiten mit Aldehyden in einer Abramov-Reaktion* erfolgen.^{352,353}

Die Pudovik-Reaktion wird auch als Phospho-Aldol-Reaktion bezeichnet und ist bei Aldehyden, Ketonen und Iminen möglich.³⁵⁴ Dialkylphosphite liegen in Lösung unter neutralen Bedingungen in zwei tautomeren Formen vor: Die Phosphonat-Form, auch als *H*-Phosphonat bezeichnet, steht im Gleichgewicht mit der Phosphit-Form (**Schema 13**). In pH-neutraler Lösung ist das Gleichgewicht stark zur Seite der Phosphonats verschoben, welches ein elektrophiles Phosphor-Zentrum besitzt. Durch sein freies Elektronenpaar besitzt das Phosphit-Tautomer hingegen nukleophile Reaktivität.³⁵⁵ Nach dem heute allgemein angenommenen Mechanismus, der allerdings noch nicht experimentell bestätigt wurde, wird durch Einwirkung einer Base (z. B. Alkoxide oder Amine)³⁵³ das Gleichgewicht in Richtung des Phosphits verschoben und möglicherweise auch ein Dialkylphosphit-Anion generiert.³⁵⁶⁻³⁵⁸ Durch den nukleophilen Angriff des Phosphit-Tautomers an eine Carbonylverbindung† entsteht die Phosphor-Kohlenstoffbindung.^{354,355}



Schema 13: Mechanismus der Phosphoaldol-Reaktion (modifiziert nach *Kee*, 2003³⁵⁶).

Durch diesen Syntheseschritt entsteht aus dem prochiralen Carbonyl-Kohlenstoffatom des Aldehyds ein asymmetrisches Zentrum. Zu Beginn der eigenen Arbeiten waren noch keine enantiomerenreinen Fosmidomycin-Derivate dieses Strukturtyps bekannt. So gab es bisher keine Information darüber, in

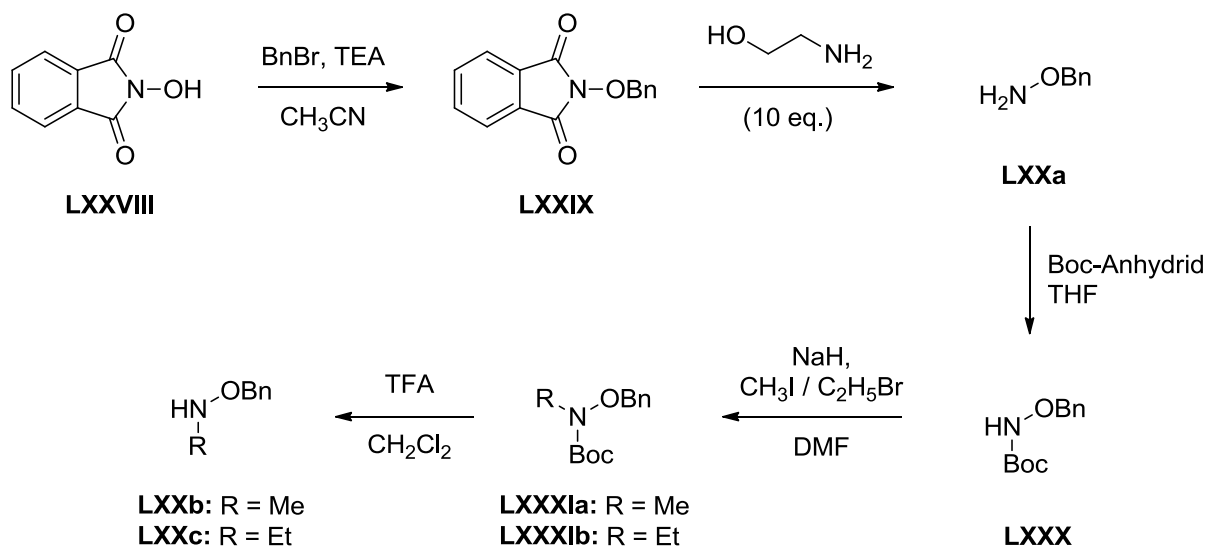
* Bei der Abramov-Reaktion erfolgt nach der nukleophilen Addition des Trialkylphosphits ein zum zweiten Schritt der Michaelis-Arbusov-Reaktion analoger Alkyltransfer. Die Pudovik-Reaktion kann auch als Michaelis-Becker-analoge Variante der Abramov-Reaktion betrachtet werden.³⁵² In der Literatur wird oft nicht zwischen den beiden Reaktionsnamen unterschieden, in dieser Arbeit wird die allgemein übliche Zuordnung verwendet.

† Die Reaktion kann durch Metallionen katalysiert werden, indem durch Koordination beider Reaktanden eine Annäherung des Aldehyds an das Phosphoratom begünstigt wird.³⁵⁴

welcher stereochemischen Konfiguration diese Verbindungen bevorzugt am aktiven Dxr-Zentrum binden. Aus diesem Grund wurde in den eigenen Synthesen mit racemischen α -Hydroxyphosphonaten gearbeitet. Ein weiteres Argument für die Verwendung racemischer Vorstufen war, dass das zum Phosphor α -ständige Kohlenstoffatom CH-acide ist. In späteren Synthesestufen könnte deshalb unter basischen Bedingungen eine Racemisierung auftreten. Bei einer racemischen Synthese ist eine nachträgliche Enantiomerentrennung der Zielverbindungen, beispielsweise mittels präparativer chiraler HPLC, möglich. Alternativ kann eine Racemattrennung von Phosphonaten über die fraktionierte Kristallisation diastereomerer Salze (z. B. mit Ephedrin) durchgeführt werden.³⁵⁹ Für eine stereoselektive Synthese von α -Hydroxyphosphonaten kann die Pudovik-Reaktion zum Beispiel durch chirale Lewis-Säuren katalysiert werden.^{357,360} Enantiomerenreine α -Hydroxyphosphonate sind auch über andere Reaktionswege wie beispielsweise die enantioselektive Reduktion von Ketophosphonaten oder die enzymatische Hydrolyse von α -Acyloxyphosphonaten zugänglich.^{361,362}

3.3.2 Synthese der Edukte

Die unterschiedlich substituierten Hydroxylamine **LXXa-c** wurden ausgehend von *N*-Hydroxyphthalimid (**LXXVIII**) synthetisiert (**Schema 14**). Die Phthaloylschutzgruppe erlaubt als Gabriel-analoge Reaktion eine selektive *O*-Alkylierung des Hydroxylamins zur Einführung einer Benzylschutzgruppe, die sowohl für die *N*-Alkylierung als auch für die Umsetzung der Hydroxylamine zu Hydroxamsäuren benötigt wird. **LXXVIII** wurde in Acetonitril gelöst, durch Zugabe von Triethylamin deprotoniert und mit Benzylbromid zu **LXXIX** umgesetzt.³⁶³ Die Freisetzung von *O*-Benzylhydroxylamin (**LXXa**) aus **LXXIX** erfolgte durch eine Ethanolaminolyse,³⁶⁴ die im Gegensatz zur konventionellen Hydrazinolyse eine einfache Abtrennung des wasserlöslichen Nebenprodukts erlaubt. **LXXa** wurde durch fraktionierende Destillation gereinigt und in über 90 %iger Ausbeute erhalten. Um eine selektive *N*-Monoalkylierung des *O*-Benzylhydroxylamins zu gewährleisten, wurde die Aminofunktionalität von **LXXa** zuvor durch Umsetzung mit einer äquivalenten Menge an Boc-Anhydrid geschützt.³⁶⁵ Das Boc-geschützte Zwischenprodukt **LXXX** wurde zur Alkylierung in Dimethylformamid (DMF) gelöst, mit Natriumhydrid deprotoniert und anschließend mit Methyljodid oder Ethylbromid umgesetzt.³⁶⁵ Die Alkylierungsreaktionen verliefen praktisch quantitativ und die *N*-alkylierten Zwischenstufen (**LXXXI**) konnten ohne weitere Reinigung zur Schutzgruppenabspaltung eingesetzt werden. Dazu wurden **LXXXIa** und **b** in Dichlormethan gelöst und mit einem Überschuss an Trifluoressigsäure versetzt.³⁶⁵ Nach mehrstündigem Rühren wurden die *N*-alkylierten, *O*-geschützten Hydroxylamine **LXXb** und **c** durch basische Extraktion und anschließende Säulenchromatographie gereinigt.



Schema 14: Synthese der *O*-benzylgeschützten Hydroxylamine **LXXa-c**.

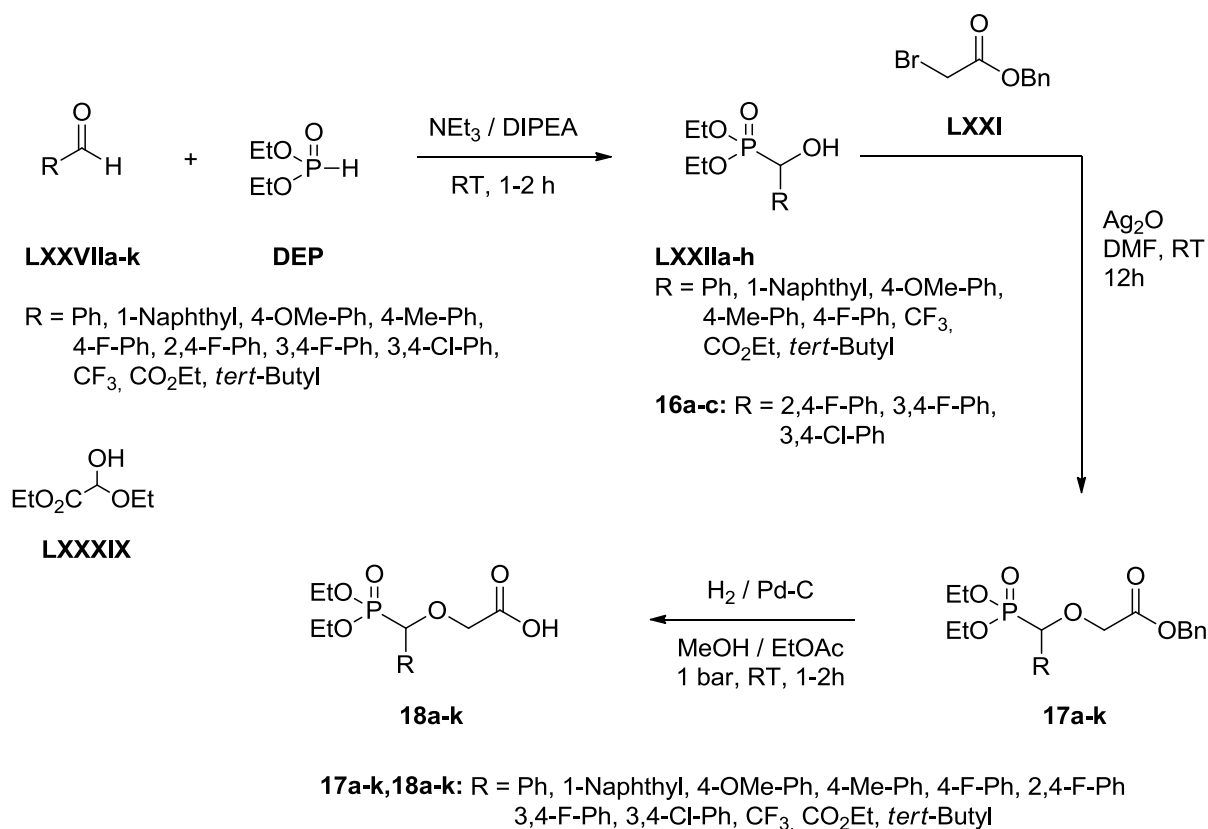
Die Synthese und die analytischen Daten der in dieser Arbeit verwendeten α -Hydroxyphosphonate **LXXIIa-h** sind literaturbekannt.³⁶⁶⁻³⁷⁴ Unbekannt waren bis jetzt die difluorphenylsubstituierten Derivate **16a** und **b**, während die 3,4-dichlorphenylsubstituierte Verbindung **16c** zwar in der Literatur bereits erwähnt, aber mit Ausnahme von ^{31}P -NMR-Daten bisher nicht vollständig charakterisiert wurde.^{375,376}

Die Synthese der aromatisch substituierten α -Hydroxyphosphonate **LXXIIa-h** und **16a-c** erfolgte ausgehend von den substituierten Benzaldehyden **LXXVIIa-h** (Schema 15). Diese wurden in Gegenwart von zwei Äquivalenten Triethylamin oder *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) mit einem 10 %igem Überschuss an Diethylphosphit umgesetzt. Als Ausgangsprodukte für die aliphatisch substituierten α -Hydroxyphosphonate **LXXIIIi-k** (R = CF₃, CO₂Et, *tert*-Butyl) wurden der Aldehyd **LXXVIIj** in Form des Ethyl-Halbacetals **LXXXII** und die Aldehyde **LXXVIIi** und **k** als 50 %ige Lösung in Toluol bzw. 75 %ige Lösung in *tert*-Butanol eingesetzt. Der Reaktionsfortschritt konnte infrarotspektroskopisch an der abnehmenden Intensität der Aldehyd-Carbonylabsorptionsbande verfolgt werden, eine quantitative Umsetzung war oft schon nach kurzer Zeit festzustellen. Die meist kristallinen Reaktionsprodukte wurden nach Umkristallisation oder Säulenchromatographie in guter Reinheit und Ausbeute (**16a-c**: 74–100 %) gewonnen.

Die Alkylierung der Hydroxyphosphonate wurde am Beispiel der Verbindung **LXXIIa** nach einer von *Haemers et al.* für die Synthese oxasterer Fosmidomycin-Derivate veröffentlichten Vorschrift erprobt,²⁵⁹ die Reaktionen führten jedoch trotz Variation der Bedingungen nicht zum gewünschten Produkt. Eine Literaturrecherche zu Alkylierungsmethoden ergab, dass Silber(I)-oxid-vermittelte Alkylierungen von primären und sekundären Hydroxygruppen mit Alkylhalogeniden unter schonenden Reaktionsbedingungen einfach durchführbar sind.

Diese Methode wurde in verschiedenen Variationen zum Beispiel für die selektive Monoalkylierung primärer und sekundärer Dirole³⁷⁷, für die α -Hydroxylierung, -Alkoxylierung und -Carboxylierung von

Amiden^{378,379} oder für die Funktionalisierung tertiärer Alkylbromide mit *O*-, *N*- und *C*-Nukleophilen* beschrieben³⁸⁰ und erwies sich auch als geeignet für die Alkylierung aliphatischer α -Hydroxyphosphonate.^{381,382}



Schema 15: Synthese der Carbonsäuren **18a-k**.

Die α -Hydroxyphosphonate **LXXIIa-k** und **16a-c** wurden in DMF gelöst und mit einem leichten Überschuss an Bromessigsäurebenzylester (**LXXI**) in Gegenwart von 1,5 Äquivalenten neutralem Silber(I)-oxid umgesetzt (**Schema 15**). Nachdem die vollständige Umsetzung des Edukts per Dünnschichtchromatographie festzustellen war, folgte eine Filtration der Suspension über Kieselgur. Nach wässriger Aufarbeitung des Filtrats konnten die Alkylierungsprodukte **17a-i** chromatographisch gereinigt werden. Einzig die Verbindung **17k** ließ sich in nur sehr geringer Ausbeute (16 %) und nicht analysenrein isolieren, war aber als Ausgangsmaterial für die folgenden Synthesestufen von ausreichender Qualität. Nach der Alkylierung erfolgte die Palladium-katalysierte Hydrogenolyse der Benzylester **17a-k** zu den Carbonsäuren **18a-k** unter atmosphärischem Wasserstoffdruck (**Schema 15**). Als Lösungsmittel wurden Methanol und Ethylacetat eingesetzt. Die Verwendung von Ethylacetat bot den Vorteil, dass keine Methylesterbildung erfolgte, die in Einzelfällen bei der Chromatographie mit methanolhaltigem Elutionsmittel beobachtet wurde. Zudem wurde bereits von *Schlüter* beschrieben, dass chlorierte Aromaten empfindlich gegenüber Dehalogenierung sind und

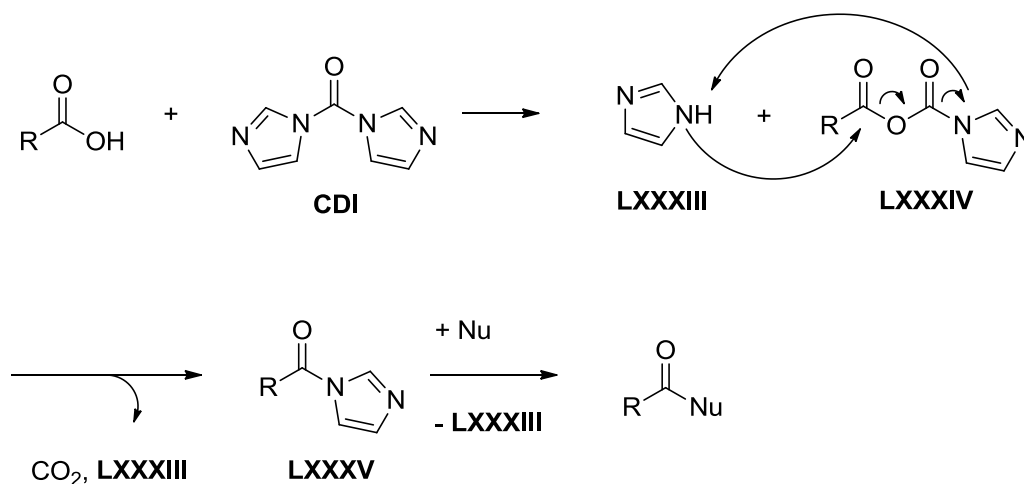
* Als Nukleophile konnten Carbonsäuren, primäre und sekundäre Alkohole, Phenole, primäre und sekundäre Amine und das *C*-Nukleophil Ethylacetoacetat mit *tert*-Alkylbromiden ohne nennenswerte Bildung des durch Bromwasserstoff-Eliminierung gebildeten Alken-Nebenproduktes umgesetzt werden, bei Einsatz anderer Silbersalze konnte diese Chemoselektivität nicht erreicht werden.³⁸⁰

daher nicht in Methanol unter Wasserstoffüberdruck, sondern in Ethylacetat unter geringerem Druck chemoselektiv umgesetzt werden können.³⁸³ Unter den entsprechenden Bedingungen konnte auch der Benzylester **17h** zersetzungsfrei in die Carbonsäure **18h** überführt werden. Bei der Hydrogenolyse der Verbindungen **17c** und **d** war hingegen ein geringer Anteil von Methanol im Lösungsmittel für eine vollständige Umsetzung notwendig.

3.3.3 Synthese der Zielverbindungen

Azolide als Carbonsäure-Kupplungsreagenzien

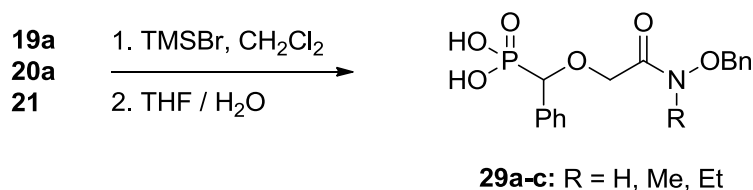
Das von *Staab* entwickelte 1,1'- oder *N,N'*-Carbonyldiimidazol (CDI, **Schema 16**) ist der 1956 erstmals synthetisierte und seitdem in der organischen Synthese am häufigsten eingesetzte Vertreter der Azolide.^{384,385} Unter der Bezeichnung „Azolid“ werden heterocyclische Amide zusammengefasst, deren Stickstoffatom Teil eines aromatischen Fünfrings ist. Im Gegensatz zu normalen Amiden, die nur eine geringe Reaktivität des Carbonyl-Kohlenstoffs gegenüber nukleophilen Reaktionen zeigen, sind die Azolide ähnlich reaktiv wie Carbonsäurehalogenide und -anhydride. Für präparative Zwecke sind vor allem Imidazolide gut geeignet, da sie sowohl ausreichende Reaktivität als auch Stabilität besitzen und das bei der Reaktion freigesetzte Imidazol als Hilfsbase die weitere Umsetzung katalysiert.³⁸⁵ CDI stellt für solche Reaktionen eine gute Alternative zu Phosgen dar, da es ähnlich reaktiv, untoxisch und auf Grund seiner kristallinen Form leichter zu handhaben ist.^{386,387}



Schema 16: Mechanismus CDI-vermittelter Kupplungsreaktionen zu Carbonsäure-Derivaten.

† Ein intramolekularer Mechanismus, in dem das Imidazol aus dem gemischten Anhydrid an der Acyl-Carbonylgruppe angreift, konnte durch Isotopenmarkierungs-Experimente weitgehend ausgeschlossen werden.³⁸⁸

Die Abspaltung der Schutzgruppen wurde am Beispiel der Verbindungen **19a**, **20a** und **21** in beiden möglichen Reihenfolgen durchgeführt, um für weitere Synthesen die geeignetere Reaktionsfolge zu ermitteln (**Schema 18**). Hierbei war die hydrogenolytische Abspaltung der Benzylschutzgruppe, gefolgt von der TMSBr-vermittelten Desalkylierung der Diethylphosphonate bezüglich Ausbeute und Reinheit der Zwischenstufen günstiger als die umgekehrte Reihenfolge. Die Diethylphosphonate **29a-c** wurden zwar in kristalliner Form und guter Reinheit erhalten, die Kristallisation erfolgte jedoch teilweise erst nach langer Zeit und in vergleichsweise geringen Ausbeuten von etwa 30 %.

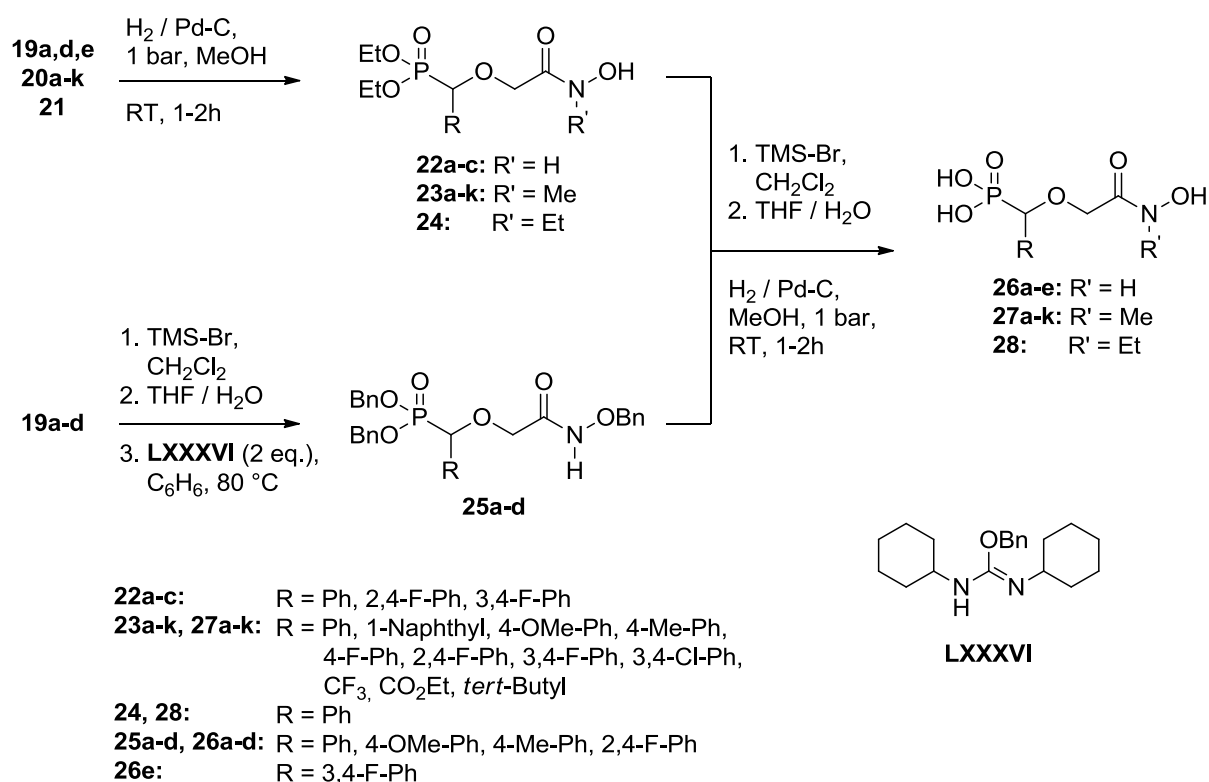


Schema 18: Synthese der freien Phosphonsäuren **29a-c**.

Die katalytische Hydrogenolyse der Benzylschutzgruppe von **19a,d,e**, **20a-k** und **21** führte in hohen Ausbeuten (meist über 90 %) zu den analysenreinen Hydroxamsäuren **22a-c**, **23a-k** und **24** (**Schema 19**). Über eine anschließende Desalkylierung der Phosphonsäurediethylester^{217,308} konnten die *N*-alkylierten Phosphonohydroxamsäuren **27a-k** und **28** als kristalline Feststoffe erhalten werden, die bis auf **27i** analysenrein waren.* Die Identität der Zielverbindung **27i** wurde durch hochauflösende Massenspektrometrie bestätigt. Durch TMSBr-vermittelte Desalkylierung der am Hydroxamsäure-Stickstoff unsubstituierten Phosphonsäurediethylester **22a-c** konnten die entsprechenden Zielverbindungen mit freier Hydroxamsäurestruktur nicht in kristalliner, analysenreiner Form erhalten werden, sondern fielen als gefärbte, verunreinigte Öle an, die auf Grund ihrer hohen Polarität chromatographisch nicht gereinigt werden konnten. Ein alternativer Syntheseweg zur Gewinnung ausreichend reiner Endprodukte bot sich mit der literaturbekannten Umesterung von Phosphonsäurediethylestern zu lipophileren Dibenzylestern an, die von *Behrendt* im Vorfeld bereits für die Synthese ähnlicher Fosmidomycin-Derivate erfolgreich eingesetzt wurde.^{217,389} Hierbei werden *O*-Benzylisoharnstoffe eingesetzt, deren Umwandlung in die thermodynamisch stabileren Harnstoffe unter Übertragung des Alkylsubstituenten auf die Phosphonsäurefunktionalität die treibende Kraft der Reaktion darstellt.³⁸⁹ Als Dibenzylphosphonate geschützt sollten Phosphonsäuren chromatographisch gut zu reinigen und durch hydrogenolytische Schutzgruppenabspaltung in guter Ausbeute in die freien Zielverbindungen überführbar sein. Das Alkylierungsreagenz *O*-Benzyl-*N,N*-dicyclohexylisoharnstoff **LXXXVI** wurde nach einer literaturbekannten Methode aus Benzylalkohol und *N,N*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) unter Kupfer(I)-Katalyse hergestellt.³⁹⁰

* Anders als das von *Haemers et al.* beschriebene *N*-methylsubstituierte β -Oxa-Analogon von Fosmidomycin mit inverser Hydroxamsäurefunktionalität **LIIf**²⁵⁹ sind die α -substituierten Zielverbindungen **27** und **28** hydrolyse- und lagerstabil. Falls die Instabilität von **LIIf** durch die *P,O*-Acetalstruktur bedingt ist, kann aus dieser Beobachtung ein stabilisierender Effekt der α -Substituenten auf die acetalische Verknüpfung abgeleitet werden.

Die geschützten Zwischenprodukte **19a-d** wurden durch Behandlung mit TMSBr und anschließender Hydrolyse in die korrespondierenden freien Phosphonsäuren überführt. Diese wurden als Rohprodukte in Anlehnung an eine Literaturvorschrift mit zwei Äquivalenten **LXXXVI** in Benzen einige Stunden unter Rückfluss erhitzt.³⁹¹ Die Phosphonsäuredibenzylester **25a-d** wurden nach chromatographischer Reinigung an Kieselgel analysenrein oder in mindestens 95 %iger HPLC-Reinheit erhalten. **25a-d** wurden anschließend durch palladiumkatalysierte Hydrogenolyse in die Zielverbindungen **26a-d** überführt, deren per HPLC ermittelte Reinheit bei mindestens 95 % lag.

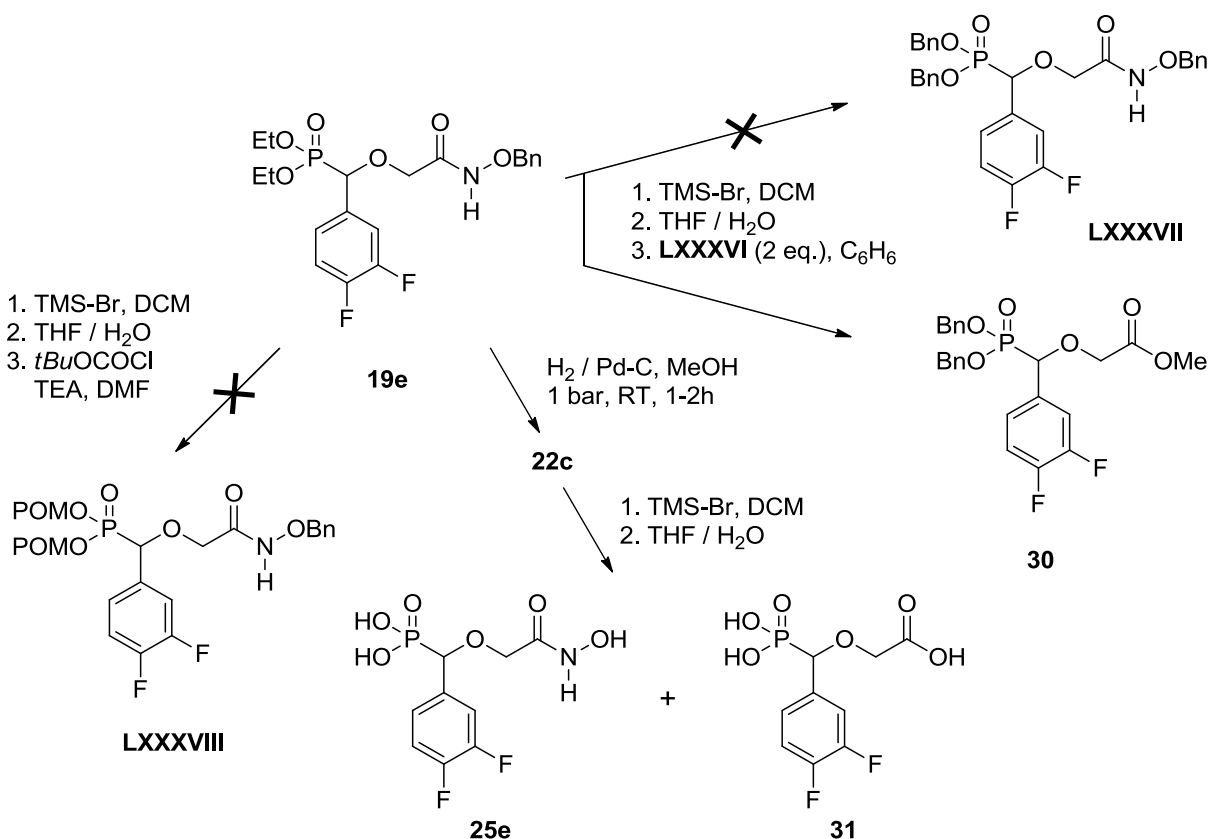


Schema 19: Synthese der Zielverbindungen **26-28**.

Aus dem nach Umesterung des Diethylphosphonats **19e** erhaltenen Produktgemisch konnte das gewünschte Dibenzylphosphonat **LXXXVII** nicht isoliert werden (**Schema 20**). Stattdessen führte die Umsetzung von **19e** unter Abspaltung der Hydroxamsäurefunktionalität zu dem Carbonsäuremethylester **30**. Dieses Nebenprodukt konnte chromatographisch isoliert und mittels NMR- und IR-Spektroskopie, Massenspektrometrie und Elementaranalyse identifiziert werden. Der starke Elektronenzug durch die Sauerstoffbrücke und den difluorierten Phenylrest könnte zu einer besonders hohen Reaktivität und damit Hydrolyselabilität der Hydroxamat-Carbonylgruppe von **19e** im Vergleich zu **19a-d** führen.* Der Grund für die Umwandlung der benzylgeschützten Hydroxamsäure in einen Methylester könnte die Anwesenheit von Methanol-Rückständen im

* Bei der ebenfalls difluorierten Verbindung **19d** ist ein ähnlicher Effekt anzunehmen, der die Stabilität der Hydroxamsäurefunktionalität aber nicht in demselben Maß zu beeinträchtigen scheint wie bei **19e**.

Phosphonsäure-Rohprodukt sein, da dieses zuvor zur Abtrennung unlöslicher Verunreinigungen in Methanol gelöst und filtriert werden musste. Für die weiteren Reaktionsschritte wurden hingegen reine Reagenzien und Lösungsmittel eingesetzt, so dass eine Verunreinigung zu einem späteren Zeitpunkt unwahrscheinlich ist. Auch das im Überschuss eingesetzte TMSBr konnte aus dem öligen Rohprodukt durch mehrstündiges Trocknen im Hochvakuum nicht restlos entfernt werden. Dass die Verunreinigungen der Phosphonsäure durch Methanol und TMSBr eventuell zur Bildung des Methylesters geführt haben könnten, wurde aufgrund der Tatsache vermutet, dass die Reaktion von *O*-benzylgeschützten Hydroxamsäuren zu Methylestern in Methanol und in Gegenwart von Trimethylsilylchlorid literaturbekannt ist.³⁹²⁻³⁹⁴ Methanolysen von Hydroxamsäuren laufen auch in Anwesenheit verschiedener Säuren (Salzsäure,^{395,396} Trifluormethansulfonsäure,³⁹⁷ Schwefelsäure³⁹⁸) und Säurechloride (Acetyl- oder Thionylchlorid^{399,400}) ab. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde das mit TMSBr-Resten verunreinigte Rohprodukt der Diethylphosphonat-Spaltung in Methanol gelöst und mehrere Stunden bei Raumtemperatur und unter Erwärmung gerührt. Im Infrarotspektrum trat jedoch zu keiner Zeit die charakteristische Ester-Carbonyl-Absorptionsbande auf, so dass die Bildung des Nebenproduktes auf diesem Weg nicht erklärt bzw. nachvollzogen werden konnte.*



Schema 20: Versuche zur Gewinnung der Zielverbindung **25e** und der Prodrug-Vorstufe **LXXXVIII**.

* Die Entstehung von Carbonsäuremethylestern war später auch bei zwei in Abschnitt 4.3.1 beschriebenen Prodrugsynthesen ausgehend von **19e** zu beobachten, bei denen die Edukte nicht mit Methanol in Berührung gekommen waren.

Um die Zielverbindung **25e** zu erhalten, wurde ausgehend von dem Diethylphosphonat **19e** alternativ der für die *N*-substituierten Hydroxamsäuren genutzte Syntheseweg verfolgt (**Schema 20**). Die Abspaltung der Benzylschutzgruppe verlief in 99 % Ausbeute und führte zu der analysenreinen unsubstituierten Hydroxamsäure **22c**. Aus dieser konnte durch TMSBr-vermittelte Desalkylierung jedoch nur ein verunreinigtes Gemisch aus der Phosphonohydroxamsäure **25e** und der Phosphonocarbonsäure **31** erhalten werden, das laut HPLC-Analyse etwa im Verhältnis 9:1 vorlag.* Das zähe Öl ließ sich weder kristallisieren noch durch semipräparative HPLC reinigen. Die Arbeitsgruppe von *Van Calenbergh* berichtete über ähnliche Probleme bei der Reinigung α -arylsubstituierter Phosphonohydroxamsäuren, die auf eine geringe Löslichkeit und hohe Affinität der Verbindungen zur stationären Phase zurückgeführt wurden.^{†, 254} Die Hydroxamsäurefunktionalität von **25e** konnte durch eine Tüpfelprobe mit Eisen(III)-chlorid zwar nachgewiesen werden. Sie scheint allerdings nicht stabil zu sein, da in IR- und Massenspektren nur die Carbonsäure **31** nachzuweisen war und die nach semipräparativer HPLC-Trennung erhaltene vermeintliche Zielverbindung eine stärkere Verunreinigung als zuvor zeigte. Die Herstellung der Zielverbindung **25e** in Form verschiedener Phosphonsäure-Prodrugs gelang ebenfalls nicht, da schon die benzylgeschützten Vorstufen wie beispielsweise **LXXXVIII** aus den Reaktionsansätzen nicht isoliert werden konnten (siehe auch Abschnitt 4.3.1).

3.3.4 Spektroskopische Eigenschaften

NMR-Spektroskopische Eigenschaften

Stellvertretend für die α -arylsubstituierten Phosphonohydroxamsäuren sollen zunächst die NMR-spektroskopischen Eigenschaften der Verbindung **22a** diskutiert werden, deren ¹H-NMR-Spektrum in **Abb. 62** dargestellt ist. Das Stereozentrum in α -Stellung zur Phosphonsäureesterfunktionalität führt auch hier zu der in Abschnitt 2.3.3 an Verbindung **2a** bereits besprochenen Signalaufspaltung durch Diastereotopie oder Anisotropie, welche die Signale der Ethylgruppen **a/a'**, **b/b'** sowie der Methylengruppe **d/d'** betrifft. Heteronukleare Kopplungen zu ³¹P treten bei den Protonen **b/b'** und **c** auf. Das Dublett-Signal der ausschließlich mit ³¹P koppelnden Methingruppe **c** ist durch den benachbarten, elektronenziehenden Sauerstoff stark tieffeldverschoben. Die Methylengruppen-Signale **d/d'** bilden ein AB-Spinsystem aus zwei Dubletts, während die Protonen der Methylengruppen **b** und **b'** durch die Kopplung zum Phosphor und zu den benachbarten Methylgruppen **a** und **a'** komplexere Multiplettsignale erzeugen.

* Die Verbindung **31** konnte mittels hochauflösender Massenspektrometrie identifiziert werden.

† Diese Verbindungen wurden als Bisammoniumsalze chromatographisch an Cellulose gereinigt.²⁵⁴ Da im Verlauf der eigenen Arbeiten bereits *in vitro*-Daten für **25a** und **d** vorlagen, die für **25e** keine herausragende biologische Aktivität erwarten ließen, wurde auf weitere Reinigungsversuche an diesem Produkt verzichtet.

Für das NH-Proton der Hydroxamsäurefunktionalität **e** treten im Spektrum zwei verbreiterte Singulets im Abstand von etwa 0,5 ppm mit einem Integralverhältnis von 0,9:0,1 Protonen auf. Ebenso zeigt die wegen des größeren Abstands zur Carbonylfunktion zu höherem Feld verschobene OH-Gruppe **f** zwei überlagerte, verbreiterte Singulets im entsprechenden Integralverhältnis.*

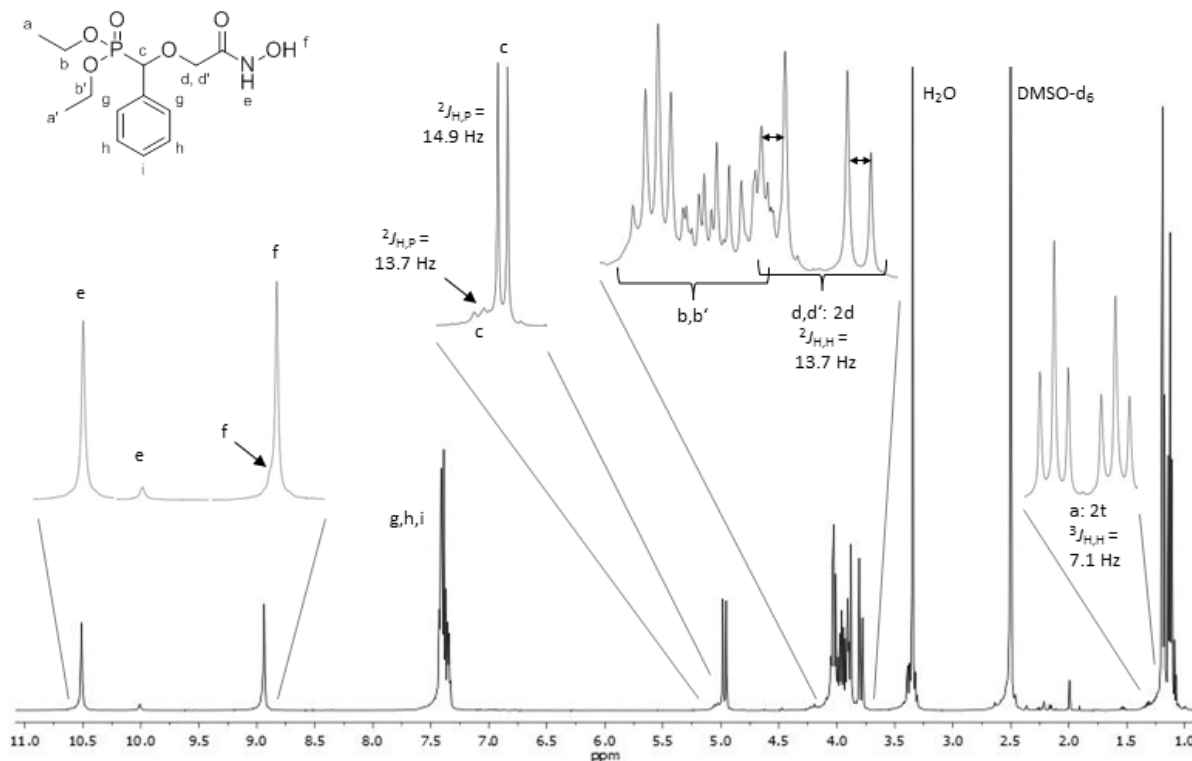


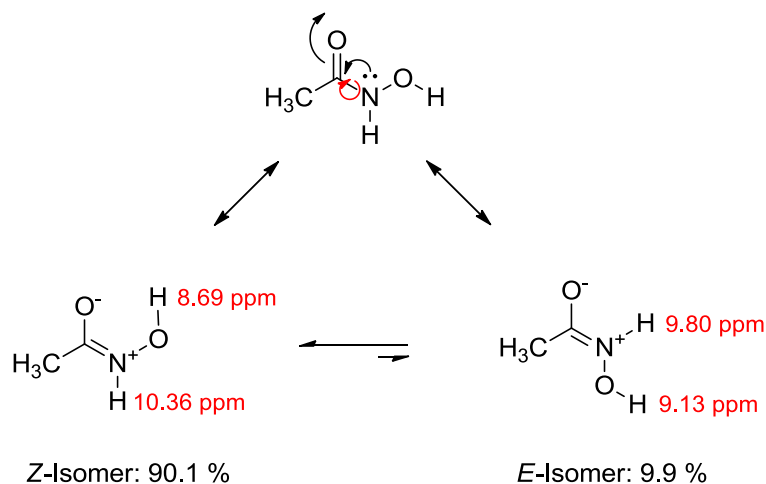
Abb. 62: ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **22a** in DMSO-d_6 .

Auch das Dublett des Methin-Protons **c** tritt verdoppelt mit einem Integralverhältnis von 0,9:0,1 Protonen auf.[†] Diese Signalaufspaltungen könnten durch das Vorliegen zweier Hydroxamsäure-Rotamere bedingt sein. Die Hydroxamsäurefunktionalität kann auf Grund des partiellen Doppelbindungscharakters und der dadurch eingeschränkten Drehbarkeit der C-N-Bindung in Oxo- und Iminol-Form jeweils als *E*- oder *Z*-Isomer vorliegen (**Schema 21**). Die bevorzugte Konformation ist abhängig von verschiedenen Faktoren wie *N*- und *O*-Substitution, Lösungsmittel und Temperatur.⁴⁰¹⁻⁴⁰³ An einfachen Modellverbindungen wurde durch NMR-spektroskopische Untersuchungen gezeigt, dass in wässriger Lösung bzw. restwasserhaltigem Lösungsmittel (z. B. DMSO) bei den meisten Hydroxamsäuren hauptsächlich das *Z*-Isomer der Oxo-Form vorliegt.^{402,403} Wie quantenmechanische Berechnungen unterstützen, ist die *Z*-Konformation bei einer Hydratisierung

* Die Zuordnung der NH- und OH-Signale auf Basis der chemischen Verschiebung kann durch die gute Übereinstimmung mit den Hydroxamsäure-Resonanzsignalen verschiedener *N*- oder *O*-alkylierter Derivate aus dieser Arbeit bestätigt werden, in denen jeweils eines dieser Signale fehlt und daher das andere zweifelsfrei zugeordnet werden kann.

† Ob für die Methylengruppe **d** auch ein zweites, tieffeldverschobenes Resonanzsignal existiert, kann hier auf Grund der Überlagerung mit den Multiplikts von **b/b'** nicht festgestellt werden. Bei den freien Phosphonohydroxamsäuren **26b-d** sind auch die Resonanzsignale dieser Methylengruppen deutlich erkennbar verdoppelt.

des Moleküls energetisch begünstigt, während bei fehlender Hydratisierung überwiegend das *E*-Isomer vorliegt.^{401,404} Für Acetohydroxamsäure wurde mittels ^1H -, ^{13}C - und ^{15}N -NMR-Spektroskopie ein *E/Z*-Verhältnis von 1:9 in DMSO-d_6 nachgewiesen (**Schema 21**).⁴⁰²



Schema 21: *E/Z*-Isomere von Acetohydroxamsäure, prozentualer Anteil und chemische Verschiebungen in DMSO-d_6 bei 20 °C (modifiziert nach Brown, 1988⁴⁰²).

Da die chemischen Verschiebungen und Integralverhältnisse der NH- und OH-Resonanzsignale **e** und **f** von Verbindung **22a** denen der Acetohydroxamsäure ähnlich sind, ist bei **22a** ebenfalls eine Bevorzugung der *Z*-Konformation zu vermuten. Die in den beiden Isomeren zum Carbonyl-Sauerstoff *trans*-ständigen Protonen sollten jeweils die zu tieferem Feld hin verschobenen Resonanzsignale für **e** und **f** erzeugen.⁴⁰² Um die in Verbindung **22a** überwiegende Konformation zu ermitteln, wurde ein NOESY-Experiment in DMSO durchgeführt, bei dem die räumliche Nähe von Wasserstoffatomen durch das Auftreten des NOEs* erkannt werden kann. Nur bei einer *Z*-konfigurierten Hydroxamsäurefunktionalität kann ein NOE zwischen der Methylengruppe **d** und dem zur Carbonylgruppe *trans*-ständigen NH-Proton auftreten, im *E*-Isomer ist eine derartige Wechselwirkung nicht möglich (**Schema 22**).

Tatsächlich ist in dem in **Abb. 63** dargestellten Ausschnitt des NOESY-Spektrums von Verbindung **22a** eine Korrelation zwischen beiden Dubletts des AB-Systems von **d** und dem tieffeldverschobenen NH-Signal **e** bei 10,51 ppm zu erkennen, das dem *Z*-Isomer zugeordnet wird. Eine Korrelation zwischen dem hochfeldverschobenen NH-Signal (10,01 ppm) und der Methylengruppe **d** tritt hingegen nicht auf. **22a** liegt demnach in DMSO zu etwa 90 % in *Z*-Konformation vor (**Schema 22**).

* NOE = Nuclear Overhauser Effect/Kern-Overhauser-Effekt: Bei einem genügend kleinen räumlichen Abstand zweier Kerne A und B wird die Intensität der beobachteten ^1H -Absorption von A (ν_A) durch die zusätzliche Einstrahlung der Absorptionsfrequenz des Kerns B (ν_B) verändert, indem über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen die Relaxation des Kerns A beeinflusst wird. Die Korrelation erscheint im 2D-NMR-Spektrum als Kreuzsignal.³¹⁷

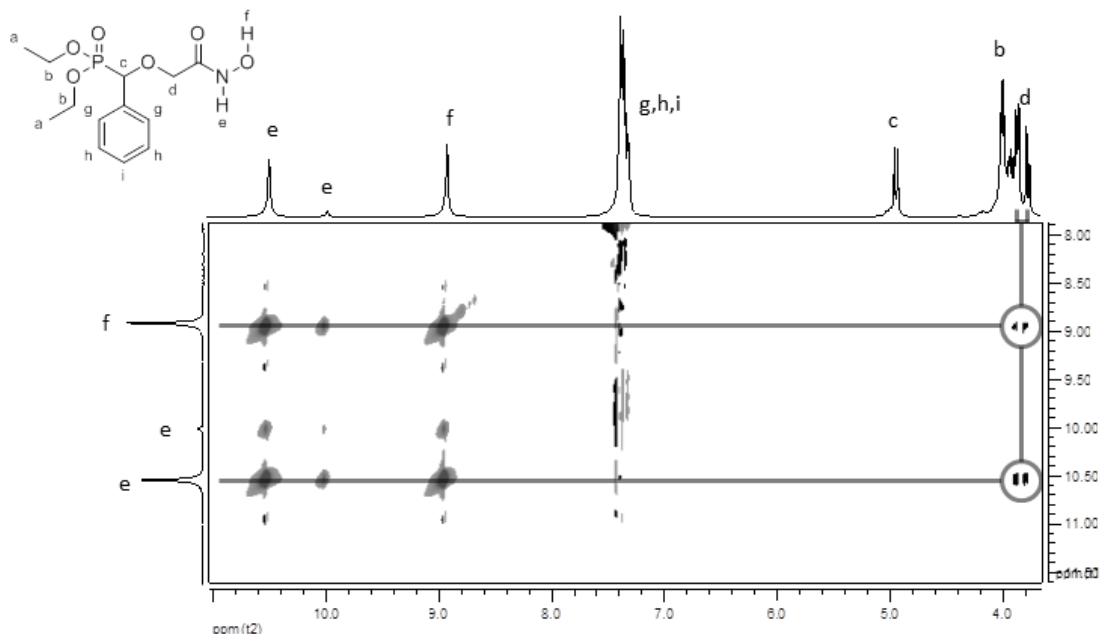
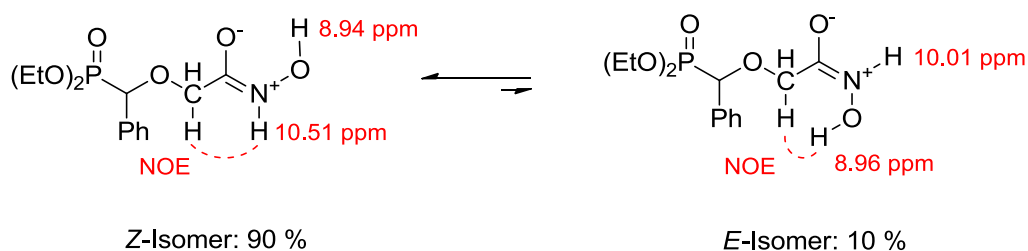


Abb. 63: Ausschnitt aus dem NOESY-Spektrum der Verbindung **22a**.

Da sich die Resonanzsignale der Hydroxygruppe **f** für *E*- und *Z*-Konformation gegenseitig überlagern, kann anhand des vorliegenden Resonanzspektrums nicht bestätigt werden, dass der NOE zwischen den Protonen **f** und **d** wie erwartet nur bei dem *E*-Isomer auftritt. Die Intensität des beobachteten NOE-Kreuzsignals zwischen **f** und **d** ist allerdings ähnlich hoch wie die des NOEs zwischen **e** und **d**, obwohl das dem *E*-Isomer zuzuordnende OH-Signal von sehr geringer Intensität ist. Dieser Effekt könnte dadurch bedingt sein, dass sich die Protonen **f** und **d** in der *E*-Konformation stärker annähern können als die Protonen **e** und **d** in der *Z*-Konformation.



Schema 22: *E/Z*-Isomerie bei Verbindung **22a**, Isomerenverteilung in DMSO- d_6 bei 20 °C.

Stellvertretend für die *N*-alkylierten Phosphonohydroxamsäuren ist in **Abb. 64** das ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **27a** in DMSO- d_6 dargestellt. Die der Carbonylgruppe benachbarte Methylengruppe **b/b'** bildet ein charakteristisches AB-Spinsystem mit Dacheffekt aus. Anders als bei der freien Hydroxamsäure **22a** findet man hier nur einen Signalsatz für das Methin-Proton **a**, so dass auf das Vorliegen nur eines Strukturisomers geschlossen werden kann. Beim Auftreten einer *E/Z*-Isomerie

müssten insbesondere die Resonanzsignale der *N*-Methylgruppe **c** und der Hydroxygruppe **d** in zwei Signale aufgespalten werden, was ebenfalls nicht beobachtet wird.

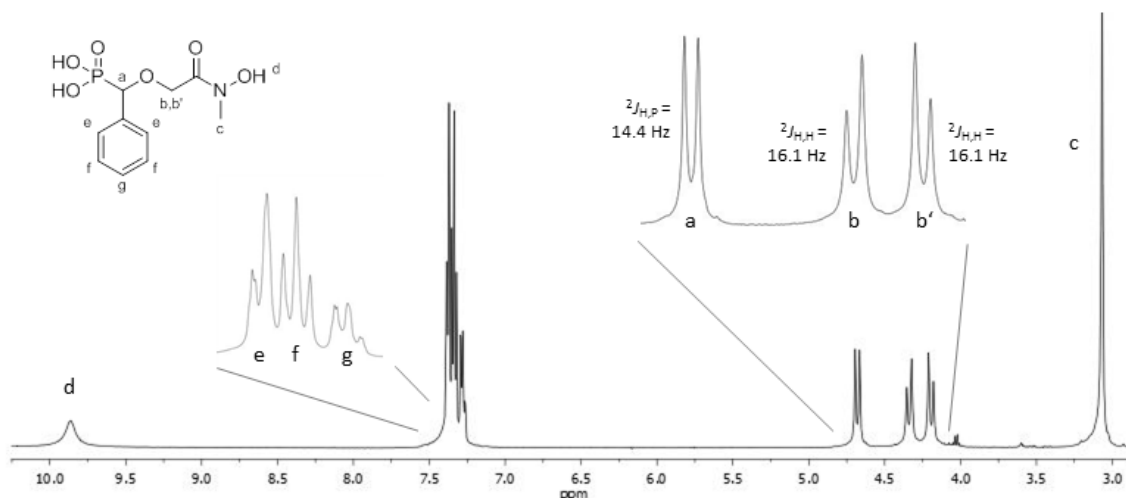
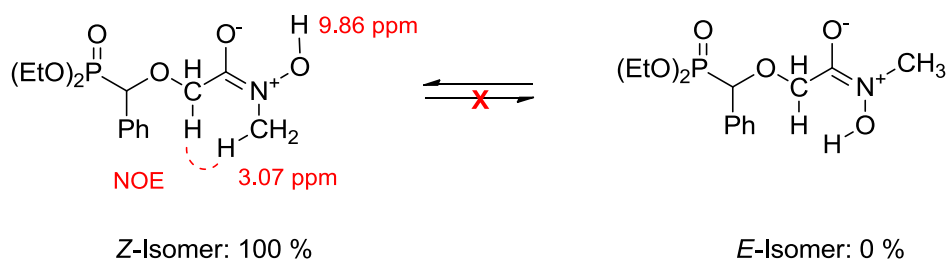


Abb. 64: ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **27a** in DMSO-d_6 .

Für *N*-alkylierte Hydroxamsäuren wie zum Beispiel *N*-Methylaceto-, *N*-Propion- oder *N*-Benzohydroxamsäure ist literaturbekannt, dass in DMSO ausschließlich das *Z*-Isomer vorliegt, da wahrscheinlich die Solvatisierung durch den Wasseranteil im Lösungsmittel eine bessere Stabilisierung des *Z*-Isomers im Vergleich zur *E*-Isomer bewirkt. Die sterische Interaktion zwischen der *N*-Methylgruppe und dem Kohlenstoffgerüst der *Z*-konfigurierten Hydroxamsäure ist energetisch günstiger als die Interaktion der OH-Gruppe mit dem Gerüst, wie sie in der *E*-Konformation auftritt.⁴⁰³ Um die bevorzugte Konformation der Verbindung **27a** in DMSO zu ermitteln, wurde ein NOESY-Spektrum aufgenommen, von dem **Abb. 65** einen Ausschnitt zeigt.

Die NOE-Signalen lassen die räumliche Nähe der Methylgruppe **c** zu den Protonen des Kohlenstoffgerüsts **a** und **b/b'** deutlich erkennen. Da der Effekt nur bei einer *Z*-konfigurierten Hydroxamsäurefunktionalität möglich ist, kann das ausschließliche Vorliegen des *Z*-Isomers von **27a** angenommen werden (**Schema 23**).



Schema 23: *E/Z*-Isomerie bei Verbindung **27a**, Isomerenverteilung in DMSO-d_6 bei 20 °C.

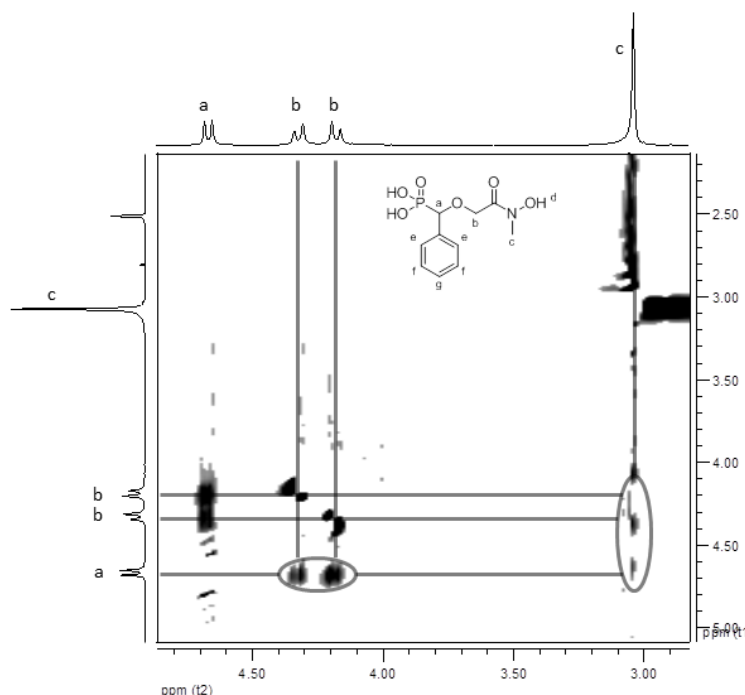


Abb. 65: Ausschnitt aus dem NOESY-Spektrum der Verbindung **27a**.

Die Erkenntnisse über die *E/Z*-Isomerie der freien und *N*-methylierten Hydroxamsäuren **22a** und **27a** stimmen mit den Ergebnissen der durch *Behrendt* im Rahmen seiner Dissertation durchgeführten NMR-spektroskopischen Untersuchungen an strukturell ähnlichen Fosmidomycin-Derivaten überein.⁴⁰⁵

Die fluorierten aromatischen Fosmidomycin-Analoga weisen aufgrund zahlreicher heteronuklearer Kopplungen einige Besonderheiten auf. Exemplarisch für die oxa-isosteren Fosmidomycin-Analoga sollen daher die ¹³C-Spektren der Verbindungen **27e,f** und **16b** vorgestellt werden (**Abb. 66**). Die chemischen Verschiebungen und Aufspaltungsmuster dieser Beispielverbindungen entsprechen weitgehend den NMR-Daten literaturbekannter mono- und difluorbenzylsubstituierter Phosphonsäuren,⁴⁰⁶ Diethylphosphonate⁴⁰⁷ und fluorierter α -Aminoarylmethanphosphonsäuren.⁴⁰⁸

Die *N*-Methylsubstituenten der Hydroxamsäuren **27e** und **f** erscheinen als Singulets bei etwa 35 ppm. Die Resonanzsignale der Ethoxygruppen (**a/a'** und **b/b'**) des α -Hydroxyphosphonats **16b** ähneln bezüglich chemischer Verschiebung und Aufspaltungsmuster denen der in Abschnitt 2.3.3 besprochenen Benzamide-Analoga Fosmidomycins. Charakteristisch für die *P,O*-Acetalstruktur ist hingegen die starke Tieffeldverschiebung der Methin-Kohlenstoff-Signale (**27e,f**: **a**, **16b**: **c**), die im Bereich von 70–80 ppm als Dublett mit ¹J_{C,P}-Kopplungskonstanten von etwa 160 Hz auftreten.

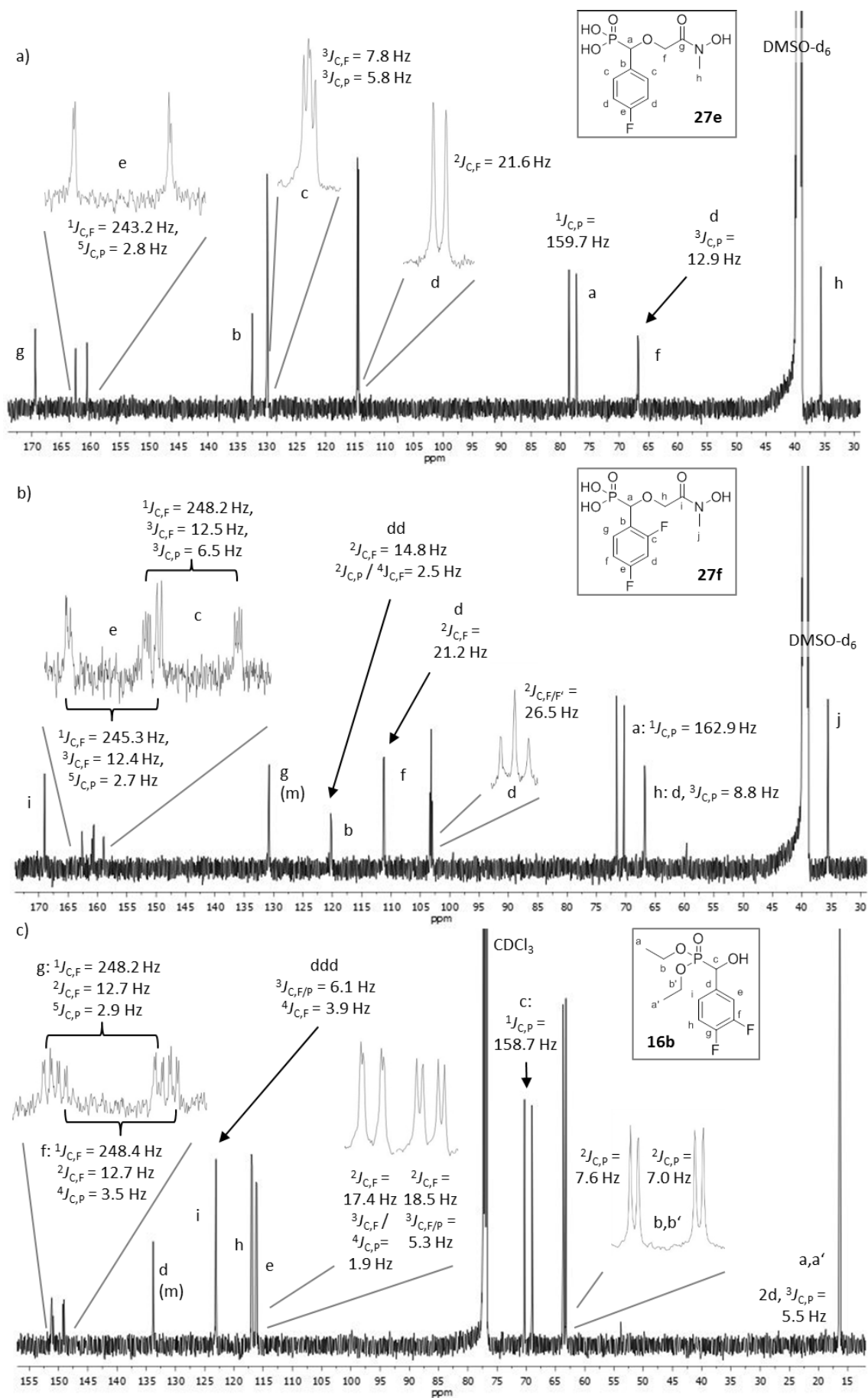


Abb. 66: ¹³C-NMR-Spektren der Verbindungen **27e** (a), **27f** (b) in DMSO-d₆ und **16b** (c) in CDCl₃.

Die Signale der Carbonyl-Kohlenstoffatome erscheinen als Singulett in einem Resonanzbereich um 170 ppm. Fast alle Resonanzsignale der aromatischen Kohlenstoffatome von **27e**, **27f** und **16b** werden durch heteronukleare Kopplungen mit ^{19}F und/oder ^{31}P aufgespalten.

Der symmetrisch in *para*-Stellung fluoridierte Phenylsubstituent von Verbindung **27e** erzeugt vier Resonanzsignale (**b-e**), bei denen die Größe der $J_{\text{C,F}}$ -Kopplungskonstante mit zunehmendem Abstand zwischen Fluor und Kohlenstoff abnimmt. Das Signal des direkt mit Fluor verbundenen Kohlenstoffatoms **e** ist auf Grund der Abschirmung durch den elektronegativen Substituenten stark tieffeldverschoben. Die Überlagerung der ausgeprägten $^1J_{\text{C,F}}$ -Kopplung mit der deutlich schwächeren $^5J_{\text{C,P}}$ -Kopplung führt zu einer Signalaufspaltung in Form eines doppelten Dubletts. Die tertiären aromatischen Kohlenstoffatome **d** erzeugen durch $^2J_{\text{C,F}}$ -Kopplung ein Dublettsignal, das auffällig hochfeldverschoben ist. Bei den Signalen für die tertiären Kohlenstoffatome **c** ist wieder eine doppelte Dublett-Aufspaltung zu erkennen, die 3J -Kopplungen des Kohlenstoffs zu ^{31}P und ^{19}F sind hier von vergleichbarer Größe. Das quartäre Kohlenstoffatom **b** erzeugt ein etwas verbreitertes Singulett-Signal, bei dem die heteronuklearen Kopplungen nicht mehr aufgelöst sind.

Die Resonanzsignale der direkt an Fluor gebundenen, aromatischen Kohlenstoffatome bilden bei den difluorierten Verbindungen **27f** (**c,e**) und **16b** (**f,g**) durch die Überlagerung zweier Kopplungen zu ^{19}F und einer Kopplung zu ^{31}P stark tieffeldverschobene, dreifache Dubletts. Die Signale der beiden fluorierten Kohlenstoffatome sind jeweils an ihrer chemischen Verschiebung und an der Größe von $J_{\text{C,P}}$ zu unterscheiden. Die Differenzierung ist bei **27f** deutlich besser möglich als bei **16b**. In den Resonanzsignalen der aromatischen Kohlenstoffatome sind meist nur eine oder zwei heteronukleare Kopplungen aufgelöst, und nur die C,F-Kopplungen mit Kopplungskonstanten über 10 Hz können zweifelsfrei zugeordnet werden.

Abschließend sollen noch einige Besonderheiten der ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren von Verbindung **20i** gezeigt werden (**Abb. 67**). Durch die geringere Größe des Trifluormethylsubstituenten ist die Diastereotopie der Ethoxygruppen schwächer ausgeprägt als bei den arylsubstituierten Derivaten, wie die geringere Differenz der chemischen Verschiebungen der Signalgruppen für **a/a'** und **b/b'** zeigt. Die dem Chiralitätszentrum am nächsten stehenden Methylen-Protonen **d/d'** bilden wegen chemischer und magnetischer Inäquivalenz ein AB-System, während die weiter entfernte *N*-Methylgruppe **e** und die Benzyl-Methylengruppe **f** keine Aufspaltung erfahren und Singulettsignale erzeugen. Auffällig ist das Resonanzsignal der Methingruppe **c**, welches durch die Überlagerung einer $^2J_{\text{H,P}}$ -Kopplung und drei $^3J_{\text{H,F}}$ -Kopplungen in ein doppeltes Quartett aufgespalten wird.

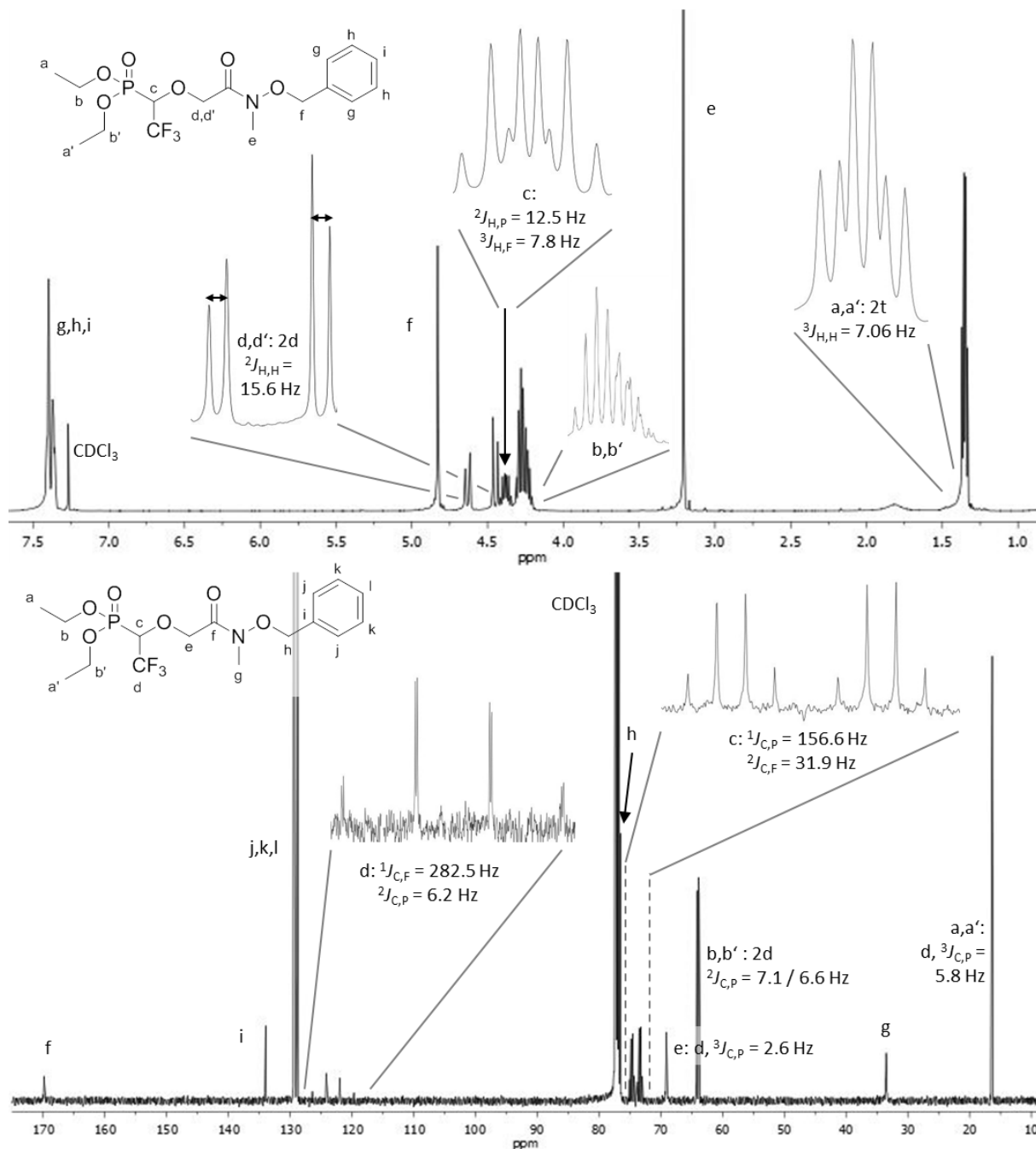


Abb. 67: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum der Verbindung **20i** in CDCl_3 .

Im ^{13}C -NMR-Spektrum von **20i** ist für die Methylgruppen der Ethoxygruppen **a/a'** nur ein einziges Dublett-Signal vorhanden, während die dem Chiralitätszentrum näher gelegenen diastereotopen Methylengruppen **b/b'** zwei getrennte Dubletts erzeugen. Das Resonanzsignal der Methingruppe **c** ist durch die Überlagerung der $^1J_{C,P}$ - und $^2J_{C,F}$ -Kopplungen in ein doppeltes Quartett aufgespalten. Eine ähnliche Aufspaltung erfährt auch das Signal des quartären, trifluorierten Kohlenstoffatoms **d**: Dieses wird durch die starken heteronuklearen $^1J_{C,F}$ -Kopplungen in ein Quartett aufgespalten, dessen Linien durch die deutlich schwächere $^2J_{C,P}$ -Kopplung verdoppelt erscheinen. Sowohl im ^1H - als auch im ^{13}C -NMR-Spektrum von **20i** sind im Gegensatz zu den arylsubstituierten Verbindungen dieser Substanzklasse keine heteronuklearen Fernkopplungen zu beobachten.

IR-Spektroskopische Eigenschaften

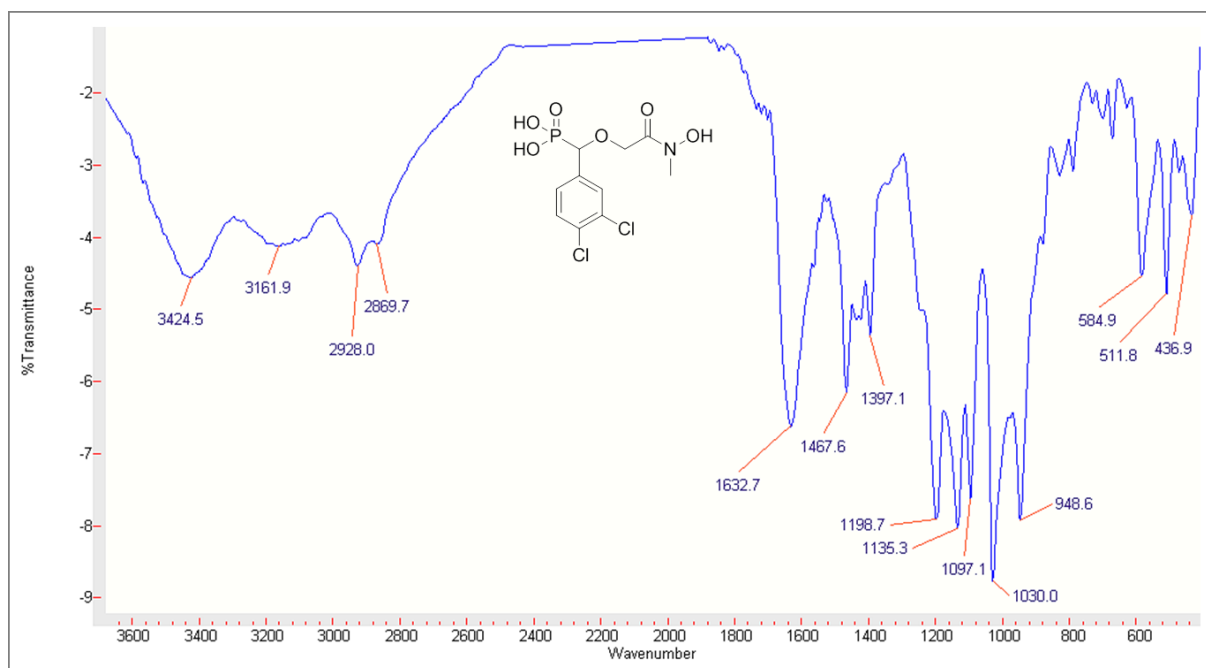


Abb. 68: IR-Spektrum der Verbindung **27h** (KBr-Pressling).

Stellvertretend für die oxa-isosteren Fosmidomycin-Analoga ist in **Abb. 68** das IR-Spektrum des Fosmidomycin-Analogons **27h** dargestellt. Die breiten Banden mit Absorptionsmaxima oberhalb von 3000 cm^{-1} sind auf die O-H-Valenzschwingungen der Phosphonsäure- und Hydroxamsäuregruppe zurückzuführen. In Übereinstimmung mit Literaturangaben kann die Absorptionsbande bei 3162 cm^{-1} der N-substituierten Hydroxamsäurefunktionalität zugeordnet werden.⁴⁰⁹ Die Absorptionsbanden der aromatischen C-H-Valenzschwingungen werden durch die O-H-Valenzbande verdeckt, während die aliphatischen C-H-Bindungen an ihrer Valenzschwingung knapp unterhalb 3000 cm^{-1} zu erkennen sind. Bei 1633 cm^{-1} findet sich die charakteristische Carbonyl-Absorption der Hydroxamsäurefunktionalität. Zwei intensive Absorptionsbanden im Fingerprint-Bereich des Spektrums werden den P-O- (1199 cm^{-1})- und P=O-Valenzschwingungen (1030 cm^{-1}) zugeordnet.

3.4 Untersuchung der biologischen Aktivität

Alle in diesem Kapitel vorgestellten, in **Abb. 69** zusammengefassten oxa-isosteren Fosmidomycin-Analoga (**26a-28**) wurden auf ihre Hemmwirkung gegenüber den rekombinanten Dxr-Enzymen von *P. falciparum*, *E. coli* und *M. tuberculosis* untersucht. Die antiplasmodiale *in vitro*-Aktivität der Testverbindungen wurde gegenüber dem Chloroquin-sensitiven *P. falciparum*-Stamm 3D7 und dem multiresistenten Stamm Dd2 evaluiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind zusammen mit den Referenzwerten für Fosmidomycin (**Fos-Na**)* in **Tabelle 6** dargestellt.

* Referenzsubstanz: Fosmidomycin-Mononatriumsalz von Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg).

Verbin- dung	Enzymassay*			Zellkulturassay†	
	<i>Pf</i> Dxr IC ₅₀ (μM)	<i>Ec</i> Dxr IC ₅₀ (μM)	<i>Mt</i> Dxr IC ₅₀ (μM)	<i>P.f.</i> Dd2 IC ₅₀ (μM)	<i>P.f.</i> 3D7 IC ₅₀ (μM)
26a	1.5 +/- 0.1	20 +/-2	466 +/- 60	n. b.	> 50
26b	2.2 +/- 0.1	17 +/- 1	352 +/- 29	n. b.	> 50
26c	1.8 +/- 0.1	12 +/- 1	348 +/- 29	n. b.	> 50
26d	1.7 +/- 0.1	9.3 +/- 0.3	192 +/- 16	n. b.	> 50
26e	3.9 +/- 0.2	49 +/- 2	> 500	n. b.	> 50
27a	0.037 +/- 0.002	0.94 +/- 0.05	16 +/- 1	0.70	1.2
27b	0.039 +/- 0.004	4.6 +/- 0.3	15 +/- 1	0.35	0.52
27c	0.046 +/- 0.004	0.45 +/- 0.04	2.8 +/- 0.2	0.34	0.31
27d	0.025 +/- 0.003	0.32 +/- 0.02	4.0 +/- 0.2	0.19	0.18
27e	0.027 +/- 0.001	0.16 +/- 0.01	5.1 +/- 0.4	0.35	0.48
27f	0.065 +/- 0.005	0.73 +/- 0.07	12 +/- 1	1.2	1.3
27g	0.012 +/- 0.001	0.24 +/- 0.01	4.6 +/-0.2	0.13	0.54
27h	0.014 +/- 0.001	0.20 +/- 0.02	1.6 +/-0.1	0.14	0.24
27i	0.15 +/- 0.01	0.16 +/- 0.01	4.2 +/- 0.3	0.81	1.1
27j	1.9 +/- 0.2	5.7 +/- 0.2	178 +/- 15	9.2	14
27k	> 500	22 +/- 1	> 500	> 50	> 50
28	0.205 +/- 0.009	25 +/- 2	287 +/- 21	3.8	8.1
Fos-Na	0.16 +/- 0.02	0.12 +/- 0.01	0.23 +/- 0.01	0.81	0.88

Tabelle 6: *In vitro*-Aktivitäten der oxasteren Fosmidomycin-Analoga **26-28** (n.b. = nicht bestimmt).

* Mittelwerte +/- Standardabweichung aus nichtlinearer Regression aus 7–13 Messpunkten.^{319,320}

† Mittelwerte aus mindestens 2 unabhängigen Doppelbestimmungen.

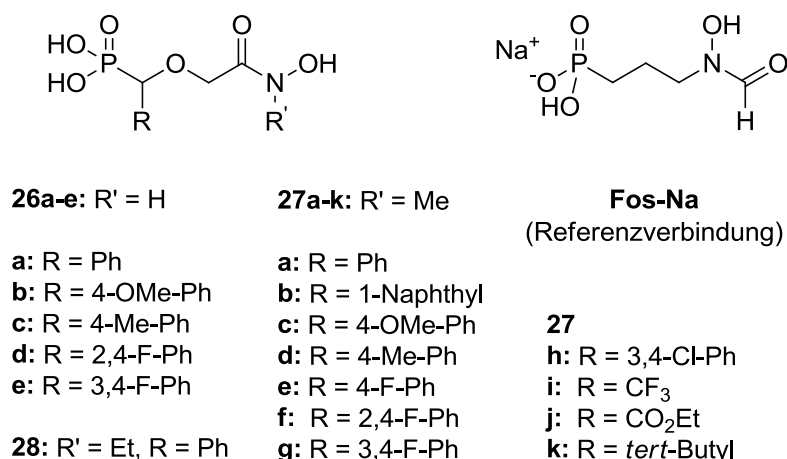


Abb. 69: Übersicht der in Kapitel 3 vorgestellten Verbindungen.

3.4.1 *PfDxr*-Inhibition und antiplasmodiale Aktivität

Die Fosmidomycin-Analoga **26a-28** lassen sich nach ihrer *PfDxr*-hemmenden und antiplasmodialen Aktivität in drei Gruppen einteilen. Die stärksten Inhibitoren (**27a-h**) hemmen isolierte *PfDxr* im niedrigen nanomolaren Konzentrationsbereich ($IC_{50} = 12\text{--}65\text{ nM}$) und inhibieren das Wachstum beider *P. falciparum*-Stämme im niedrigen bis submikromolekularen Bereich ($0,12\text{--}1,2\text{ }\mu\text{M}$). Nur **27f** inhibiert beide Plasmodienstämme *in vitro* schwächer als Fosmidomycin. Die Verbindungen aus dieser Gruppe besitzen als gemeinsames Strukturmerkmal eine *N*-methylierte Hydroxamsäurefunktionalität und einen aromatischen Substituenten in α -Position.

Demgegenüber steht die Gruppe der α -arylsubstituierten freien Hydroxamsäurederivate **26a-e**, die nur im niedrigen mikromolekularen Konzentrationsbereich enzymhemmend wirken ($IC_{50} = 1,5\text{--}3,9\text{ }\mu\text{M}$) und im Zellkulturassay keine antiplasmodiale Aktivität zeigen ($IC_{50} > 50\text{ }\mu\text{M}$).

Die dritte Gruppe, die sich aus den in α -Position aliphatisch substituierten, *N*-methylierten Fosmidomycin-Analoga **27i,j** und dem *N*-ethylierten Derivat **28** zusammensetzt, lässt sich nicht klar von den beiden zuerst genannten abgrenzen. Sowohl in Enzym- als auch Zellkulturassays werden vergleichbare oder bis zu 10fach geringere Aktivitäten im Vergleich zu Fosmidomycin gemessen. Die IC_{50} -Werte dieser Gruppe liegen gegenüber der *PfDxr* im Bereich von $0,15\text{--}1,9\text{ }\mu\text{M}$ und gegenüber den beiden *P. falciparum*-Stämmen im Bereich von $0,81\text{--}14\text{ }\mu\text{M}$.

Die α -*tert*-butylsubstituierte Verbindung **27k** ist das einzige in dieser Arbeit vorgestellte oxa-isostere Fosmidomycin-Analogon, welches weder die *PfDxr* hemmt noch *in vitro* Wachstumsinhibition zeigt. In **Abb. 70** sind die Inhibitonskurven ausgewählter Derivate gegenüber der *PfDxr* dargestellt.

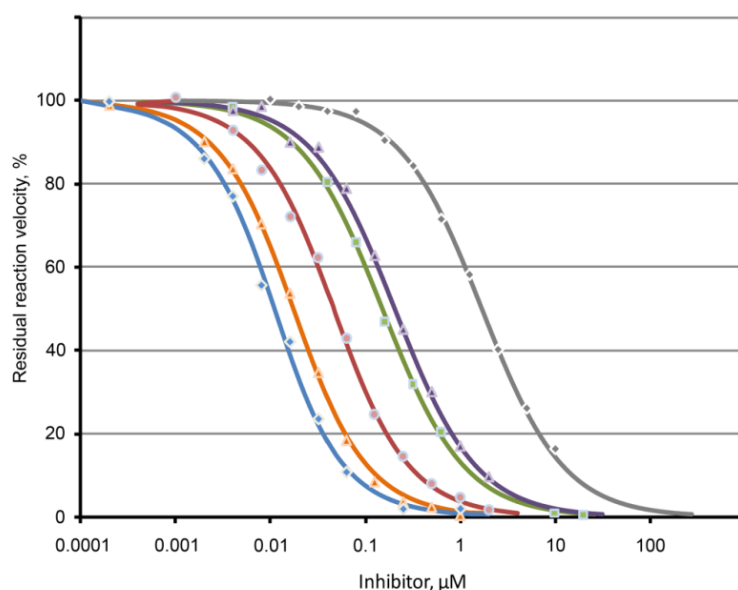


Abb. 70: Inhibitionskurven ausgewählter Verbindungen aus dem *PfDxr*-Assay (♦: **27h**, ▲: **27e**, ●: **27b**, ■: **Fos-Na**, ▲: **28** ♦: **26d**, Grafik: *B. Illarionov*, Universität Hamburg).

In den Zellkulturassays wurden für die *N*-alkylierten Fosmidomycin-Analoga **27a-j** und **28** jeweils um etwa eine Zehnerpotenz höhere IC_{50} -Werte gemessen als im Enzymassay, die Aktivitätsabstufungen gegenüber Dd2 und 3D7 sind jedoch ähnlich. Im Korrelationsdiagramm (**Abb. 71**, links) liegen die meisten Datenpunkte daher annähernd auf einer Diagonale, die in Richtung der Ordinate zu höheren IC_{50} -Werten verschoben ist. Die höheren IC_{50} -Werte im Erythrozytenassay könnten damit begründet werden, dass die hohe Polarität der Phosphonohydroxamsäuren ihre Durchdringung von Erythrozyten-, Parasiten- und Apikoplastmembranen erheblich erschwert. So ist eine deutlich höhere Konzentration des Inhibitors im Zellkulturmedium erforderlich, um eine 50 %ige Wachstumsinhibition von *P. falciparum* zu erzielen, als zur 50 %igen Aktivitätshemmung der isolierten Zielstruktur *PfDxr* benötigt wird.

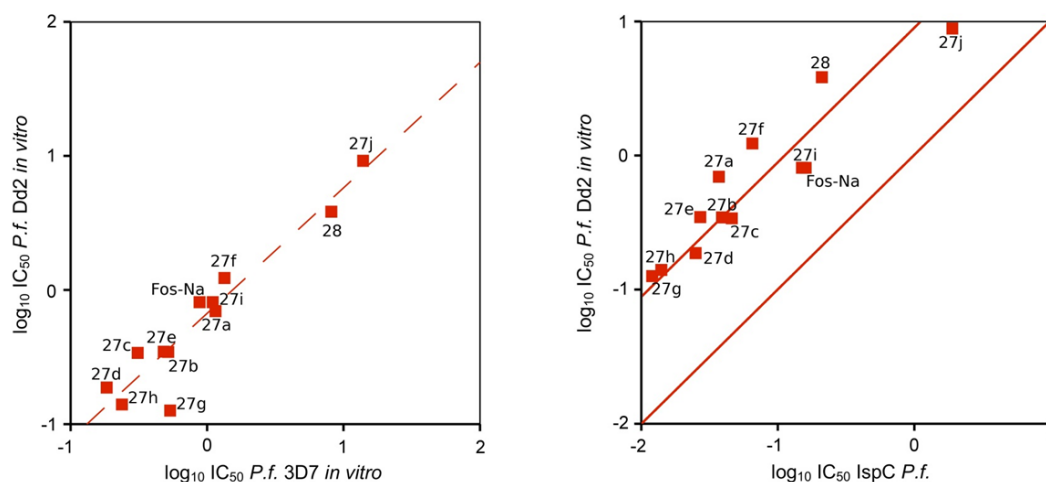


Abb. 71: Links: Korrelation der IC_{50} -Werte von **27a-j**, **28** und **Fos-Na** aus den Dd2- und 3D7-Zellkulturassays; die Regressionsgerade ähnelt der Funktion $y = x$. Rechts: Korrelation der im Dd2-Zellkulturassay und im Enzymassay ermittelten IC_{50} -Werte für **27a-j**, **28** und **Fos-Na**. (Grafik: *T. Gräwert*, Universität Hamburg).

Wie aufgrund des Wirkmechanismus zu erwarten ist, zeigen die Inhibitionswerte der Fosmidomycin-Analoga gegenüber dem Chloroquin-sensitiven und dem Chloroquin-resistenten Parasitensamm eine gute Korrelation, so dass die Regressionsgerade über die Datenpunkte im Korrelationsdiagramm (**Abb. 71**, rechts) nahezu einer Diagonalen entspricht.

Auswirkung der N-Substitution der Hydroxamsäurefunktionalität

Die Ergebnisse der Enzym- und Zellkulturassays zeigen übereinstimmend, dass die Substitution des Hydroxamsäure-Stickstoffatoms für die *in vitro*-Aktivität der oxasteren Fosmidomycin-Analoga entscheidend ist (**Abb. 72**). Vergleicht man die IC_{50} -Werte der unterschiedlich *N*-substituierten Analoga **27a** und **28** gegenüber der *PfDxr*, ist beim Austausch des Methyl- gegen den Ethylsubstituenten eine Zunahme des IC_{50} -Wertes um den Faktor 6 festzustellen, der auch bei der Wachstumsinhibition der *P. falciparum*-Laborstämme auftritt. Die Aktivitätsminderung von **28** könnte durch eine Beeinflussung der Metallkoordinierung durch den Ethylrest bedingt sein. Der Aktivitätsunterschied zwischen der freien Hydroxamsäure **26a** und dem *N*-Methyl-Derivat **27a** ist gegenüber der *PfDxr* noch deutlich stärker ausgeprägt und zeigt sich im Zellkulturassay am vollständigen Wirkungsverlust der Verbindung **26a**. Möglicherweise ist die im Vergleich zu **27a** und **28** viel geringere Aktivität von **26a** neben einer unterschiedlichen Wechselwirkung mit der *PfDxr* auch auf eine geringere Stabilität der freien Hydroxamsäurefunktionalität im *in vitro*-Experiment zurückzuführen.* Die Aktivität der freien Hydroxamsäurederivate könnte deshalb – besonders unter den Bedingungen der Zellkulturassays – zum Beispiel durch eine Hydrolyse der Hydroxamsäurefunktionalität vermindert werden.

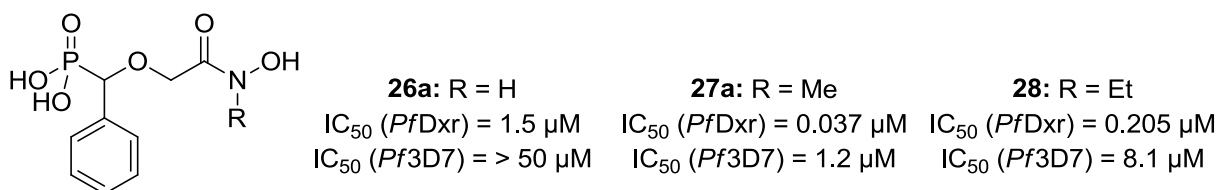


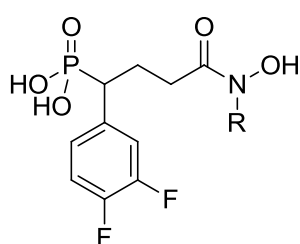
Abb. 72: Vergleich der unterschiedlich *N*-substituierten Hydroxamsäuren **26a**, **27a** und **28**.

Verbindung **27a** inhibiert wie auch die anderen Vertreter aus dieser Gruppe isolierte *PfDxr* verglichen mit der Referenzsubstanz Fosmidomycin deutlich stärker. Die *P. falciparum*-Wachstumsinhibition durch **27a** (0,7–1,2 μ M) und Fosmidomycin (0,8–0,9 μ M) ist dagegen vergleichbar. Die Wirksamkeit des effektiveren *PfDxr*-Inhibitors **27a** wird im Zellkulturassay möglicherweise dadurch abgeschwächt, dass nur ein geringer Anteil der Verbindung zum Wirkort gelangt. Bei Fosmidomycin könnte das gegenüber der *PfDxr* festgestellte Aktivitätsdefizit im Vergleich zu **27a** durch einen effektiveren

* Diese Vermutung wird aufgrund der beobachteten Zersetzung der freien Hydroxamsäurefunktionalität bei der Synthese und Derivatisierung von Verbindung **26e** getroffen und durch die Tatsache unterstützt, dass die Synthese der analogen, *N*-methylierten Verbindung **27g** und deren Prodrugs ohne derartige Probleme verlief (siehe auch Abschnitt 4.3.1).

Transport in den Apikoplasten kompensiert werden. Wie in Abschnitt 1.3 erwähnt, erfolgt die Aufnahme von Fosmidomycin in Plasmodien-infizierte Erythrozyten über parasitär induzierte Transportwege, die für das Analogon **27a** aufgrund der Strukturmodifikation schlechter zugänglich sein könnten. Bisher ist jedoch nicht bekannt, wie bei Fosmidomycin die Passage der weiteren, auf dem Weg zum Zielenzym zu überwindenden Membranen erfolgt. Daher können die Aufnahmewege verschiedener *PfDxr*-Inhibitoren in den Apikoplasten nicht miteinander verglichen oder zur Interpretation von Aktivitätsunterschieden herangezogen werden.

Aufgrund der oben dargestellten Aktivitätsabstufungen wurde die *N*-methylierte Hydroxamsäurefunktionalität bei der nachfolgenden Variation des α -Substituenten beibehalten und Verbindung **27a** als neue Leitstruktur ausgewählt. Da inzwischen jedoch das im Vergleich zu **XLVc** bessere *in vivo*-Potenzial der von *Behrendt* synthetisierten freien Hydroxamsäure **XLVIc** (Abb. 73) bekannt war,²¹⁸ wurden exemplarisch die aromatisch α -substituierten, freien Hydroxamsäuren **26b-e** synthetisiert, um durch Variation des α -Arylsubstituenten eventuell noch eine Aktivitätssteigerung gegenüber **26a** zu erreichen. Enzymhemmung und Wachstumsinhibition konnten hierdurch allerdings nicht verbessert werden.*



XLVc: R = Me
 IC_{50} (*PfDxr*) = 3.4 nM
 IC_{50} (*PfK1*) = 0.29 μ M

XLVIc: R = H
 IC_{50} (*PfDxr*) = 3.9 nM
 IC_{50} (*PfK1*) = 0.38 μ M

Abb. 73: Antiplasmodial aktivste *PfDxr*-Inhibitoren, synthetisiert von *Behrendt*, 2011.⁴⁰⁵

Überlegungen und Versuche zur Strukturufklärung des *PfDxr*-Komplexes mit *N*-methylierten, β -oxa-isosteren Fosmidomycin-Analoga

Die ausgeprägte Aktivität *N*-methylierter Phosphonohydroxamsäuren könnte analog den Folgerungen von *Umeda et al.* interpretiert werden, die in den in Abschnitt 1.4 vorgestellten Kristallstrukturen die unterschiedlichen Bindungsmodi von Fosmidomycin und dessen *N*-Methyl-Derivat FR900098 verglichen.¹⁸⁴ So könnte der *N*-Methylrest durch zusätzliche hydrophobe Wechselwirkungen im aktiven *PfDxr*-Zentrum und eine bessere Stabilisierung der Hydroxamsäure-*Z*-Konformation die Affinität zum Enzym erhöhen. Ähnlich wie bei dem α -arylsubstituierten, inversen Fosmidomycin-Analogon **XLVc** (Abb. 73), dessen Bindungsmodus an die *EcDxr* von *Behrendt et al.* aufgeklärt wurde (siehe Abschnitt 1.6.3), könnten auch bei den strukturell verwandten oxa-isosteren Inhibitoren

* Wie sich auch in den *Ec*- und *MtDxr*-Assays zeigt, besitzt die Verbindung **26e** innerhalb dieser Substanzklasse gegenüber *PfDxr* die geringste Aktivität, während ansonsten keine eindeutige Aktivitätsreihenfolge vorherrscht. Vermutlich ist die Ursache in der geringeren Reinheit dieser Substanz im Vergleich zu **26a-d** zu sehen.

aus dieser Arbeit intramolekulare Wechselwirkungen zwischen *N*-Methyl- und α -Arylsubstituent zur Stabilisierung des Enzym-Inhibitor-Komplexes beitragen. Dabei ist ebenfalls eine Übertragbarkeit des *Ec*Dxr-Bindungsmodus auf den *Pf*Dxr-Inhibitor-Komplex anzunehmen.

Die durch die Arbeitsgruppe von Michael Groll an der Technischen Universität München durchgeführten Versuche zur Kokristallisation des Fosmidomycin-Analogons **27g** mit *Pf*Dxr führten allerdings nicht zur Strukturaufklärung des Enzym-Inhibitor-Komplexes. Eine Röntgenkristallstrukturanalyse der aus *Pf*Dxr, **27g** und Mn^{2+} -Ionen erhaltenen Kristalle war nicht unterhalb einer Auflösung von 3,0 Å möglich. Als Strukturelement des Inhibitors ist lediglich die Phosphonatgruppe zu erkennen, die anders als bei Fosmidomycin hier von den Aminosäureresten Ser270, Ser360 und Lys312 koordiniert wird. Das ebenfalls im Enzymkomplex enthaltene Mg^{2+} -Ion wird wie im quaternären *Pf*Dxr-Fosmidomycin-Komplex (siehe Abschnitt 1.4) durch die Reste Asp231, Glu233 und Glu315 koordiniert, während der Kofaktor NADPH fehlt. Der größte Bereich der *Pf*Dxr-Schleifenregion (Lys292–Lys297) zeigt keine definierte Elektronendichte.

Fosmidomycin-Analoga mit aliphatischen Substituenten in α -Position

Beim Vergleich der aromatisch (**27a-h**) und aliphatisch (**27i-k**) substituierten Fosmidomycin-Analoga zeigt sich das geringere inhibitorische Potenzial der aliphatischen Derivate **27i-k** (Tabelle 6). Die fehlende Aktivität des *tert*-butylsubstituierten Oxa-Analogons **27k** ist sehr wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass der voluminöse Alkylrest die Bindung des Moleküls an das katalytische Zentrum der *Pf*Dxr verhindert. Verbindung **27j** trägt einen im Vergleich zu **27k** sterisch etwas weniger anspruchsvollen Alkylsubstituenten mit elektronenziehenden Eigenschaften, der sich auf die enzymhemmende und antiplasmodiale *in vitro*-Aktivität deutlich günstiger auswirkt. Das α -Trifluormethyl-Derivat **27i** (Abb. 74) zeigt unter den aliphatischen Analoga die stärkste Inhibitionswirkung. Während **27i** die *Pf*Dxr schwächer inhibiert als die aromatischen *N*-methylierten Analoga **27a-h**, ist die antiplasmodiale *in vitro*-Wirkung teilweise ähnlich oder besser (z. B. im Vergleich zu **27a** und **f**).

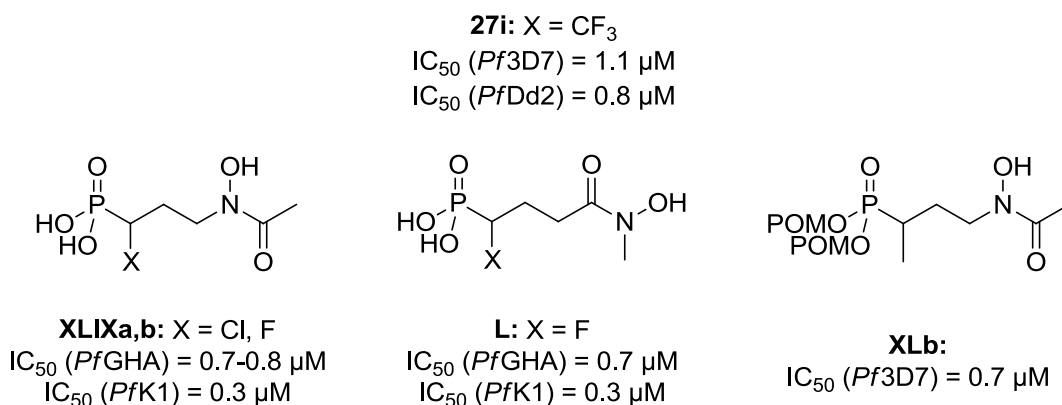


Abb. 74: Aliphatische und halogensubstituierte Fosmidomycin-Analoga.^{239,258}

Der relativ kleine Trifluormethylsubstituent von **27i** scheint die Bindung des Inhibitors an die *PfDxr* sterisch nicht zu behindern. Die Kombination dieses lipophilen, elektronenziehenden Substituenten mit dem inversen, *N*-methylierten Hydroxamsäure-Pharmakophor bringt allerdings keine Wirkungssteigerung im Vergleich zu Fosmidomycin oder den aromatischen, oxa-isosteren Analoga. Die Wachstumsinhibition des *P.f.*3D7-Stamms durch **27i** ist mit einem IC_{50} -Wert von ca. 1 μ M etwas schwächer als die antiplasmodiale Aktivität des von *Kurz et al.* entwickelten α -Methyl-Analogons **XLb**, das ebenfalls gegenüber dem Stamm 3D7 evaluiert wurde (**Abb. 74**).²³⁹ Für die von *Van Calenbergh und Mitarbeitern* synthetisierten α -halogenierten Fosmidomycin-Analoga **XLIX** und **L**, deren gutes *in vitro*- und *in vivo*-Potenzial unter anderem die Motivation zur Synthese von **27i** und **k** darstellte, liegen gegenüber *P.f.*3D7 keine IC_{50} -Werte vor.²⁵⁸ **XLIX** und **L** wurden auf ihre Aktivität gegenüber anderen Chloroquin-sensitiven (*P.f.*GHA) und Chloroquin- bzw. multiresistenten (*P.f.*K1) *P. falciparum*-Stämmen getestet. Obwohl schon die eigenen Ergebnisse zeigen, dass *in vitro*-Daten gegenüber verschiedenen *P. falciparum*-Stämmen nicht direkt vergleichbar sind, lässt sich die Gegenüberstellung der IC_{50} -Werte in **Abb. 74** doch entnehmen, dass die antiplasmodialen Aktivitäten von **27i**, **XLIX** und **L** in derselben Größenordnung liegen.*

Vergleich *N*-methylierter Fosmidomycin-Analoga mit aromatischen Substituenten in α -Position

Durch Gegenüberstellung der Fosmidomycin-Analoga **27a-h** können einige Struktur-Wirkungsbeziehungen für die aromatische Molekülregion aufgezeigt werden. Die Inhibitionswerte aus dem *PfDxr*-Assay korrelieren in den meisten Fällen gut mit den antiplasmodialen *in vitro*-Aktivitäten, insbesondere gegenüber dem *P. falciparum*-Stamm Dd2 (**Abb. 71** links). Gegenüber dem Chloroquin-sensitiven 3D7-Stamm liegen die IC_{50} -Werte meist um den Faktor 1,5–2 höher als gegenüber dem multiresistenten Dd2-Stamm.

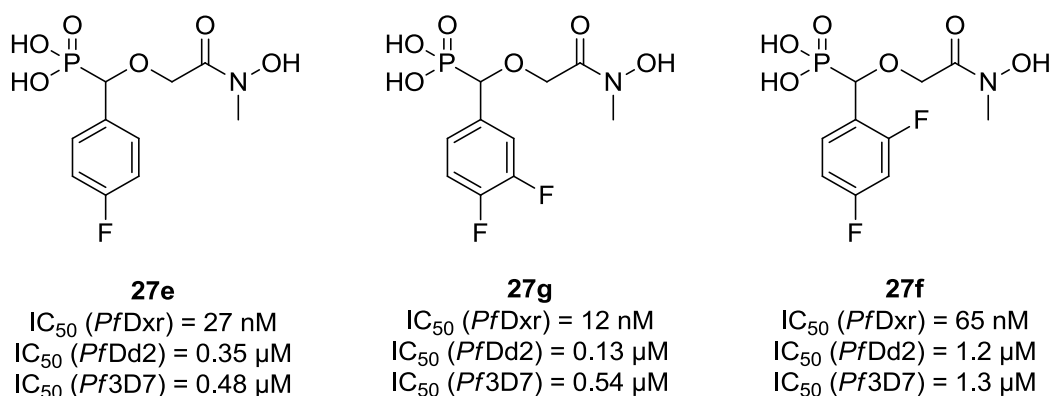


Abb. 75: Vergleich der fluorierten aromatischen Fosmidomycin-Analoga **27e-g**.

* Bei *in vitro*-Assays verwendeten die meisten in diesem Kapitel zitierten Autoren (Ausnahme: *Behrendt et al.*) andere Auswertungsmethoden, so dass auch die Vergleichbarkeit von IC_{50} -Werten gegenüber demselben Erregerstamm meist eingeschränkt ist.

Die 3,4-dihalogenphenylsubstituierten Verbindungen **27g** und **h** sind die inhibitorisch aktivsten Vertreter unter den aromatischen, oxasteren Fosmidomycin-Analoga. 3,4-Difluor- und 3,4-Dichlorsubstitution des Phenylrests sind im gleichen Maß aktivitätssteigernd. Der Vergleich der drei fluorierten Fosmidomycin-Analoga **27e-g** zeigt, dass der elektronenziehende Einfluss der Halogene die inhibitorische Aktivität im Vergleich zu **27a** steigern kann, dass sich eine ungünstige räumliche Anordnung der Substituenten jedoch nachteilig auswirkt (**Abb. 75**): Während die monofluorphenylsubstituierte Phosphonohydroxamsäure **27e** nur eine etwas schwächere Enzym- und Wachstumsinhibition zeigt als das 3,4-difluorphenylsubstituierte Analogon **27g**, ist die Aktivitätsminderung durch die Verschiebung des *meta*-Fluorsubstituenten in die *ortho*-Position des Aromaten bei **27f** bezogen auf **27g** viel höher.

Die gute enzymhemmende und antiplasmodiale Aktivität des *para*-tolylsubstituierten Analogons **27d** (**Abb. 76**) lässt vermuten, dass elektronische Effekte eher einen untergeordneten Beitrag zur Enzyminhibition der aromatischen Analoga leisten, da sowohl elektronenschiebende als auch -ziehende α -Arylsubstituenten die Aktivität im Vergleich zur Leitstruktur **27a** steigern können. Das zeigt sich an der vergleichbaren Enzymhemmung durch **27d** und **27e** sowie an der besseren *P. falciparum*-Wachstumsinhibition durch **27d** im Vergleich zu **27e** (**Abb. 75** und **Abb. 76**).

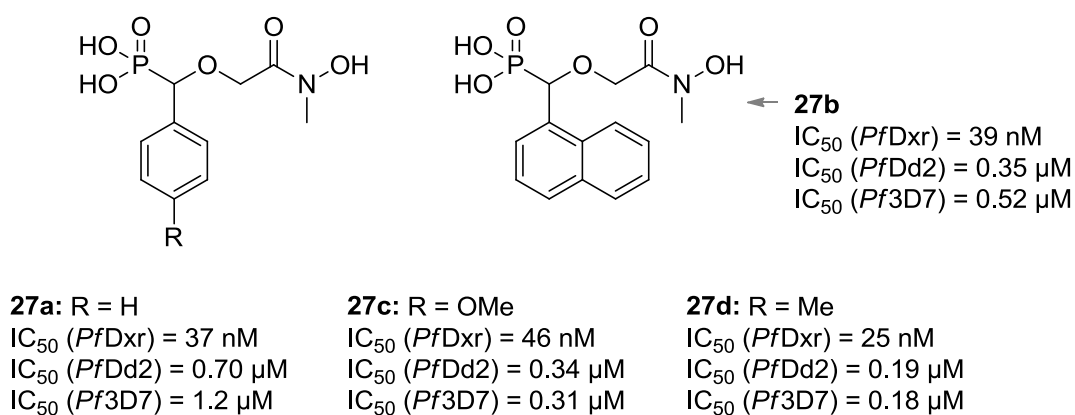


Abb. 76: Vergleich der Leitstruktur **27a** mit den Analoga **27b-d**.

Eine *para*-Methoxysubstitution des Phenylkerns (**27c**) wirkt sich im Vergleich zur *para*-Methylsubstitution (**27d**) etwas ungünstiger auf die *PfDxr*-Inhibition und *P. falciparum*-Wachstumshemmung aus.

Vergleicht man das α -naphthylsubstituierte Analogon **27b** mit der die α -phenylsubstituierten Verbindung **27a**, ist eine vergleichbare Enzymhemmung sowie eine bessere antiplasmodiale Aktivität des Derivats **27b** festzustellen (**Abb. 76**). Das aktive Zentrum der *PfDxr* toleriert demnach auch größere Arylsubstituenten, die im Erythrozytenassay durch ihre höhere Lipophilie günstiger als Phenylsubstituenten sein könnten.

Vergleich der oxa-isosteren Fosmidomycin-Analoga mit „carba-analogen“ Derivaten

Durch die Arbeiten von *Behrendt et al.* stehen für einige der aromatischen oxasteren Fosmidomycin-Analoga (**26a,c,e**, **27a,b,d,g,h** und **28**) die Vergleichsdaten von direkten β -„Carba-Analoga“ zur Verfügung (**XLV**, **XLVI**, siehe Abschnitt 1.6.3)*. Beim Vergleich der *PfDxr*-Inhibitoren fällt auf, dass die Carba-Derivate stärker inhibierend wirken und der Aktivitätsunterschied zwischen freien (**XLVI**) und *N*-methylierten (**XLV**) Hydroxamsäuren wesentlich geringer ausfällt als bei den Oxa-Analoga (**Abb. 77**). Bei optimaler Aromatensubstitution der Carba-Analoga ist dieser Unterschied sogar kaum noch messbar (**XLVc** und **XLVIc**, **Abb. 73**), während er bei den Oxa-Analoga über die antiplasmodiale Aktivität oder Inaktivität entscheidet (**27a-h**: $IC_{50} \leq 1 \mu M$, **26a-e**: $IC_{50} > 50 \mu M$).

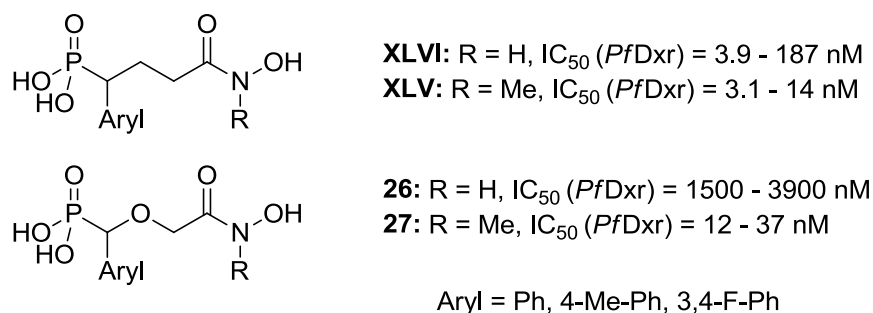


Abb. 77: Vergleich der *PfDxr*-Inhibitoren ausgewählter oxasterer, α -arylsubstituierter Fosmidomycin-Analoga mit entsprechenden „Carba-Analoga“, synthetisiert von *Behrendt*, **2010/2011**.^{217,218,405}

Wie an früherer Stelle schon diskutiert wurde, könnte die niedrige Aktivität von **26a-e** unter anderem durch die Instabilität der freien Hydroxamsäurefunktionalität bedingt sein. Dieses Problem scheint bei den carba-analogen, freien Hydroxamsäuren **XLVI** nicht aufzutreten, möglicherweise aufgrund der Abwesenheit des elektronegativen Heteroatoms in β -Position des Propyl-Spacers.

Auch die durch Einführung dieses Sauerstoffatoms gebildete *P,O*-Acetalstruktur könnte für eine geringere Stabilität und damit Aktivität der oxa-isosteren Analoga im Vergleich zu den Carba-Analoga verantwortlich sein. Bisher wurde in der Literatur allerdings nicht über die Hydrolyse, sondern nur über Substitutionsreaktionen von *P,O*-Acetalen mit stärkeren Nukleophilen als Wasser berichtet.⁴¹⁰ Da die Acetalstruktur den eigenen Beobachtungen nach unter verschiedenen Synthesebedingungen stabil ist, scheint eine ungenügende Stabilität unter physiologischen Bedingungen eher unwahrscheinlich.

Insgesamt lässt sich an dieser Gegenüberstellung erkennen, dass der Austausch der β -Methylengruppe gegen ein Sauerstoffatom trotz der durch diese Strukturmodifikation erwartete höhere Acidität der Phosphonsäurefunktionalität bei den inversen Fosmidomycin-Analoga eine Reduktion der Aktivität mit sich bringt. Zwei Gründe sind dafür – im Zusammenspiel oder unabhängig voneinander – anzunehmen:

* In der Dissertation von *Behrendt* (**2011**) werden auch die *para*-tolylsubstituierten Derivate **XLVe** (IC_{50} (*PfDxr*) = 14 nM, IC_{50} (*P.f.K1*) = 0,14 μM) und **XLVIId** (IC_{50} (*PfDxr*) = 187 nM, IC_{50} (*P.f.K1*) = 5,7 μM) beschrieben, bei denen es sich um „Carba-Analoga“ der *para*-tolylsubstituierten Oxa-Analoga **27d** und **26c** handelt.⁴⁰⁵

Einerseits könnte die zwischen dem β -Sauerstoffatom und dem Enzym vorausgesagte Wasserstoffbrückenbindung nicht gebildet werden, andererseits könnte durch die Modifikation des Spacers die Bindung der Pharmakophore im katalytischen *Pf*Dxr-Zentrum verändert werden.

Gemäß dem Zusammenhang zwischen der Änderung der freien Enthalpie ΔG und der Gleichgewichts- bzw. Inhibitionskonstante K_i einer enzymatischen Umsetzung*

$$\Delta G = RT \ln K_i = -2,3 RT \log K_i$$

lassen sich die Auswirkungen von Strukturmodifikationen der Fosmidomycin-Analoga auf die *Pf*Dxr-Bindungsaffinität quantitativ vergleichen. Der IC_{50} -Wert eines Enzyminhibitors entspricht zwar nur bei einem nichtkompetitiven Inhibitionsmodus dem K_i -Wert, ist bei einem für die betrachteten Inhibitoren angenommenen, kompetitivem Inhibitionsmodus[†] jedoch über die Cheng-Prusoff-Gleichung[‡] mit dem K_i -Wert korreliert.⁴¹¹ Aus der Beziehung

$$\begin{aligned} \Delta(\Delta G) &= \Delta G_A - \Delta G_B = -2,3 RT (\log K_{i,A} - \log K_{i,B}) = -2,3 RT \log (K_{i,A}/K_{i,B}) \\ &\approx -2,3 RT \log [IC_{50}(A) / IC_{50}(B)] \end{aligned}$$

folgt, dass sich der logarithmierte Quotient der IC_{50} -Werte zweier Inhibitoren A und B proportional zur Änderung der freien Bindungsenthalpie $\Delta(\Delta G)$ verhält, die durch den Strukturunterschied zwischen A und B hervorgerufen wird.

Das in **Abb. 78** links abgebildete Diagramm verdeutlicht den Einfluss des CH_2/O -Austauschs in β -Position auf die Änderung der freien Bindungsenthalpie ΔG .

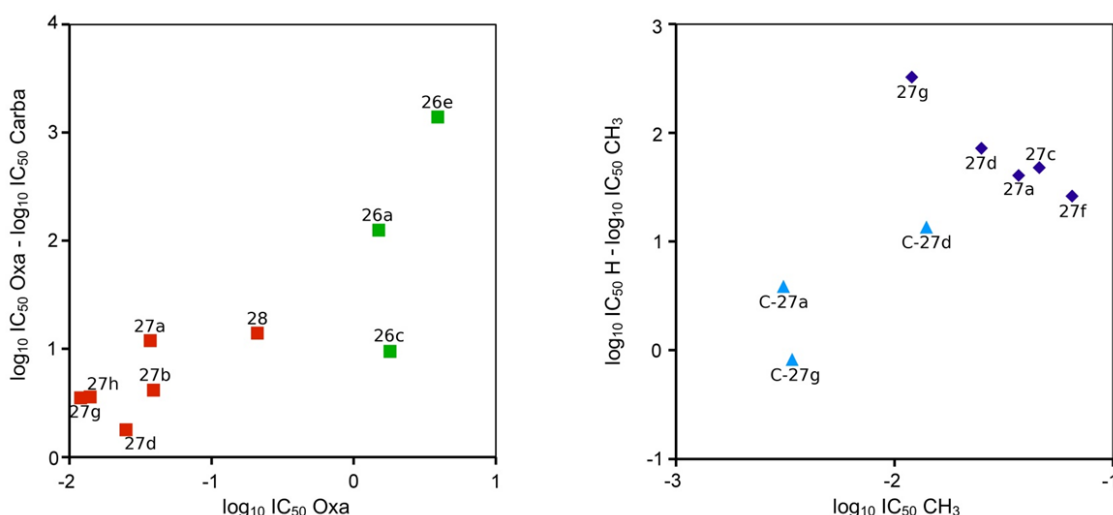


Abb. 78: Links: Einfluss des Carba-Oxa-Austauschs in β -Position des Propyl-Spacers (rot: *N*-methylierte Hydroxamsäuren, grün: freie Hydroxamsäuren). Rechts: Einfluss der *N*-Methylsubstitution (hellblau: Carba-, dunkelblau: Oxa-Analoga). **C-27a** = carba-27a (**XLVa**), **C-27d** = carba-27d (**XLVe**), **C-27g** = carba-27g (**XLVc**) (Grafik: T. Gräwert, Universität Hamburg).

* mit $R = 8,315 \text{ J/(mol}\cdot\text{K)}$ und T = Temperatur in Kelvin.

† Ein kompetitiver Inhibitionsmodus wird aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der Oxa-Analoga zu dem Carba-Analogen **XLVa** angenommen, für das experimentell ein kompetitiver Inhibitionsmodus bestimmt wurde.²¹⁷

‡ $K_i = IC_{50} / (1 + [S]/K_m)$ mit $[S]$ = Substratkonzentration und $K_m = [S]$ bei halbmaximaler Enzymaktivität.

Die Auftragung von $\Delta(\Delta G) = \log [IC_{50}(\text{oxa}) / IC_{50}(\text{carba})]$ gegen den logarithmierten IC_{50} -Wert des jeweiligen Oxa-Derivats zeigt, dass sich diese Strukturmodifikation bei den schwächeren *Pf*Dxr-Inhibitoren der Gruppe **26** im Durchschnitt stärker auswirkt als bei den stärkeren Inhibitoren der Gruppe **27**.

Die Auftragung von $\Delta(\Delta G) = \log [IC_{50}(\text{NCH}_3) / IC_{50}(\text{NH})]$ im Diagramm **Abb. 78** rechts zeigt, dass der Austausch der freien gegen eine *N*-methylierte Hydroxamsäurefunktionalität bei den Carba-Analoga einen geringeren Aktivitätsunterschied bewirkt als bei den Oxa-Analoga: Die IC_{50} -Quotienten der Carba-Analoga liegen nahe 1, während der Mittelwert der IC_{50} -Quotienten bei den Oxa-Analoga zwischen 0,1 und 0,01 liegt. Dies entspricht einem Enthalpiegewinn um den Faktor 10–100 durch die *N*-Methylierung der Hydroxamsäurefunktionalität der Oxa-Analoga, der in dieser Größe bei den Carba-Analoga nicht gefunden wird. Ein einfacher Zusammenhang zwischen *N*-Methylierung und β -Oxa-Modifikation besteht allerdings nicht.

Vergleich der Leitstruktur **27a** mit α -unsubstituierten, oxa-isosteren Fosmidomycin-Analoga

Für eine direkte Gegenüberstellung der Enzyminhibition von **27a** mit dem oxasteren Fosmidomycin-Analogen **LIIb** von *Haemers et al.* (**Abb. 79**) liegen keine Daten vor, da **LIIb** nicht gegenüber der *Pf*Dxr getestet wurde.²⁵⁹ Der Vergleich der *P.f*3D7-Wachstumsinhibition erfolgt unter dem Vorbehalt, dass die IC_{50} -Werte von **27a** und **LIIb** mittels unterschiedlicher Auswertungsmethoden bestimmt wurden.*

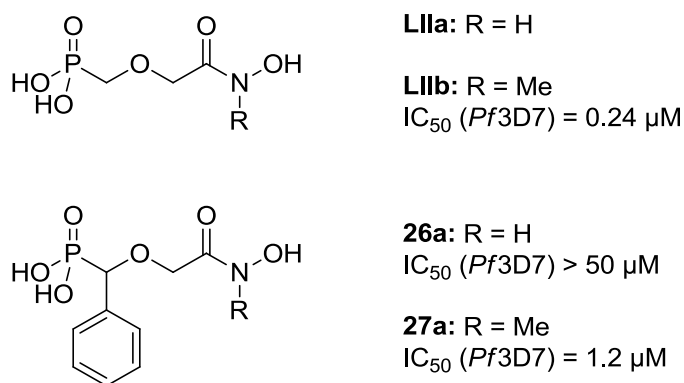


Abb. 79: Oxa-isostere, in α -Position substituierte und unsubstituierte inverse Fosmidomycin-Analoga.

LIIb besitzt gegenüber dem 3D7-Stamm einen niedrigeren IC_{50} -Wert als **27a**, woraus ein aktivitätsmindernder Einfluss des Phenylsubstituenten bei inversen β -Oxa-Analoga abgeleitet werden könnte. Möglicherweise kann **LIIb** ähnlich wie Fosmidomycin einen oder mehrere Transportwege zum Wirkort nutzen, die für das größere und lipophilere Molekül **27a** nicht zugänglich sind. Die

* Die *in vitro*-Untersuchung der *P. falciparum*-Wachstumsinhibition durch **LIIa** und **b** erfolgte anders als in dieser Arbeit über die Methode des [^3H]Hypoxanthin-Einbaus mit anschließender Radioaktivitätsmessung.^{259,412}

inhibitorische Aktivität der freien Hydroxamsäuren **LIIa** und **26a** gegenüber *P. falciparum* 3D7 lässt sich nicht vergleichen, da die antiplasmodiale Aktivität von **LIIa** nicht untersucht wurde.

Wie bereits diskutiert wurde, liegen die IC_{50} -Werte der Phosphonohydroxamsäuren im Zellkulturassay deutlich höher als im Enzymassay. Für die beiden stärksten Dxr-Inhibitoren **27g** und **h** sollten daher zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit lipophile Prodrugs synthetisiert und gegenüber den beiden *P. falciparum*-Laborstämmen evaluiert werden. Diese Arbeiten sind Gegenstand von Kapitel 4.

Zusammenfassung: *PfDxr*-hemmende und antiplasmodiale Aktivität der Fosmidomycin-Analoga

Unter den in dieser Arbeit synthetisierten, oxa-isosteren Fosmidomycin-Analoga sind mehrere Inhibitoren, die sowohl auf die plasmodiale DOXP-Reduktoisomerase (*PfDxr*) als auch auf verschiedene *P. falciparum*-Stämme *in vitro* eine stärkere funktions- bzw. wachstumsinhibierende Wirkung ausüben als Fosmidomycin. Diese Inhibitoren besitzen als gemeinsames Strukturmerkmal einen α -Arylsubstituenten sowie eine inverse, *N*-methylierte Hydroxamsäurefunktionalität. Durch geeignete Substitution des Phenylsubstituenten, insbesondere eine 3,4-Dihalogensubstitution bei den Analoga **27g** und **h**, konnte die enzymhemmende und *P. falciparum*-wachstumsinhibierende Aktivität des als Leitstruktur gewählten Fosmidomycin-Analogons **27a** deutlich gesteigert werden (**Abb. 80**).

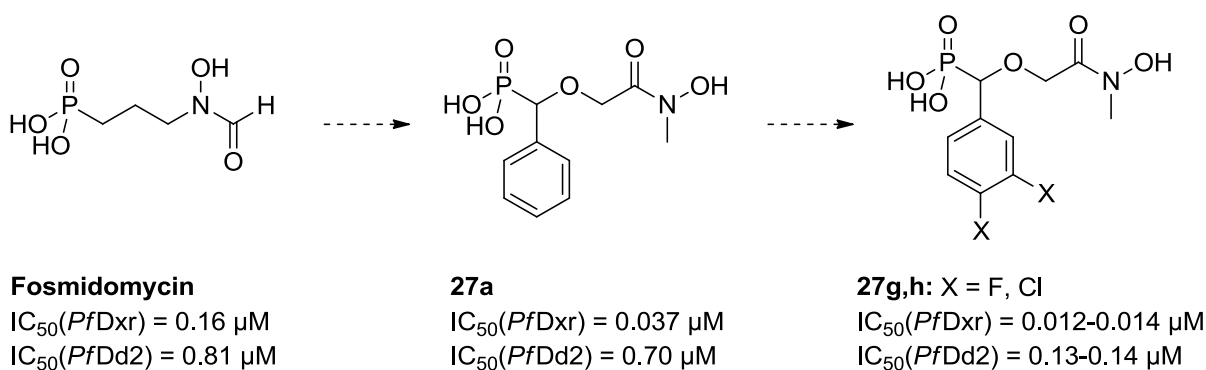


Abb. 80: Entwicklung oxa-isosterer Fosmidomycin-Analoga mit verbesserter inhibitorischer *in vitro*-Aktivität gegenüber rekombinanter *PfDxr* und dem *P. falciparum*-Stamm Dd2.

3.4.2 *EcDxr*-Inhibition

Die IC_{50} -Werte der inversen, oxa-isosteren Fosmidomycin-Analoga **26–28** gegenüber der *EcDxr* liegen durchschnittlich um eine Zehnerpotenz höher als gegenüber der *PfDxr*. Auch hier zeigen die freien Hydroxamsäuren **26a–e** eine geringere inhibitorische Aktivität als die *N*-methylierten Analoga **27a–j** (**Tabelle 6**). Das *N*-ethylierte Derivat **28** inhibiert, anders bei der *PfDxr* beobachtet (**Abb. 72**), die *EcDxr* schwächer als das freie Hydroxamsäure-Derivat **26a** (**Abb. 81**).

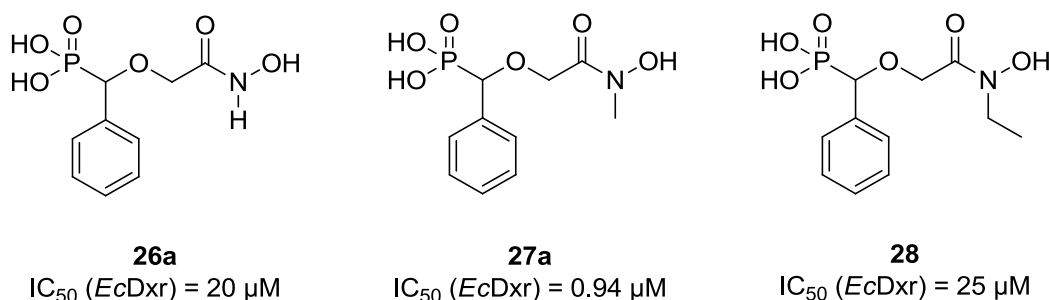


Abb. 81: Einfluss der *N*-Substitution auf die *EcDxr*-Inhibition.

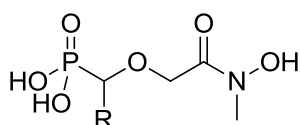
Bei den *N*-methylierten oxasteren Fosmidomycin-Analoga **27c–h** (IC_{50} = 0,16–0,73 μ M), die als gemeinsames Strukturelement einen substituierten Phenylrest in α -Position besitzen, entspricht die Aktivitätsabstufung gegenüber der *EcDxr* im Wesentlichen derjenigen gegenüber der *PfDxr*. Die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen für diesen Molekülbereich sind demzufolge übertragbar. Allerdings zeigt die Leitstruktur **27a** mit 0,94 μ M eine schwächere *EcDxr*-Inhibition als die Derivate mit substituierten Phenylresten. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die in **27c–h** jeweils enthaltenen *meta*- und/oder *para*-Substituenten bindende Wechselwirkungen mit der *EcDxr* eingehen können, die bei **27a** nicht möglich sind. Die Vergrößerung des Arylsubstituenten von Phenyl (**27a**) zu Naphthyl (**27b**) bewirkt anders als im *PfDxr*-Assay gegenüber der *EcDxr* einen deutlichen Aktivitätsverlust, wie auch die Aktivitätsunterschiede der Carba-Analoga **XLVa/b** und **XLVIa/b** gegenüber der *EcDxr* bereits gezeigt hatten (siehe Abschnitt 1.6.3).

Gegenüber der *EcDxr* zeigen die aliphatisch substituierten Verbindungen **27i–k** die gleiche Aktivitätsreihenfolge wie gegenüber der *PfDxr*. Es fällt jedoch auf, dass das α -Trifluormethyl-Derivat **27i** zusammen mit den aromatischen Analoga **27e** und **h** zu den besten drei *EcDxr*-Inhibitoren gehört. **27j** inhibiert das Enzym ähnlich effektiv wie **27b** und deutlich stärker als das *N*-Ethyl-Derivat **28**. Selbst das gegenüber der *PfDxr* inaktive *tert*-Butyl-Derivat **27k** zeigt mit 22 μ M noch eine moderate Aktivität gegenüber der *EcDxr* und liegt damit im Bereich der freien Hydroxamsäuren **26a–e**.

Aus den vorliegenden Ergebnissen lässt sich ableiten, dass sich die Unterschiede im Aufbau der katalytischen Dxr-Zentren von *P. falciparum* und *E. coli* auf die Wirksamkeit Fosmidomycins und des kleinen oxa-isosteren Analogons **27i** kaum auswirken, bei Fosmidomycin-Analoga mit sterisch anspruchsvollen α -Alkyl- und -Arylsubstituenten jedoch zu starken Aktivitätsunterschieden führen. Während eine aromatische α -Substitution in Kombination mit einer *N*-methylierten, inversen

Hydroxamsäurefunktionalität gegenüber der *PfDxr* eine deutliche Aktivitätssteigerung im Vergleich zu Fosmidomycin bringt, ist dies gegenüber der *EcDxr* nicht der Fall. Mit Ausnahme von **27i** ist eine direkte Vorhersage der antiplasmodialen Aktivität der oxa-isosteren Fosmidomycin-Analoga **26-28** auf Basis der *EcDxr*-Inhibition nicht möglich.

Der Vergleich der *EcDxr*-Inhibition durch die inversen, oxa-isosteren Fosmidomycin-Analoga **27a** und **LIIb** (Abb. 82) führt zu der Annahme, dass der α -Phenylsubstituent von **27a** für dessen geringere Aktivität gegenüber der *EcDxr* verantwortlich ist. Die *E. coli*-Dxr bietet in der Fosmidomycin-Binderegion vermutlich weniger Raum für Spacer-Substituenten als die plasmodiale Dxr.

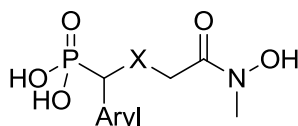


LIIb: R = H; IC_{50} (*EcDxr*) = 0.072 μ M

27a: R = Ph; IC_{50} (*EcDxr*) = 0.94 μ M

Abb. 82: Vergleich der *EcDxr*-Inhibition durch **LIIb** und **27a**.

Im Vergleich zu den α -arylsubstituierten, carba-analogen Derivaten des Strukturtyps **XLV** liegen die IC_{50} -Werte der oxa-isosteren Fosmidomycin-Analoga **27** gegenüber der *EcDxr* etwas höher, aber ebenfalls im Bereich von 0,1–1 μ M. (Abb. 83).



XLV: X = C, IC_{50} (*EcDxr*) = 0.12 - 0.29 μ M

27: X = O, IC_{50} (*EcDxr*) = 0.24 - 0.94 μ M

Aryl = Ph, 4-Me-Ph, 3,4-F-Ph

Abb. 83: Vergleich der *EcDxr*-Inhibition ausgewählter oxasterer, α -arylsubstituierter Fosmidomycin-Analoga mit entsprechenden „Carba-Analoga“, synthetisiert von Behrendt, 2010/2011.^{217,218,405}

Für das zu dem arylsubstituierten Analogon **27g** (IC_{50} (*EcDxr*) = 0,24 μ M) „carba-analoge“ Derivat **XLVc** (IC_{50} (*EcDxr*) = 0,12 μ M) ist bekannt, dass die Bindung an die *EcDxr* wegen des α -Arylsubstituenten nur in der offenen Enzymkonformation erfolgen kann und wahrscheinlich durch intramolekulare Wechselwirkungen innerhalb des Inhibitors stabilisiert wird (siehe Abschnitt 1.6.3). Da der Platzbedarf der Arylsubstituenten von **27a** und **27c-h** mit dem von **XLVc** vergleichbar ist, sollten diese Analoga ebenfalls in einer offenen Enzymkonformation binden (siehe auch Abschnitt 1.6.3). Die Bindung könnte durch die bereits angesprochenen, potenziellen Wechselwirkungen der aromatischen Substituenten von **27c-h** mit dem Enzym im Vergleich zur Bindung von **27a** stabilisiert werden.

Wie in Abschnitt 1.4 beschrieben und durch Kristallstrukturanalysen bewiesen wurde, nimmt die *EcDxr* bei der Bindung von Fosmidomycin (IC_{50} (*EcDxr*) = 0,12 μ M) im Gegensatz zu **XLVc** eine geschlossene Enzymkonformation ein. Das trifluormethylsubstituierte, oxa-isostere Fosmidomycin-Analogon **27i** (IC_{50} (*EcDxr*) = 0,16 μ M), welches unter den hier vorgestellten Fosmidomycin-Analoga den kleinsten Substituenten in α -Position besitzt, könnte ebenfalls in einer geschlossenen Konformation binden, was den im Vergleich zu mehreren aromatischen Analoga niedrigeren IC_{50} -Wert erklären könnte.

Die Verbindungen **26a**, **27a**, **28** und **27g** sowie zwei Prodrugs von **27g** (**35a** und **39**, siehe Abschnitt 4.3) wurden im Institut für Pharmazeutische Biologie der Heinrich-Heine-Universität auf ihre antibakterielle Aktivität gegenüber verschiedenen *E. coli*-Stämmen untersucht. Bei keinem Fosmidomycin-Analogon wurde unterhalb einer minimalen Hemmkonzentration von 64 μ g/mL eine *E. coli*-Wachstumshemmung festgestellt.

3.4.3 *MtDxr*-Inhibition

Die IC_{50} -Werte der oxasteren Fosmidomycin-Analoga **26-28** gegenüber rekombinanter *MtDxr* liegen im ein- bis dreistelligen mikromolaren Konzentrationsbereich und damit um zwei Zehnerpotenzen höher als gegenüber der *PfDxr* (Tabelle 6, S 99). Dagegen wurde für Fosmidomycin gegenüber der *MtDxr* (0,23 μ M) im Vergleich zu *PfDxr* (0,16 μ M) und *EcDxr* (0,12 μ M) ein nur leicht erhöhter IC_{50} -Wert bestimmt.* Unter den oxasteren, inversen Fosmidomycin-Analoga zeigt der Vertreter mit dem kleinsten Substituenten, das α -trifluormethylierte Derivat **27i**, den geringsten relativen Aktivitätsunterschied gegenüber *PfDxr* und *MtDxr*. Ähnlich wie bei der Diskussion der *EcDxr*-Inhibition festgestellt wurde, weisen auch die katalytischen Zentren der plasmodialen und mykobakteriellen Dxr-Enzyme trotz hoher Konservierung der Aminosäurereste genügend Unterschiede auf, dass sterisch anspruchsvollere Modifikationen des Propyl-Spacers größere Unterschiede in die Hemmung der verschiedenen Dxr-Homologe zur Folge haben.

Anhand der Kristallstruktur von *MtDxr* im Komplex mit **XXXVh** (Abb. 84) hatten *Andaloussi* und *Henriksson* bereits gezeigt, dass dieser Inhibitor im gebundenen Zustand nicht so tief im aktiven Zentrum liegt wie Fosmidomycin und seine Spacer-Region eine von Fosmidomycin abweichende Konformation einnimmt. Dadurch werden die Ordnung der flexiblen Schleife und die Struktur der Hydroxamat-Bindestelle beeinflusst. Ein vergleichbarer Effekt könnte die geringere Bindungsaffinität der oxasteren Analoga **26a-27h** im Vergleich zu Fosmidomycin erklären.

* Der hier ermittelte IC_{50} -Wert Fosmidomycins liegt im Bereich der bisher publizierten Daten (0,08–0,31 μ M).

Die α -dichlorphenylsubstituierte Verbindung **27h** zeigt unter den in dieser Arbeit vorgestellten oxasteren Fosmidomycin-Analoga die stärkste *MtDxr*-Inhibition ($IC_{50} = 1,6 \mu M$). Verglichen mit **27a** ($IC_{50} = 16 \mu M$) zeigt sich hier der gleiche aktivitätssteigernde Effekt der Chlorsubstitution wie bei **XXXVh**, dessen *MtDxr*-Inhibition im Vergleich zu **XXXVd** zehnfach stärker ist (**Abb. 84**).

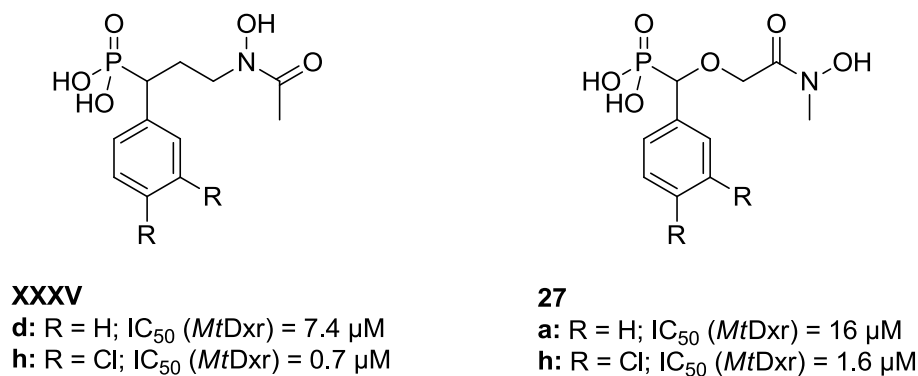


Abb. 84: *MtDxr*-Inhibition durch α -arylsubstituierte Fosmidomycin-Analoga.

Wie 2011 von *Karlén, Larhed und Mitarbeitern* gezeigt wurde, sind α -Aryl-Fosmidomycin-Analoga in Form der freien Phosphonohydroxamsäuren gegenüber *M. tuberculosis* inaktiv.^{150,413} Die im folgenden Kapitel vorgestellten Prodrugs oxa-isosterer Fosmidomycin-Analoga könnten aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften eine Perspektive zur Verbesserung der antimykobakteriellen Aktivität von Fosmidomycin-Analoga bieten.

4 Prodrugs α -substituierter, β -oxa-isosterer Fosmidomycin-Analoga

4.1 Das Prodrug-Prinzip in der Wirkstoffentwicklung

Der Begriff „pro-drug“ wurde 1958 von *Adrien Albert* eingeführt,⁴¹⁴ das entsprechende Konzept wurde allerdings schon wesentlich früher entwickelt.⁴¹⁵ Prodrugs sind Arzneistoffe, die selbst keine biologische Wirkung besitzen und erst *in vivo* durch chemische oder enzymatische Reaktionen in aktive Wirkstoffe umgewandelt werden.⁴¹⁶⁻⁴²⁰ Eine besondere Art von Prodrugs stellen die so genannten „Bioprecursor Prodrugs“ dar, die kein Prodrug-Strukturelement besitzen und deren Bioaktivierung *in vivo* zum Beispiel durch enzymatische Oxidation oder Reduktion erfolgt.^{417,419} Prodrugs werden zur Optimierung von physikochemischen, biopharmazeutischen oder pharmakokinetischen Eigenschaften entwickelt.^{416,418} Unzulänglichkeiten in Löslichkeit, Permeationsvermögen, chemischer und metabolischer Stabilität, Geschmack oder Wirkdauer können den klinischen Nutzen eines Arzneistoffs beeinträchtigen, durch den Einsatz von Prodrugs aber überwunden werden.⁴¹⁷⁻⁴¹⁹ Die Bioverfügbarkeit eines Wirkstoffs lässt sich beispielsweise verbessern, indem durch geeignete Prodrug-Strukturelemente die für parenterale oder orale Administration maßgebliche Wasserlöslichkeit erhöht wird, ein vorzeitiger metabolischer Abbau verhindert wird oder körpereigene Transportsysteme genutzt werden.⁴²¹ Darüber hinaus ist es möglich, Arzneistoffe in Prodrug-Form gezielt und selektiv in Geweben anzureichern,* wodurch eine höhere Effizienz am Wirkort erreicht und toxische Nebenwirkungen vermieden werden können.⁴¹⁷⁻⁴¹⁹ Bei der Entwicklung von Prodrugs müssen mehrere dieser Aspekte zugleich berücksichtigt werden. So sollte beispielsweise die gewünschte metabolische Labilität nicht die chemische Stabilität und damit die Synthese beeinträchtigen. Das Prodrug-Strukturelement sollte keine toxischen Abbauprodukte freisetzen und eine erhöhte Lipophilie darf nicht zu einem übermäßigen First-Pass-Effekt führen.⁴²¹

Am häufigsten werden Carboxyl-, Hydroxyl-, Amino-, Phosphat-/Phosphonat- und Carbonylfunktionalitäten für das Design von Prodrugs genutzt und typischerweise als Ester, Carbonate, Carbamate, Amide, Phosphate und Oxime derivatisiert. Ester stellen die gebräuchlichste Prodrug-Stoffklasse dar. Ihre Bioaktivierung erfolgt durch die im Organismus allgegenwärtigen Esterasen[†] und CYP450-Enzyme.^{416,422,423} Im folgenden Abschnitt sollen die wichtigsten Phosphonsäure-Prodrugs und die in dieser Arbeit eingesetzten Prodrug-Funktionalitäten für Hydroxamsäuren vorgestellt werden.

* Beispiele für solche Prodrug-Anwendungen sind die gezielte Anreicherung von L-Dopa im ZNS zur Parkinsontherapie oder die tumorspezifische Anreicherung antineoplastischer Wirkstoffe.⁴²⁰

† Dazu zählen Carboxylesterasen, Acetylcholinesterasen, Cholinesterasen, Paraoxonasen und Arylesterasen.^{416,422}

4.1.1 Phosphonsäure-Prodrugs

Phosphate, Phosphonate und Phosphinate besitzen eine höhere Acidität als vergleichbare Carbonsäuren und liegen daher bei physiologischem pH-Wert in der Regel deprotoniert vor.* In der ionisierten Form sind diese Substanzen jedoch normalerweise nicht zur passiven Membranpermeation befähigt. Dies führt dazu, dass Phosphate und Phosphonate eine geringe orale Bioverfügbarkeit besitzen und intrazelluläre Wirkorte nur schwer erreichen können. Durch den Einsatz von Prodrugs, in denen die ionisierbaren Funktionalitäten maskiert sind, können die nachteiligen Eigenschaften dieser Substanzklassen umgangen werden.⁴²⁴⁻⁴²⁷ Lipophile Prodrugs sind in der Lage, Plasmamembranen zu durchdringen und anschließend die aktive Form freizusetzen, die dann in geladener Form praktisch nicht mehr aus der Zelle herausdiffundieren kann.⁴²⁷

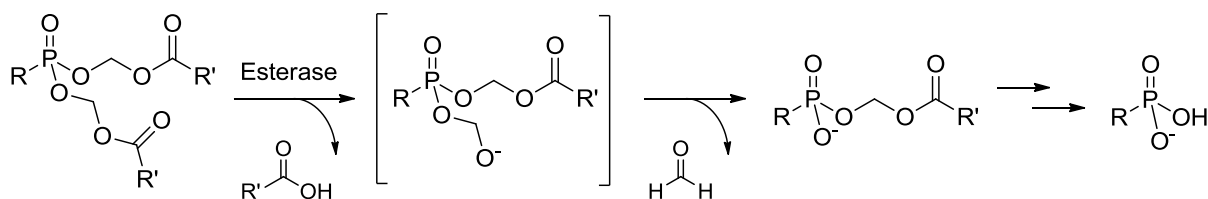
Einfache Phosphonsäurealkylester eignen sich nicht als Prodrugs, da sie anders als Carbonsäureester keine guten Substrate von Esterasen sind. Arylester sind auf Grund der besseren phenolischen Abgangsgruppe labiler, wegen der Freisetzung von toxischen Phenol-Derivaten jedoch problematisch.⁴²⁶ *Reichenberg et al.* synthetisierten Diarylester-Prodrugs von FR900098 (**XXIII**, siehe Abschnitt 1.6.2), die im Mausmodell eine erhöhte antiplasmodiale Aktivität im Vergleich zu der Stammsubstanz zeigten.²³⁵

Acyloxyalkylester zählen zu den am häufigsten verwendeten lipophilen Phosphonsäure-Prodrugs.⁴²⁵ Diese Verbindungen enthalten eine Carbonsäureesterfunktionalität, die über einen Spacer mit der Phosphonsäurefunktionalität verknüpft ist, und werden auch als Doppelester-Prodrugs bezeichnet.²³⁸ Bei dem Spacer handelt es sich um einen maskierten Aldehyd, der in Form eines Acylals vorliegt.† Die Bioaktivierung von Acyloxyalkylester-Prodrugs zu freien Phosphonsäuren beginnt mit der Hydrolyse einer Carbonsäureestergruppe durch unspezifische Esterasen, gefolgt von einem spontanen Zerfall der instabilen Halbacetal-Zwischenstufe unter Abspaltung des Aldehyds (**Schema 24**).⁴²⁷

Ein häufiger Vertreter dieser Prodrug-Klasse ist der Bis-Pivaloyloxymethyl (POM)-Ester, dessen Doppelester-Einheiten aus Pivalinsäure und Formaldehyd aufgebaut sind. **Adefovir-Dipivoxil** ist das Bis-POM-Prodrug des virustatischen Nucleotid-Analogons **Adefovir** und wird zur Therapie von Hepatitis B eingesetzt (**Abb. 85**). Die orale Bioverfügbarkeit des Prodrugs ist etwa vier- bis sechsmal so hoch wie die der freien Phosphonsäure.^{416,428} Verschiedene Acyloxyalkyl-Prodrugs des Dxr-Inhibitors FR900098 (z. B. **XXXVa**, siehe Abschnitt 1.6.2) zeigen *in vitro* gegenüber den *P. falciparum*-Laborstämmen 3D7 und Dd2 sowie *in vivo* gegenüber *P. vincke*i höhere antiplasmodiale Aktivität als die Stammverbindung.²³⁶ Diese Prodrugs zeigen eine erhöhte orale Bioverfügbarkeit und werden besser am Wirkort angereichert.²³⁸

* Diese Eigenschaft wird bei Phosphat-Prodrugs von Alkoholen oder Aminen zur Steigerung der Wasserlöslichkeit genutzt, um z.B. eine parenterale Applikation zu ermöglichen.⁴¹⁷

† Acylsubstituierte Acetale werden auch als Acylale bezeichnet.

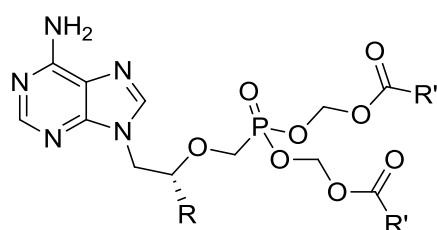


Schema 24: Aktivierungsmechanismus von Acyloxyalkylestern (modifiziert nach Hecker, 2008³⁹⁸).

Die Freisetzung von Formaldehyd bei der Bioaktivierung von Acyloxyalkyl-Prodrugs lässt vor allem die chronische Anwendung von POM-Prodrugs bedenklich erscheinen. Im Vergleich mit der täglich durch Nahrung und Umwelteinflüsse aufgenommenen Formaldehyd-Menge steuert eine therapeutisch eingenommene Menge an Prodrug allerdings nur einen geringen Mehranteil bei, der keine merkliche Zusatzbelastung des menschlichen Organismus darstellen sollte.⁴²⁹ In Carbonsäure-POM-Prodrugs ist das acetalische Kohlenstoffatom oft mit einer einfachen Alkylgruppe substituiert, so dass bei der Aktivierung kein Formaldehyd, sondern zum Beispiel toxikologisch unbedenklicherer Acetaldehyd freigesetzt wird.* Diese Art von Phosphonsäure-Prodrugs finden jedoch kaum Anwendung, da deren Synthese und Reinigung durch das Auftreten einer Vielzahl von Stereoisomeren erschwert wird.⁴²⁵

Auch durch die freigesetzte Pivalinsäure können POM-Prodrugs unerwünschte Wirkungen hervorrufen.⁴³⁰ Pivalinsäure wird im menschlichen Organismus als Coenzym A-Thioester aktiviert und als Pivaloylcarnitin renal eliminiert. Die Acylierung von Carnitin kann zu einer Störung des Fettsäurestoffwechsels führen, so dass eine längerfristige Therapie mit POM-Prodrugs oder hohe Dosierungen als problematisch angesehen werden.^{425,430}

Eine strukturell verwandte Klasse von Phosphonsäure-Prodrugs stellen die **Bis-Alkyloxycarbonyloxyalkylester** dar, deren Bioaktivierung nach einem ähnlichen Mechanismus wie in **Schema 24** erfolgt.⁴²⁷ In diesen Verbindungen ist die Carbonsäure- durch eine Kohlensäurekomponente ersetzt, so dass neben der freien Phosphonsäure ein Aldehyd, ein Alkohol und Kohlendioxid entstehen. Ein aktuelles Arzneistoffbeispiel für diese Stoffklasse ist das zur Behandlung von HIV-Infektionen verwendete Virustatikum **Tenofovir-Disoproxil (Abb. 85)**.^{417,425} Auch von FR900098 wurden Alkyloxycarbonyloxyalkylester (**XXV**, siehe Abschnitt 1.6.2) hergestellt, die *in vivo* eine höhere Aktivität als der freie Inhibitor zeigten.²³⁷



Adefovir-Dipivoxil: R = H, R' = *t*-Butyl
Tenofovir-Disoproxil: R = Me, R' = *Oi*-Propyl

Abb. 85: Acyloxyalkyl- und Alkyloxycarbonyloxyalkyl-Prodrugs in klinischer Anwendung.

* Eine weitere Möglichkeit zur Vermeidung der Formaldehyd-Freisetzung ist die kovalente Verknüpfung der beiden Abspaltungsprodukte in Form eines Phosphonsäure-Phthalidylesters.⁴²⁵

Weitere Prodrugs und ihre besonderen Merkmale sind in **Tabelle 7** zusammengefasst.

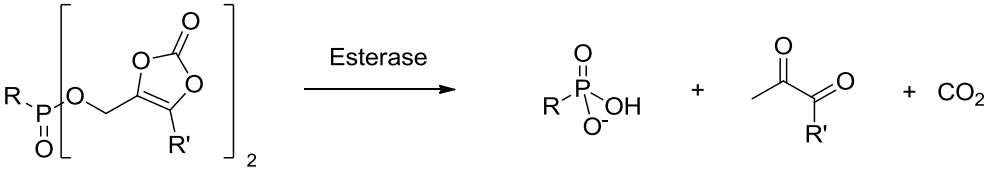
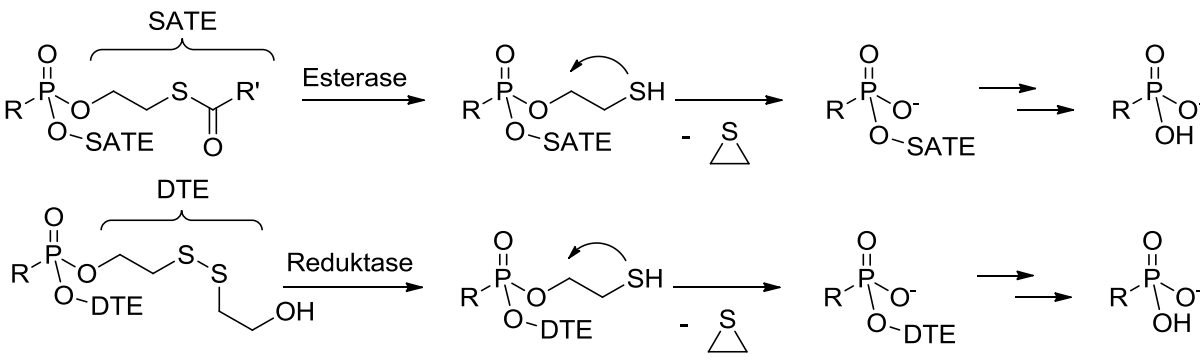
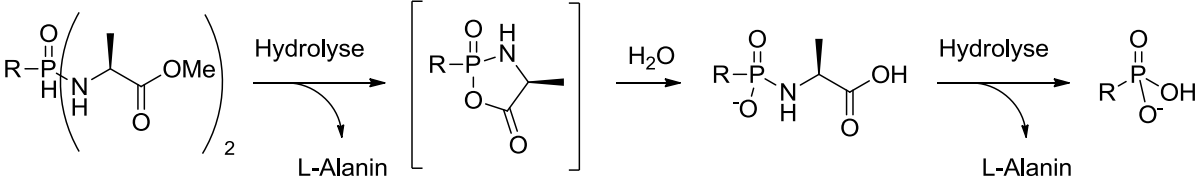
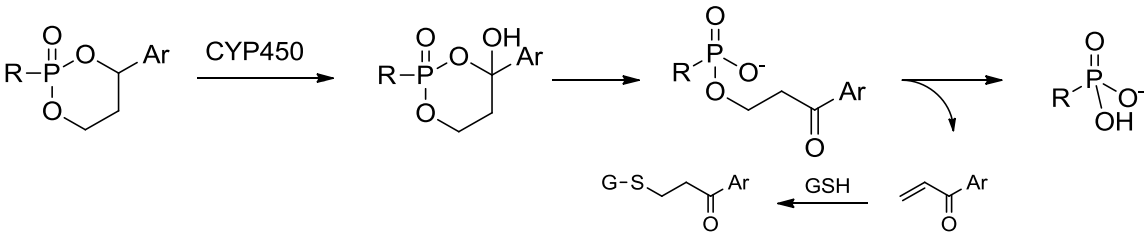
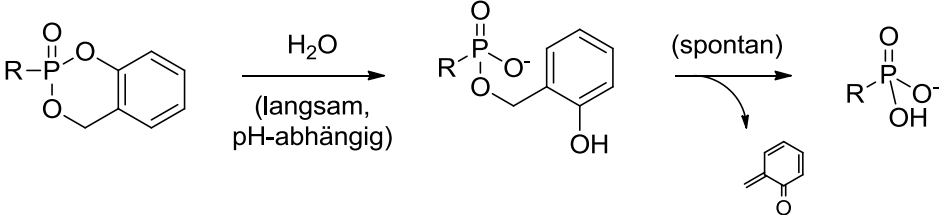
Dioxolenon-Prodrugs: keine Stereozentren, relativ untoxische Abspaltungsprodukte^{425,431} 
S-Acylthioethanol (SATE)- und Dithioethanol (DTE)-Ester: Potenziell toxisches Nebenprodukt⁴³² 
Phosphondiamide: keine Chiralität am Phosphor, untoxisches Abspaltungsprodukt^{419,425} 
HepDirect-Prodrugs: Bioaktivierung in der Leber, Nebenprodukt wird durch Glutathion inaktiviert⁴³³ 
cycloSal-Prodrugs: ausschließlich chemische, pH-abhängige Aktivierung⁴³⁴ 

Tabelle 7: Weitere in der Wirkstoffentwicklung eingesetzte Phosphonsäure-Prodrugs.

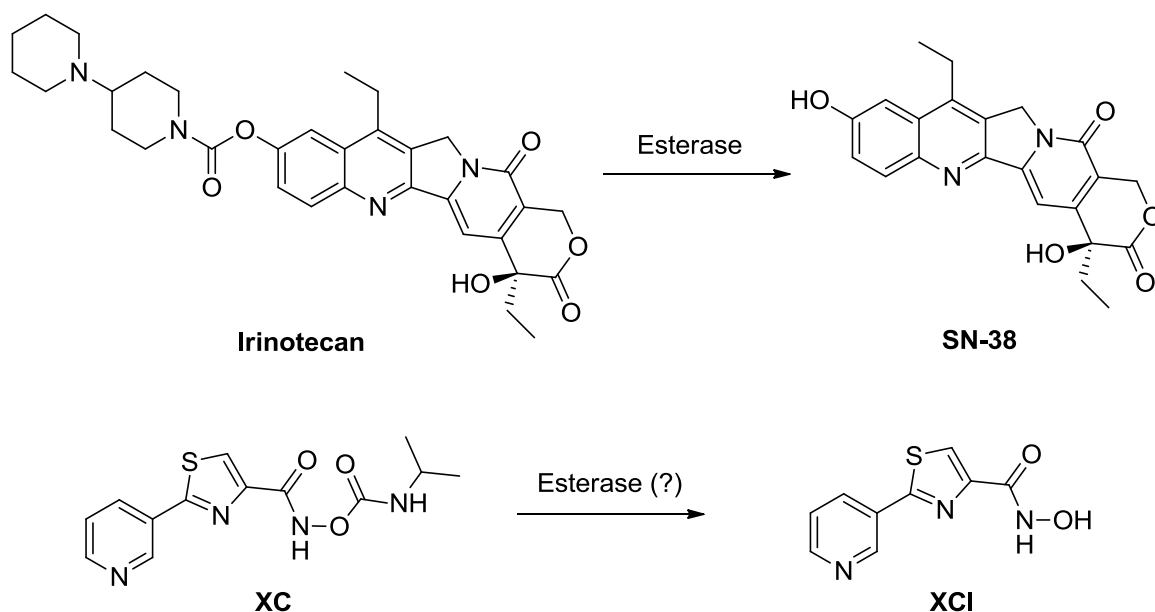


Abb. 87: Beispiele für Carbamat-Prodrugs von Phenolen und Hydroxamsäuren.

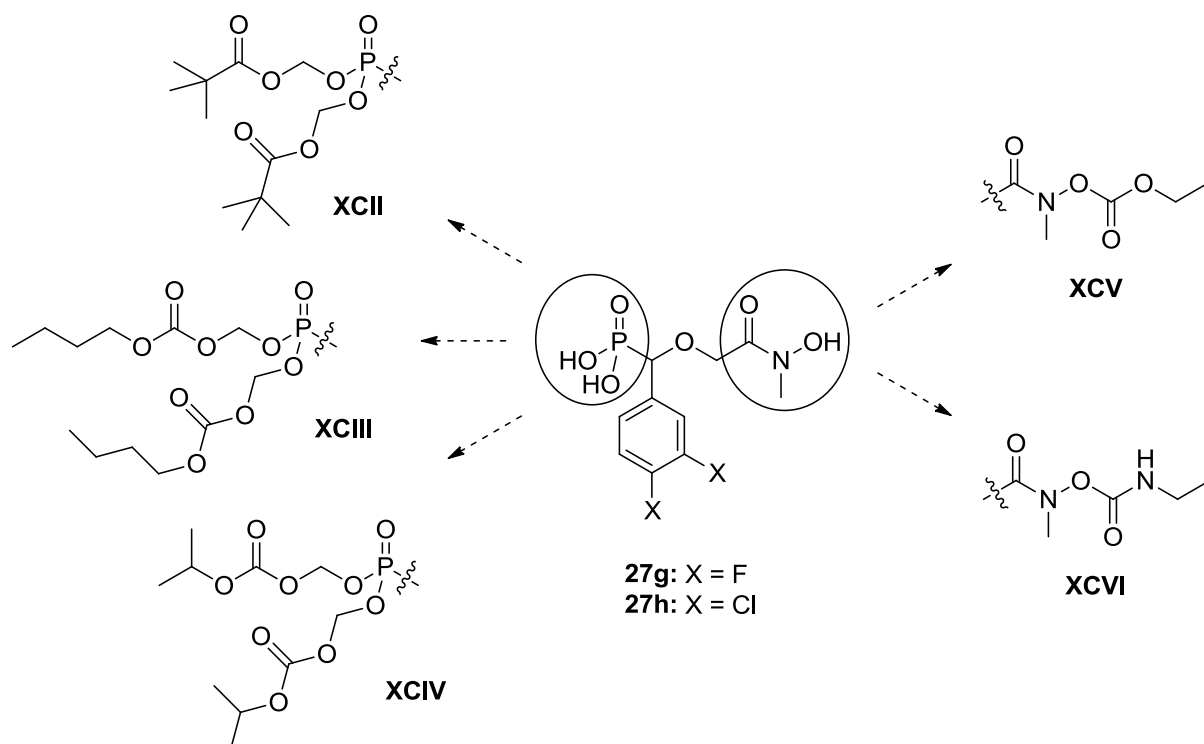
4.2 Synthesestrategie der Prodrugs β -oxa-isosterer Fosmidomycin-Analoga

Im Rahmen der eigenen Arbeiten sollte das Prodrug-Konzept exemplarisch auf die in Kapitel 3 vorgestellten inversen, oxasteren Fosmidomycin-Analoga angewendet werden. Am Beispiel von FR900098 war bereits gezeigt worden, dass eine Derivatisierung der Phosphonsäurefunktionalität als Acyloxyalkyl- und Alkyloxycarbonyloxyalkylester zu einer deutlichen Steigerung der antiplasmodialen Aktivität *in vitro* und *in vivo* führen kann (siehe Abschnitt 1.6.2). Lipophile Phosphonsäure-Prodrugs von FR900098 zeigen im Gegensatz zu der Stammverbindung ($\text{MIC} > 2000 \mu\text{M}$) *in vitro* auch eine Wachstumsinhibition von *M. tuberculosis* mit MIC-Werten im mikromolaren Konzentrationsbereich (z. B. **XXIVc**, $\text{MIC} = 54\text{--}215 \mu\text{M}$).²⁴⁴ Die *in vitro*-Aktivität des von Haemers *et al.* synthetisierten oxasteren Fosmidomycin-Analogons **LIIb** konnte durch Derivatisierung als Bis-POM-Prodrug **LIII** um den Faktor 5 gesteigert werden.²⁵⁹ Derartige Prodrug-Funktionalitäten haben sich bereits in zugelassenen Wirkstoffen bewährt. Auf diese Erkenntnisse aufbauend sollten entsprechende Prodrugs der wirksamsten oxasteren Fosmidomycin-Analoga synthetisiert werden. Weiterhin sollte ein in unserem Arbeitskreis erstmalig entwickelter, lipophiler Doppelester-Prodrug-Typ synthetisiert werden, in dem sowohl Phosphonsäure- als auch Hydroxamsäurefunktionalität derivatisiert vorliegen.

4.3 Synthese und Eigenschaften der Prodrugs

4.3.1 Synthese der Prodrugs

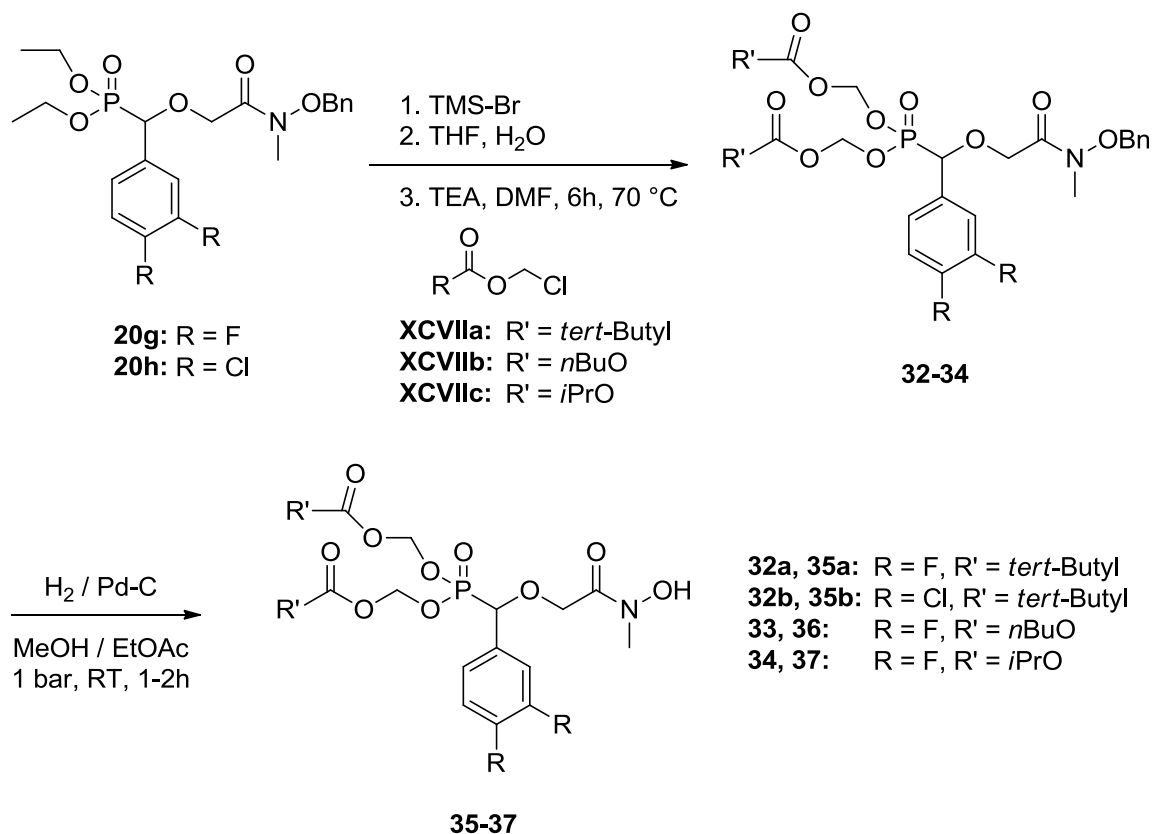
Um zu überprüfen, ob die Aktivität der oxa-isosteren Fosmidomycin-Analoga im Zellkulturassay durch die Maskierung der hydrophilen funktionellen Gruppen verbessert werden kann, sollten verschiedene Prodrugs der inhibitorisch aktivsten Vertreter **27g** und **h** synthetisiert werden. Die Phosphonsäuregruppen sollten als Bis-Pivaloyloxymethylester (**XCII**) und als Isopropyl- und *n*-Butyloxycarbonyloxymethylester (**XCIII** bzw. **XCIV**) derivatisiert werden. Die acetalischen Methylenebrücken der Doppel-ester-Funktionalitäten sollten jeweils unsubstituiert bleiben, um die Synthese nicht durch Trennprobleme aufgrund von Stereoisomeren zu erschweren. Zusätzlich sollte in zwei Phosphonsäureester-Prodrugs die Hydroxamsäurefunktionalität als Carbonat (**XCV**) und als Carbamat (**XCVI**) geschützt werden, um die Lipophilie weiter zu erhöhen (**Schema 25**).



Schema 25: Geplante Prodrug-Funktionalitäten für oxastere Fosmidomycin-Analoga.

Als Ausgangsmaterial für die Synthese der Phosphonsäure-Prodrugs **35-37** (**Schema 26**) eignen sich die geschützten Phosphonohydroxamsäuren **20g** und **h**, deren Phosphonsäureestergruppen analog zu der in Abschnitt 2.3.2 beschriebenen Umesterung zunächst hydrolysiert und dann alkyliert werden können. Anschließend kann die Hydroxamsäurefunktionalität hydrogenolytisch freigesetzt und weiter derivatisiert werden.

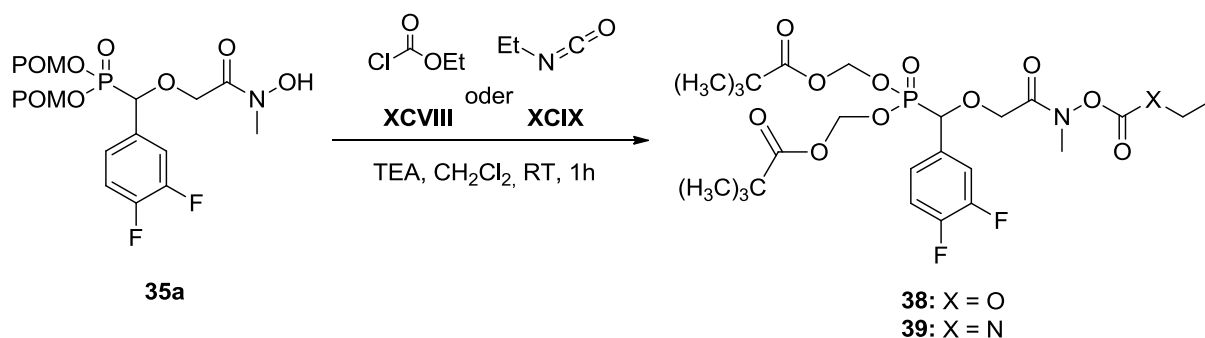
Die Desalkylierung der Diethylphosphonate **20g** und **h** erfolgte durch Behandlung mit überschüssigem TMSBr und anschließender Hydrolyse, worauf die freien Phosphonsäuren ohne weitere Reinigung zur Alkylierung eingesetzt wurden (**Schema 26**).^{217,308} Als Alkylierungsreagenzien wurde für die Synthese der Bis-POM-Ester **32a** und **b** das kommerziell erhältliche Chlormethylpivalat (**XCVIIa**) verwendet. Die Herstellung der Alkyl-Chlormethylcarbonate **XCVIIb** und **c** erfolgte in Anlehnung an eine Literaturvorschrift durch Umsetzung von Chlormethylchloroformiat mit Isopropanol bzw. *n*-Butanol in Gegenwart von Pyridin.^{440,441}



Schema 26: Synthese der dihalogenphenylsubstituierten Phosphonsäure-Prodrugs **35-37**.

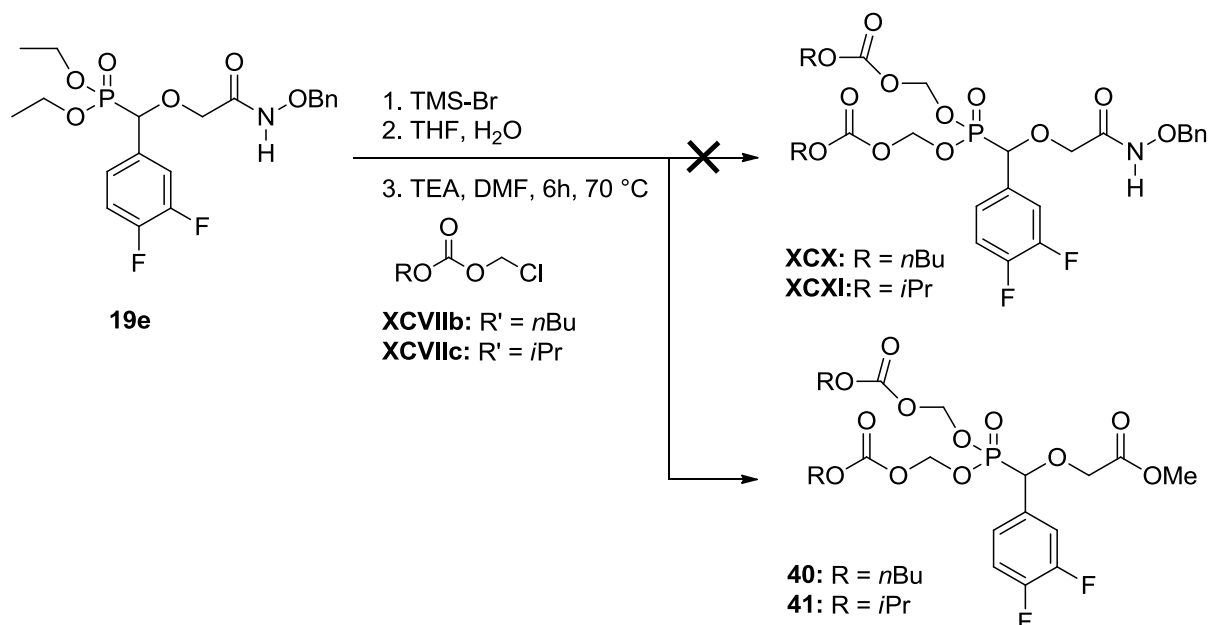
Die Umsetzung der Phosphonsäure mit den Alkylanzien **XCVIIa-c** erfolgte in Anlehnung an eine Literaturvorschrift in Dimethylformamid und in Gegenwart von Triethylamin, wobei das Reaktionsgemisch einige Stunden unter Rückfluss erhitzt wurde.²⁴¹ Die *O*-benzylgeschützten Prodrugs **32-34** wurden nach chromatographischer Reinigung einer Pd-katalysierten Hydrogenolyse unterzogen, die zu den Zielverbindungen **35-37** führte.

Zur Derivatisierung der Hydroxamsäurefunktionalität wurde das Bis-POM-Prodrug **35a** in wasserfreiem Dichlormethan gelöst und bei Raumtemperatur in Gegenwart von Triethylamin mit Ethylchloroformiat (**XCVIII**) bzw. Ethylisocyanat (**XCIX**) umgesetzt (**Schema 27**). Die Carbonat- und Carbamat-Prodrugs **38** und **39** wurden als zähflüssige Öle nach säulenchromatographischer Reinigung in 90–100 % Ausbeute analysenrein erhalten.



Schema 27: Synthese der Prodrugs **38** und **39** mit geschützter Hydroxamsäurefunktionalität.

Da die Synthese der Phosphonohydroxamsäure **25e** über die in Abschnitt 3.3.3 beschriebenen Wege nicht in ausreichender Reinheit gelang, sollte auch diese Zielverbindung in Form eines Prodrugs hergestellt werden, da dann die chromatographische Reinigung des lipophilen Produkts unproblematisch sein sollte. Versuche zur Synthese des Bis-POM-Prodrugs **LXXXVIII** (siehe Abschnitt 3.3.3, **Schema 20**) oder eines der beiden Alkyloxycarbonyloxyalkyl-Prodrugs **XCX** und **XCXI** (**Schema 28**) scheiterten allerdings. Im letzten Kapitel wurde bereits beschrieben, dass nach der TMSBr-vermittelten Desalkylierung des Diethylphosphonats **19e** und anschließender Umsetzung mit Chlormethylpivalat das Bis-POM-Prodrug **LXXXVIII** nicht isoliert werden konnte.



Schema 28: Versuche zur Synthese von Phosphonsäure-Prodrugs ausgehend von **19e**.

Nach Umsetzung von **19e** mit TMSBr und den Alkylchlormethylcarbonaten **XCVIIb** und **c** konnten anstatt der gewünschten Verbindungen **XCX** und **XCXI** nur die Nebenprodukte **40** und **41** isoliert werden (**Schema 28**). Bei beiden ist die Prodrug-Funktionalität zwar vorhanden, die Hydroxamsäurefunktionalität jedoch durch einen Methylester ausgetauscht. Die Methylester **40** und **41** konnten durch IR- und NMR-Spektren sowie Elementaranalyse identifiziert werden und ähneln dem in Abschnitt 3.3.3 bereits beschriebenen Nebenprodukt **30** aus der Phosphonsäure-

Umesterungsreaktion von **19e**. Diese Beobachtung bestätigt die zuvor gewonnene Erkenntnis, dass die freie Hydroxamsäurefunktionalität bei dem in **19e** vorliegenden Substitutionsmuster zu reaktiv für die Reaktionsbedingungen der Phosphonsäure-Derivatisierungen zu sein scheint. Weshalb bei der Umsetzung von **19e** eine Methanolyse und nicht eine Hydrolyse des Hydroxamats auftrat, konnte auch in diesen Fällen nicht geklärt werden. Bei einer Nachstellung der Reaktionsbedingungen ohne Zugabe von Alkylanzien konnte keine Methylesterbildung festgestellt werden.

4.3.2 Spektroskopische Eigenschaften

NMR-Spektroskopische Eigenschaften

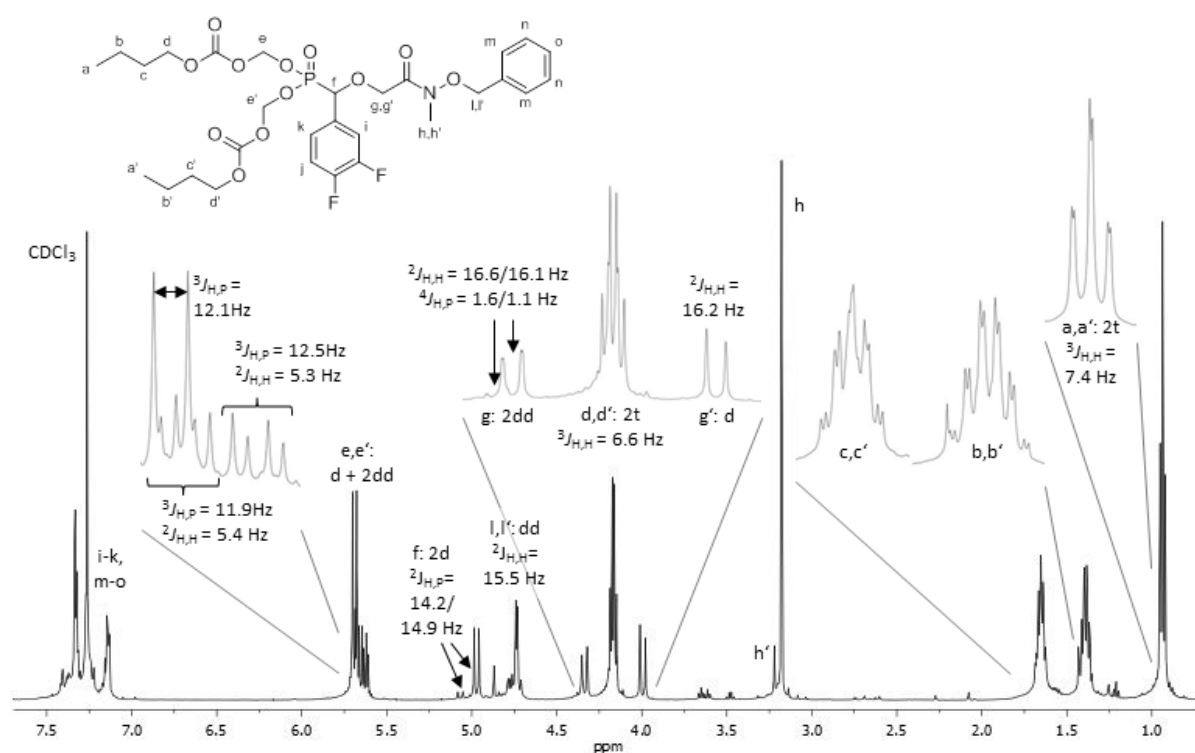


Abb. 88: ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **33** in CDCl_3 .

Die NMR-Spektren der Prodrugs oxasterer Fosmidomycin-Analoga weisen durch die Prodrug-Funktionalitäten einige Besonderheiten auf, die hier am Beispiel des ^1H -NMR-Spektrums von Verbindung **33** vorgestellt werden sollen (**Abb. 88**). Sämtliche Resonanzsignale der diastereotopen Alkyloxycarbonyloxymethylgruppen (**a/a'**–**e/e'**) treten auf Grund der chemischen und magnetischen Inäquivalenz der Protonen doppelt auf. Besonders hervorzuheben ist das Aufspaltungsmuster der acetalischen Methylengruppen **e/e'**: Während eine der Methylengruppen ein AB-System bildet, dessen Signale durch eine $^3J_{\text{H,P}}$ -Kopplung verdoppelt sind, erfährt das Resonanzsignal der anderen Methylengruppe nur eine Dublett-Aufspaltung durch die Kopplung mit Phosphor. Die beiden Reste der Prodrug-Funktionalität sind vermutlich so angeordnet, dass sich Diastereotopie- und Anisotropie-

Effekte nur auf die Methylengruppe auswirken, die dem Chiralitätszentrum näher liegt. Die andere Methylengruppe wird hingegen so wenig beeinflusst, dass Unterschiede in den chemischen Verschiebungen der Methylengruppen **e** und **e'** im Spektrum nicht mehr aufgelöst werden und die Protonen isochron erscheinen.

Das durch die Methylen-Protonen **g/g'** gebildete AB-System zeigt ebenfalls ein unsymmetrisches Aufspaltungsmuster, welches auch bei mehreren in Abschnitt 3.3.4 beschriebenen Verbindungen auftritt: Nur das zu tieferem Feld verschobene Dublett des dachförmigen AB-Signalsystems zeigt eine zusätzliche Aufspaltung durch Fernkopplung zum Phosphor, bei dem hochfeldverschobenen Signalteil ist nur die geminale *H,H*-Kopplung aufgelöst. Die unterschiedliche räumliche Anordnung von **g** und **g'** relativ zur Phosphonsäurefunktionalität ist vermutlich auch hier die Ursache des unterschiedlichen Kopplungsverhaltens der diastereotopen Protonen. Die Verdoppelung der Resonanzsignale für die Protonen **f**, **g** und **h** deutet auf die Anwesenheit zweier verschiedener Konformationen von **33** hin, die auf Grund einer eingeschränkten Rotationsfähigkeit der großen Alkylsubstituenten nur langsam im Sinn der NMR-Zeitskala ineinander übergehen und zu einer Signalaufspaltung entsprechend einem Rotamerenverhältnis von etwa 9:1 führen.

IR-Spektroskopische Eigenschaften

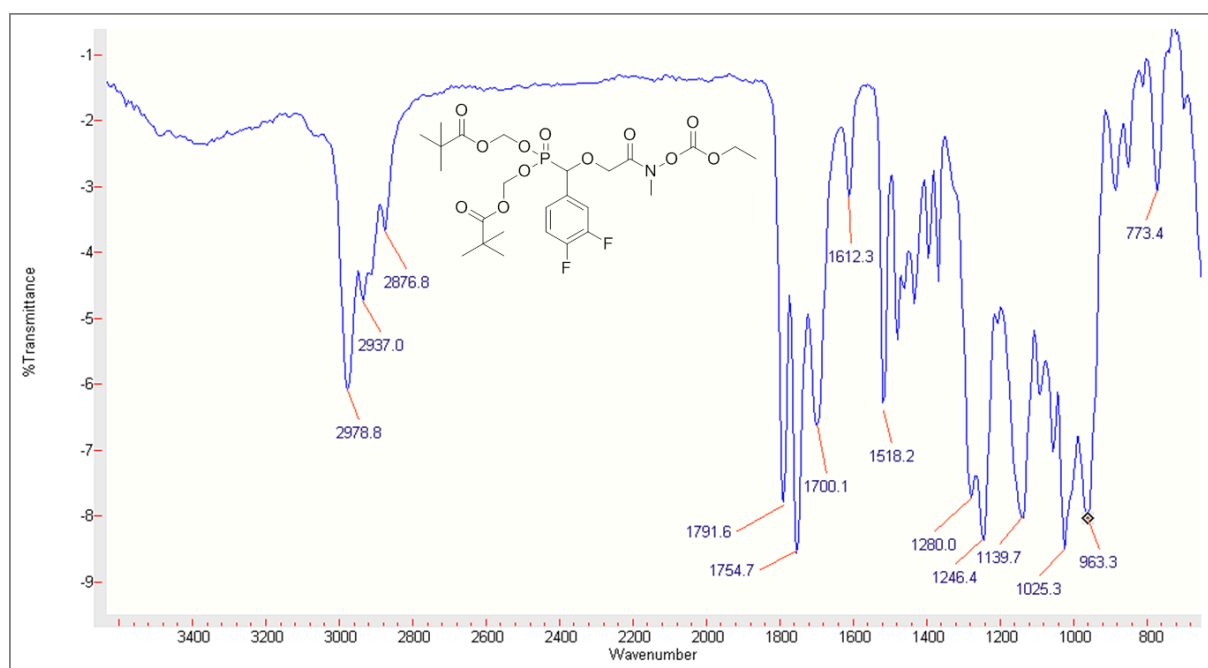


Abb. 89: IR-Spektrum der Verbindung **38** (NaCl-Film).

Im IR-Spektrum des Doppelster-Produgs **38** tritt erwartungsgemäß keine Absorptionsbande einer O-H-Valenzschwingung auf (**Abb. 89**). Besonders fallen im Spektrum die drei dicht nebeneinander liegenden Carbonyl-Absorptionsbanden im Bereich von $1700\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ auf. Die C=O-Valenzschwingungen der Carbonatgruppe führen zu der starken Absorptionsbande bei 1792 cm^{-1} ,

während die zu etwas niedrigeren Wellenzahlen verschobene Bande bei 1755 cm^{-1} durch die Ester-Carbonylgruppe entsteht. Etwas schwächer ausgeprägt ist die Absorptionsbande bei 1700 cm^{-1} , die durch die Carbonyl-Valenzschwingung der Hydroxamsäurefunktionalität verursacht wird. Da hier formal ein gemischtes Anhydrid vorliegt, ist diese Bande im Vergleich zu $\text{C}=\text{O}$ -Absorptionsbanden freier Hydroxamsäuren zu höheren Wellenzahlen hin verschoben. Im Fingerprint-Bereich tritt neben den Absorptionsbanden der Phosphonsäurefunktionalität (1246 und 1025 cm^{-1} : $\text{P}=\text{O}$ - und $\text{P}-\text{O}$) eine starke Absorptionsbande bei 1140 cm^{-1} hervor, die auf Valenzschwingungen der zahlreichen im Molekül enthaltenen $\text{C}-\text{O}$ -Einfachbindungen zurückgeführt werden kann.

4.4 Untersuchung der biologischen Aktivität

Die biologische Evaluation der Prodrugs oxasterer Fosmidomycin-Analoga **35-39** (Abb. 90) erfolgte gegenüber den *P. falciparum*-Laborstämmen Dd2 und 3D7. Zum Vergleich sind in **Tabelle 8** auch die IC_{50} -Werte der freien Phosphonohydroxamsäuren **27g** und **h** sowie von Fosmidomycin (**Fos-Na**) angegeben.

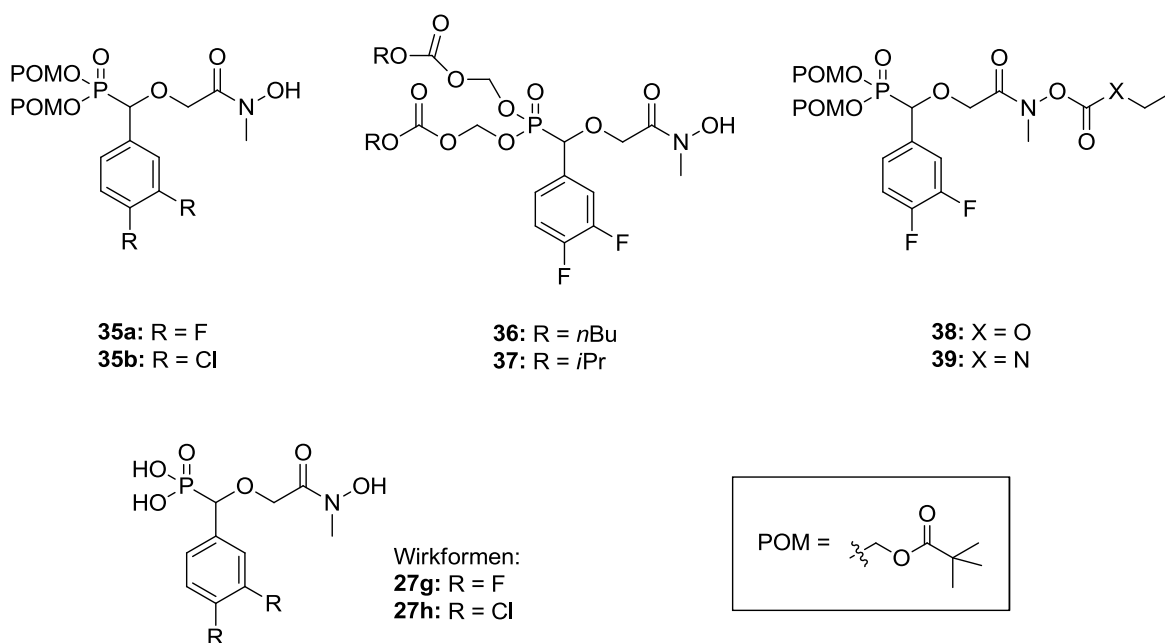


Abb. 90: Übersicht über die in Kapitel 4 vorgestellten Prodrugs **35-39**.

Alle Phosphonsäure-Prodrugs zeigen im Vergleich zu den Stammverbindungen im Zellkulturassay gegenüber *P. falciparum* Dd2 und 3D7 eine deutlich gesteigerte Wachstumsinhibition. Vergleicht man beispielsweise die antiplasmodialen Aktivitäten der Prodrugs **35a** und **36** gegenüber *P.f.*3D7 ($\text{IC}_{50} = 13\text{--}14\text{ nM}$) und die hervorragende Wachstumshemmung des Dd2-Stamms durch **36** ($\text{IC}_{50} = 9\text{ nM}$) mit der *Pf*Dxr-Hemmung durch die freie Phosphonohydroxamsäure **27g** ($\text{IC}_{50} = 12\text{ nM}$), so ist von einer nahezu vollständigen Überführung des Prodrugs an den Wirkort und anschließender Freisetzung der Wirkform auszugehen. Die hohe Lipophilie der Prodrugs scheint die passive Diffusion

der Prodrugs in den Apikoplasten zu begünstigen und so möglicherweise das Fehlen eines aktiven Transportwegs zu kompensieren. Der Unterschied zwischen den POM-Prodrugs mit freier (**35a**) und geschützter Hydroxamsäurefunktionalität (**38** und **39**) macht sich gegenüber Dd2 nicht bemerkbar, während gegenüber 3D7 leicht erhöhte IC₅₀-Werte der modifizierten Bis-POM-Prodrugs **38** und **39** im Vergleich zu **35a** auftreten. Im Zellkulturassay scheint die Lipophilie des „einfachen“ Prodrugs **35a** für eine maximale Verfügbarkeit der Wirkform am Enzym auszureichen. Im Zellkulturassay scheinen hydrolytische Vorgänge aufzutreten, durch die analog zu den Phosphonsäure-Prodrugs auch die Hydroxamsäure-Prodrugfunktionalitäten gespalten werden.

Verbindung	Zellkulturassay*		Enzymassay†
	<i>P.f.</i> Dd2 IC ₅₀ (μM)	<i>P.f.</i> 3D7 IC ₅₀ (μM)	<i>Pf</i> Dxr IC ₅₀ (μM)
27g	0.13	0.54	0.012 +/- 0.001
Prodrug 35a	0.022	0.013	-
Prodrug 36	0.009	0.014	-
Prodrug 37	0.029	0.035	-
Prodrug 38	0.019	0.023	-
Prodrug 39	0.022	0.031	-
27h	0.14	0.24	0.014 +/- 0.001
Prodrug 35b	0.019	0.037	-
Fos-Na‡	0.81	0.88	0.16 +/- 0.02

Tabelle 8: *In vitro*-Aktivitäten der Prodrugs oxasterer Fosmidomycin-Analoga.

Vor der Planung von *in vivo*-Versuchen zur Antimalaria-Aktivität ausgewählter Prodrugs sollen zunächst noch weitere *in vitro*-Daten, unter anderem gegenüber verschiedenen *P. falciparum*-Patientenisolaten aus dem Albert Schweitzer Krankenhaus in Lambaréné (Gabun) erhoben werden. Ausgewählte Prodrugs aus dieser Arbeit werden gegenwärtig im Institut für Pharmazeutische Biologie der Heinrich-Heine-Universität auf ihre Aktivität gegen *Mycobacterium smegmatis* und *Mycobacterium bovis* untersucht.

* Mittelwerte aus mindestens 2 unabhängigen Doppelbestimmungen.

† Mittelwerte +/- Standardabweichung aus nichtlinearer Regression aus 7–13 Messpunkten.^{319,320}

‡ Referenzsubstanz: Fosmidomycin-Mononatriumsalz von Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg).

5 Experimenteller Teil

5.1 Verzeichnis der Geräte und Analysenmethoden

Schmelzpunkte: Mettler FP 51/FP5, Gallenkamp MPD350.BM2.5

IR-Spektren: Varian 800 FT-IR Scimitar series

Die Aufnahme der IR-Spektren erfolgte bei Feststoffen in Form von KBr-Presslingen und bei flüssigen Substanzen als Film auf einer NaCl-Platte (im Text gekennzeichnet als KBr bzw. Film).

¹H-NMR-Spektren: Bruker Avance DRX 500 (500 MHz), Bruker Avance DRX 200 (200 MHz)

Die Angabe der chemischen Verschiebung δ erfolgt in ppm. Als interner Standard wurde Tetramethylsilan (TMS) eingesetzt. Die Protonenverhältnisse wurden durch Integration ermittelt. Signalmultiplizitäten werden wie folgt abgekürzt: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett und m = Multiplett. Die Kopplungskonstanten J werden in Hz angegeben, für Spin-Spinsysteme höherer Ordnung nur bei vollständig aufgelösten Signalsätzen.

¹³C-NMR-Spektren: Bruker Avance DRX 500 (125 MHz)

Die chemischen Verschiebungen δ werden relativ zum internen Standard TMS in ppm angegeben. Die Signalmultiplizitäten werden abgekürzt als s = Singulett und d = Dublett angegeben. Die Angabe der Kopplungskonstanten J erfolgt in Hz, bei Spin-Spinsystemen höherer Ordnung nur für vollständig aufgelöste Signalsätze.

Elementaranalysen: Perkin Elmer PE 2400 CHN Elemental Analyzer

Massenspektren (FAB-HRMS): VG Analytical VG-70S (doppeltfokussierendes Sektorfeld-MS)

Trockenmittel für organische Phasen: wasserfreies Natriumsulfat oder Magnesiumsulfat

Chromatographische Verfahren:

Für dünnschichtchromatographische Untersuchungen wurden DC-Aluminiumplatten der Firma Merck, beschichtet mit Kieselgel 60 und Fluoreszenzindikator (F₂₅₄), verwendet. Die Chromatographie erfolgte unter Kammersättigung über eine Laufstrecke von 6–8 cm, die Detektion erfolgte durch Fluoreszenzlöschung bei UV-Licht der Wellenlänge 254 nm oder Anfärbung mit wässriger Kaliumpermanganat-Lösung.

Säulenchromatographische Reinigungen wurden an Kieselgel 60 (0.04–0.063 mm / 230–400 mesh, Porengröße 60 Å) der Hersteller Fluka oder Macherey-Nagel durchgeführt.

Analytische HPLC-Untersuchungen wurden analog einer literaturbekannten Methode durchgeführt.²⁴⁹ Dazu stand das HPLC-System LaChrom Elite® (VWR-Hitachi) mit Pumpe L-2130 und UV-Detektor L-2400 zur Verfügung. Als Trennsäule wurde die RP-Säule Phenomenex Luna C-18(2) (250 mm x 4.6 mm, Partikelgröße 1.8 µm) in Kombination mit einer Phenomenex Security Guard®

Standard C18-Vorsäule verwendet. Als Laufmittel wurden Gemische aus Acetonitril und Wasser oder wässriger Ammoniumacetat-Lösung (5 mmol/L) eingesetzt. Die Laufzeit der Methoden A–E beträgt jeweils 20 Minuten.

Methode A: Gradientenelution (0 – 95%Acetonitril in 5 mM Ammoniumacetat-Lösung)

Methode B: isokratische Elution (1:1 Acetonitril / 5 mM Ammoniumacetat-Lösung)

Methode C: isokratische Elution (95:5 Acetonitril / 5 mM Ammoniumacetat-Lösung)

Methode D: isokratische Elution (1:1 Acetonitril / Wasser)

Methode E: isokratische Elution (95:5 Acetonitril / Wasser)

5.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)

AAV 1: Synthese der Anilide **1a,b**, **2a,b**, **3a,b** und **4a,b** ausgehend von den Carbonsäuren **LVIIa-d**

3 mmol der ausgewählten Carbonsäure **LVII** werden in einem Rundkolben mit aufgesetztem Trockenrohr in 15 ml wasserfreiem Toluol gelöst und mit 0,3 ml trockenem Dimethylformamid (4 mmol) versetzt. Über eine Spritze werden langsam 1,1 ml Oxalylchlorid (13 mmol) so langsam zugetropft, dass die Gasentwicklung nicht zu heftig erfolgt. Nach ein- bis zweistündigem Stunden Rühren des Reaktionsansatzes bei Raumtemperatur wird der Reaktionsfortschritt mittels Infrarot-Spektroskopie überprüft. Die vollständige Umsetzung der Carbonsäure zeigt sich an der Abwesenheit der Carbonylvalenzschwingung bei ca. 1720 cm^{-1} und dem gleichzeitigen Auftreten einer Carbonyl-Absorptionsbande bei etwa 1800 cm^{-1} . Die Lösung des Säurechlorids wird von der wässrigen Phase abdekantiert und in einen trockenen 50-mL Rundkolben überführt. Nach zweimaligem Nachspülen des Reaktionskolbens mit Toluol werden die vereinigten organischen Phasen am Rotationsverdampfer eingeeengt, um Lösungsmittel und überschüssiges Oxalylchlorid zu entfernen.

Der Rückstand wird in 10 ml wasserfreiem Dichlormethan gelöst und zu einer eisgekühlten Lösung von 3 mmol des Anilins **LVIIIa** (auch als Trifluoracetat) oder **LVIIIb** und 0,48 ml trockenem Pyridin (6 mmol) in 10 ml wasserfreiem Dichlormethan hinzugegeben. Anschließend wird die Eiskühlung entfernt und die Lösung bei Raumtemperatur 12 Stunden gerührt. Die Entstehung des Reaktionsprodukts wird mittels Dünnschichtchromatographie und IR-Spektroskopie überprüft. Nach vollständiger Umsetzung des Carbonsäurechlorids zum Amid wird die Lösung mit 10 ml Wasser, 2x 10 ml 5 %iger Zitronensäurelösung und 10 ml Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Das Produkt wird zur Kristallisation gekühlt gelagert. Feste Produkte werden durch Umkristallisation aus Ethylacetat/*n*-Hexan oder Waschen mit Ethylacetat/*n*-Hexan gereinigt, bei Ölen erfolgt die Reinigung durch Chromatographie an Kieselgel mit Ethylacetat als Elutionsmittel.

AAV 2: Abspaltung der Benzylschutzgruppe bzw. Reduktion der Nitrogruppe zur Gewinnung der Anilin- und Phenol-Derivate 5a,b, 6a,b, 7 und 8a,b sowie der Zielverbindungen 13b und 15a,b

1 mmol der ausgewählten Benzyl- oder Nitroverbindung (**1a,b**, **2a,b**, **3a**, **4a,b**, **9** oder **11a,b**) wird in einem Druckgefäß in 20 ml Methanol gelöst und mit 15–20 % (w/w) Palladium auf Aktivkohle (10 %) versetzt. Das Gefäß wird mehrmals evakuiert und anschließend mit Wasserstoff befüllt, die Reaktion erfolgt unter einem Wasserstoff-Überdruck von 2 bar bei Raumtemperatur. Nach 1–2 Stunden wird der Reaktionsfortschritt dünnschichtchromatographisch überprüft. Ist kein Edukt mehr zu detektieren, wird der Katalysator über Kieselgur abfiltriert. Die Lösung wird unter vermindertem Druck eingeeengt. Das Reaktionsprodukt wird unter Kühlung zur Kristallisation gebracht. Phenole und aromatische Amine mit geschützter Phosphonsäurefunktionalität werden durch Umkristallisation aus Ethylacetat oder Chromatographie an Kieselgel mit Ethylacetat als Elutionsmittel gereinigt. Zielverbindungen mit freier Phosphonsäurefunktionalität werden gegebenenfalls aus Ethylacetat/Isopropanol oder Isopropanol/Wasser umkristallisiert.

AAV 3: Diethylphosphonat-Hydrolyse zur Gewinnung der freien Phosphonsäuren 9, 10, 11a,b und 12 sowie der Zielverbindungen 13a und 14a,b

1 mmol des ausgewählten Diethylphosphonats (**1b**, **2a**, **3a,b**, **4a,b**, **5a** oder **6a,b**) wird in 5 ml über Calciumhydrid getrocknetem Dichlormethan gelöst. Das Reaktionsgefäß wird mit Stickstoff begast. Unter Eiskühlung werden bei freien Phenolen 0,80 ml (6 mmol) und bei geschützten Phenolen sowie aromatischen Nitro- und Aminoverbindungen jeweils 0,66 ml (5 mmol) Trimethylsilylbromid über eine Spritze zugetropft. Das Reaktionsgefäß wird dicht verschlossen und der Ansatz wird eine Stunde unter Eiskühlung gerührt. Anschließend wird die Eiskühlung entfernt, um weitere 12 Stunden bei Raumtemperatur zu rühren. Unter vermindertem Druck wird das Lösungsmittel entfernt, der ölige Rückstand wird in 5 ml trockenem Tetrahydrofuran gelöst. 0,05–0,06 ml Wasser (3–4 mmol) werden zugegeben und die Lösung wird anschließend bei offenem Reaktionskolben 30–60 Minuten gerührt. Danach wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand wird im Hochvakuum über Nacht getrocknet. Kristallisiert das Produkt, evtl. nach Zugabe von Ethylacetat oder Diethylether, erfolgt gegebenenfalls eine Reinigung durch Umkristallisation aus Isopropanol/Ethylacetat. Andernfalls wird die Substanz in 30 ml Ethylacetat oder Dichlormethan aufgenommen und zweimal mit 2 ml verdünnter Salzsäurelösung (1 mol/l) gewaschen. Nach Trocknen über Magnesiumsulfat und Filtration wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Zur Unterstützung des Kristallisationsvorgangs wird die Substanz gekühlt gelagert. Die Kristalle werden anschließend mit Ethylacetat/Diethylether oder Ethylacetat/*n*-Hexan gewaschen.

AAV 4: Synthese der Diethyl-((dihalogenphenyl)(hydroxy)methyl)phosphonate 16a-c

Zu 10 mmol des ausgewählten aromatischen Aldehyds **LXXVf,g** oder **h** werden 1,4 ml Diethylphosphit (11 mmol) gegeben. Anschließend werden unter Eiskühlung 3,1 ml Triethylamin (22 mmol) zugegeben und das Reaktionsgemisch wird bei Raumtemperatur gerührt. Die Umsetzung des Aldehyds wird infrarotspektroskopisch und dünnschichtchromatographisch kontrolliert. Ist kein Aldehyd mehr vorhanden, wird das Reaktionsgemisch in 50 ml Ethylacetat aufgenommen und mit 3x 15 ml verdünnter Salzsäurelösung (1 mol/l) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und eingengt. Kristallisiert das Produkt unter Kühlung aus, werden die Kristalle mit Diethylether/Petrolether (1:1) gewaschen. Die Reinigung von Ölen erfolgt durch Chromatographie an Kieselgel mit Ethylacetat als Elutionsmittel.

AAV 5: Synthese der Benzylester 17a-k aus den Hydroxyphosphonaten 16a-c und LXXIIa-h

5 mmol des ausgewählten Hydroxyphosphonats **16** oder **LXXII** werden in 5 ml trockenem Dimethylformamid gelöst und mit 0,96 ml Bromessigsäurebenzylester (6 mmol) versetzt. Unter Rühren werden 1,74 g neutrales Silberoxid hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wird bei Raumtemperatur unter Feuchtigkeitsausschluss 12 Stunden gerührt. Anschließend wird der Feststoff über Kieselgur abfiltriert, mit Ethylacetat nachgespült, das Filtrat wird unter vermindertem Druck eingengt. Der Rückstand wird in 50 ml Ethylacetat gelöst und mit 3x 10 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und eingengt. Das Rohprodukt wird durch Chromatographie an Kieselgel (Elutionsmittel: Ethylacetat oder Ethylacetat/*n*-Hexan (1:1 – 1:0)) gereinigt.

AAV 6: Katalytische Hydrogenolyse der Benzylester 17a-k zu den Carbonsäuren 18a-k

1 mmol des ausgewählten Benzylesters **17** wird in 30 ml Ethylacetat oder Methanol gelöst und mit 15–20 % (w/w) Palladium auf Aktivkohle (10%) versetzt. Das Reaktionsgefäß wird mehrmals evakuiert und wieder mit Wasserstoff befüllt. Anschließend wird die Suspension unter atmosphärischem Wasserstoffdruck bei Raumtemperatur mehrere Stunden geschüttelt. Sobald die vollständige Hydrolyse der Benzylester dünnschichtchromatographisch nachzuweisen ist, wird der Katalysator über Kieselgur abfiltriert. Nach Einengen der Lösung unter vermindertem Druck wird ein Öl erhalten, welches in den meisten Fällen bei gekühlter Lagerung langsam auskristallisiert. Gegebenenfalls wird Diethylether zugegeben, um die Kristallisation zu beschleunigen. Eine weitere Reinigung ist in der Regel nicht erforderlich.

AAV 7: Synthese der N-benzylgeschützten Phosphonohydroxamsäuren 19a-e, 20a-k und 21 aus den Carbonsäuren 18a-k und den Hydroxylaminen LXXa-c

5 mmol der ausgewählten Carbonsäure **18** werden in 20 ml trockenem Dichlormethan gelöst und mit 0,89 g Carbonyldiimidazol (5,5 mmol) versetzt. Unter Feuchtigkeitsausschluss wird bei Raumtemperatur 30–60 Minuten gerührt, bis die Gasentwicklung beendet ist. Dann werden 5 mmol des O-benzylgeschützten Hydroxylamins **LXXa,b** oder **c**, gelöst in etwa 5 mL trockenem Dichlormethan, zum Reaktionsansatz gegeben. Es wird weiter bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsfortschritt wird mittels Dünnschichtchromatographie und IR-Spektroskopie überprüft. Ist die Carbonyl-Absorptionsbande der Carbonsäure verschwunden und statt dessen eine Hydroxamsäure-Carbonylbande im Bereich von 1680 cm^{-1} aufgetreten, wird die Reaktionslösung mit 10 ml Wasser versetzt und unter vermindertem Druck eingeeengt. Der Rückstand wird in 30 ml Ethylacetat aufgenommen und nacheinander mit 3x 15 ml 10 %iger Zitronensäurelösung, 10 ml gesättigter Natriumcarbonatlösung und 10 ml Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über Magnesiumsulfat wird diese filtriert und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Gegebenenfalls wird das Produkt chromatographisch an Kieselgel mit Ethylacetat als Elutionsmittel gereinigt.

AAV 8: Katalytische Hydrogenolyse der Benzylester-Schutzgruppen von 19a,d,e, 20a-k und 21 zur Gewinnung der Hydroxamsäuren 22a-c, 23a-k und 24

1 mmol der ausgewählten O-benzylgeschützten Hydroxamsäure **19-21** wird in 30 ml Methanol gelöst und mit 15–20 % (w/w) Palladium auf Aktivkohle (10 %) versetzt. Das Reaktionsgefäß wird evakuiert und anschließend mit Wasserstoff befüllt. Bei atmosphärischem Druck und Raumtemperatur wird die Suspension 1–2 Stunden geschüttelt, bis dünnschichtchromatographisch keine Ausgangssubstanz mehr nachweisbar ist. Die Anwesenheit der Hydroxamsäurefunktionalität wird außerdem durch eine Tüpfelprobe mit 1 %iger methanolischer Eisen(III)-chlorid Lösung überprüft: eine dunkel violette Färbung zeigt ein positives Ergebnis an. Der Katalysator wird durch Filtration über Kieselgur abgetrennt, Katalysator-Rückstände werden gegebenenfalls durch Filtration über eine kleine Menge Kieselgel entfernt. Die Lösung wird eingeeengt und das Produkt kristallisiert bei gekühlter Lagerung aus. Gegebenenfalls wird das Produkt aus Ethylacetat umkristallisiert, eine weitere Reinigung ist in den meisten Fällen jedoch nicht erforderlich.

AAV 9: Synthese der Dibenzylphosphonate 25a-d aus den Diethylphosphonaten 19a-d

3 mmol des ausgewählten Diethylphosphonats **19** werden in 15 ml trockenem Dimethylformamid gelöst und unter Eiskühlung und Schutzgasatmosphäre mit 1,98 ml Bromtrimethylsilan (15 mmol) versetzt. Der Reaktionskolben wird verschlossen und das Reaktionsgemisch wird für eine Stunde bei 0 °C und weitere 23 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wird in 10–15 ml trockenem Tetrahydrofuran gelöst und nach Zugabe von 0,15–0,18 ml Wasser (9–10 mmol) bei offenem Kolben 30–60 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wird das zurückbleibende Öl über Nacht im Hochvakuum getrocknet.

Die Substanz wird in 15 ml Benzen gelöst und es werden 1,89 g nach Lit.³⁹⁰ hergestellter *O*-Benzyl-*N,N'*-Dicyclohexylisoharnstoff **LXXXVI** (6 mmol) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 4 Stunden unter Rückfluss erhitzt und die entstandene Suspension wird nach Abkühlen am Rotationsverdampfer eingengt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wird der Rückstand unter Kühlung in 30 ml Ethylacetat aufgenommen und zur möglichst vollständigen Ausfällung des Nebenproduktes über Nacht gekühlt gelagert. Nach dem Abfiltrieren des Nebenprodukts wird die Lösung mit 10 ml Wasser und 3x 20 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck eingengt. Das erhaltene Öl wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit einem Elutionsmittelgradienten von Ethylacetat/*n*-Hexan (3:7–6:4) gereinigt.

AAV 10: Hydrogenolyse der tris-benzylgeschützten Phosphonohydroxamsäuren 25a-d zu den Zielverbindungen 26a-d

0,5 mmol der benzylgeschützten Phosphonohydroxamsäure **25** werden in 30 ml Methanol gelöst und mit 15–20 % (w/w) Palladium auf Aktivkohle (10 %) versetzt. Das Reaktionsgefäß wird mehrfach evakuiert und mit Wasserstoff befüllt und die Suspension bei Raumtemperatur unter atmosphärischem Wasserstoffdruck 1–2 Stunden geschüttelt. Die Vollständigkeit der Umsetzung wird mittels Dünnschichtchromatographie überprüft und die Freisetzung der Hydroxamsäure durch eine Tüpfelprobe mit 1 %iger methanolischer Eisen(III)-chlorid-Lösung nachgewiesen. Nach vollständiger Umsetzung wird der Katalysator über Kieselgur abfiltriert und die Lösung unter vermindertem Druck eingengt. Der Rückstand wird anschließend über Nacht im Hochvakuum getrocknet. Das erhaltene Öl schäumt dabei auf und wird fest.

AAV 11: Herstellung der freien Phosphonsäuren 29a-c und der Zielverbindungen 26e, 27a-k und 28 durch TMSBr-vermittelte Hydrolyse der Diethylphosphonate 19a, 20a, 21 sowie 22c, 23a-k und 24

1 mmol des ausgewählten Phosphonsäurediethylesters **19-24** wird unter Schutzgasatmosphäre in 5–10 ml über Calciumhydrid getrocknetem Dichlormethan gelöst. Nachdem die Lösung im Eisbad auf 0 °C gekühlt wurde, werden 0,79 ml (6 mmol) Trimethylsilylbromid zugegeben. Der Reaktionskolben wird anschließend luftdicht verschlossen und der Ansatz eine Stunde unter Eiskühlung und weitere 23 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Unter vermindertem Druck wird dann das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand wird in 5–10 ml trockenem Tetrahydrofuran gelöst. Nach Zugabe von 0,05–0,06 ml Wasser (3–4 mmol) wird die Lösung 30–60 Minuten bei offenem Kolben gerührt. Anschließend wird die Lösung am Rotationsverdampfer eingeengt und der Rückstand über Nacht im Hochvakuum getrocknet. Das erhaltene Öl wird in einer kleinen Menge Ethylacetat, in einigen Fällen auch in etwas Dichlormethan gelöst und kristallisiert bei Raumtemperatur langsam aus. Tritt keine Kristallisation ein, wird das Lösungsvolumen auf 20–30 ml Ethylacetat vergrößert. Die Lösung wird zweimal mit 1–2 ml verdünnter Salzsäurelösung (1–2 mol/l) gewaschen, die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und nach Filtration unter vermindertem Druck konzentriert. Aus der erhaltenen Lösung kristallisiert das Produkt aus.

AAV 12: Synthese der benzylgeschützten Phosphonsäurediester-Prodrugs 32a,b, 33 und 34 aus den geschützten Phosphonohydroxamsäuren 20g und 20h

4 mmol des Diethylphosphonats **20g** oder **h** werden unter Schutzgasatmosphäre in 20 ml über Calciumhydrid getrocknetem Dichlormethan gelöst und unter Eiskühlung mit 2,64 ml Trimethylsilylbromid (20 mmol) versetzt. Die Lösung wird unter Luftausschluss erst eine Stunde bei 0 °C und dann weitere 23 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels und des überschüssigen Reagenzes unter vermindertem Druck wird der Rückstand in 10 ml wasserfreiem Tetrahydrofuran gelöst und mit 0,15 ml Wasser (8 mmol) versetzt. Das Gemisch wird 30–60 Minuten gerührt und anschließend am Rotationsverdampfer eingeengt. Der Rückstand wird über Nacht im Hochvakuum getrocknet.

Das Rohprodukt wird in 15 ml trockenem Dimethylformamid gelöst und mit 1,66 ml Triethylamin (12 mmol) versetzt. Nach zehnmütigem Rühren bei Raumtemperatur werden 40 mmol **XCVIIa,b** oder **c** zu der Lösung gegeben. Unter Feuchtigkeitsausschluss wird der Reaktionsansatz bei 70 °C gerührt. Nach 2 und 4 Stunden werden jeweils weitere 0,55 ml Triethylamin (4 mmol) und 6–7 mmol Alkylierungsreagenz zugegeben. Nach insgesamt 6 Stunden Rühren bei 70 °C wird die Heizquelle entfernt und der Ansatz wird weitere 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden 120 ml Diethylether zugegeben und die organische Phase mit 60 ml Wasser, 2x 60 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und ein weiteres Mal mit 60 ml Wasser gewaschen. Nach Trocknen

über Magnesiumsulfat wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Öl wird durch Chromatographie an Kieselgel mit Diethylether als Elutionsmittel gereinigt.

AAV 13: Abspaltung der Benzylschutzgruppen aus 32a,b, 33 und 34 zur Gewinnung der Phosphonsäure-Prodrugs 35a,b, 36 und 37

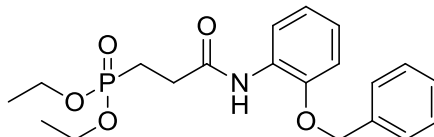
0,5 mmol der benzylgeschützten Hydroxamsäure **32-34** werden in 20 ml Methanol, im Falle der chlorierten Verbindung in 30 ml Ethylacetat, gelöst. Es werden 15–20 % (w/w) Palladium auf Aktivkohle (10 %) hinzugegeben. Das Reaktionsgefäß wird wiederholt evakuiert und mit Wasserstoff begast. Bei einem atmosphärischen Wasserstoffdruck wird die Suspension eine Stunde (bei **32b** 4–5 Stunden) bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Entstehung der freien Hydroxamsäure kann dünnschichtchromatographisch, infrarotspektroskopisch und mittels Tüpfelprobe mit 1 %iger methanolischer Eisen(III)-chloridlösung nachgewiesen werden. Ist die Umsetzung vollständig, wird der Katalysator über Kieselgur abfiltriert. Das nach Einengen der Lösung am Rotationsverdampfer erhaltene Öl wird gegebenenfalls durch Chromatographie an Kieselgel mit Ethylacetat als Elutionsmittel gereinigt.

AAV 14: Synthese der N-Ethoxycarbonyl- und N-Ethylcarbamoyl-Prodrugs 38 und 39 aus dem Bis-POM-Prodrug 35a

0,3 mmol **35a** werden in 5 ml trockenem Dichlormethan gelöst. Nach Zugabe von 0,05 ml Triethylamin (0,3 mmol) wird die Lösung unter Feuchtigkeitsausschluss im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Über eine Spritze wird langsam eine Lösung von 0,3 mmol Ethylchloroformiat (**XCVIII**) oder Ethylisocyanat (**XCIX**) in 3 ml trockenem Dichlormethan zugetropft. Nach 10 Minuten wird die Eiskühlung entfernt und der Ansatz bei Raumtemperatur weiter gerührt. Falls die Umsetzung nach 30 Minuten noch nicht vollständig ist, werden noch 0,01–0,02 ml Reagenz hinzugegeben. Sobald mittels Dünnschichtchromatographie und Infrarotspektroskopie eine vollständige Umsetzung nachgewiesen werden kann, wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Öl wird in 30 ml Ethylacetat gelöst und die organische Phase mit 2x 10 ml Wasser gewaschen. Nach Trocknen über Magnesiumsulfat wird die Lösung am Rotationsverdampfer eingeeengt. Das Produkt wird durch Chromatographie an Kieselgel mit einem Elutionsmittelgemisch von Ethylacetat/*n*-Hexan (1:1) gereinigt.

5.3 Analytische Daten der Verbindungen aus Kapitel 2

Diethyl-(2-((2-(benzyloxy)phenyl)amino)-2-oxoethyl)phosphonat **1a**



Hergestellt aus 0,63 g 3-Diethoxyphosphorylpropansäure (3 mmol) und 0,60 g 2-Benzyloxyanilin (3 mmol) nach **AAV 1**.

Ausbeute 51 %, farblose Kristalle

Schmelzpunkt 87 °C

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3348 (N-H), 2978 (C-H_{aliph.}), 1672 (C=O, Amid I), 1540 (Amid II), 1255 (P=O), 1055/1031 (P-O)

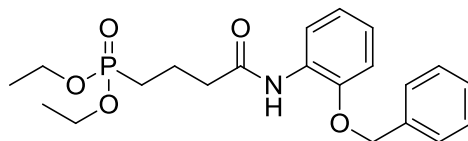
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.30 (t, J =7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃), 2.12–2.22 (m, 2H, PCH₂), 2.60–2.68 (m, 2H, PCH₂CH₂), 4.02–4.16 (m, 4H, POCH₂CH₃), 5.12 (s, 2H, OCH₂Ph), 6.92–7.24 (m, 3H, arom.), 7.34–7.50 (m, 5H, arom.), 7.85 (s, 1H, NH), 8.36 (d, J =7.5 Hz, 1H, arom.)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 16.41 (d, ³ $J_{C,P}$ =6.0 Hz, POCH₂CH₃), 21.09 (d, ¹ $J_{C,P}$ =144.0 Hz, PCH₂), 30.61 (d, ² $J_{C,P}$ =3.3 Hz, PCH₂CH₂), 61.81 (d, ² $J_{C,P}$ =6.4 Hz, POCH₂CH₃), 71.02 (OCH₂Ph), 111.74 (C₆H₄: C3), 120.00 (C₆H₄: C6), 121.50 (C₆H₄: C5), 123.82 (C₆H₄: C4), 127.63 (C₆H₅: C2, C6), 127.83 (C₆H₄: C1), 128.43 (C₆H₅: C4), 128.84 (C₆H₅: C3, C5), 136.29 (C₆H₅: C1), 147.04 (C₆H₄: C2), 168.92 (d, ³ $J_{C,P}$ =17.2 Hz, C=O)

C₂₀H₂₆NO₅P (391.40)

Berechnet (%) C 61.37 H 6.70 N 3.58

Gefunden (%) C 61.15 H 6.62 N 3.50

Diethyl-(4-((2-(benzyloxy)phenyl)amino)-4-oxobutyl)phosphonat **1b**

Hergestellt aus 0,67 g 4-Diethoxyphosphorylbutansäure (3 mmol) und 0,78 g 2-Benzyloxyanilin (3 mmol) nach **AAV 1** und anschließender Säulenchromatographie an Kieselgel (Ethylacetat).

Ausbeute 73 %, gelbes Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3420 (N-H), 2981 (C-H_{aliph.}), 1682 (C=O, Amid I), 1526 (Amid II), 1259 (P=O), 1052/1026 (P-O)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.30 (t, J =7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃), 1.80–1.88, 1.97–2.08 (2m, 4H, PCH₂CH₂), 2.49 (t, J =7.2 Hz, 2H, PCH₂CH₂CH₂), 4.03–4.15 (m, 4H, POCH₂CH₃), 5.13 (s, 2H, OCH₂Ph), 6.92–6.96 (m, 1H, arom.), 6.98 (dd, J =7.7, 1.4 Hz, 1H, arom.), 6.00–7.04 (m, 1H, arom.), 7.34–7.39 (m, 1H, arom.), 7.39–7.43 (m, 3H, arom.), 7.85 (s, 1H, NH), 8.37 (dd, J =7.9, 0.9 Hz, 1H, arom.)

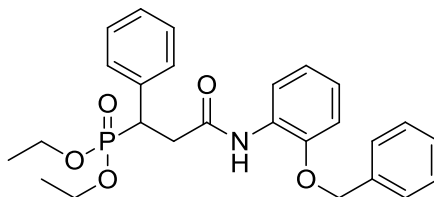
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 16.46 (d, ³ $J_{C,P}$ =6.1 Hz, POCH₂CH₃), 18.60 (d, ² $J_{C,P}$ =4.8 Hz, PCH₂CH₂), 24.73 (d, ¹ $J_{C,P}$ =141.0 Hz, PCH₂), 37.60 (d, ³ $J_{C,P}$ =13.9 Hz, PCH₂CH₂CH₂), 61.58 (d, ² $J_{C,P}$ =6.5 Hz, POCH₂CH₃), 70.95 (OCH₂Ph), 111.76 (C₆H₄: C3), 120.12 (C₆H₄: C6), 121.49 (C₆H₄: C5), 123.73 (C₆H₄: C4), 127.56 (C₆H₅: C2, C6), 127.91 (C₆H₄: C1), 128.36 (C₆H₅: C4), 128.80 (C₆H₅: C3, C5), 136.41 (C₆H₅: C1), 147.08 (C₆H₄: C2), 170.06 (C=O)

C₂₁H₂₈NO₅P (405.42)

Berechnet (%) C 62.21 H 6.96 N 3.45

Gefunden (%) C 61.96 H 7.13 N 3.49

Diethyl-(3-((2-(benzyloxy)phenyl)amino)-3-oxo-1-phenylpropyl)phosphonat **2a**



Hergestellt aus 2,86 g 3-Diethoxyphosphoryl-3-phenylpropansäure (10 mmol) und 1,99 g 2-Benzyloxyanilin (10 mmol) nach **AAV 1** und anschließender Umkristallisation aus Ethylacetat/*n*-Hexan.

Ausbeute 70 %, farblose Kristalle

Schmelzpunkt 92 °C

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3282 (N-H), 3031 (C-H_{arom.}), 2981/2910 (C-H_{aliph.}), 1673 (C=O, Amid I), 1531 (Amid II), 1248 (P=O), 1048/1021 (P-O)

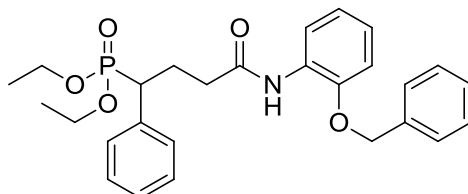
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.05 (t, J =7.1 Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.27 (t, J =7.1 Hz, 3H, POCH₂CH₃), 2.92 (dt, J =15.4, 10.6 Hz, 1H, PCHCH₂), 3.15 (ddd, J =15.3, 10.8, 4.6 Hz, 1H, PCHCH₂), 3.62–3.72 (m, 1H, POCH₂CH₃), 3.78 (ddd, J =22.1, 10.0, 4.6 Hz, 1H, PCH), 3.83–3.92 (m, 1H, POCH₂CH₃), 4.01–4.13 (m, 2H, POCH₂CH₃), 5.06 (dd, J =15.9, 11.8 Hz, 2H, OCH₂Ph), 6.85–6.92 (m, 2H, arom.), 6.59 (dt, J =7.7, 1.0 Hz, 1H, arom.), 7.14–7.30 (m, 3H, arom.), 7.35–7.45 (m, 7H, arom.), 7.73 (s, 1H, NH), 8.26 (dd, J =8.1, 0.8 Hz, 1H, arom.)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 16.16 (d, ³ $J_{C,P}$ =5.8 Hz, POCH₂CH₃), 16.36 (d, ³ $J_{C,P}$ =5.8 Hz, POCH₂CH₃), 38.62 (PCHCH₂), 40.38 (d, ¹ $J_{C,P}$ =139.9 Hz, PCH), 62.01 (d, ² $J_{C,P}$ =7.0 Hz, POCH₂CH₃), 63.01 (d, ² $J_{C,P}$ =7.0 Hz, POCH₂CH₃), 70.83 (OCH₂Ph), 111.58 (C₆H₄: C3), 119.98 (C₆H₄: C6), 121.34 (C₆H₄: C5), 123.71 (C₆H₄: C4), 127.47 (d, $J_{C,P}$ =2.7 Hz), 127.55 (C₆H₅: C2, C6), 127.72 (C₆H₄: C1), 128.40 (C₆H₅: C4), 128.65 (d, $J_{C,P}$ =2.3 Hz, 2C), 128.82 (C₆H₅: C3, C5), 129.13 (d, $J_{C,P}$ =6.5 Hz, 2C), 135.40 (d, $J_{C,P}$ =6.6 Hz), 136.33 (Benzyl: C1), 146.89 (C₆H₄: C2), 167.87 (C=O)

C₂₆H₃₀NO₅P (467.49)

Berechnet (%) C 66.80 H 6.47 N 3.00

Gefunden (%) C 66.60 H 6.54 N 3.10

Diethyl-(4-((2-(benzyloxy)phenyl)amino)-4-oxo-1-phenylbutyl)phosphonat **2b**

Hergestellt aus 3,00 g 4-Diethoxyphosphoryl-4-phenylbutansäure (10 mmol) und 1,99 g 2-Benzoyloxyanilin (10 mmol) nach **AAV 1** und anschließender Säulenchromatographie an Kieselgel (Ethylacetat).

Ausbeute 96 %, gelbes Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3422 (N-H), 2982 (C-H_{aliph.}), 1682 (C=O, Amid I), 1526 (Amid II), 1247 (P=O), 1051/1027 (P-O)

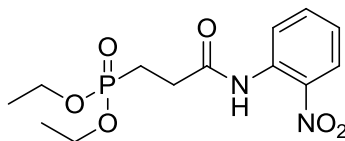
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.09 (t, $J=7.0$ Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.28 (t, $J=7.1$ Hz, 3H, POCH₂CH₃), 2.14–2.23, 2.26–2.39, 2.50–2.60 (3m, 4H, PCHCH₂CH₂), 3.16 (ddd, $J=22.1, 10.4, 4.1$ Hz, 1H, PCH), 3.68–3.78 (m, 1H, POCH₂CH₃), 3.85–3.94 (m, 1H, POCH₂CH₃), 4.01–4.10 (m, 2H, POCH₂CH₃), 5.09 (s, 2H, OCH₂Ph), 6.91 (dd, $J=7.8, 1.6$ Hz, 1H, arom.), 6.94–7.02 (m, 2H, arom.), 7.21–7.40 (m, 10H, arom.), 7.64 (s, 1H, NH), 8.37 (dd, $J=7.7, 1.4$ Hz, 1H, arom.)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 16.24 (d, $^3J_{C,P}=5.7$ Hz, POCH₂CH₃), 16.42 (d, $^3J_{C,P}=6.1$ Hz, POCH₂CH₃), 25.70 (d, $^2J_{C,P}=1.5$, PCHCH₂), 35.24 (d, $^3J_{C,P}=14.7$ Hz, PCHCH₂CH₂), 43.46 (d, $^1J_{C,P}=137.6$ Hz, PCH), 61.96 (d, $^2J_{C,P}=7.3$ Hz, POCH₂CH₃), 62.57 (d, $^2J_{C,P}=6.8$ Hz, POCH₂CH₃), 70.91 (OCH₂Ph), 111.74 (C₆H₄: C3), 120.04 (C₆H₄: C6), 121.50 (C₆H₄: C5), 123.64 (C₆H₄: C4), 127.34 (d, $J_{C,P}=2.8$ Hz), 127.46 (C₆H₅: C2, C6), 127.92 (C₆H₄: C1), 128.31 (C₆H₅: C4), 128.64 (d, $J_{C,P}=2.3$ Hz, 2C), 128.78 (C₆H₅: C3, C5), 129.33 (d, $J_{C,P}=6.9$ Hz, 2C), 135.54 (d, $J_{C,P}=7.0$ Hz), 136.38 (Benzyl: C1), 146.96 (C₆H₄: C2), 170.07 (C=O)

C₂₇H₃₂NO₅P (481.52)

Berechnet (%) C 67.35 H 6.70 N 2.91

Gefunden (%) C 67.09 H 6.77 N 2.93

Diethyl-(3-((2-nitrophenyl)amino)-3-oxopropyl)phosphonat **3a**

Hergestellt aus 0,95 g 3-Diethoxyphosphorylpropansäure (4,5 mmol) und 0,62 g 2-Nitroanilin (4,5 mmol) nach **AAV 1** und anschließender Reinigung des Produkts durch Waschen mit *n*-Hexan/Ethylacetat (1:1) und *n*-Hexan.

Ausbeute 77 %, gelbe Kristalle

Schmelzpunkt 108 °C

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3183/3122 (N-H), 3054/3018 (C-H_{arom.}), 2981 (C-H_{aliph.}), 1704 (C=O, Amid I), 1549/1534 (Amid II), 1212 (P=O), 1025 (P-O)

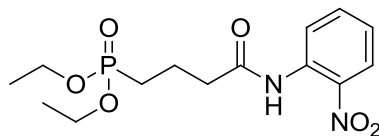
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.34 (t, *J*=7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃), 2.20 (ddd, *J*=17.9, 8.8, 7.0 Hz, 2H, PCH₂), 2.79 (ddd, *J*=12.4, 9.0, 7.0 Hz, 2H, PCH₂CH₂), 4.07–4.19 (m, 4H, POCH₂CH₃), 7.20 (ddd, *J*=8.4, 7.4, 1.1 Hz, 1H, arom. H4), 7.66 (ddd, *J*=8.6, 7.3, 1.4 Hz, 1H, arom. H5), 8.22 (dd, *J*=8.5, 1.4 Hz, 1H, arom. H6), 8.74 (dd, *J*=8.4, 0.8 Hz, 1H, arom. H3), 10.40 (s, 1H, NH)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 16.44 (d, ³*J*_{C,P}=6.1 Hz, POCH₂CH₃), 20.96 (d, ¹*J*_{C,P}=144.8 Hz, PCH₂), 31.45 (d, ²*J*_{C,P}=3.7 Hz, PCH₂CH₂), 61.92 (d, ²*J*_{C,P}=6.4 Hz, POCH₂CH₃), 122.28, 123.46, 125.80, 134.58, 135.99, 136.49, 170.03 (d, ³*J*_{C,P}=16.5 Hz, C=O)

C₁₃H₁₉N₂O₆P (330.27)

Berechnet (%) C 47.28 H 5.80 N 8.48

Gefunden (%) C 47.15 H 5.83 N 8.44

Diethyl-(4-((2-nitrophenyl)amino)-4-oxobutyl)phosphonat **3b**

Hergestellt aus 0,67 g 4-Diethoxyphosphorylbutansäure (3 mmol) und 0,41 g 2-Nitroanilin (3 mmol) nach **AAV 1** und anschließender Säulenchromatographie über Kieselgel (Ethylacetat).

Ausbeute 76 %, gelbes Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3364 (N-H), 2924 (C-H_{aliph.}), 1693 (C=O, Amid I), 1526 (Amid II), 1210 (P=O), 1051/1030 (P-O)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.34 (t, J =7.0 Hz, 6H, POCH₂CH₃), 1.83–1.92, 2.03–2.13 (2m, 4H, PCH₂CH₂), 2.64 (t, J =7.2 Hz, 2H, PCH₂CH₂CH₂), 4.06–4.19 (m, 4H, POCH₂CH₃), 7.19 (dd, J =8.3, 7.4 Hz, 1H, arom. H4), 7.66 (t, J =7.9 Hz, 1H, arom. H5), 8.22 (d, J =8.4 Hz, 1H, arom. H6), 8.76 (d, J =8.5 Hz, 1H, arom. H3), 10.35 (s, 1H, NH)

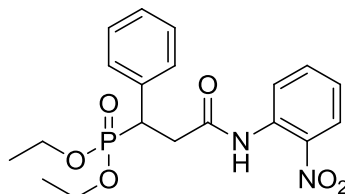
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 16.49 (d, ³ $J_{C,P}$ =6.0 Hz, POCH₂CH₃), 18.38 (d, ² $J_{C,P}$ =4.8 Hz, PCH₂CH₂), 24.80 (d, ¹ $J_{C,P}$ =141.6 Hz, PCH₂), 38.22 (d, ³ $J_{C,P}$ =14.1 Hz, PCH₂CH₂CH₂), 61.67 (d, ² $J_{C,P}$ =6.5 Hz, POCH₂CH₃), 122.29, 123.32, 125.77, 134.70, 135.95, 136.45, 171.03 (C=O)

C₁₄H₂₁N₂O₆P (344.30)

Berechnet (%) C 48.84 H 6.15 N 8.14

Gefunden (%) C 48.87 H 6.14 N 7.96

Diethyl-(3-((2-(benzyloxy)phenyl)amino)-3-oxo-1-phenylpropyl)phosphonat **4a**



Hergestellt aus 2,86 g 3-Diethoxyphosphoryl-3-phenylpropansäure (10 mmol) und 1,38 g 2-Nitroanilin (10 mmol) nach **AAV 1**.

Ausbeute 93 %, gelbe Kristalle

Schmelzpunkt 125 °C

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3256 (N-H), 2987 (C-H_{aliph.}), 1706 (C=O, Amid I), 1532 (Amid II), 1221 (P=O), 1054/1023 (P-O)

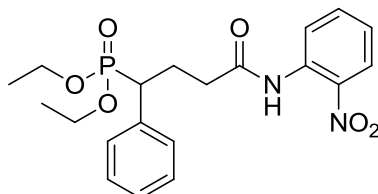
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.10 (t, J =7.1 Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.30 (t, J =7.1 Hz, 3H, POCH₂CH₃), 3.09 (dt, J =15.6, 10.5 Hz, 1H, PCHCH₂), 3.28 (ddd, J =15.1, 10.2, 4.6 Hz, 1H, PCHCH₂), 3.71–3.78 (m, 1H, POCH₂CH₃), 3.79 (ddd, J =22.5, 10.3, 4.7 Hz, 1H, PCH), 3.88–3.93 (m, 1H, POCH₂CH₃), 4.03–4.15 (m, 2H, POCH₂CH₃), 7.14 (ddd, J =8.3, 7.1, 0.9 Hz, 1H, C₆H₄: H4), 7.22–7.27 (m, 1H, C₆H₅), 7.32 (t, J =7.6 Hz, 2H, C₆H₅), 7.40–7.43 (m, 2H, C₆H₅), 7.57 (ddd, J =8.6, 7.3, 1.4 Hz, 1H, C₆H₄: H5), 8.16 (dd, J =8.5, 1.4 Hz, 1H, C₆H₄: H6), 8.62 (dd, J =8.5, 0.7 Hz, 1H, C₆H₄: H3), 10.29 (s, 1H, NH)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 16.20 (d, $^3J_{C,P}$ =5.7 Hz, POCH₂CH₃), 16.40 (d, $^3J_{C,P}$ =5.8 Hz, POCH₂CH₃), 39.27 (d, $^2J_{C,P}$ =1.1 Hz, PCHCH₂), 40.44 (d, $^1J_{C,P}$ =140.7 Hz, PCH), 62.18 (d, $^2J_{C,P}$ =7.3 Hz, POCH₂CH₃), 63.04 (d, $^2J_{C,P}$ =7.1 Hz, POCH₂CH₃), 122.25, 123.38, 125.67, 127.63 (d, $J_{C,P}$ =2.8 Hz), 128.75 (d, $J_{C,P}$ =2.1 Hz, 2C), 129.06 (d, $J_{C,P}$ =6.4 Hz, 2C), 134.40, 135.01 (d, $J_{C,P}$ =6.8 Hz), 135.84, 136.36, 169.00 (d, $^3J_{P,C}$ =18.0 Hz, C=O)

C₁₉H₂₃N₂O₆P (406.37)

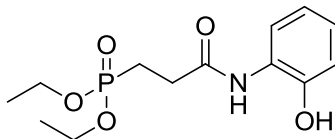
Berechnet (%) C 56.16 H 5.70 N 6.89

Gefunden (%) C 56.22 H 5.95 N 6.72

Diethyl-(4-((2-nitrophenyl)amino)-4-oxo-1-phenylbutyl)phosphonat **4b**

Hergestellt aus 3,00 g 4-Diethoxyphosphoryl-4-phenylbutansäure (10 mmol) und 1,38 g 2-Nitroanilin (10 mmol) nach **AAV 1** und Reinigung des kristallinen Produktes durch Waschen mit *n*-Hexan.

Ausbeute	93 %, hellgelbe Kristalle		
Schmelzpunkt	193 °C		
IR $\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹)	3171/3110 (N-H), 3001 (C-H _{aliph.}), 1692 (C=O, Amid I), 1528 (Amid II), 1231/1210 (P=O), 1056/1021 (P-O)		
¹ H-NMR	(500 MHz, CDCl ₃) = δ (ppm) 1.11 (t, J =7.1 Hz, 3H, POCH ₂ CH ₃), 1.30 (t, J =7.1 Hz, 3H, POCH ₂ CH ₃), 2.32–2.43, 2.43–2.52, 2.53–2.63 (3m, 4H, PCHCH ₂ CH ₂), 3.16 (ddd, J =22.6, 10.6, 4.7 Hz, 1H, PCH), 3.70–3.79 (m, 1H, POCH ₂ CH ₃), 3.87–3.96 (m, 1H, POCH ₂ CH ₃), 4.02–4.15 (m, 2H, POCH ₂ CH ₃), 7.17 (ddd, J =8.4, 7.2, 1.0 Hz, 1H, C ₆ H ₄ : H4), 7.23–7.37 (m, 5H, C ₆ H ₅), 7.63 (ddd, J =8.6, 7.3, 1.4 Hz, 1H, C ₆ H ₄ : H5), 8.19 (dd, J =8.5, 1.4 Hz, 1H, C ₆ H ₄ : H6), 8.73 (dd, J =8.5, 0.8 Hz, 1H, C ₆ H ₄ : H3), 10.16 (s, 1H, NH)		
¹³ C-NMR	(125 MHz, CDCl ₃) = δ (ppm) 16.25 (d, $^3J_{C,P}$ =5.7 Hz, POCH ₂ CH ₃), 16.44 (d, $^3J_{C,P}$ =5.7 Hz, POCH ₂ CH ₃), 25.46 (d, $^2J_{C,P}$ =1.6 Hz, PCHCH ₂), 36.05 (d, $^3J_{C,P}$ =15.2 Hz, PCHCH ₂ CH ₂), 43.61 (d, $^1J_{C,P}$ =138.2 Hz, PCH), 62.00 (d, $^2J_{C,P}$ =7.2 Hz, POCH ₂ CH ₃), 62.69 (d, $^2J_{C,P}$ =7.0 Hz, POCH ₂ CH ₃), 122.21, 123.22, 125.71, 127.53 (d, $J_{C,P}$ =3.1 Hz), 128.76 (d, $J_{C,P}$ =2.4 Hz, 2C), 129.29 (d, $J_{C,P}$ =6.6 Hz, 2C), 134.67, 135.18 (d, $^2J_{C,P}$ =6.6 Hz), 135.92, 136.30, 171.12 (C=O)		
C ₂₀ H ₂₅ N ₂ O ₆ P	(420.40)		
Berechnet (%)	C 57.14	H 5.99	N 6.66
Gefunden (%)	C 56.88	H 5.97	N 6.59

Diethyl-(3-((2-hydroxyphenyl)amino)-3-oxopropyl)phosphonat **5a**

Hergestellt aus 0,24 g **1a** (0,6 mmol) nach **AAV 2**.

Ausbeute 100 %, farblose Kristalle

Schmelzpunkt 105 °C

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3332 (N-H), 3154 (O-H), 2989 (C-H_{aliph.}), 1688 (C=O, Amid I), 1532 (Amid II), 1209 (P=O), 1029 (P-O)

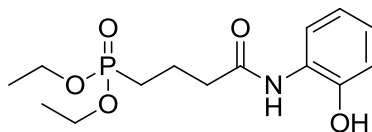
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.32 (t, J =7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃), 2.21 (ddd, J =17.4, 8.4, 7.2 Hz, 2H, PCH₂), 2.77–2.84 (m, 2H, PCH₂CH₂), 4.04–4.16 (m, 4H, POCH₂CH₃), 6.83 (dt, J =7.6, 1.3 Hz, 1H, arom.), 6.99 (dd, J =8.07, 1.1 Hz, 1H, arom.), 7.08 (dt, J =7.7, 1.4 Hz, 1H, arom.), 7.30 (dd, J =7.9, 1.2 Hz, 1H, arom.), 9.21 (br. s, 1H, OH), 9.51 (s, 1H, NH)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 16.36 (d, $^3J_{C,P}$ =5.9 Hz, POCH₂CH₃), 21.01 (d, $^1J_{C,P}$ =143.6 Hz, PCH₂), 29.28 (d, $^2J_{C,P}$ =3.1 Hz, PCH₂CH₂), 62.43 (d, $^2J_{C,P}$ =6.6 Hz, POCH₂CH₃), 118.92 (C₆H₄: C3), 120.01 (C₆H₄: C6), 122.43 (C₆H₄: C5), 126.00 (C₆H₄: C1), 126.58 (C₆H₄: C4), 148.68 (C₆H₄: C2), 170.89 (d, $^3J_{C,P}$ =14.7 Hz, C=O)

C₁₃H₂₀NO₅P (301.28)

Berechnet (%) C 51.83 H 6.69 N 4.65

Gefunden (%) C 52.08 H 6.90 N 4.40

Diethyl-(4-((2-hydroxyphenyl)amino)-4-oxobutyl)phosphonat **5b**

Hergestellt aus 0,41 g **1b** (1 mmol) nach **AAV 2**.

Ausbeute 87 %, gelbliches Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3237 (br., N-H), 2984 (C-H_{aliph.}), 1656 (C=O, Amid I), 1528 (Amid II), 1217 (P=O), 1053/1031 (P-O)

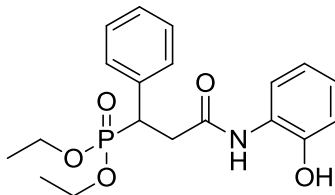
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.34 (t, J =7.0 Hz, 6H, POCH₂CH₃), 1.88 (dt, J =17.7, 6.8 Hz, 2H, PCH₂), 2.08 (ddt, J =19.7, 12.9, 6.5 Hz, 2H, PCH₂CH₂), 2.66 (t, J =6.8 Hz, 2H, PCH₂CH₂CH₂), 4.05–4.17 (m, 4H, POCH₂CH₃), 6.84 (dt, J =7.8, 1.2 Hz, 1H, arom.), 7.00 (dd, J =8.1, 1.3 Hz, 1H, arom.), 7.07–7.12 (m, 1H, arom.), 7.17 (dd, J =8.0, 1.0 Hz, 1H, arom.), 9.08 (s, 1H, NH)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 16.42 (d, ³ $J_{C,P}$ =6.1 Hz, POCH₂CH₃), 18.99 (d, ² $J_{C,P}$ =5.3 Hz, PCH₂CH₂), 23.82 (d, ¹ $J_{C,P}$ =140.3 Hz, PCH₂), 36.15 (d, ³ $J_{C,P}$ =9.8 Hz, PCH₂CH₂CH₂), 62.07 (d, ² $J_{C,P}$ =6.6 Hz, POCH₂CH₃), 118.89 (C₆H₄: C3), 120.08 (C₆H₄: C6), 122.26 (C₆H₄: C5), 125.99 (C₆H₄: C1), 126.53 (C₆H₄: C4), 148.53 (C₆H₄: C2), 172.20 (C=O)

C₁₄H₂₂NO₅P (315.30)

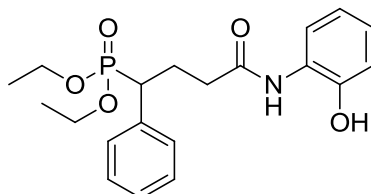
HPLC Retentionszeit: 13.04 min

Methode A AUC: 98.6 %

Diethyl-(3-((2-hydroxyphenyl)amino)-3-oxo-1-phenylpropyl)phosphonat **6a**

Hergestellt aus 0,94 g **2a** (2 mmol) nach **AAV 2**.

Ausbeute	83 %, farblose Kristalle		
Schmelzpunkt	157 °C		
IR $\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹)	3282/3249 (N-H, O-H), 3085 (C-H _{arom.}), 2983 (C-H _{aliph.}), 1659 (C=O, Amid I), 1558 (Amid II), 1225 (P=O), 1046/1019 (P-O)		
¹ H-NMR	(500 MHz, CDCl ₃) = δ (ppm) 1.01 (t, J =7.1 Hz, 3H, POCH ₂ CH ₃), 1.31 (t, J =7.1 Hz, 3H, POCH ₂ CH ₃), 3.30–3.37 (m, 2H, PCHCH ₂), 3.53–3.62 (m, 1H, POCH ₂ CH ₃), 3.76–3.85 (m, 1H, POCH ₂ CH ₃), 3.90 (ddd, J =21.6, 8.5, 6.8 Hz, 1H, PCH), 4.05–4.17 (m, 2H, POCH ₂ CH ₃), 6.70–6.74 (m, 2H, arom.), 6.94 (dd, J =8.1, 1.2 Hz, 1H, arom.), 7.00–7.05 (m, 1H, arom.), 7.06 (dd, J =8.0, 1.4 Hz, 1H, arom.), 7.25–7.34 (m, 3H, arom.), 7.45–7.48 (m, 1H, arom.), 9.11 (br. s, 1H, OH), 9.75 (s, 1H, NH)		
¹³ C-NMR	(125 MHz, CDCl ₃) = δ (ppm) 16.08 (d, $^3J_{C,P}$ =5.5 Hz, POCH ₂ CH ₃), 16.34 (d, $^3J_{C,P}$ =6.0 Hz, POCH ₂ CH ₃), 36.92 (PCHCH ₂), 40.10 (d, $^1J_{C,P}$ =140.4 Hz, PCH), 62.42 (d, $^2J_{C,P}$ =7.4 Hz, POCH ₂ CH ₃), 63.85 (d, $^2J_{C,P}$ =7.3 Hz, POCH ₂ CH ₃), 119.25 (C ₆ H ₄ : C3), 119.78 (C ₆ H ₄ : C6), 122.33 (C ₆ H ₄ : C5), 126.03 (C ₆ H ₄ : C4), 126.62 (C ₆ H ₄ : C1), 127.86 (d, $J_{C,P}$ =2.7 Hz), 128.76 (d, $J_{C,P}$ =2.3 Hz, 2C), 129.15 (d, $J_{C,P}$ =6.5 Hz, 2C), 134.70 (d, $J_{C,P}$ =6.5 Hz), 148.85 (C ₆ H ₄ : C2), 169.87 (d, $J_{C,P}$ =15.6 Hz, C=O)		
C ₁₉ H ₂₄ NO ₅ P	(377.37)		
Berechnet (%)	C 60.47	H 6.41	N 3.71
Gefunden (%)	C 60.52	H 6.26	N 3.69

Diethyl-(4-((2-hydroxyphenyl)amino)-4-oxo-1-phenylbutyl)phosphonat **6b**

Hergestellt aus 0,96 g **2b** (2 mmol) nach **AAV 2**.

Ausbeute 88 %, farblose Kristalle

Schmelzpunkt 145 °C

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3219/3123 (N-H, O-H), 3040 (C-H_{arom.}), 2989 (C-H_{aliph.}), 1652 (C=O, Amid I), 1545 (Amid II), 1244/1223 (P=O), 1027 (P-O)

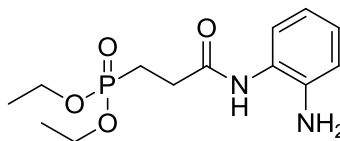
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.07 (t, $J=7.1$ Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.17 (t, $J=7.1$ Hz, 3H, POCH₂CH₃), 2.18–2.32, 2.39–2.51 (2m, 4H, PCHCH₂CH₂), 3.10 (ddd, $J=22.0, 9.2, 5.2$ Hz, 1H, PCH), 3.69–3.78 (m, 1H, POCH₂CH₃), 3.81–3.90 (m, 1H, POCH₂CH₃), 3.90–3.99 (m, 2H, POCH₂CH₃), 6.74 (dt, $J=7.9, 1.3$ Hz, 1H, arom.), 6.90 (dd, $J=8.1, 1.3$ Hz, 1H, arom.), 6.96–7.01 (m, 1H, arom.), 7.16 (dd, $J=8.0, 1.3$ Hz, 1H, arom.), 7.17–7.27 (m, 6H, arom.), 8.35 (s, 1H, NH), 9.12 (br. s, 1H, OH)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 16.23 (d, $^3J_{C,P}=5.7$ Hz, POCH₂CH₃), 16.33 (d, $^3J_{C,P}=5.8$ Hz, POCH₂CH₃), 26.30 (d, $^2J_{C,P}=1.3$, PCHCH₂), 34.46 (d, $^3J_{C,P}=12.3$ Hz, PCHCH₂CH₂), 43.29 (d, $^1J_{C,P}=137.8$ Hz, PCH), 64.42 (d, $^2J_{C,P}=6.9$ Hz, POCH₂CH₃), 62.84 (d, $^2J_{C,P}=7.2$ Hz, POCH₂CH₃), 118.73 (C₆H₄: C3), 120.09 (C₆H₄: C6), 122.01 (C₆H₄: C5), 125.92 (C₆H₄: C4), 126.41 (C₆H₄: C1), 127.58 (d, $J_{C,P}=1.8$ Hz), 128.75 (d, $J_{C,P}=1.7$ Hz, 2C), 129.17 (d, $J_{C,P}=6.6$ Hz, 2C), 135.38 (d, $J_{C,P}=6.9$ Hz), 148.36 (C₆H₄: C2), 172.03 (C=O)

C₂₀H₂₆NO₅P (391.40)

Berechnet (%) C 61.37 H 6.70 N 3.58

Gefunden (%) C 61.50 H 6.92 N 3.60

Diethyl-(3-((2-aminophenyl)amino)-3-oxopropyl)phosphonat 7

Hergestellt aus 0,26 g **3a** (0,8 mmol) nach **AAV 2**.

Ausbeute 100 %, farblose Kristalle

Schmelzpunkt 106 °C

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3446/3356/3265 (N-H), 2983 (C-H_{aliph.}), 1690 (C=O, Amid I), 1531 (Amid II), 1205 (P=O), 1058/1031 (P-O)

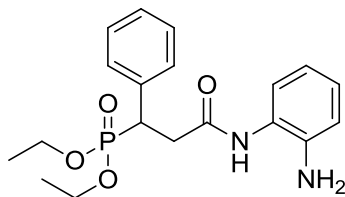
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.32 (t, J =7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃), 2.19 (dt, J =17.5, 7.5 Hz, 2H, PCH₂), 2.72 (dt, J =16.8, 7.5 Hz, 2H, PCH₂CH₂), 3.70 (br. s, 2H, NH₂), 4.05–4.14 (m, 4H, POCH₂CH₃), 6.72–6.79 (m, 2H, arom. H3,5), 7.03 (dt, J = 7.7, 1.2 Hz, 1H, arom. H4), 7.27 (dd, J =7.6, 1.7 Hz, 1H, arom. H6), 8.32 (s, 1H, NH)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 16.39 (d, ³ $J_{C,P}$ =5.9 Hz, POCH₂CH₃), 21.10 (d, ¹ $J_{C,P}$ =142.9 Hz, PCH₂), 29.46 (d, ² $J_{C,P}$ =3.7 Hz, PCH₂CH₂), 62.09 (d, ² $J_{C,P}$ =6.5 Hz, POCH₂CH₃), 117.44, 118.81, 123.98, 125.41, 126.90, 140.80 (C₆H₄: C2), 169.90 (d, ³ $J_{C,P}$ =13.2 Hz, C=O)

C₁₃H₂₁N₂O₄P (300.29)

HPLC Retentionszeit: 11.65 min

Methode A AUC: 95.1 %

Diethyl-(3-((2-aminophenyl)amino)-3-oxo-1-phenylpropyl)phosphonat **8a**

Hergestellt aus 2,44 g **4a** (6 mmol) nach **AAV 2** und anschließender Umkristallisation aus Ethylacetat/Diethylether.

Ausbeute 97 %, gelbliche Kristalle

Schmelzpunkt 147 °C

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3381/3229 (N-H), 2989 (C-H_{aliph.}), 1679 (C=O, Amid I), 1528 (Amid II), 1238 (P=O), 1049 (P-O)

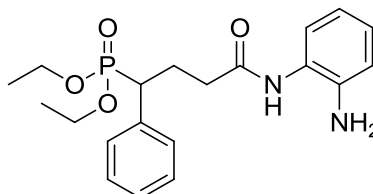
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.02 (t, J =7.1 Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.31 (t, J =7.1 Hz, 3H, POCH₂CH₃), 3.09–3.20 (m, 2H, PCHCH₂), 3.60–3.69 (m, 1H, POCH₂CH₃), 3.78–3.83 (m, 2H, PCH, POCH₂CH₃), 4.05–4.15 (m, 2H, POCH₂CH₃), 6.64–6.70 (m, 2H, C₆H₄: H3,5), 6.97 (dt, J =7.7, 1.3 Hz, 1H, C₆H₄: H4), 7.02 (dd, J =7.8, 0.9 Hz, 1H, C₆H₄: H6), 7.24–7.34 (m, 3H, C₆H₅), 7.42–7.47 (m, 2H, C₆H₅), 8.40 (s, 1H, NH)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 16.12 (d, $^3J_{C,P}$ =5.9 Hz, POCH₂CH₃), 16.39 (d, $^3J_{C,P}$ =5.9 Hz, POCH₂CH₃), 37.40 (PCHCH₂), 40.62 (d, $^1J_{C,P}$ =140.2 Hz, PCH), 62.24 (d, $^2J_{C,P}$ =7.3 Hz, POCH₂CH₃), 63.31 (d, $^2J_{C,P}$ =6.9 Hz, POCH₂CH₃), 117.28, 118.76, 123.74, 125.67, 127.00, 127.59 (d, $J_{C,P}$ =2.8 Hz), 128.69 (d, $J_{C,P}$ =1.8 Hz, 2C), 129.31 (d, $J_{C,P}$ =6.5 Hz, 2C), 135.38 (d, $J_{C,P}$ =6.4 Hz), 140.81 (C₆H₄: C2), 168.74 (d, $^3J_{P,C}$ =16.4 Hz, C=O)

C₁₉H₂₅N₂O₄P (376.39)

HPLC Retentionszeit: 14.16 min

Methode A AUC: 95.4 %

Diethyl-(4-((2-aminophenyl)amino)-4-oxo-1-phenylbutyl)phosphonat **8b**

Hergestellt aus 0,42 g **4b** (1 mmol) nach **AAV 2**.

Ausbeute 92 %, gelbliches Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3350/3252 (N-H), 3032 (C-H_{arom.}), 2983 (C-H_{aliph.}), 1665 (C=O, Amid I), 1535 (Amid II), 1230 (P=O), 1052/1026 (P-O)

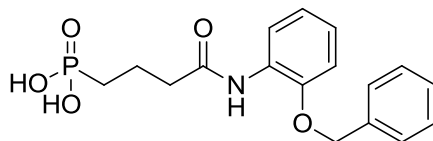
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.15 (t, J =7.1 Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.24 (t, J =7.1 Hz, 3H, POCH₂CH₃), 2.26–2.39, 2.46–2.57 (2m, 4H, PCHCH₂CH₂), 3.20 (ddd, J =21.8, 9.2, 5.5 Hz, 1H, PCH), 3.77–3.87 (m, 1H, POCH₂CH₃), 3.89–3.96 (m, 1H, POCH₂CH₃), 3.96–4.06 (m, 2H, POCH₂CH₃), 6.73–6.80 (m, 2H, C₆H₄: H3,5), 7.03 (dt, J =7.7, 1.1 Hz, C₆H₄: H4), 7.19 (dd, J =8.2, 1.1 Hz, 1H, C₆H₄: H6), 7.25–7.35 (m, 5H, C₆H₅), 7.63 (s, 1H, NH)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 16.22 (d, ³ $J_{C,P}$ =5.8 Hz, POCH₂CH₃), 16.32 (d, ³ $J_{C,P}$ =5.8 Hz, POCH₂CH₃), 26.35 (d, ² $J_{C,P}$ =2.5 Hz, PCHCH₂), 34.44 (d, ³ $J_{C,P}$ =12.4 Hz, PCHCH₂CH₂), 43.28 (d, ¹ $J_{C,P}$ =137.4 Hz, PCH), 62.10 (d, ² $J_{C,P}$ =7.1 Hz, POCH₂CH₃), 62.54 (d, ² $J_{C,P}$ =6.9 Hz, POCH₂CH₃), 117.83, 119.19, 124.17, 124.99, 126.89, 127.38 (d, $J_{C,P}$ =2.8 Hz), 128.64 (d, $J_{C,P}$ =1.6 Hz, 2C), 129.17 (d, $J_{C,P}$ =6.8 Hz, 2C), 135.85 (d, $J_{C,P}$ =6.8 Hz), 140.51 (C₆H₄: C2), 170.71 (C=O)

C₂₀H₂₇N₂O₄P (390.41)

HPLC Retentionszeit: 14.62 min

Methode A AUC: 94.5 %

(4-((2-(Benzyloxy)phenyl)amino)-4-oxobutyl)phosphonsäure 9

Hergestellt aus 0,61 g **1b** (1,5 mmol) nach **AAV 3**.

Ausbeute 48 %, farblose Kristalle

Schmelzpunkt 97 °C

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3412/3309 (N-H), 3032 (C-H_{arom.}), 2936 (C-H_{aliph.}), 1652 (C=O, Amid I), 1532 (Amid II), 1256 (P=O), 1016/1001 (P-O)

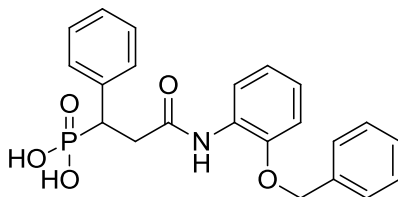
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 1.30 (t, $J=7.1$ Hz, 6H, POCH₂CH₃), 1.58–1.63, 1.75–1.85 (2m, 4H, PCH₂CH₂), 2.47 (t, $J=7.2$ Hz, 2H, PCH₂CH₂CH₂), 5.20 (s, 2H, OCH₂Ph), 6.86–6.91 (m, 1H, arom.), 6.99–7.03 (m, 2H, arom.), 7.30 (t, $J=7.3$ Hz, 1H, arom.), 7.39 (t, $J=7.6$ Hz, 2H, arom.), 7.50 (d, $J=7.4$ Hz, 2H, arom.), 7.84 (d, $J=7.7$ Hz, 1H, arom.), 9.09 (s, 1H, NH)

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 19.26 (d, $^2J_{C,P}=3.4$ Hz, PCH₂CH₂), 27.01 (d, $^1J_{C,P}=136.7$ Hz, PCH₂), 36.62 (d, $^3J_{C,P}=16.3$ Hz, PCH₂CH₂CH₂), 69.44 (OCH₂Ph), 112.81 (C₆H₄: C3), 120.33 (C₆H₄: C6), 122.89 (C₆H₄: C5), 124.37 (C₆H₄: C4), 127.17 (C₆H₅: C2, C6), 127.53 (C₆H₄: C1), 127.59 (C₆H₅: C4), 128.30 (C₆H₅: C3, C5), 137.00 (C₆H₅: C1), 148.87 (C₆H₄: C2), 170.80 (C=O)

C₁₇H₂₀NO₅P (349.32)

HPLC Retentionszeit: 10.99 min

Methode A AUC: 99.0 %

(3-((2-(Benzyloxy)phenyl)amino)-3-oxo-1-phenylpropyl)phosphonsäure 10

Hergestellt aus 0,47 g **2a** (1 mmol) nach **AAV 3**.

Ausbeute 49 %, farblose Kristalle

Schmelzpunkt 110 °C

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3409 (N-H), 3032 (C-H_{arom.}), 1671/1657 (C=O, Amid I), 1528 (Amid II), 1255 (P=O), 1006 (P-O)

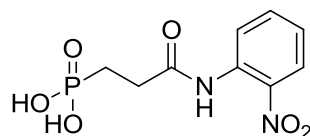
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 2.92 (ddd, $J=12.9, 9.3, 3.1$ Hz, 1H, PCHCH₂), 3.21 (ddd, $J=15.6, 11.9, 7.0$ Hz, 1H, PCHCH₂), 3.37 (br. s, OH), 3.47 (ddd, $J=21.8, 11.6, 3.2$ Hz, 1H, PCH), 5.12 (s, 2H, OCH₂Ph), 6.77–6.82 (m, 2H, arom.), 6.93–7.00 (m, 2H, arom.), 7.15 (dt, $J=7.0, 1.0$ Hz, 1H, arom.), 7.21 (t, $J=7.5$ Hz, 2H, arom.), 7.29–7.35 (m, 3H, arom.), 7.39 (t, $J=7.5$ Hz, 2H, arom.), 7.46 (d, $J=7.3$ Hz, 2H, arom.), 7.62 (d, $J=7.7$ Hz, 1H, arom.), 9.17 (s, 1H, NH)

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 36.46 (PCHCH₂), 41.53 (d, $^1J_{C,P}=134.8$ Hz, PCH), 69.29 (OCH₂Ph), 112.72 (C₆H₄: C3), 120.17 (C₆H₄: C6), 122.78 (C₆H₄: C5), 124.32 (C₆H₄: C4), 126.05 (d, $J_{C,P}=1.7$ Hz), 127.16 (Benzyl: C2, C6), 127.31 (C₆H₄: C1), 127.58 (Benzyl: C4), 127.62 (d, $J_{C,P}=1.6$ Hz, 2C), 128.23 (Benzyl: C3, C5), 128.98 (d, $J_{C,P}=5.9$ Hz, 2C), 136.99 (Benzyl: C1), 137.62 (d, $J_{C,P}=6.5$ Hz), 148.67 (C₆H₄: C2), 168.96 (d, $^3J_{C,P}=18.7$ Hz, C=O)

C₂₂H₂₂NO₅P (411.39)

HPLC Retentionszeit: 11.90 min

Methode A AUC: 96.9 %

(3-((2-Nitrophenyl)amino)-3-oxopropyl)phosphonsäure 11a

Hergestellt aus 0,33 g **3a** (1 mmol) nach **AAV 3**.

Ausbeute 78 %, gelbe Kristalle

Schmelzpunkt 156 °C

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3381 (N-H), 2936 (C-H_{aliph.}), 1689 (C=O, Amid I), 1511 (Amid II), 1282 (P=O), 1047/1012 (P-O)

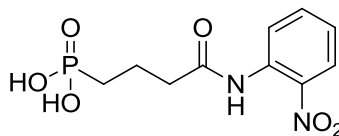
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 1.75–1.84 (m, 2H, PCH₂), 2.50–2.55 (m, 2H, PCH₂CH₂, überlappend mit DMSO), 3.90 (br. s, OH), 7.36 (ddd, $J=8.4, 7.4, 1.3$ Hz, 1H, arom. H4), 7.59 (dd, $J=8.1, 1.2$ Hz, 1H, arom. H6), 7.70 (dt, $J=7.7, 1.4$ Hz, 1H, arom. H5), 7.93 (dd, $J=8.2, 1.4$ Hz, 1H, arom. H3), 10.36 (s, 1H, NH)

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 23.07 (d, $^1J_{C,P}=138.5$ Hz, PCH₂), 29.80 (d, $^2J_{C,P}=2.8$ Hz, PCH₂CH₂), 124.73, 125.13, 125.30, 130.93, 133.76, 142.55 (C₆H₄: C2), 170.30 (d, $^3J_{C,P}=19.2$ Hz, C=O)

C₉H₁₁N₂O₆P (274.17)

Berechnet (%) C 39.43 H 4.04 N 10.22

Gefunden (%) C 39.17 H 3.78 N 9.99

(4-((2-Nitrophenyl)amino)-4-oxobutyl)phosphonsäure **11b**

Hergestellt aus 0,61 g **3b** (1,8 mmol) nach **AAV 3**.

Ausbeute 88 %, gelbe Kristalle

Schmelzpunkt 131 °C

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3325 (N-H), 1669 (C=O, Amid I), 1520 (Amid II), 1280 (P=O), 1028 (P-O)

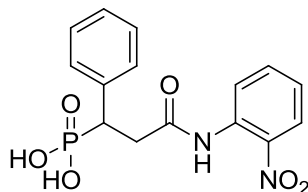
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 1.53–1.62, 1.73–1.84 (2m, 4H, PCH₂CH₂), 2.44 (t, J =7.4 Hz, 2H, PCH₂CH₂CH₂), 5.72 (br. s, OH), 7.36 (t, J =7.8 Hz, 1H, arom. H4), 7.59 (d, J =8.1 Hz, 1H, arom. H6), 7.69 (t, J =7.7 Hz, 1H, arom. H5), 7.92 (d, J =8.2 Hz, 1H, arom. H3), 10.30 (s, 1H, NH)

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 18.77 (d, ² $J_{C,P}$ =3.8 Hz, PCH₂CH₂), 26.84 (d, ¹ $J_{C,P}$ =136.6 Hz, PCH₂), 36.26 (d, ³ $J_{C,P}$ =15.7 Hz, PCH₂CH₂CH₂), 124.70, 124.99, 125.13, 130.98, 133.74, 142.53 (C₆H₄: C2), 170.82 (C=O)

C₁₀H₁₃N₂O₆P (288.19)

HPLC Retentionszeit: 8.83 min

Methode A AUC: 98.9 %

(3-((2-Nitrophenyl)amino)-3-oxo-1-phenylpropyl)phosphonsäure **12a**

Hergestellt aus 0,48 g **4a** (1,2 mmol) nach **AAV 3**.

Ausbeute 86 %, gelbe Kristalle

Schmelzpunkt 162 °C

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3364 (N-H), 1708 (C=O, Amid I), 1277 (P=O), 1023/1006 (P-O)

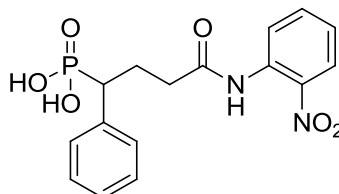
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 2.94 (ddd, $J=15.6, 9.1, 3.8$ Hz, 1H, PCHCH₂), 3.05 (ddd, $J=15.6, 11.5, 7.5$ Hz, 1H, PCHCH₂), 3.43 (ddd, $J=21.9, 11.4, 3.8$ Hz, 1H, PCH), 7.14–7.19 (m, $J=8.3, 7.1, 0.9$ Hz, 1H, C₆H₄: H4), 7.23–7.32 (m, 15H, C₆H₅), 7.42 (dd, $J=8.2, 1.0$ Hz, 1H, C₆H₄: H6), 7.61 (dt, $J=7.9, 1.4$ Hz, 1H, C₆H₄: H5), 7.87 (dd, $J=8.2, 1.3$ Hz, 1H, C₆H₄: H3), 10.28 (s, 1H, NH)

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 36.49 (PCHCH₂), 41.22 (d, $^1J_{C,P}=134.7$ Hz, PCH), 124.67, 125.02, 126.16 (d, $J_{C,P}=2.4$ Hz), 127.71 (d, $J_{C,P}=2.0$ Hz, 2C), 128.86 (d, $J_{C,P}=5.7$ Hz, 2C), 130.77, 133.69, 137.32 (d, $J_{C,P}=6.6$ Hz), 142.15 (C₆H₄: C2), 169.07 (d, $^3J_{P,C}=18.9$ Hz, C=O)

C₁₅H₁₅N₂O₆P (350.26)

Berechnet (%) C 51.44 H 4.32 N 8.00

Gefunden (%) C 51.17 H 4.28 N 7.87

(4-((2-Nitrophenyl)amino)-4-oxo-1-phenylbutyl)phosphonsäure **12b**

Hergestellt aus 0,42 g **4b** (1 mmol) nach **AAV 3**.

Ausbeute 82 %, gelbe Kristalle

Schmelzpunkt 150 °C

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3389/3356 (N-H), 2931 (C-H_{aliph.}), 1702 (C=O, Amid I), 1278 (P=O), 1001 (P-O)

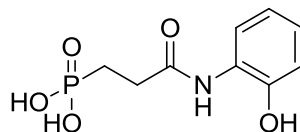
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 1.97–2.08, 2.15–2.25, 2.30–2.40 (3m, 4H, PCHCH₂CH₂), 2.91 (ddd, J =21.9, 11.2, 4.1 Hz, 1H, PCH), 7.19–7.24 (m, 2H, C₆H₄: H4), 7.27–7.37 (m, 5H, C₆H₅), 7.50 (dd, J =8.1, 1.1 Hz, C₆H₄: H6), 7.66 (dt, J =7.8, 1.4 Hz, 1H, C₆H₄: H5), 7.90 (dd, J =8.2, 1.4 Hz, 1H, C₆H₄: H3), 10.17 (s, 1H, NH)

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 25.46 (PCHCH₂), 33.93 (d, ³ $J_{C,P}$ =14.8 Hz, PCHCH₂CH₂), 44.40 (d, ¹ $J_{C,P}$ =133.8 Hz, PCH), 124.65, 124.96, 125.12, 126.18 (d, $J_{C,P}$ =2.3 Hz), 127.98 (d, $J_{C,P}$ =1.3 Hz, 2C), 129.04 (d, $J_{C,P}$ =6.2 Hz, 2C), 130.89, 133.67, 137.99 (d, $J_{C,P}$ =6.5 Hz), 142.57 (C₆H₄: C2), 170.64 (C=O)

C₁₆H₁₇N₂O₆P (364.29)

Berechnet (%) C 52.75 H 4.70 N 7.69

Gefunden (%) C 52.47 H 4.66 N 7.51

(3-((2-Hydroxyphenyl)amino)-3-oxopropyl)phosphonsäure **13a**

Hergestellt aus 0,18 g **5a** (0,6 mmol) nach **AAV 3**.

Ausbeute 82 %, farblose Kristalle

Schmelzpunkt 135 °C

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3394 (N-H), 3233 (br., O-H), 1664 (C=O, Amid I), 1541 (Amid II), 1197 (P=O), 1003 (P-O)

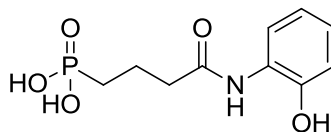
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 1.78–1.83, 2.53–2.61 (2m, 4H, PCH₂CH₂), 6.75 (t, *J*=7.3 Hz, 1H, arom.), 6.84 (d, *J*=7.8 Hz, 1H, arom.), 6.95 (t, *J*=7.4 Hz, 1H, arom.), 7.60 (d, *J*=7.7 Hz, 1H, arom.), 9.36 (s, 1H, NH), 9.64 (br. s, 1H, OH)

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 23.37 (d, ¹*J*_{C,P}=138.6 Hz, PCH₂), 29.64 (d, ²*J*_{C,P}=2.7 Hz, PCH₂CH₂), 115.81 (C₆H₄: C3), 118.77 (C₆H₄: C6), 123.00 (C₆H₄: C5), 124.87 (C₆H₄: C4), 125.91 (C₆H₄: C1), 148.37 (C₆H₄: C2), 170.67 (d, ³*J*_{C,P}=17.2 Hz, C=O)

C₉H₁₂NO₅P (245.17)

Berechnet (%) C 44.09 H 4.93 N 5.71

Gefunden (%) C 44.09 H 4.86 N 5.54

(4-((2-Hydroxyphenyl)amino)-4-oxobutyl)phosphonsäure **13b**

Hergestellt aus 0,24 g **9** (0,7 mmol) nach **AAV 2**.

Ausbeute 77 %, gelbliche Kristalle

Schmelzpunkt 136°C

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3404 (N-H), 3180 (O-H), 2973 (C-H_{aliph.}), 1647 (C=O, Amid I), 1539 (Amid II), 1198 (P=O), 1230/1219 (P=O), 1024 (P-O)

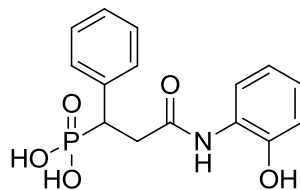
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 1.51–1.60, 1.73–1.84 (2m, 4H, PCH₂CH₂), 2.47 (t, $J=7.3$ Hz, 2H, PCH₂CH₂CH₂), 6.73–6.78 (m, 1H, arom.), 6.85 (dd, $J=7.9, 0.9$ Hz, 1H, arom.), 6.94 (dt, $J=7.7, 0.7$ Hz, 1H, arom.), 7.68 (d, $J=7.6$ Hz, 1H, arom.), 9.25 (s, 1H, NH)

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 19.27 (d, $^2J_{C,P}=3.7$ Hz, PCH₂CH₂), 26.95 (d, $^1J_{C,P}=136.4$ Hz, PCH₂), 36.44 (d, $^3J_{C,P}=16.4$ Hz, PCH₂CH₂CH₂), 115.77 (C₆H₄: C3), 118.84 (C₆H₄: C6), 122.28 (C₆H₄: C5), 124.54 (C₆H₄: C4), 126.19 (C₆H₄: C1), 147.80 (C₆H₄: C2), 171.30 (C=O)

C₁₀H₁₄NO₅P (259.20)

Berechnet (%) C 46.34 H 5.44 N 5.40

Gefunden (%) C 46.44 H 5.33 N 5.33

(3-((2-Hydroxyphenyl)amino)-3-oxo-1-phenylpropyl)phosphonsäure 14a

Hergestellt aus 0,38 g **6a** (1 mmol) nach **AAV 3**.

Ausbeute 51 %, farblose Kristalle

Schmelzpunkt 180 °C

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3399 (N-H), 1614 (C=O, Amid I), 1547 (Amid II), 1211/1198 (P=O), 1018 (P-O)

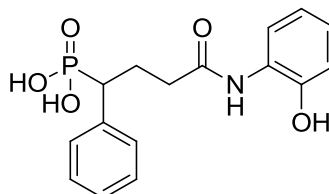
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 2.94 (ddd, J =14.9, 9.8, 3.9 Hz, 1H, PCHCH₂), 3.13 (ddd, J =15.3, 10.6, 8.9 Hz, 1H, PCHCH₂), 3.48 (ddd, J =21.8, 11.0, 3.9 Hz, 1H, PCH), 3.50 (br. s, OH), 6.67 (t, J =7.6 Hz, 1H, arom.), 6.78 (d, J =7.9 Hz, 1H, arom.), 6.89 (t, J =7.4 Hz, 1H, arom.), 7.16 (t, J =7.2 Hz, 1H, arom.), 7.25 (t, J =7.6 Hz, 2H, arom.), 7.32 (d, J =7.5 Hz, 2H, arom.), 7.44 (d, J =7.8 Hz, 1H, arom.), 9.33 (s, 1H, NH), 9.57 (br. s, 1H, OH)

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 36.45 (PCHCH₂), 41.55 (d, $^1J_{C,P}$ =134.8 Hz, PCH), 115.77 (C₆H₄: C3), 118.70 (C₆H₄: C6), 122.50 (C₆H₄: C5), 124.72 (C₆H₄: C4), 125.90 (C₆H₄: C1), 126.11 (d, $J_{C,P}$ =2.2 Hz), 127.68 (d, $J_{C,P}$ =1.4 Hz, 2C), 128.99 (d, $J_{C,P}$ =5.6 Hz, 2C), 137.69 (d, $J_{C,P}$ =6.5 Hz), 147.99 (C₆H₄: C2), 169.48 (d, $^3J_{C,P}$ =17.7 Hz, C=O)

C₁₅H₁₆NO₅P (321.27)

Berechnet (%) C 56.08 H 5.02 N 4.36

Gefunden (%) C 56.27 H 4.90 N 4.35

(4-((2-Hydroxyphenyl)amino)-4-oxo-1-phenylbutyl)phosphonsäure **14b**

Hergestellt aus 0,39 g **6b** (1 mmol) nach **AAV 3**. Es wurde kein kristallines Produkt erhalten.

Ausbeute 88 %, farbloser Schaum

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3393 (N-H), 1645 (C=O, Amid I), 1538 (Amid II), 1198 (P=O), 1236/1195 (P=O), 993 (P-O)

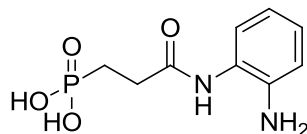
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 2.00–2.12, 2.20–2.30, 2.30–2.40 (3m, 4H, PCHCH₂CH₂), 2.91 (ddd, J =21.9, 11.2, 3.8 Hz, 1H, PCH), 3.52 (br. s, OH), 6.74 (t, J =7.2 Hz, 1H, arom.), 6.83 (dd, J =7.9, 1.0 Hz, 1H, arom.), 6.93 (t, J =7.6 Hz, 1H, arom.), 7.18–7.35 (m, 5H, arom.), 7.59 (d, J =7.5 Hz, 1H, arom.), 9.16 (s, 1H, NH), 9.64 (br. s, 1H, OH)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 25.92 (PCHCH₂), 34.09 (d, $^3J_{C,P}$ =14.8 Hz, PCHCH₂CH₂), 44.58 (d, $^1J_{C,P}$ =133.6 Hz, PCH), 115.88 (C₆H₄: C3), 118.83 (C₆H₄: C6), 122.47 (C₆H₄: C5), 124.63 (C₆H₄: C4), 126.13 (C₆H₄: C1), 126.14 (d, $J_{C,P}$ =2.8 Hz), 127.94 (d, $J_{C,P}$ =1.2 Hz, 2C), 129.06 (d, $J_{C,P}$ =6.4 Hz, 2C), 137.99 (d, $J_{C,P}$ =6.4 Hz), 147.92 (C₆H₄: C2), 171.24 (C=O)

C₁₆H₁₈NO₅P (325.29)

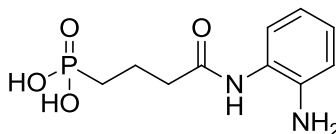
HPLC Retentionszeit: 8.71 min

Methode A AUC: 92.2 %

(3-((2-Nitrophenyl)amino)-3-oxopropyl)phosphonsäure **15a**

Hergestellt aus 0,21 g **11a** (0,8 mmol) nach **AAV 2**. Das Produkt kristallisierte bereits während der Umsetzung aus und wurde durch anschließende heiße Filtration vom Katalysator abgetrennt. Beim Einengen der methanolischen Lösung kristallisierte das Produkt aus.

Ausbeute	38 %, gelbliche Kristalle
Schmelzpunkt	>300 °C
IR $\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹)	3224 (N-H), 1627 (C=O, Amid I), 1574 (Amid II), 1220 (P=O), 1064 (P-O)
¹ H-NMR	(500 MHz, D ₂ O) = δ (ppm) 2.05 (dt, J =12.9, 6.4 Hz, 2H, PCH ₂), 3.27 (dt, J =11.9, 8.2 Hz, 2H, PCH ₂ CH ₂), 7.44 (dd, J =6.2, 3.1, 2H, arom.), 7.63 (dd, J =6.1, 3.2 Hz, 2H, arom.)
¹³ C-NMR	Zur Herstellung einer ausreichend konzentrierten Lösung für ¹³ C-NMR-Spektroskopie ist die Löslichkeit von 15a zu gering.
C ₉ H ₁₃ N ₂ O ₄ P	(244.18)
HPLC	Retentionszeit: 1.84 min
Methode B	AUC: 99.3 %

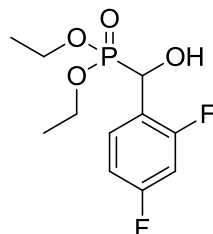
(4-((2-Aminophenyl)amino)-4-oxobutyl)phosphonsäure **15b**

Hergestellt aus 0,23 g **11b** (0,8 mmol) nach **AAV 2** und anschließender Umkristallisation aus Isopropanol/Ethylacetat.

Ausbeute	82 %, gelbliche Kristalle
Schmelzpunkt	>300 °C
IR $\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹)	3738/3678 (N-H), 3448 (O-H), 2934 (C-H _{aliph.}), 1655 (C=O, Amid I), 1542 (Amid II)
¹ H-NMR	(500 MHz, DMSO-d ₆) = δ (ppm) 1.53–1.62, 1.74–1.85 (2m, 4H, PCH ₂ CH ₂), 2.40 (t, J =7.3 Hz, 2H, PCH ₂ CH ₂ CH ₂), 5.10 (br. s, OH), 6.54 (dt, J =7.5, 1.2 Hz, 1H, arom. H5), 6.72 (dt, J =8.0, 1.1 Hz, 1H, arom. H3), 6.89 (dd, J =7.8, 1.3 Hz, 1H, arom. H4), 7.16 (dt, J =7.8, 1.1 Hz, 1H, arom. H6), 9.13 (s, 1H, NH)
¹³ C-NMR	(125 MHz, DMSO-d ₆) = δ (ppm) 19.29 (d, $^2J_{C,P}$ =3.6 Hz, PCH ₂ CH ₂), 27.01 (d, $^1J_{C,P}$ =136.5 Hz, PCH ₂), 36.26 (d, $^3J_{C,P}$ =15.6 Hz, PCH ₂ CH ₂ CH ₂), 115.76, 116.04, 123.39, 125.11, 125.57, 141.69 (C ₆ H ₄ : C2), 170.62 (C=O)
C ₁₀ H ₁₅ N ₂ O ₄ P	(258.21)
HPLC	Retentionszeit: 1.83 min
Methode B	AUC: 99.9 %

5.4 Analytische Daten der Verbindungen aus Kapitel 3

Diethyl-((2,4-difluorphenyl)(hydroxy)methyl)phosphonat 16a



Hergestellt aus 1,42 g 2,4-Difluorbenzaldehyd (10 mmol) und 1,52 g Diethylphosphit (11 mmol) nach **AAV 4**.

Ausbeute 100 %, farblose Kristalle

Schmelzpunkt 55 °C

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3268 (O-H), 2992 (C-H_{aliph.}), 1208 (P=O), 1051/1024 (P-O)

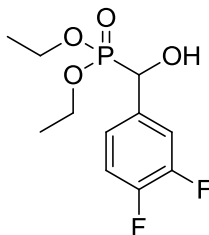
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.24 (t, J =7.1 Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.31 (t, J =7.1 POCH₂CH₃), 4.05–4.20 (m, 4H, POCH₂CH₃), 4.77 (br. s, 1H, OH), 5.34 (d, ² $J_{H,P}$ =10.7 Hz, 1H, PCH), 6.80 (dt, ³ $J_{H,F}$ =9.5 Hz, ⁵ $J_{H,P}$ =2.1 Hz, 1H, arom. H3), 6.93 (dt, ³ $J_{H,H}$ =³ $J_{H,F}$ =8.5 Hz, ⁵ $J_{H,P}$ =2.0 Hz, 1H, arom. H5), 7.68 (ddt, ³ $J_{H,H}$ =⁴ $J_{H,F}$ =8.6 Hz, ⁴ $J_{H,F}$ =6.5 Hz, ⁴ $J_{H,P}$ =2.2 Hz, 1H, arom. H6)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 16.33 (d, ³ $J_{C,P}$ =5.6 Hz, POCH₂CH₃), 16.36 (d, ³ $J_{C,P}$ =5.4 Hz, POCH₂CH₃), 63.20 (d, ² $J_{C,P}$ =7.3 Hz, POCH₂CH₃), 63.38 (dd, ¹ $J_{C,P}$ =164.5 Hz, ³ $J_{C,F}$ = 2.4 Hz, PCH), 63.68 (d, ² $J_{C,P}$ =7.2 Hz, POCH₂CH₃), 103.40 (dt, ² $J_{C,F}$ =² $J_{C,F}$ =25.7 Hz, ⁴ $J_{C,P}$ =1.7 Hz, C₆H₃F₂: C3), 111.55 (dt, ² $J_{C,F}$ = 21.2 Hz, ⁴ $J_{C,F}$ =⁴ $J_{C,P}$ =3.0 Hz, C₆H₃F₂: C5), 120.62 (dd, ² $J_{C,F}$ =13.7 Hz, ² $J_{C,P}$ =3.1 Hz, C₆H₃F₂: C1), 130.02 (ddd, ³ $J_{C,F}$ =³ $J_{C,F}$ =9.2 Hz, ³ $J_{C,P}$ =4.4 Hz, C₆H₃F₂: C6), 159.77 (ddd, ¹ $J_{C,F}$ =249.5 Hz, ³ $J_{C,F}$ =12.0 Hz, ³ $J_{C,P}$ =6.8 Hz, C₆H₃F₂: C2), 162.66 (ddd, ¹ $J_{C,F}$ =249.3 Hz, ³ $J_{C,F}$ =11.9 Hz, ⁵ $J_{C,P}$ = 3.3 Hz, arom. C4)

C₁₁H₁₅F₂O₄P (280.20)

Berechnet (%) C 47.15 H 5.40

Gefunden (%) C 47.25 H 5.24

Diethyl-((3,4-difluorphenyl)(hydroxy)methyl)phosphonat **16b**

Hergestellt aus 7,10 g 3,4-Difluorbenzaldehyd (50 mmol) und 7,60 g Diethylphosphit (55 mmol) nach **AAV 4**.

Ausbeute 74 %, farblose Kristalle

Schmelzpunkt 67 °C

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3233 (O-H), 2987 (C-H_{aliph.}), 1230/1200 (P=O), 1059/1027 (P-O)

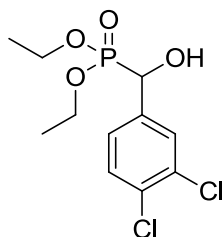
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.26 (t, J =7.1 Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.29 (t, J =7.1 Hz, POCH₂CH₃), 4.02–4.16 (m, 4H, POCH₂CH₃), 4.99 (d, ² $J_{H,P}$ =10.6 Hz, 1H, PCH), 7.10–7.23 (m, 2H, arom. H), 7.36 (tdd, ⁴ $J_{H,F}$ =11.4 Hz, ³ $J_{H,H}$ =7.6 Hz, ⁴ $J_{H,H}$ =⁴ $J_{H,P}$ =2.0 Hz, 1H, arom. H)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 16.39 (d, ³ $J_{C,P}$ =5.6 Hz, POCH₂CH₃), 16.40 (d, ³ $J_{C,P}$ =5.4 Hz, POCH₂CH₃), 63.21 (d, ² $J_{C,P}$ =7.6 Hz, POCH₂CH₃), 63.68 (d, ² $J_{C,P}$ =7.0 Hz, POCH₂CH₃), 69.66 (d, ¹ $J_{C,P}$ =160.5 Hz, PCH), 116.15 (dd, ² $J_{C,F}$ =18.5 Hz, ³ $J_{C,F}$ =³ $J_{C,P}$ =5.3 Hz, C₆H₃F₂: C2), 116.95 (dd, ² $J_{C,F}$ =17.4 Hz, ³ $J_{C,F}$ =⁴ $J_{C,P}$ =1.9 Hz, C₆H₃F₂: C5), 123.08 (ddd, ³ $J_{C,P}$ =³ $J_{C,F}$ =6.1 Hz, ⁴ $J_{C,F}$ =3.9 Hz, C₆H₃F₂: C6), 133.80 (m, C₆H₃F₂: C1), 150.00 (ddd, ¹ $J_{C,F}$ =248.4 Hz, ² $J_{C,F}$ =12.7 Hz, ⁴ $J_{C,P}$ =3.5 Hz, C₆H₃F₂: C3), 150.20 (ddd, ¹ $J_{C,F}$ =248.2 Hz, ² $J_{C,F}$ =12.7 Hz, ⁵ $J_{C,P}$ =2.9 Hz, C₆H₃F₂: C4)

C₁₁H₁₅F₂O₄P (280.20)

Berechnet (%) C 47.15 H 5.40

Gefunden (%) C 47.07 H 5.64

Diethyl-((3,4-dichlorphenyl)(hydroxy)methyl)phosphonat **16c**

Hergestellt aus 1,75 g 3,4-Dichlorbenzaldehyd (10 mmol) und 1.52 g Diethylphosphit (11 mmol) nach **AAV 4**.

Ausbeute 89 %, farblose Kristalle

Schmelzpunkt 68 °C

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3215 (O-H), 2981 (C-H_{aliph.}), 1223 (P=O), 1056/1020 (P-O)

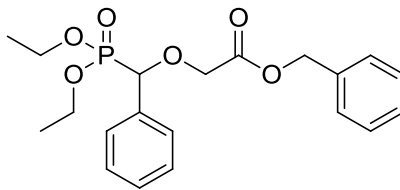
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.27 (t, $J=7.1$ Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.30 (t, $J=7.0$ POCH₂CH₃), 4.05–4.15 (m, 4H, POCH₂CH₃), 4.99 (d, $^2J_{\text{H,P}}=11.1$ Hz, 1H, PCH), 7.31 (ddd, $^3J_{\text{H,H}}=8.3$ Hz, $^4J_{\text{H,H}}=^4J_{\text{H,P}}=2.1$ Hz, 1H, arom. H), 7.43 (d, $^3J_{\text{H,H}}=8.3$ Hz, 1H, arom. H), 7.61 (dd, $^4J_{\text{H,H}}=^4J_{\text{H,P}}=1.9$ Hz, 1H, arom. H)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 16.39 (d, $^3J_{\text{C,P}}=5.4$ Hz, POCH₂CH₃), 16.41 (d, $^3J_{\text{C,P}}=5.4$ Hz, POCH₂CH₃), 63.28 (d, $^2J_{\text{C,P}}=7.4$ Hz, POCH₂CH₃), 63.79 (d, $^2J_{\text{C,P}}=7.0$ Hz, POCH₂CH₃), 69.64 (d, $^1J_{\text{C,P}}=159.6$ Hz, PCH), 126.32 (d, $^3J_{\text{C,P}}=5.0$ Hz, C₆H₃Cl₂: C6), 128.92 (d, $^3J_{\text{C,P}}=5.5$ Hz, C₆H₃Cl₂: C2), 130.12 (d, $^4J_{\text{C,P}}=1.6$ Hz, C₆H₃Cl₂: C5), 131.94 (d, $^4J_{\text{C,P}}=3.5$ Hz, C₆H₃Cl₂: C3), 132.43 (d, $^5J_{\text{C,P}}=2.5$ Hz, C₆H₃Cl₂: C4), 137.06 (C₆H₃Cl₂: C1)

C₁₁H₁₅Cl₂O₄P (313.11)

Berechnet (%) C 42.19 H 4.83

Gefunden (%) C 42.00 H 4.98

Benzyl-2-((diethoxyphosphoryl)(phenyl)methoxy)acetat **17a**

Hergestellt aus 1,22 g Diethyl-((phenyl)(hydroxy)methyl)phosphonat (5 mmol) und 1,38 g Bromessigsäurebenzylester (6 mmol) nach **AAV 5**.

Ausbeute 72 %, farbloses Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 2986 (C-H_{aliph.}), 1756 (C=O), 1284/1253 (P=O), 1051/1027 (P-O)

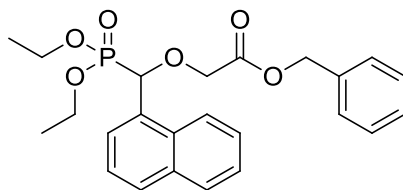
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.20 (t, J =7.1 Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.26 (t, J =7.1 Hz, POCH₂CH₃), 3.94–4.03 (m, 1H, POCH₂CH₃), 4.04–4.14 (m, 3H, POCH₂CH₃), 4.05 (d, J =16.5 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.27 (dd, J =16.5, 0.9 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.94 (d, $^2J_{H,P}$ =14.9 Hz, 1H, PCH), 5.15 (s, 2H, OCH₂Ph), 7.29–7.39 (m, 8H, arom.), 7.42–7.46 (m, 2H, arom.)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 16.31 (d, $^3J_{C,P}$ =5.7 Hz, POCH₂CH₃), 16.40 (d, $^3J_{C,P}$ =5.8 Hz, POCH₂CH₃), 63.14 (d, $^2J_{C,P}$ =6.5 Hz, POCH₂CH₃), 63.39 (d, $^2J_{C,P}$ =6.7 Hz, POCH₂CH₃), 66.41 (d, $^3J_{C,P}$ =13.8 Hz, OCH₂C=O), 66.62 (OCH₂Ph), 78.42 (d, $^1J_{C,P}$ =167.9 Hz, PCH), 128.36, 128.37 (d, $^3J_{C,P}$ =2.9 Hz, 2C), 128.43, 128.47, 128.53 (d, $^5J_{C,P}$ =1.9 Hz), 128.61 (2C), 128.78 (d, $^4J_{C,P}$ =2.8 Hz, 2C), 133.57 (d, $^2J_{C,P}$ =2.5 Hz), 135.30, 169.49 (C=O)

C₂₀H₂₅O₆P (392.38)

Berechnet (%) C 61.22 H 6.42

Gefunden (%) C 61.09 H 6.44

Benzyl-2-((diethoxyphosphoryl)(1-naphthyl)methoxy)acetat **17b**

Hergestellt aus 2,80 g Diethyl-((naphthyl)(hydroxy)methyl)phosphonat (9,5 mmol) und 2,62 g Bromessigsäurebenzylester (11,4 mmol) nach **AAV 5**.

Ausbeute 74 %, gelbes Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 2983 (C-H_{aliph.}), 1756 (C=O), 1257 (P=O), 1052/1024 (P-O)

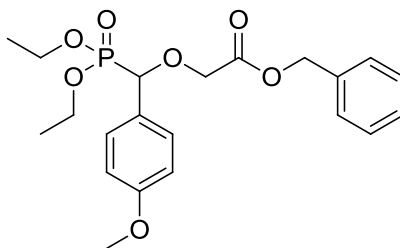
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.04 (t, J =7.1 Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.24 (t, J =7.1 Hz, POCH₂CH₃), 3.75–3.85 (m, 1H, POCH₂CH₃), 3.95–4.05 (m, 2H, POCH₂CH₃), 4.01 (d, J =17.0 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.08–4.18 (m, 1H, POCH₂CH₃), 4.28 (dd, J =16.6, 1.1 Hz, 1H, OCH₂C=O), 5.13 (dd, J =17.8, 12.2 Hz, OCH₂Ph) 5.82 (d, $^2J_{\text{H,P}}$ =16.1 Hz, 1H, PCH), 7.25–7.29 (m, 2H, arom.), 7.30–7.34 (m, 3H, arom.), 7.46–7.53 (m, 3H, arom.), 7.79 (dd, J =6.9, 2.7 Hz, 1H, arom.), 7.82–7.89 (m, 2H, arom.), 8.11 (d, J =7.8 Hz, 1H, arom.)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 15.57 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ =5.7 Hz, POCH₂CH₃), 16.81 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ =6.0 Hz, POCH₂CH₃), 63.58 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ =6.6 Hz, POCH₂CH₃), 63.87 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ =6.7 Hz, POCH₂CH₃), 66.62 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ =14.1 Hz, OCH₂C=O), 67.01 (OCH₂Ph), 75.45 (d, $^1J_{\text{C,P}}$ =172.2 Hz, PCH), 124.19, 125.76 (d, $J_{\text{C,P}}$ =3.3 Hz), 126.21, 126.75, 127.42 (d, $J_{\text{C,P}}$ =5.8 Hz), 128.75 (2C), 128.85, 128.99 (2C), 129.14, 129.74 (d, $J_{\text{C,P}}$ =2.6 Hz), 129.80 (d, $J_{\text{C,P}}$ =3.4 Hz), 132.18 (d, $J_{\text{C,P}}$ =5.4 Hz), 134.16 (d, $J_{\text{C,P}}$ =1.9 Hz), 135.61, 169.99 (C=O)

C₂₄H₂₇O₆P (442.44)

Berechnet (%) C 65.15 H 6.15

Gefunden (%) C 64.97 H 5.98

Benzyl-2-((diethoxyphosphoryl)(4-methoxyphenyl)methoxy)acetat **17c**

Hergestellt aus 1,22 g Diethyl-((4-methoxyphenyl)(hydroxy)methyl)phosphonat (5 mmol) und 1,38 g Bromessigsäurebenzylester (6 mmol) nach **AAV 5**.

Ausbeute 53 %, farbloses Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 2983 (C-H_{aliph.}), 1756 (C=O), 1253 (P=O), 1053/1028 (P-O)

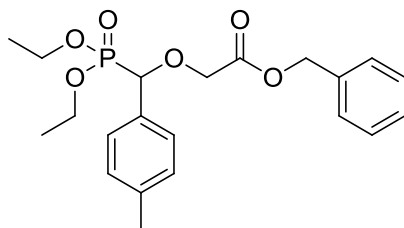
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.20 (t, $J=7.1$ Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.28 (t, $J=7.1$ Hz, 3H, POCH₂CH₃), 3.81 (s, 3H, OCH₃), 3.91–3.99 (m, 1H, POCH₂CH₃), 4.02 (d, $J=16.7$ Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.04–4.17 (m, 3H, POCH₂CH₃), 4.23 (dd, $J=16.6, 1.0$ Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.89 (d, $^2J_{H,P}=14.4$ Hz, 1H, PCH), 5.15 (s, 2H, OCH₂Ph), 6.89 (d, $J=8.6$ Hz, 2H, arom.), 7.29–7.39 (m, 7H, arom.)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 16.34 (d, $^3J_{C,P}=5.7$ Hz, POCH₂CH₃), 16.44 (d, $^3J_{C,P}=5.8$ Hz, POCH₂CH₃), 55.28 (OCH₃), 63.05 (d, $^2J_{C,P}=6.5$ Hz, POCH₂CH₃), 63.32 (d, $^2J_{C,P}=7.0$ Hz, POCH₂CH₃), 65.90 (d, $^3J_{C,P}=14.3$ Hz, OCH₂C=O), 66.58 (OCH₂Ph), 77.82 (d, $^1J_{C,P}=146.9$ Hz, PCH), 114.01 (d, $^4J_{C,P}=1.6$ Hz, 2C), 125.19 (d, $^2J_{C,P}=2.7$ Hz), 128.36 (2C), 128.46, 128.60 (2C), 129.88 (d, $^3J_{C,P}=6.0$ Hz, 2C), 135.26, 160.04 (d, $^5J_{C,P}=2.7$ Hz), 169.61 (C=O)

C₂₁H₂₇O₆P (422.41)

Berechnet (%) C 59.71 H 6.44

Gefunden (%) C 59.65 H 6.50

Benzyl-2-((diethoxyphosphoryl)(*p*-tolyl)methoxy)acetat **17d**

Hergestellt aus 1,22 g Diethyl-((*p*-tolyl)(hydroxy)methyl)phosphonat (5 mmol) und 1,38 g Bromessigsäurebenzylester (6 mmol) nach **AAV 5**.

Ausbeute 40 %, farbloses Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 2982 (C-H_{aliph.}), 1755 (C=O), 1256 (P=O), 1024 (P-O)

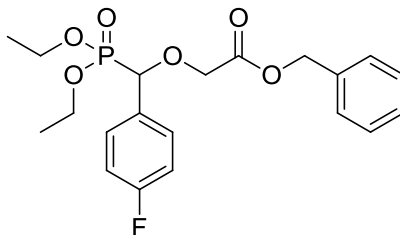
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.21 (t, J =7.1 Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.27 (t, J =7.1 Hz, POCH₂CH₃), 2.35 (d, J =1.5 Hz, 3H, CH₃), 3.93–4.01 (m, 1H, POCH₂CH₃), 4.03 (d, J =16.7 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.06–4.16 (m, 3H, POCH₂CH₃), 4.25 (dd, J =16.6, 1.2 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.91 (d, $^2J_{H,P}$ =14.8 Hz, 1H, PCH), 5.15 (s, 2H, OCH₂Ph), 7.17 (d, J =7.9 Hz, 2H, arom.), 7.29–7.37 (m, 7H, arom.)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 16.33 (d, $^3J_{C,P}$ =6.1 Hz, POCH₂CH₃), 16.42 (d, $^3J_{C,P}$ =6.0 Hz, POCH₂CH₃), 21.25 (CH₃), 63.07 (d, $^2J_{C,P}$ =6.7 Hz, POCH₂CH₃), 63.33 (d, $^2J_{C,P}$ =7.1 Hz, POCH₂CH₃), 66.09 (d, $^3J_{C,P}$ =14.0 Hz, OCH₂C=O), 66.57 (OCH₂Ph), 78.11 (d, $^1J_{C,P}$ =168.8 Hz, PCH), 128.35 (2C), 128.36, 128.43 (d, $^3J_{C,P}$ =5.2 Hz, 2C), 128.59 (2C), 129.27 (d, $^4J_{C,P}$ =2.2 Hz, 2C), 130.28 (d, $^2J_{C,P}$ =2.7 Hz), 135.27, 138.66 (d, $^5J_{C,P}$ =3.4 Hz), 169.57 (C=O)

C₂₁H₂₇O₆P (406.41)

Berechnet (%) C 62.06 H 6.70

Gefunden (%) C 61.97 H 6.83

Benzyl-2-((diethoxyphosphoryl)(4-fluorophenyl)methoxy)acetat **17e**

Hergestellt aus 2,62 g Diethyl-((4-fluorophenyl)(hydroxy)methyl)phosphonat (10 mmol) und 1,75 g Bromessigsäurebenzylester (12 mmol) nach **AAV 5**.

Ausbeute 73 %, gelbliches Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 2984 (C-H_{aliph.}), 1756 (C=O), 1256/1224 (P=O), 1052/1027 (P-O)

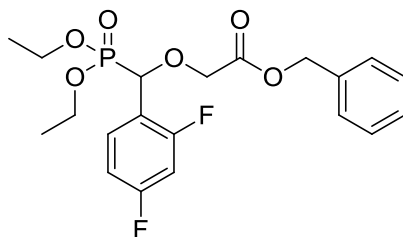
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.22 (t, J =7.1 Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.27 (t, J =7.1 Hz, POCH₂CH₃), 3.97–4.15 (m, 4H, POCH₂CH₃), 4.05 (d, J =16.8 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.27 (dd, J =16.6, 1.2 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.91 (d, $^2J_{H,P}$ =14.5 Hz, 1H, PCH), 5.15 (s, 2H, OCH₂Ph), 7.05 (t, $^3J_{H,H}$ = $^3J_{H,F}$ =8.6 Hz, 2H, C₆H₄F: H3, H5), 7.29–7.33 (m, 5H, C₆H₅), 7.42 (ddd, $^3J_{H,H}$ =8.4 Hz, $^4J_{H,F}$ =5.3 Hz, $^4J_{H,P}$ =2.1 Hz, 2H, C₆H₄F: H2, H6)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 16.33 (d, $^3J_{C,P}$ =6.0 Hz, POCH₂CH₃), 16.41 (d, $^3J_{C,P}$ =6.0 Hz, POCH₂CH₃), 63.16 (d, $^2J_{C,P}$ =6.9 Hz, POCH₂CH₃), 63.44 (d, $^2J_{C,P}$ =7.0 Hz, POCH₂CH₃), 66.37 (d, $^3J_{C,P}$ =13.5 Hz, OCH₂C=O), 66.70 (OCH₂Ph), 77.60 (d, $^1J_{C,P}$ =169.2 Hz, PCH), 115.56 (dd, $^2J_{C,F}$ =21.6 Hz, $^4J_{C,P}$ =2.0 Hz, C₆H₄F: C3, C5), 128.41 (2C, C₆H₅), 128.53 (C₆H₅), 128.62 (2C, C₆H₅), 129.40 (t, $^2J_{C,P}$ = $^4J_{C,F}$ = 2.7 Hz, C₆H₄F: C1), 130.13 (dd, $^3J_{C,F}$ =8.2 Hz, $^3J_{C,P}$ =5.8 Hz, C₆H₄F: C2, C6), 135.16 (C₆H₅), 162.98 (dd, $^1J_{C,F}$ =247.6 Hz, $^5J_{C,P}$ =3.4 Hz, C₆H₄F: C4), 169.40 (C=O)

C₂₀H₂₄FO₆P (410.37)

Berechnet (%) C 58.54 H 5.89

Gefunden (%) C 58.65 H 5.74

Benzyl-2-((diethoxyphosphoryl)(2,4-difluorophenyl)methoxy)acetat **17f**

Hergestellt aus 1,40 g **16a** (5 mmol) und 1,38 g Bromessigsäurebenzylester (6 mmol) nach **AAV 5**.

Ausbeute 83 %, gelbes Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 2984 (C-H_{aliph.}), 1756 (C=O), 1257 (P=O), 1052/1025 (P-O)

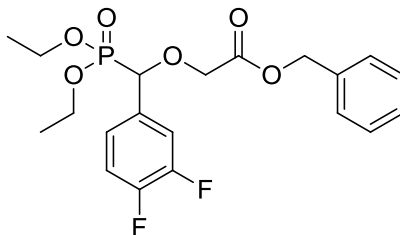
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.22 (t, J =7.1 Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.30 (t, J =7.1 Hz, POCH₂CH₃), 4.00–4.15 (m, 2H, POCH₂CH₃), 4.08 (d, J =16.6 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.16–4.23 (m, 2H, POCH₂CH₃), 4.25 (dd, J =16.5, 0.6 Hz, 1H, OCH₂C=O), 5.16 (s, 2H, OCH₂Ph), 5.23 (d, $J_{H,P}$ =14.6 Hz, 1H, PCH), 6.80 (dt, $J_{H,F}$ =9.4 Hz, $J_{H,P}$ =1.9 Hz, 1H, C₆H₃F₂: H3), 6.93 (dt, $J_{H,H}$ = $J_{H,F}$ =8.5 Hz, $J_{H,P}$ =2.1 Hz, 1H, C₆H₃F₂: H5), 7.30–7.40 (m, 5H, C₆H₅), 7.64 (ddt, $J_{H,H}$ = $J_{H,F}$ =8.5 Hz, $J_{H,F}$ =6.4 Hz, $J_{H,P}$ =2.1 Hz, 1H, C₆H₃F₂: H6)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 16.29 (d, $J_{C,P}$ =5.6 Hz, POCH₂CH₃), 16.40 (d, $J_{C,P}$ =5.9 Hz, POCH₂CH₃), 63.27 (d, $J_{C,P}$ =6.9 Hz, POCH₂CH₃), 63.54 (d, $J_{C,P}$ =6.7 Hz, POCH₂CH₃), 66.78 (OCH₂Ph), 66.90 (d, $J_{C,P}$ =12.7 Hz, OCH₂C=O), 70.50 (dd, $J_{C,P}$ =173.2 Hz, $J_{C,F}$ =1.0 Hz, PCH), 103.80 (dt, $J_{C,F}$ = $J_{C,F}$ =25.6 Hz, $J_{C,P}$ =1.3 Hz, C₆H₃F₂: C3), 112.12 (dt, $J_{C,F}$ =21.5 Hz, $J_{C,F}$ = $J_{C,P}$ =2.8 Hz, C₆H₃F₂: C5), 117.16 (ddd, $J_{C,F}$ =13.8 Hz, $J_{C,P}$ =3.4 Hz, $J_{C,F}$ =1.9 Hz, C₆H₃F₂: C1), 128.42 (2C, C₆H₅), 128.53 (C₆H₅), 128.62 (2C, C₆H₅), 130.55 (ddd, $J_{C,F}$ = $J_{C,F}$ =9.1 Hz, $J_{C,P}$ =4.1 Hz, C₆H₃F₂: C6), 135.12 (C₆H₅), 160.80 (ddd, $J_{C,F}$ =250.6 Hz, $J_{C,F}$ =12.1 Hz, $J_{C,P}$ =7.0 Hz, C₆H₃F₂: C2), 163.07 (ddd, $J_{C,F}$ =250.6 Hz, $J_{C,F}$ =11.9 Hz, $J_{C,P}$ =2.9 Hz, C₆H₃F₂: C4), 169.16 (C=O)

C₂₀H₂₃F₂O₆P (428.36)

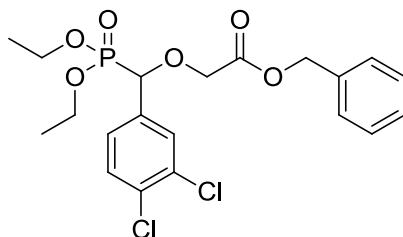
Berechnet (%) C 56.08 H 5.41

Gefunden (%) C 56.26 H 5.37

Benzyl-2-((diethoxyphosphoryl)(3,4-difluorophenyl)methoxy)acetat **17g**

Hergestellt aus 5,60 g **16b** (20 mmol) und 5,50 g Benzylbromoacetat (24 mmol) nach **AAV 5**.

Ausbeute	82 %, farbloses Öl	
IR $\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹)	2984 (C-H _{aliph.}), 1754 (C=O), 1282/1259 (P=O), 1052/1020 (P-O)	
¹ H-NMR	(500 MHz, CDCl ₃) = δ (ppm) 1.25 (t, J =7.1 Hz, 3H, POCH ₂ CH ₃), 1.27 (t, J =7.1 Hz, POCH ₂ CH ₃), 4.03–4.17 (m, 4H, POCH ₂ CH ₃), 4.08 (d, J =16.6 Hz, 1H, OCH ₂ C=O), 4.30 (dd, J =16.6, 1.2 Hz, 1H, OCH ₂ C=O), 4.87 (d, $J_{H,P}$ =14.6 Hz, 1H, PCH), 5.16 (s, 2H, OCH ₂ Ph), 7.11–7.18 (m, 2H, C ₆ H ₃ F ₂), 7.27–7.37 (m, 6H, C ₆ H ₅ , C ₆ H ₃ F ₂)	
¹³ C-NMR	(125 MHz, CDCl ₃) = δ (ppm) 16.35 (d, $J_{C,P}$ =5.7 Hz, POCH ₂ CH ₃), 16.40 (d, $J_{C,P}$ =5.8 Hz, POCH ₂ CH ₃), 63.29 (d, $J_{C,P}$ =6.8 Hz, POCH ₂ CH ₃), 63.55 (d, $J_{C,P}$ =7.1 Hz, POCH ₂ CH ₃), 66.69 (d, $J_{C,P}$ =12.6 Hz, OCH ₂ C=O), 66.80 (OCH ₂ Ph), 77.24 (d, $J_{C,P}$ =168.7 Hz, PCH), 117.20 (dd, $J_{C,F}$ =18.2 Hz, $J_{C,P}$ =5.3 Hz, C ₆ H ₃ F ₂ : C2), 117.46 (dd, $J_{C,F}$ =17.3 Hz, $J_{C,P}$ =1.7 Hz, C ₆ H ₃ F ₂ : C5), 124.40 (ddd, $J_{C,P}$ =6.1 Hz, $J_{C,F}$ =4.1 Hz, C ₆ H ₃ F ₂ : C6), 128.44 (2C, C ₆ H ₅), 128.59 (C ₆ H ₅), 128.64 (2C, C ₆ H ₅), 130.95 (m, C ₆ H ₃ F ₂ : C1), 135.07 (C ₆ H ₅), 150.34 (ddd, $J_{C,F}$ =249.0 Hz, $J_{C,P}$ =12.3 Hz, $J_{C,P}$ =2.5 Hz, C ₆ H ₃ F ₂ : C4), 150.51 (ddd, $J_{C,F}$ =249.6 Hz, $J_{C,P}$ =12.5 Hz, $J_{C,P}$ =3.1 Hz, C ₆ H ₃ F ₂ : C3), 169.24 (C=O)	
C ₂₀ H ₂₃ F ₂ O ₆ P	(428.36)	
Berechnet (%)	C 56.08	H 5.41
Gefunden (%)	C 55.93	H 5.70

Benzyl-2-((3,4-dichlorphenyl)(diethoxyphosphoryl)methoxy)acetat **17h**

Hergestellt aus 1,57 g **16c** (5 mmol) und 1,38 g Bromessigsäurebenzylester (6 mmol) nach **AAV 5**.

Ausbeute 76%, gelbliches Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 2984 (C-H_{aliph.}), 1756 (C=O), 1255 (P=O), 1051/1028 (P-O)

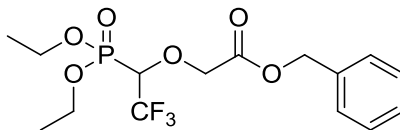
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.26 (t, J =6.9 Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.28 (t, J =6.9 Hz, POCH₂CH₃), 4.05–4.16 (m, 4H, POCH₂CH₃), 4.09 (d, J =17.1 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.31 (dd, J =16.6, 0.7 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.87 (d, $J_{H,P}$ =14.7 Hz, 1H, PCH), 5.16 (s, 2H, OCH₂Ph), 7.26–7.38 (m, 6H, C₆H₅, C₆H₄Cl₂), 7.43 (d, J =8.3 Hz, 1H, C₆H₄Cl₂), 7.53 (t, J =1.9 Hz, 1H, C₆H₄Cl₂)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 16.36 (d, $J_{C,P}$ =5.8 Hz, POCH₂CH₃), 16.39 (d, $J_{C,P}$ =5.2 Hz, POCH₂CH₃), 63.37 (d, $J_{C,P}$ =6.7 Hz, POCH₂CH₃), 63.59 (d, $J_{C,P}$ =6.8 Hz, POCH₂CH₃), 66.82 (OCH₂Ph), 66.87 (d, $J_{C,P}$ =11.9 Hz, OCH₂C=O), 77.22 (d, $J_{C,P}$ =167.8 Hz, PCH), 127.37 (d, $J_{C,P}$ =5.5 Hz, C₆H₄Cl₂: C6), 128.43 (C₆H₅, 2C), 128.59 (C₆H₅, 2C), 128.64 (C₆H₅, 2C), 129.92 (d, $J_{C,P}$ =5.9 Hz, C₆H₃Cl₂: C2), 130.48 (d, $J_{C,P}$ =2.0 Hz, C₆H₃Cl₂: C5), 132.74 (d, $J_{C,P}$ =2.7 Hz, C₆H₃Cl₂), 132.79 (d, $J_{C,P}$ =3.6 Hz, C₆H₃Cl₂), 134.32 (d, $J_{C,P}$ =2.0 Hz, C₆H₃Cl₂: C4), 135.04 (C₆H₅), 169.19 (C=O)

C₂₀H₂₃Cl₂O₆P (461.27)

Berechnet (%) C 52.08 H 5.03

Gefunden (%) C 51.91 H 5.25

Benzyl-2-(1-(diethoxyphosphoryl)-2,2,2-trifluoroethoxy)acetat 17i

Hergestellt aus 1,37 g Diethyl-(2,2,2-trifluor-1-hydroxyethyl)phosphonat (7,5 mmol) und 2,06 g Bromessigsäurebenzylester (9 mmol) nach **AAV 5**.

Ausbeute 63 %, gelbliches Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 2987 (C-H_{aliph.}), 1763 (C=O), 1256 (P=O), 1046/1024 (P-O)

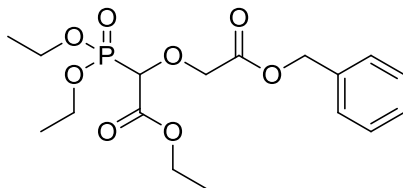
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.34 (t, J =7.0 Hz, 6H, POCH₂CH₃), 4.20–4.32 (m, 5H, POCH₂CH₃ + PCH), 4.43 (d, J =16.2 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.55 (d, J =16.2 Hz, 1H, OCH₂C=O), 5.20 (s, 2H, OCH₂Ph), 7.30–7.40 (m, 5H, arom.)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 16.33 (d, $^3J_{C,P}$ =5.7 Hz, POCH₂CH₃), 63.90 (d, $^2J_{C,P}$ =7.0 Hz, POCH₂CH₃), 64.36 (d, $^2J_{C,P}$ =6.7 Hz, POCH₂CH₃), 66.96 (OCH₂Ph), 69.30 (d, $^3J_{C,P}$ =5.5 Hz, OCH₂C=O), 74.53 (dq, $^1J_{C,P}$ =162.6 Hz, $^2J_{C,F}$ =32.2 Hz, PCH), 122.86 (qd, $^1J_{C,F}$ =282.5 Hz, $^2J_{C,P}$ =5.8 128.55 (2C), 128.63, 128.66 (2C), 135.00, 168.32 (C=O)

C₁₅H₂₀F₃O₆P (384.28)

Berechnet (%) C 46.88 H 5.25

Gefunden (%) C 46.86 H 5.10

Ethyl-2-(2-(benzyloxy)-2-oxoethoxy)-2-(diethoxyphosphoryl)acetat **17j**

Hergestellt aus 1,92 g Ethyl-2-(diethoxyphosphoryl)-2-hydroxyacetat (8 mmol) und 2,20 g Bromessigsäurebenzylester (12 mmol) nach **AAV 5**.

Ausbeute 40 %, gelbliches Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 2985 (C-H_{aliph.}), 1749 (C=O), 1216 (P=O), 1025 (P-O)

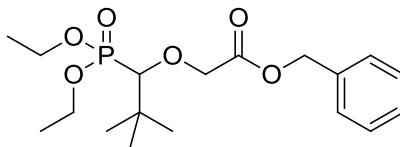
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.31 (t, $J=7.1$ Hz, 3H, COOCH₂CH₃), 1.33 (t, $J=7.0$ Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.34 (t, $J=7.1$ Hz, POCH₂CH₃), 4.18–4.34 (m, 7H, COOCH₂CH₃ + POCH₂CH₃ + OCH₂C=O), 4.47 (dd, $J=16.8$, 1.2 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.63 (d, $^2J_{H,P}=18.0$ Hz, 1H, PCH), 5.18 (s, 2H, OCH₂Ph), 7.30–7.40 (m, 5H, arom.)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 14.50 (COOCH₂CH₃), 16.75 (d, $^3J_{C,P}=5.8$ Hz, POCH₂CH₃), 62.44 (COOCH₂CH₃), 64.25 (d, $^2J_{C,P}=6.7$ Hz, POCH₂CH₃), 64.37 (d, $^2J_{C,P}=6.6$ Hz, POCH₂CH₃), 67.27 (OCH₂Ph), 68.44 (d, $^3J_{C,P}=10.9$ Hz, OCH₂C=O), 76.56 (d, $^1J_{C,P}=155.5$ Hz, PCH), 128.91 (2C), 128.98, 129.05 (2C), 135.47, 167.04 (C=O), 169.56 (C=O)

C₁₇H₂₅O₈P (388.35)

Berechnet (%) C 52.58 H 6.49

Gefunden (%) C 52.47 H 6.58

Benzyl-2-(1-(diethoxyphosphoryl)-2,2-dimethylpropoxy)acetat **17k**

Hergestellt aus 4,48 g Diethyl-(1-hydroxy-2,2-dimethylpropyl)-phosphonat (20 mmol) und 5,50 g Bromessigsäurebenzylester (24 mmol) nach **AAV 5**. Das Reaktionsprodukt konnte trotz mehrfacher chromatographischer Reinigung nicht analysenrein bzw. in mindestens 90 %iger HPLC-Reinheit erhalten werden.

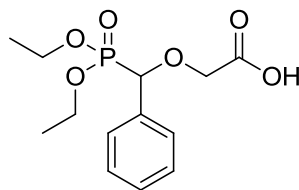
Ausbeute 16 %, gelbes Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 2977 (C-H_{aliph.}), 1755 (C=O), 1252 (P=O), 1027 (P-O)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.12 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.31 (t, $J=7.1$ Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.33 (t, $J=7.1$ Hz, POCH₂CH₃), 4.08–4.17 (m, 2H, POCH₂CH₃), 4.16–4.23 (m, 2H, POCH₂CH₃), 4.66 (d, $J=16.0$ Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.75 (d, $J=16.1$ Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.84 (d, $^2J_{H,P}=10.1$ Hz, 1H, PCH), 5.15 (dd, $J=19.6, 12.2$ Hz, 2H, OCH₂Ph), 7.32–7.39 (m, 5H, arom.)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 16.33 (d, $^3J_{C,P}=5.9$ Hz, POCH₂CH₃), 16.49 (d, $^3J_{C,P}=5.5$ Hz, POCH₂CH₃), 26.56 (d, $^3J_{C,P}=5.9$ Hz, C(CH₃)₃), 34.65 (d, $^2J_{C,P}=2.8$ Hz, C(CH₃)₃), 62.39 (d, $^2J_{C,P}=6.4$ Hz, POCH₂CH₃), 63.10 (d, $^2J_{C,P}=7.3$ Hz, POCH₂CH₃), 63.72 (OCH₂C=O), 67.28 (OCH₂Ph), 80.44 (d, $^1J_{C,P}=162.6$ Hz, PCH), 128.46 (2C), 128.64, 128.66 (2C), 134.85, 167.05 (C=O)

C₁₈H₂₉O₆P (372.39)

2-((Diethoxyphosphoryl)(phenyl)methoxy)essigsäure **18a**

Hergestellt aus 8,70 g **18a** (22 mmol) nach **AAV 6**.

Ausbeute 75 %, farblose Kristalle

Schmelzpunkt 102 °C

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 2910 (C-H_{aliph.}), 1741 (C=O), 1198 (P=O), 1030 (P-O)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.24 (t, $J=7.1$ Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.28 (t, $J=7.1$ Hz, POCH₂CH₃), 4.00–4.17 (m, 4H, POCH₂CH₃), 4.04 (d, $J=16.6$ Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.32 (dd, $J=16.7, 1.6$ Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.86 (d, $^2J_{H,P}=15.4$ Hz, 1H, PCH), 7.33–7.45 (m, 5H, arom.)

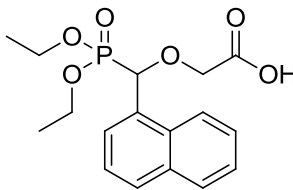
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 16.29 (d, $^3J_{C,P}=5.4$ Hz, POCH₂CH₃), 16.32 (d, $^3J_{C,P}=5.4$ Hz, POCH₂CH₃), 63.70 (d, $^2J_{C,P}=7.1$ Hz, POCH₂CH₃), 63.96 (d, $^2J_{C,P}=6.6$ Hz, POCH₂CH₃), 67.45 (d, $^3J_{C,P}=13.5$ Hz, OCH₂C=O), 78.96 (d, $^1J_{C,P}=168.5$ Hz, PCH), 127.99 (d, $^3J_{C,P}=5.7$ Hz, 2C), 128.65 (d, $^4J_{C,P}=2.2$ Hz, 2C), 128.99 (d, $^5J_{C,P}=2.9$ Hz), 133.17 (d, $^2J_{C,P}=2.6$ Hz), 171.41 (C=O)

C₁₃H₁₉O₆P (302.26)

Berechnet (%) C 51.66 H 6.34

Gefunden (%) C 51.73 H 6.08

2-((Diethoxyphosphoryl)(1-naphthyl)methoxy)-essigsäure **18b**



Hergestellt aus 1,50 g **17b** (3,4 mmol) nach **AAV 6**.

Ausbeute 88 %, farblose Kristalle

Schmelzpunkt 136 °C

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 2982/2911 (C-H_{aliph.}), 1753/1740 (C=O), 1200 (P=O), 1027 (P-O)

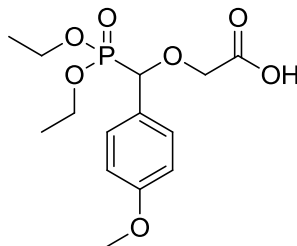
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.08 (t, J =7.0 Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.18 (t, J =7.0 Hz, POCH₂CH₃), 3.84–3.94 (m, 1H, POCH₂CH₃), 3.99–4.15 (m, 3H, POCH₂CH₃), 4.02 (d, J =16.8 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.28 (d, J =16.5 Hz, 1H, OCH₂C=O), 5.78 (d, $^2J_{H,P}$ =16.0 Hz, 1H, PCH), 7.25 (br. s, 1H, OH), 7.46–7.54 (m, 3H, arom.), 7.77 (dd, J =6.9, 2.6 Hz, 1H, arom.), 7.84–7.90 (m, 2H, arom.), 8.11 (d, J =8.0 Hz, 1H, arom.)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 16.15 (d, $^3J_{C,P}$ =5.8 Hz, POCH₂CH₃), 16.25 (d, $^3J_{C,P}$ =5.8 Hz, POCH₂CH₃), 63.75 (d, $^2J_{C,P}$ =6.9 Hz, POCH₂CH₃), 63.99 (d, $^2J_{C,P}$ =6.9 Hz, POCH₂CH₃), 67.08 (d, $^3J_{C,P}$ =13.8 Hz, OCH₂C=O), 75.50 (d, $^1J_{C,P}$ =168.5 Hz, PCH), 123.61, 125.36 (d, $J_{C,P}$ =3.0 Hz), 125.91, 126.43, 126.63 (d, $J_{C,P}$ =6.3 Hz), 128.79, 129.06 (d, $J_{C,P}$ =2.7 Hz), 129.55 (d, $J_{C,P}$ =3.1 Hz), 131.49 (d, $J_{C,P}$ =4.6 Hz), 133.73 (d, $J_{C,P}$ =1.8 Hz), 171.67 (C=O)

C₁₇H₂₁O₆P (352.32)

Berechnet (%) C 57.95 H 6.01

Gefunden (%) C 57.90 H 6.29

2-((Diethoxyphosphoryl)(4-methoxyphenyl)methoxy)essigsäure **18c**

Hergestellt aus 6,46 g **17c** (15 mmol) nach **AAV 6**.

Ausbeute 85 %, farblose Kristalle

Schmelzpunkt 86 °C

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 2911 (C-H_{aliph.}), 1754/1738 (C=O), 1253 (P=O), 1056/1024 (P-O)

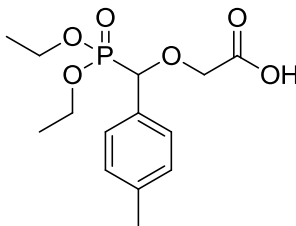
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.24 (t, $J=7.1$ Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.29 (t, $J=7.1$ POCH₂CH₃), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 4.01 (d, $J=16.7$ Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.02–4.16 (m, 4H, POCH₂CH₃), 4.26 (dd, $J=16.7$, 1.5 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.81 (d, $^2J_{H,P}=14.9$ Hz, 1H, PCH), 6.07 (br. s., 1H. OH), 6.92 (d, $J=8.6$ Hz, 2H, arom.), 7.35 (dd, $J=8.7$, 2.0 Hz, 2H, arom.)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 16.33 (d, $^3J_{C,P}=5.4$ Hz, POCH₂CH₃), 16.36 (d, $^3J_{C,P}=5.4$ Hz, POCH₂CH₃), 55.32 (OCH₃), 63.60 (d, $^2J_{C,P}=7.1$ Hz, POCH₂CH₃), 63.93 (d, $^2J_{C,P}=6.7$ Hz, POCH₂CH₃), 67.20 (d, $^3J_{C,P}=13.7$ Hz, OCH₂C=O), 78.51 (d, $^1J_{C,P}=171.1$ Hz, PCH), 114.16 (d, $^4J_{C,P}=1.6$ Hz, 2C), 124.72 (d, $^2J_{C,P}=2.5$ Hz), 129.44 (d, $^3J_{C,P}=5.8$ Hz, 2C), 160.23 (d, $^5J_{C,P}=2.7$ Hz), 171.30 (C=O)

C₁₄H₂₁O₇P (332.29)

Berechnet (%) C 50.60 H 6.37

Gefunden (%) C 50.40 H 6.52

2-((Diethoxyphosphoryl)(*p*-tolyl)methoxy)essigsäure **18d**

Hergestellt aus 6,36 g **17d** (16 mmol) nach **AAV 6**.

Ausbeute 98 %, farblose Kristalle

Schmelzpunkt 77 °C

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 2984 (C-H_{aliph.}), 1740 (C=O), 1201 (P=O), 1024 (P-O)

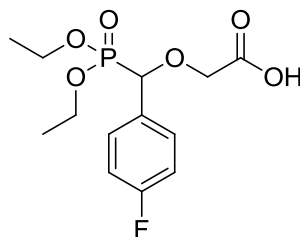
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.25 (t, J =7.1 Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.28 (t, J =7.0 Hz, 3H, POCH₂CH₃), 2.36 (s, J =0.9 Hz, 3H, CH₃), 4.01 (d, J =16.7 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.03–4.19 (m, 4H, POCH₂CH₃), 4.27 (dd, J =16.7, 1.2 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.85 (d, $J_{H,P}$ =15.3 Hz, 1H, PCH), 7.19 (d, J =7.9 Hz, 2H, arom.), 7.31 (dd, J =7.9, 1.6 Hz, 2H, arom.)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 16.30 (d, $J_{C,P}$ =5.2 Hz, POCH₂CH₃), 16.34 (d, $J_{C,P}$ =5.8 Hz, POCH₂CH₃), 21.26 (CH₃), 63.67 (d, $J_{C,P}$ =7.1 Hz, POCH₂CH₃), 63.95 (d, $J_{C,P}$ =6.6 Hz, POCH₂CH₃), 67.27 (d, $J_{C,P}$ =13.8 Hz, OCH₂C=O), 78.76 (d, $J_{C,P}$ =169.6 Hz, PCH), 127.95 (d, $J_{C,P}$ =5.7 Hz, 2C), 129.41 (d, $J_{C,P}$ =2.1 Hz, 2C), 129.85 (d, $J_{C,P}$ =3.0 Hz), 138.99 (d, $J_{C,P}$ =2.8 Hz), 171.53 (C=O)

C₁₄H₂₁O₆P (316.29)

Berechnet (%) C 53.16 H 6.69

Gefunden (%) C 52.95 H 6.78

2-((Diethoxyphosphoryl)(4-fluorophenyl)methoxy)essigsäure **18e**

Hergestellt aus 2,80 g **17e** (6,8 mmol) nach **AAV 6**.

Ausbeute 100 %, farbloses Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3271 (br., O-H), 2986 (C-H_{aliph.}), 1738 (C=O), 1226 (P=O), 1051/1032 (P-O)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.25 (t, J =7.1 Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.28 (t, J =7.1 Hz, POCH₂CH₃), 4.02 (d, J =16.7 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.05–4.17 (m, 4H, POCH₂CH₃), 4.27 (dd, J =16.7, 1.2 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.91 (d, $^2J_{H,P}$ =15.1 Hz, 1H, PCH), 6.75 (br. s, 1H, OH), 7.08 (t, $^3J_{H,H}$ = $^3J_{H,F}$ =8.6 Hz, 2H, arom. H3, H5), 7.42 (ddd, $^3J_{H,H}$ =8.7 Hz, $^4J_{H,F}$ =5.2 Hz, $^4J_{H,P}$ =2.1 Hz, 2H, arom. H2, H6)

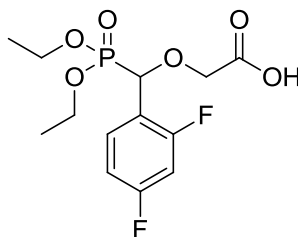
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 16.29 (d, $^3J_{C,P}$ =5.6 Hz, POCH₂CH₃), 16.31 (d, $^3J_{C,P}$ =5.6 Hz, POCH₂CH₃), 63.79 (d, $^2J_{C,P}$ =7.0 Hz, POCH₂CH₃), 63.92 (d, $^2J_{C,P}$ =6.8 Hz, POCH₂CH₃), 66.74 (d, $^3J_{C,P}$ =13.6 Hz, OCH₂C=O), 77.67 (d, $^1J_{C,P}$ =170.0 Hz, PCH), 115.68 (dd, $^2J_{C,F}$ =21.9 Hz, $^4J_{C,P}$ =1.7 Hz, C₆H₄F: C3, C5), 129.06 (t, $^2J_{C,P}$ = $^4J_{C,F}$ = 2.7 Hz, C₆H₄F: C1), 129.96 (dd, $^3J_{C,F}$ =8.1 Hz, $^3J_{C,P}$ =6.1 Hz, C₆H₄F: C2, C6), 163.07 (dd, $^1J_{C,F}$ =248.0 Hz, $^5J_{C,P}$ =3.2 Hz, C₆H₄F: C4), 171.65 (C=O)

C₁₃H₁₈FO₆P (320.25)

Berechnet (%) C 48.76 H 5.67

Gefunden (%) C 48.88 H 5.56

2-((Diethoxyphosphoryl)(2,4-difluorophenyl)methoxy)essigsäure **18f**



Hergestellt aus 0,43 g **17f** (1 mmol) nach **AAV 6**.

Ausbeute 96 %, farblose Kristalle

Schmelzpunkt 88 °C

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 2913 (C-H_{aliph.}), 1736 (C=O), 1201 (P=O), 1027 (P-O)

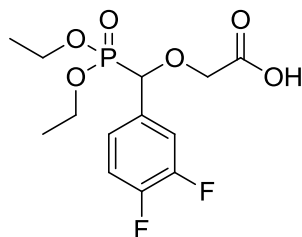
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.26 (t, J =7.1 Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.31 (t, J =7.1 Hz, POCH₂CH₃), 4.06 (d, J =16.6 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.10–4.25 (m, 4H, POCH₂CH₃), 4.27 (dd, J =16.5, 1.1 Hz, 1H, OCH₂C=O), 5.19 (d, $^2J_{H,P}$ =15.0 Hz, 1H, PCH), 6.31 (br. s, 1H, OH), 6.84 (dt, $^3J_{H,F}$ =9.3 Hz, $^5J_{H,P}$ =1.8 Hz, 1H, arom. H3), 6.96 (dt, $^3J_{H,H}$ = $^3J_{H,F}$ =8.3 Hz, $^5J_{H,P}$ =2.0 Hz, 1H, arom. H5), 7.61 (ddt, $^3J_{H,H}$ = $^4J_{H,F}$ =8.5 Hz, $^4J_{H,F'}$ =6.4 Hz, $^4J_{H,P}$ =2.1 Hz, 1H, arom. H6)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 16.26 (d, $^3J_{C,P}$ =5.5 Hz, POCH₂CH₃), 16.27 (d, $^3J_{C,P}$ =5.5 Hz, POCH₂CH₃), 63.92 (d, $^2J_{C,P}$ =7.0 Hz, POCH₂CH₃), 64.03 (d, $^2J_{C,P}$ =7.0 Hz, POCH₂CH₃), 67.33 (d, $^3J_{C,P}$ =12.8 Hz, OCH₂C=O), 70.87 (d, $^1J_{C,P}$ =174.0 Hz, PCH), 103.80 (dt, $^2J_{C,F}$ = $^2J_{C,F'}$ =25.6 Hz, $^4J_{C,P}$ =2.5 Hz, C₆H₃F₂: C3), 112.12 (dt, $^2J_{C,F}$ =21.4 Hz, $^4J_{C,F}$ = $^4J_{C,P}$ =2.9 Hz, C₆H₃F₂: C5), 117.16 (d, $^2J_{C,F}$ =12.3 Hz, C₆H₃F₂: C1), 130.55 (ddd, $^3J_{C,F}$ = $^3J_{C,F'}$ =9.9 Hz, $^3J_{C,P}$ =3.9 Hz, C₆H₃F₂: C6), 160.72 (ddd, $^1J_{C,F}$ =250.7 Hz, $^3J_{C,F}$ =12.0 Hz, $^3J_{C,P}$ =7.0 Hz, C₆H₃F₂: C2), 163.18 (ddd, $^1J_{C,F}$ =251.2 Hz, $^3J_{C,F}$ =12.2 Hz, $^5J_{C,P}$ =3.4 Hz, arom. C4), 171.44 (C=O)

C₁₃H₁₇F₂O₆P (338.24)

Berechnet (%) C 46.16 H 5.07

Gefunden (%) C 46.27 H 5.04

2-((Diethoxyphosphoryl)(3,4-difluorophenyl)methoxy)essigsäure **18g**

Hergestellt aus 3,50 g **17g** (8,2 mmol) nach **AAV 6**.

Ausbeute 100 %, farblose Kristalle

Schmelzpunkt 65 °C

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 2988/2934 (C-H_{aliph.}), 1754 (C=O), 1200 (P=O), 1035 (P-O)

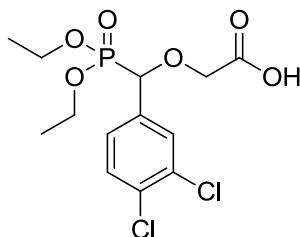
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.28 (t, J =7.1 Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.29 (t, J =7.0 Hz, POCH₂CH₃), 4.04 (d, J =16.7 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.09–4.21 (m, 4H, POCH₂CH₃), 4.30 (dd, J =16.7, 1.1 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.94 (d, $J_{H,P}$ =15.1 Hz, 1H, PCH), 7.14–7.23 (m, 2H, arom. H), 7.28–7.34 (m, 1H, arom. H), 8.12 (br. s, 1H, OH)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 16.30 (d, $J_{C,P}$ =5.9 Hz, POCH₂CH₃), 63.87 (d, $J_{C,P}$ =7.1 Hz, POCH₂CH₃), 64.09 (d, $J_{C,P}$ =6.8 Hz, POCH₂CH₃), 67.01 (d, $J_{C,P}$ =13.0 Hz, OCH₂C=O), 77.27 (d, $J_{C,P}$ =169.4 Hz, PCH), 117.04 (dd, $J_{C,F}$ =18.4 Hz, $J_{C,P}$ =5.3 Hz, C₆H₃F₂: C2), 117.46 (dd, $J_{C,F}$ =17.4 Hz, $J_{C,P}$ =2.0 Hz, C₆H₃F₂: C5), 124.26 (m, C₆H₃F₂: C6), 133.60 (m, C₆H₃F₂: C1), 150.42 (ddd, $J_{C,F}$ =247.8 Hz, $J_{C,F}$ =11.7 Hz, $J_{C,P}$ =2.8 Hz, C₆H₃F₂: C4), 150.60 (ddd, $J_{C,F}$ =249.3 Hz, $J_{C,F}$ =11.9 Hz, $J_{C,P}$ =3.2 Hz, C₆H₃F₂: C3), 171.44 (C=O)

C₁₃H₁₇F₂O₆P (338.24)

Berechnet (%) C 46.16 H 5.07

Gefunden (%) C 46.42 H 5.19

2-((3,4-Dichlorphenyl)(diethoxyphosphoryl)methoxy)essigsäure **18h**

Hergestellt aus 5,54 g **17h** (12 mmol) nach **AAV 6**.

Ausbeute 100%, farbloses Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 2985 (C-H_{aliph.}), 1740 (C=O), 1200 (P=O), 1029 (P-O)

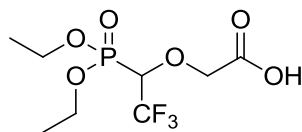
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.28 (t, J =7.1 Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.30 (t, J =7.1 Hz, POCH₂CH₃), 4.05 (d, J =16.7 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.10–4.21 (m, 4H, POCH₂CH₃), 4.32 (dd, J =16.7, 1.4 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.92 (d, $^2J_{H,P}$ =15.3 Hz, 1H, PCH), 7.08 (br. s, 1H, OH), 7.29 (dt, J =8.4, 1.9 Hz, 1H, arom.), 7.46 (d, J =8.2 Hz, 1H, arom.), 7.54 (t, J =1.9 Hz, 1H, arom.)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 16.29 (d, $^3J_{C,P}$ =5.6 Hz, POCH₂CH₃), 16.32 (d, $^3J_{C,P}$ =5.6 Hz, POCH₂CH₃), 63.94 (d, $^2J_{C,P}$ =7.1 Hz, POCH₂CH₃), 64.17 (d, $^2J_{C,P}$ =7.0 Hz, POCH₂CH₃), 67.12 (d, $^3J_{C,P}$ =12.6 Hz, OCH₂C=O), 77.21 (d, $^1J_{C,P}$ =168.5 Hz, PCH), 127.24 (d, $^3J_{C,P}$ =5.5 Hz, C₆H₃Cl₂: C6), 129.80 (d, $^3J_{C,P}$ =5.6 Hz, C₆H₃Cl₂: C2), 130.58 (d, $^4J_{C,P}$ =2.4 Hz, C₆H₃Cl₂: C5), 132.86 (d, $J_{C,P}$ =2.7 Hz), 133.00 (d, $J_{C,P}$ =3.6 Hz), 133.98 (d, $J_{C,P}$ =2.6 Hz, C₆H₃Cl₂: C4), 171.52 (C=O)

C₁₃H₁₇Cl₂O₆P (371.15)

Berechnet (%) C 42.07 H 4.62

Gefunden (%) C 42.34 H 4.41

2-(1-(Diethoxyphosphoryl)-2,2,2-trifluoroethoxy)essigsäure **18i**

Hergestellt aus 1,65 g **17i** (4,3 mmol) nach **AAV 6**.

Ausbeute 99 %, farbloses Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 2990 (C-H_{aliph.}), 1747 (C=O), 1269 (P=O), 1026 (P-O)

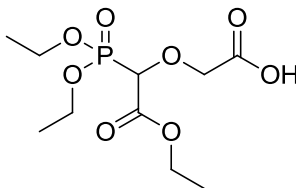
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.38 (t, J =7.1 Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.39 (t, J =7.1 Hz, 3H, POCH₂CH₃), 4.24–4.37 (m, 6H, POCH₂CH₃ + OCH₂C=O + PCH), 4.61 (dd, J =16.6, 1.6 Hz, 1H, OCH₂C=O), 5.33 (br. s, 1H, OH)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 16.22 (d, ³ $J_{C,P}$ =5.5 Hz, POCH₂CH₃), 16.25 (d, ³ $J_{C,P}$ =5.5 Hz, POCH₂CH₃), 64.48 (d, ² $J_{C,P}$ =7.2 Hz, POCH₂CH₃), 65.46 (d, ² $J_{C,P}$ =6.8 Hz, POCH₂CH₃), 70.48 (d, ³ $J_{C,P}$ =6.7 Hz, OCH₂C=O), 75.16 (dq, ¹ $J_{C,P}$ =167.0 Hz, ² $J_{C,F}$ =32.9 Hz, PCH), 122.86 (qd, ¹ $J_{C,F}$ =282.6 Hz, ² $J_{C,P}$ =6.1, 170.48 (C=O)

C₈H₁₄F₃O₆P (384.28)

Berechnet (%) C 32.66 H 4.80

Gefunden (%) C 32.93 H 4.78

2-(1-(Diethoxyphosphoryl)-2-ethoxy-2-oxoethoxy)essigsäure **18j**

Hergestellt aus 0,97 g **17j** (2,5 mmol) nach **AAV 6**.

Ausbeute 100 %, farbloses Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 2987 (C-H_{aliph.}), 1746 (C=O), 1245 (P=O), 1026 (P-O)

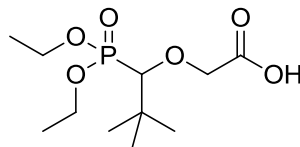
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.33 (t, J =7.1 Hz, 3H, COOCH₂CH₃), 1.36 (t, J =7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃), 4.17–4.36 (m, 7H, COOCH₂CH₃ + POCH₂CH₃ + OCH₂C=O), 4.42 (dd, J =16.8, 1.2 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.64 (d, $^2J_{H,P}$ =18.8 Hz, 1H, PCH), 7.14 (br. s, 1H, OH)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 14.07 (COOCH₂CH₃), 16.31 (d, $^3J_{C,P}$ =6.1 Hz, POCH₂CH₃), 62.41 (COOCH₂CH₃), 64.24 (d, $^2J_{C,P}$ =6.9 Hz, POCH₂CH₃), 64.62 (d, $^2J_{C,P}$ =6.5 Hz, POCH₂CH₃), 69.06 (d, $^3J_{C,P}$ =10.8 Hz, OCH₂C=O), 76.47 (d, $^1J_{C,P}$ =156.9 Hz, PCH), 166.78 (C=O), 170.98 (C=O)

C₁₀H₁₉O₈P (298.23)

Berechnet (%) C 40.27 H 6.42

Gefunden (%) C 40.54 H 6.30

2-(1-(Diethoxyphosphoryl)-2,2-dimethylpropoxy)essigsäure **18k**

Hergestellt aus 1,95 g **17k** (4,3 mmol) nach **AAV 6**.

Ausbeute 51 %, farblose Kristalle

Schmelzpunkt 116 °C

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 2981 (C-H_{aliph.}), 1754 (C=O), 1231 (P=O), 1024 (P-O)

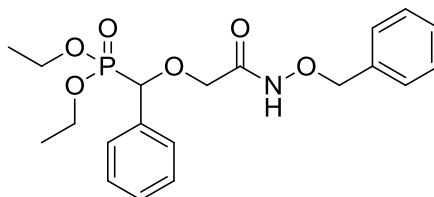
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.07 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.37 (t, J =7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃), 3.34 (d, $^2J_{H,P}$ =10.5 Hz, 1H, PCH), 4.08 (d, J =15.9 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.16–4.30 (m, 4H, POCH₂CH₃), 4.59 (dd, J =16.0, 2.91 Hz, 1H, OCH₂C=O)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 16.36 (d, $^3J_{C,P}$ =5.9 Hz, POCH₂CH₃), 16.43 (d, $^3J_{C,P}$ =5.8 Hz, POCH₂CH₃), 26.67 (d, $^3J_{C,P}$ =6.5 Hz, C(CH₃)₃), 35.80 (d, $^2J_{C,P}$ =6.5 Hz, C(CH₃)₃), 62.93 (d, $^2J_{C,P}$ =7.5 Hz, POCH₂CH₃), 64.00 (d, $^2J_{C,P}$ =7.0 Hz, POCH₂CH₃), 74.75 (d, $^3J_{C,P}$ =6.3 Hz, OCH₂C=O), 88.92 (d, $^1J_{C,P}$ =160.7 Hz, PCH), 171.13 (C=O)

C₁₁H₂₃O₆P (282.27)

Berechnet (%) C 46.81 H 8.21

Gefunden (%) C 46.89 H 8.10

Benzyl-2-((diethoxyphosphoryl)(phenyl)methoxy)acetat **19a**

Hergestellt aus 1,81 g **18a** (6 mmol) und 0,74 g *O*-Benzylhydroxylamin (6 mmol) nach **AAV 7**.

Ausbeute 93 %, farbloses Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3458 (br., N-H), 2984 (C-H_{aliph.}), 1690 (C=O), 1243/1217 (P=O), 1052/1025 (P-O)

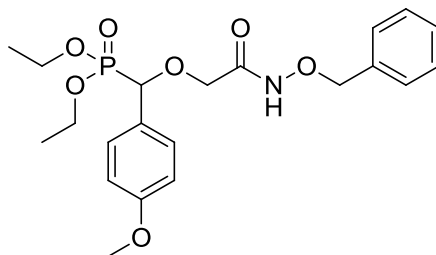
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 1.18 (t, J =7.1 Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.22 (t, J =7.1 Hz, POCH₂CH₃), 3.90–4.05 (m, 4H, POCH₂CH₃), 3.91 (d, J =15.7 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.22 (dd, J =15.8, 1.7 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.50 (d, $^2J_{\text{H,P}}$ =16.3 Hz, 1H, PCH), 5.00 (dd, J =31.1, 11.1 Hz, 2H, OCH₂Ph), 7.31–7.42 (m, 8H, arom.), 7.44–7.53 (m, 2H, arom.), 10.11 (s, 1H, NH)

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 16.34 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ =5.6 Hz, POCH₂CH₃), 63.29 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ =7.2 Hz, POCH₂CH₃), 63.77 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ =6.7 Hz, POCH₂CH₃), 69.64 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ =14.1 Hz, OCH₂C=O), 78.18 (OCH₂Ph), 79.50 (d, $^1J_{\text{C,P}}$ =169.6 Hz, PCH), 127.70 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ =5.6 Hz, 2C), 128.54 (2C), 128.68, 128.71 (d, $^4J_{\text{C,P}}$ =1.7 Hz, 2C), 129.09 (d, $^5J_{\text{C,P}}$ =3.2 Hz), 129.31 (2C), 133.00 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ =1.8 Hz), 135.25, 166.04 (C=O)

C₂₀H₂₆NO₆P (407.40)

Berechnet (%) C 58.96 H 6.43 N 3.44

Gefunden (%) C 58.98 H 6.28 N 3.27

Diethyl-((2-((benzyloxy)amino)-2-oxoethoxy)(4-methoxyphenyl)methyl)phosphonat **19b**

Hergestellt aus 2,43 g **18c** (7,3 mmol) und 0,90 g *O*-Benzyloxyhydroxylamin (7,3 mmol) nach **AAV 7**.

Ausbeute 90 %, farbloses Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 2983 (C-H_{aliph.}), 1691 (C=O), 1251 (P=O), 1028 (P-O)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.19 (t, $J=7.1$ Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.23 (t, $J=7.1$ Hz, POCH₂CH₃), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 3.87–4.04 (m, 4H, POCH₂CH₃), 3.89 (d, $J=15.8$ Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.18 (dd, $J=15.9$, 1.40 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.43 (d, $^2J_{\text{H,P}}=15.7$ Hz, 1H, PCH), 4.99 (dd, $J=31.0$, 11.1 Hz, 2H, OCH₂Ph), 6.90 (d, $J=8.6$ Hz, 2H, arom.), 7.23–7.26 (m, 1H, arom.), 7.31–7.43 (m, 4H, arom.), 7.46 (d, $J=6.7$ Hz, 2H, arom.), 10.04 (s, 1H, NH)

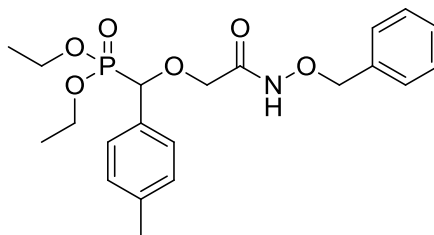
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 16.35 (POCH₂CH₃), 16.39 (POCH₂CH₃), 55.31 (OCH₃), 63.19 (d, $^2J_{\text{C,P}}=7.3$ Hz, POCH₂CH₃), 63.68 (d, $^2J_{\text{C,P}}=6.6$ Hz, POCH₂CH₃), 69.20 (d, $^3J_{\text{C,P}}=14.2$ Hz, OCH₂Ph), 78.18 (OCH₂Ph), 78.95 (d, $^1J_{\text{C,P}}=171.8$ Hz, PCH), 114.15 (d, $^4J_{\text{C,P}}=1.4$ Hz, 2C), 124.69 (d, $^2J_{\text{C,P}}=2.1$ Hz), 128.53 (2C), 128.71, 129.23 (d, $^3J_{\text{C,P}}=6.0$ Hz, 2C), 129.30 (2C), 135.23, 160.25 (d, $^5J_{\text{C,P}}=2.6$ Hz), 166.15 (C=O)

C₂₁H₂₈NO₇P (437.42)

Berechnet (%) C 56.60 H 6.41 N 3.30

Gefunden (%) C 56.39 H 6.38 N 3.12

Diethyl-((2-((benzyloxy)amino)-2-oxoethoxy)(*p*-tolyl)methyl)phosphonat **19c**



Hergestellt aus 3,01 g **18d** (9,5 mmol) und 1,17 g *O*-Benzylhydroxylamin (9,5 mmol) nach **AAV 7**.

Ausbeute 100 %, farbloses Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3185 (N-H), 2982 (C-H_{aliph.}), 1688 (C=O), 1243 (P=O), 1024 (P-O)

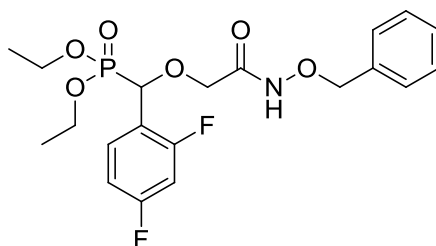
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.20 (t, *J*=7.1 Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.23 (t, *J*=7.1 Hz, 3H, POCH₂CH₃), 2.36 (d, *J*=1.5 Hz, 3H, CH₃), 3.89 (d, *J*=15.8 Hz, 1H, OCH₂C=O), 3.89–4.06 (m, 4H, POCH₂CH₃), 4.20 (dd, *J*=15.8, 1.8 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.45 (d, ²*J*_{H,P}=16.1 Hz, 1H, PCH), 4.99 (dd, *J*=31.4, 11.1 Hz, 2H, OCH₂Ph), 7.15–7.23 (m, 4H, arom.), 7.34–7.42 (m, 3H, arom.), 7.46 (d, *J*=6.8 Hz, 2H, arom.), 10.09 (s, 1H, NH)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 16.33 (POCH₂CH₃), 16.38 (POCH₂CH₃), 21.26 (CH₃), 63.23 (d, ²*J*_{C,P}=7.2 Hz, POCH₂CH₃), 63.71 (d, ²*J*_{C,P}=6.5 Hz, POCH₂CH₃), 69.44 (d, ³*J*_{C,P}=14.1 Hz, OCH₂Ph), 78.17 (OCH₂Ph), 79.32 (d, ¹*J*_{C,P}=170.4 Hz, PCH), 127.70 (d, ³*J*_{C,P}=5.7 Hz, 2C), 128.52 (2C), 128.70, 129.31 (2C), 129.41 (d, ⁴*J*_{C,P}=1.8 Hz, 2C), 129.83 (d, ²*J*_{C,P}=1.7 Hz), 135.25, 139.06 (d, ⁵*J*_{C,P}=2.8 Hz), 166.12 (C=O)

C₂₁H₂₈NO₆P (421.42)

Berechnet (%) C 59.85 H 6.70 N 3.32

Gefunden (%) C 59.64 H 6.68 N 3.38

Diethyl-((2-((benzyloxy)amino)-2-oxoethoxy)(2,4-difluorophenyl)methyl)phosphonat **19d**

Hergestellt aus 3,38 g **18f** (10 mmol) und 1,23 g *O*-Benzylhydroxylamin (10 mmol) nach AAV 7.

Ausbeute 100 %, gelbliches Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3196 (N-H), 2985 (C-H_{aliph.}), 1694 (C=O), 1247 (P=O), 1049/1030 (P-O)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.22 (t, J =7.1 Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.26 (t, J =7.1 Hz, POCH₂CH₃), 3.90 (d, J =15.7 Hz, 1H, OCH₂C=O), 3.95–4.10 (m, 4H, POCH₂CH₃), 4.18 (dd, J =15.7, 1.3 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.85 (d, $^2J_{H,P}$ =16.2 Hz, 1H, PCH), 4.99 (dd, J =27.6, 11.1 Hz, 2H, OCH₂Ph), 6.84 (dt, $^3J_{H,F}$ =9.3 Hz, $^5J_{H,P}$ =1.9 Hz, 1H, C₆H₃F₂: H3), 6.94 (dt, $^3J_{H,H}$ = $^3J_{H,F}$ =8.3 Hz, $^5J_{H,P}$ =2.0 Hz, 1H, C₆H₃F₂: H5), 7.34–7.42 (m, 3H, C₆H₅), 7.43–7.50 (m, 3H, C₆H₅, C₆H₃F₂: H6), 10.19 (s, 1H, NH)

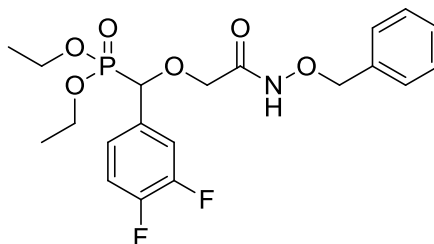
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 16.29 (d, $^3J_{C,P}$ =5.1 Hz, POCH₂CH₃), 16.33 (d, $^3J_{C,P}$ =4.9 Hz, POCH₂CH₃), 63.50 (d, $^2J_{C,P}$ =7.1 Hz, POCH₂CH₃), 63.92 (d, $^2J_{C,P}$ =6.6 Hz, POCH₂CH₃), 69.84 (d, $^3J_{C,P}$ =13.6 Hz, OCH₂C=O), 71.74 (dd, $^1J_{C,P}$ =174.8 Hz, $^3J_{C,F}$ =1.0 Hz, PCH), 78.16 (OCH₂Ph), 103.93 (dt, $^2J_{C,F}$ = $^2J_{C,F'}$ =25.7 Hz, $^4J_{C,P}$ =1.2 Hz, C₆H₃F₂: C3), 112.22 (dt, $^2J_{C,F}$ =24.4 Hz, $^4J_{C,F}$ = $^4J_{C,P}$ =2.7 Hz, C₆H₃F₂: C5), 117.16 (d, $^2J_{C,F}$ =14.4 Hz, C₆H₃F₂: C1), 128.53 (2C, C₆H₅), 128.70 (C₆H₅), 129.30 (2C, C₆H₅), 130.55 (ddd, $^3J_{C,F}$ = $^3J_{C,F'}$ =8.8 Hz, $^3J_{C,P}$ =3.9 Hz, C₆H₃F₂: C6), 135.20 (C₆H₅), 160.81 (ddd, $^1J_{C,F}$ =250.5 Hz, $^3J_{C,F}$ =12.0 Hz, $^3J_{C,P}$ =6.9 Hz, C₆H₃F₂: C2), 163.26 (ddd, $^1J_{C,F}$ =251.3 Hz, $^3J_{C,F}$ =11.9 Hz, $^5J_{C,P}$ =3.0 Hz, C₆H₃F₂: C4), 165.63 (C=O)

C₂₀H₂₄F₂NO₆P (443.38)

Berechnet (%) C 54.18 H 5.46 N 3.16

Gefunden (%) C 54.16 H 5.54 N 3.07

Diethyl-((2-((benzyloxy)amino)-2-oxoethoxy)(3,4-difluorophenyl)methyl)phosphonat **19e**



Hergestellt aus 5,21 g **18g** (15 mmol) und 1,90 g *O*-Benzylhydroxylamin (15 mmol) nach AAV 7.

Ausbeute 94 %, farbloses Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3189 (N-H), 2985 0(C-H_{aliph.}), 1694/1689 (C=O), 1286/1242 (P=O), 1051/1028 (P-O)

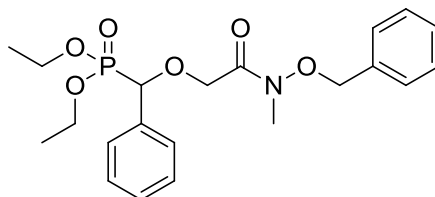
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.23 (t, J =7.3 Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.24 (t, J =7.3 Hz, POCH₂CH₃), 3.89 (d, J =15.7 Hz, 1H, OCH₂C=O), 3.96–4.10 (m, 4H, POCH₂CH₃), 4.24 (dd, J =15.7, 0.9 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.44 (d, $J_{H,P}$ =16.3 Hz, 1H, PCH), 5.00 (dd, J =34.4, 11.2 Hz, 2H, OCH₂Ph), 6.99–7.03 (m, 1H, C₆H₅), 7.13–7.22 (m, 2H, C₆H₃F₂), 7.35–7.43 (m, 3H, C₆H₅), 7.43–7.50 (m, 2H, C₆H₅, C₆H₃F₂), 10.10 (s, 1H, NH)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 16.35 (d, $J_{C,P}$ =5.5 Hz, POCH₂CH₃), 16.38 (d, $J_{C,P}$ =5.0 Hz, POCH₂CH₃), 63.48 (d, $J_{C,P}$ =7.1 Hz, POCH₂CH₃), 63.99 (d, $J_{C,P}$ =6.7 Hz, POCH₂CH₃), 69.80 (d, $J_{C,P}$ =13.7 Hz, OCH₂C=O), 78.16 (OCH₂Ph), 78.34 (d, $J_{C,P}$ =171.3 Hz, PCH), 116.62 (dd, $J_{C,F}$ =18.4 Hz, $J_{C,P}$ =4.9 Hz, C₆H₃F₂: C2), 117.59 (dd, $J_{C,F}$ =17.4 Hz, $J_{C,P}$ =1.2 Hz, C₆H₃F₂: C5), 124.50 (ddd, $J_{C,P}$ =6.2 Hz, $J_{C,F}$ =3.5 Hz, C₆H₃F₂: C6), 128.54 (2C, C₆H₅), 128.76 (C₆H₅), 129.32 (2C, C₆H₅), 130.30 (m, C₆H₃F₂: C1), 135.19 (C₆H₅), 150.47 (ddd, $J_{C,F}$ =248.6 Hz, $J_{C,F}$ =11.3 Hz, $J_{C,P}$ =2.5 Hz, C₆H₃F₂: C4), 150.68 (ddd, $J_{C,F}$ =250.4 Hz, $J_{C,F}$ =12.1 Hz, $J_{C,P}$ =3.2 Hz, C₆H₃F₂: C3), 165.60 (C=O)

C₂₀H₂₄F₂NO₆P (443.38)

Berechnet (%) C 54.18 H 5.46 N 3.16

Gefunden (%) C 54.35 H 5.35 N 3.18

Diethyl-((2-((benzyloxy)(methyl)amino)-2-oxoethoxy)(phenyl)methyl)phosphonat **20a**

Hergestellt aus 1,21 g **18a** (4 mmol) und 0,55 g *N*-Methyl-*O*-benzylhydroxylamin (4 mmol) nach **AAV 7**.

Ausbeute 98 %, farblose Kristalle

Schmelzpunkt 61 °C

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 2980/2932 (C-H_{aliph.}), 1685 (C=O), 1256 (P=O), 1019 (P-O)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 1.11 (t, $J=7.1$ Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.18 (t, $J=7.1$ Hz, POCH₂CH₃), 3.12 (s, 3H, NCH₃), 3.83–3.92 (m, 1H, POCH₂CH₃), 3.92–3.99 (m, 1H, POCH₂CH₃), 3.99–4.06 (m, 2H, POCH₂CH₃), 4.08 (d, $J=15.7$ Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.24 (d, $J=15.7$ Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.76 (dd, $J=28.3, 10.1$ Hz, 2H, OCH₂Ph), 4.95 (d, $^2J_{\text{H,P}}=14.3$ Hz, 1H, PCH), 7.13–7.22 (m, 2H, arom.), 7.23–7.30 (m, 2H, arom.), 7.30–7.43 (m, 8H, arom.)

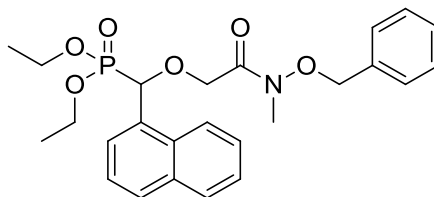
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 16.03 (d, $^3J_{\text{C,P}}=5.5$ Hz, POCH₂CH₃), 16.15 (d, $^3J_{\text{C,P}}=5.6$ Hz, POCH₂CH₃), 32.81 (NCH₃), 62.11 (d, $^2J_{\text{C,P}}=6.4$ Hz, POCH₂CH₃), 62.47 (d, $^2J_{\text{C,P}}=6.8$ Hz, POCH₂CH₃), 66.08 (d, $^3J_{\text{C,P}}=15.7$ Hz, OCH₂C=O), 75.22 (OCH₂Ph), 77.05 (d, $^1J_{\text{C,P}}=164.8$ Hz, PCH), 128.06 (2C), 128.21 (d, $^3J_{\text{C,P}}=4.8$ Hz, 2C), 128.33 (3C), 128.70, 129.40 (3C), 134.24, 169.51 (C=O)

C₂₁H₂₈NO₆P (421.42)

Berechnet (%) C 59.85 H 6.70 N 3.32

Gefunden (%) C 59.78 H 6.46 N 3.16

Diethyl-((2-((benzyloxy)(methyl)amino)-2-oxoethoxy)(1-naphthyl)methyl)phosphonat **20b**



Hergestellt aus 1,14 g **18b** (2,5 mmol) nach AAV 7.

Ausbeute 97 %, gelbliches Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 2982 (C-H_{aliph.}), 1675 (C=O), 1254 (P=O), 1049/1030 (P-O)

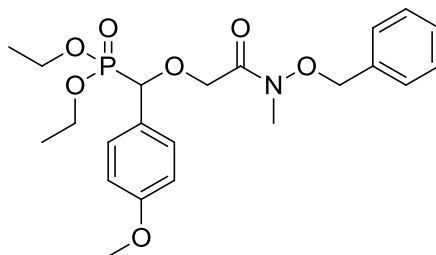
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.04 (t, $J=7.1$ Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.26 (t, $J=7.1$ Hz, 3H, POCH₂CH₃), 3.14 (s, 3H, NCH₃), 3.78–3.82 (m, 1H, POCH₂CH₃), 3.92 (d, $J=16.1$ Hz, 1H, OCH₂C=O), 3.97–4.06 (m, 1H, POCH₂CH₃), 4.12–4.22 (m, 2H, POCH₂CH₃), 4.29 (dd, $J=16.2, 0.7$ Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.52 (dd, $J=54.8, 10.6$ Hz, OCH₂Ph), 5.85 (d, $^2J_{H,P}=16.2$ Hz, 1H, PCH), 6.98–7.05 (m, 2H, arom.), 7.09–7.17 (m, 3H, arom.), 7.47–7.55 (m, 3H, arom.), 7.79 (dd, $J=6.8, 2.5$ Hz, 1H, arom.), 7.83–7.90 (m, 2H, arom.), 8.16 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, arom.)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 16.16 (d, $^3J_{C,P}=6.0$ Hz, POCH₂CH₃), 16.43 (d, $^3J_{C,P}=6.0$ Hz, POCH₂CH₃), 33.43 (NCH₃), 63.04 (d, $^2J_{C,P}=6.6$ Hz, POCH₂CH₃), 63.41 (d, $^2J_{C,P}=6.9$ Hz, POCH₂CH₃), 65.86 (d, $^3J_{C,P}=14.2$ Hz, OCH₂C=O), 74.57 (d, $^1J_{C,P}=170.7$ Hz, PCH), 76.16 (OCH₂Ph), 124.06, 125.38 (d, $J_{C,P}=3.3$ Hz), 125.75, 126.22, 127.08 (d, $J_{C,P}=4.9$ Hz), 128.50 (2C), 128.63, 128.97, 129.16 (d, $J_{C,P}=3.1$ Hz), 129.23 (2C), 129.76 (d, $J_{C,P}=2.7$ Hz), 131.98 (d, $J_{C,P}=5.4$ Hz), 133.77 (d, $J_{C,P}=3.9$ Hz), 133.79, 171.12 (C=O)

C₂₄H₂₇O₆P (471.48)

Berechnet (%) C 63.69 H 6.41 N 2.97

Gefunden (%) C 63.47 H 6.59 N 2.98

Diethyl-((2-((benzyloxy)(methyl)amino)-2-oxoethoxy)(4-methoxyphenyl)methyl)phosphonat **20c**

Hergestellt aus 1,69 g **18c** (5,1 mmol) und 0,70 g *N*-Methyl-*O*-benzylhydroxylamin (5,1 mmol) nach **AAV 7**.

Ausbeute 100 %, farbloses Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 2981 (C-H_{aliph.}), 1678 (C=O), 1251 (P=O), 1052/1028 (P-O)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.21 (t, J =7.1 Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.30 (t, J =7.1 Hz, POCH₂CH₃), 3.17 (s, 3H, NCH₃), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 3.94–4.03 (m, 1H, POCH₂CH₃), 4.03 (d, J =16.1 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.05–4.13 (m, 1H, POCH₂CH₃), 4.17 (q, J =7.1 Hz, 2H, POCH₂CH₃), 4.31 (d, J =16.0 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.68 (dd, J =39.7, 10.5 Hz, 2H, OCH₂Ph), 4.95 (d, $^2J_{\text{H,P}}$ =14.4 Hz, 1H, PCH), 6.90 (d, J =8.6 Hz, 2H, arom.), 7.17–7.24 (m, 2H, arom.), 7.29–7.35 (m, 3H, arom.), 7.38 (dd, J =8.7, 2.0 Hz, 2H, arom.)

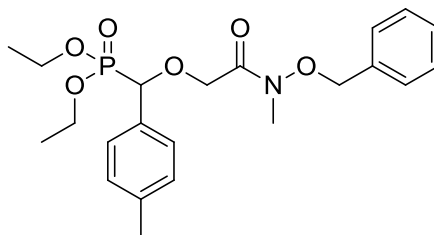
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 16.35 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ =5.8 Hz, POCH₂CH₃), 16.47 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ =5.8 Hz, POCH₂CH₃), 33.46 (NCH₃), 55.29 (OCH₃), 62.96 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ =6.6 Hz, POCH₂CH₃), 63.25 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ =6.9 Hz, POCH₂CH₃), 65.63 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ =12.8 Hz, OCH₂Ph), 77.29 (d, $^1J_{\text{C,P}}$ =169.5 Hz, PCH), 113.96 (d, $^4J_{\text{C,P}}$ =1.5 Hz, 2C), 125.63 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ =2.1 Hz), 128.70 (2C), 129.12, 129.30 (2C), 130.00 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ =6.2 Hz, 2C), 133.98, 159.94 (d, $^5J_{\text{C,P}}$ =2.5 Hz), 171.17 (C=O)

C₂₂H₃₀NO₇P (451.45)

Berechnet (%) C 58.53 H 6.70 N 3.10

Gefunden (%) C 58.75 H 6.55 N 3.14

Diethyl-((2-((benzyloxy)(methyl)amino)-2-oxoethoxy)(*p*-tolyl)methyl)phosphonat **20d**



Hergestellt aus 1,61 g **18d** (5,1 mmol) und 0,70 g *N*-Methyl-*O*-Benzylhydroxylamin (5,1 mmol) nach **AAV 7**.

Ausbeute 95 %, farbloses Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 2981 (C-H_{aliph.}), 1680 (C=O), 1255 (P=O), 1026 (P-O)

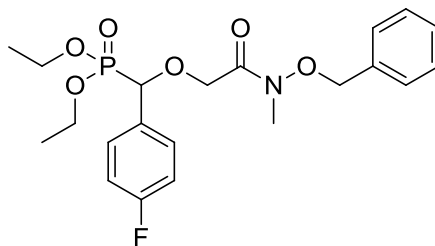
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.22 (t, J =7.1 Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.29 (t, J =7.1 Hz, POCH₂CH₃), 2.36 (d, J =1.3 Hz, 3H, CH₃), 3.16 (s, 3H, NCH₃), 3.96–4.04 (m, 1H, POCH₂CH₃), 4.05 (d, J =16.0 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.07–4.13 (m, 1H, POCH₂CH₃), 4.16 (q, J =7.2 Hz, 2H, POCH₂CH₃), 4.32 (d, J =16.0 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.67 (dd, J =44.7, 10.5 Hz, 2H, OCH₂Ph), 4.96 (d, $^2J_{\text{H,P}}$ =14.8 Hz, 1H, PCH), 7.13–7.23 (m, 4H, arom.), 7.28–7.37 (m, 5H, arom.)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 16.35 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ =5.8 Hz, POCH₂CH₃), 16.46 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ =5.8 Hz, POCH₂CH₃), 21.26 (CH₃), 33.54 (NCH₃), 62.98 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ =6.4 Hz, POCH₂CH₃), 63.27 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ =6.9 Hz, POCH₂CH₃), 65.85 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ =13.2 Hz, OCH₂Ph), 77.67 (d, $^1J_{\text{C,P}}$ =167.7 Hz, PCH), 128.54 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ =6.0 Hz, 2C), 128.68 (2C), 129.10, 129.20 (d, $^4J_{\text{C,P}}$ =1.7 Hz, 2C), 129.31 (2C), 130.68 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ =2.6 Hz), 133.98, 138.42 (d, $^5J_{\text{C,P}}$ =2.9 Hz), 171.06 (C=O)

C₂₂H₃₀NO₆P (435.45)

Berechnet (%) C 60.68 H 6.94 N 3.22

Gefunden (%) C 60.44 H 7.20 N 3.40

Diethyl-((2-((benzyloxy)(methyl)amino)-2-oxoethoxy)(4-fluorophenyl)methyl)phosphonat **20e**

Hergestellt aus 1,60 g **18e** (5 mmol) und 0,69 g *N*-Methyl-*O*-benzylhydroxylamin (5 mmol) nach **AAV 7**.

Ausbeute 85 %, gelbliches Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 2983 (C-H_{aliph.}), 1682 (C=O), 1253/1224 (P=O), 1052/1028 (P-O)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.22 (t, J =7.1 Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.28 (t, J =7.1 Hz, POCH₂CH₃), 3.18 (s, 3H, NCH₃), 3.98–4.18 (m, 4H, POCH₂CH₃), 4.00 (d, J =15.9 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.32 (d, J =16.0 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.70 (dd, J =29.3, 10.5 Hz, OCH₂Ph), 4.96 (d, $^2J_{H,P}$ =14.6 Hz, 1H, PCH), 7.06 (t, $^3J_{H,H}$ = $^3J_{H,F}$ =8.6 Hz, 2H, C₆H₄F: H3, H5), 7.20–7.25 (m, 2H, C₆H₅), 7.29–7.34 (m, 3H, C₆H₅), 7.42 (ddd, $^3J_{H,H}$ =7.7 Hz, $^4J_{H,F}$ =5.3 Hz, $^4J_{H,P}$ =2.0 Hz, 2H, C₆H₄F: H2, H6)

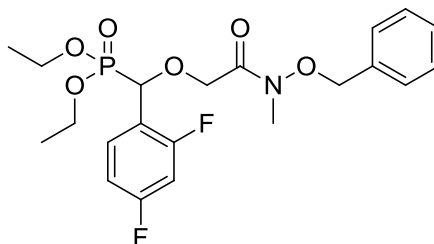
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 16.34 (d, $^3J_{C,P}$ =5.7 Hz, POCH₂CH₃), 16.43 (d, $^3J_{C,P}$ =6.1 Hz, POCH₂CH₃), 33.47 (NCH₃), 63.07 (d, $^2J_{C,P}$ =6.7 Hz, POCH₂CH₃), 63.36 (d, $^2J_{C,P}$ =6.7 Hz, POCH₂CH₃), 66.10 (d, $^3J_{C,P}$ =11.8 Hz, OCH₂C=O), 67.33 (OCH₂Ph), 77.16 (d, $^1J_{C,P}$ =168.3 Hz, PCH), 115.46 (dd, $^2J_{C,F}$ =21.4 Hz, $^4J_{C,P}$ =1.8 Hz, C₆H₄F: C3, C5), 128.72 (2C, C₆H₅), 129.18 (C₆H₅), 129.31 (2C, C₆H₅), 129.79 (dd, $^2J_{C,P}$ = $^4J_{C,F}$ =2.4 Hz, C₆H₄F: C1), 130.22 (dd, $^3J_{C,F}$ =8.1 Hz, $^3J_{C,P}$ =5.8 Hz, C₆H₄F: C2, C6), 133.92 (C₆H₅), 162.92 (dd, $^1J_{C,F}$ =247.2 Hz, $^5J_{C,P}$ =3.3 Hz, C₆H₄F: C4), 170.97 (C=O)

C₂₁H₂₇FNO₆P (439.41)

Berechnet (%) C 57.40 H 6.19 N 3.19

Gefunden (%) C 57.41 H 6.16 N 3.17

Diethyl-((2-((benzyloxy)(methyl)amino)-2-oxoethoxy)(2,4-difluorophenyl)methyl)phosphonat **20f**



Hergestellt aus 1,69 g **18f** (5 mmol) und 0,69 g *N*-Methyl-*O*-benzylhydroxylamin (5 mmol) nach **AAV 7**.

Ausbeute 93 %, farbloses Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 2984 (C-H_{aliph.}), 1682 (C=O), 1254 (P=O), 1052/1028 (P-O)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.23 (t, J =7.1 Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.31 (t, J =7.1 Hz, POCH₂CH₃), 3.18 (s, 3H, NCH₃), 4.02 (d, J =16.0 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.04–4.14 (m, 2H, POCH₂CH₃), 4.18–4.25 (m, 2H, POCH₂CH₃), 4.27 (dd, J =16.0, 0.7 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.74 (dd, J =17.4, 10.7 Hz, 2H, OCH₂Ph), 5.24 (d, $^2J_{H,P}$ =14.6 Hz, 1H, PCH), 6.81 (dt, $^3J_{H,F}$ =9.3 Hz, $^5J_{H,P}$ =1.7 Hz, 1H, C₆H₃F₂: H3), 6.93 (dt, $^3J_{H,H}$ = $^3J_{H,F}$ =8.4 Hz, $^5J_{H,P}$ =2.2 Hz, 1H, C₆H₃F₂: H5), 7.24–7.26 (m, 2H, C₆H₅), 7.31–7.34 (m, 3H, C₆H₅) 7.62 (ddt, $^3J_{H,H}$ = $^4J_{H,F}$ =8.6 Hz, $^4J_{H,F}$ =6.7 Hz, $^4J_{H,P}$ =2.2 Hz, 1H, C₆H₃F₂: H6)

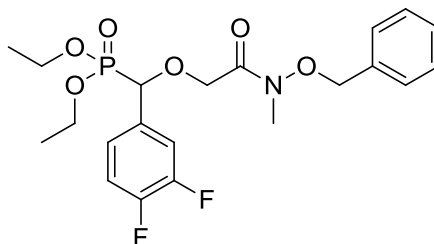
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 16.31 (d, $^3J_{C,P}$ =6.0 Hz, POCH₂CH₃), 16.42 (d, $^3J_{C,P}$ =5.8 Hz, POCH₂CH₃), 33.51 (NCH₃), 63.18 (d, $^2J_{C,P}$ =6.6 Hz, POCH₂CH₃), 63.50 (d, $^2J_{C,P}$ =6.6 Hz, POCH₂CH₃), 66.72 (d, $^3J_{C,P}$ =12.8 Hz, OCH₂C=O), 70.25 (dd, $^1J_{C,P}$ =172.2 Hz, $^3J_{C,F}$ =1.0 Hz, PCH), 76.30 (OCH₂Ph), 103.61 (dt, $^2J_{C,F}$ = $^2J_{C,F}$ =25.7 Hz, $^4J_{C,P}$ =1.2 Hz, C₆H₃F₂: C3), 111.87 (dt, $^2J_{C,F}$ =21.4 Hz, $^4J_{C,F}$ = $^4J_{C,P}$ =2.9 Hz, C₆H₃F₂: C5), 117.16 (d, $^2J_{C,F}$ =15.6 Hz, C₆H₃F₂: C1), 128.72 (2C, C₆H₅), 129.19 (C₆H₅), 129.36 (2C, C₆H₅), 130.55 (ddd, $^3J_{C,F}$ = $^3J_{C,F}$ =9.0 Hz, $^3J_{C,P}$ =4.1 Hz, C₆H₃F₂: C6), 133.96 (C₆H₅), 160.81 (ddd, $^1J_{C,F}$ =250.5 Hz, $^3J_{C,F}$ =11.8 Hz, $^3J_{C,P}$ =6.9 Hz, C₆H₃F₂: C2), 162.95 (ddd, $^1J_{C,F}$ =250.1 Hz, $^3J_{C,F}$ =12.1 Hz, $^5J_{C,P}$ =2.9 Hz, C₆H₃F₂: C4), 170.72 (C=O)

$C_{21}H_{26}F_2NO_6P$ (457.40)

Berechnet (%) C 55.14 H 5.73 N 3.06

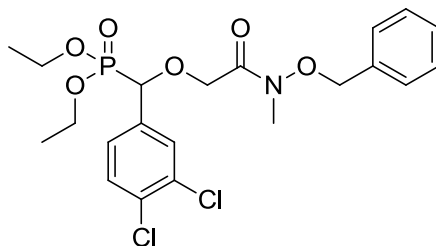
Gefunden (%) C 55.00 H 5.93 N 2.78

Diethyl-((2-((benzyloxy)(methyl)amino)-2-oxoethoxy)(3,4-difluorophenyl)methyl)-phosphonat **20g**



Hergestellt aus 4,90 g **18g** (15 mmol) und 1,99 g *N*-Methyl-*O*-benzylhydroxylamin (15 mmol) nach **AAV 7**.

Ausbeute	89 %, gelbliches Öl		
IR $\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹)	2984 (C-H _{aliph.}), 1682 (C=O), 1285/1253 (P=O), 1051/1028 (P-O)		
¹ H-NMR	(500 MHz, CDCl ₃) = δ (ppm) 1.25 (t, J =7.1 Hz, 3H, POCH ₂ CH ₃), 1.28 (t, J =7.1 Hz, POCH ₂ CH ₃), 3.19 (s, 3H, NCH ₃), 3.96 (d, J =16.2 Hz, 1H, OCH ₂ C=O), 4.05–4.18 (m, 4H, POCH ₂ CH ₃), 4.33 (dd, J =16.1, 1.0 Hz, 1H, OCH ₂ C=O), 4.72 (dd, J =10.8, 9.4 Hz, 2H, OCH ₂ Ph), 4.91 (d, $^2J_{H,P}$ =14.7 Hz, 1H, PCH), 7.11–7.19 (m, 2H, C ₆ H ₃ F ₂), 7.22–7.28 (m, 3H, C ₆ H ₅), 7.22–7.35 (m, 3H, C ₆ H ₅ , C ₆ H ₃ F ₂)		
¹³ C-NMR	(125 MHz, CDCl ₃) = δ (ppm) 16.36 (d, $^3J_{C,P}$ =6.6 Hz, POCH ₂ CH ₃), 16.41 (d, $^3J_{C,P}$ =6.5 Hz, POCH ₂ CH ₃), 33.45 (NCH ₃), 63.20 (d, $^2J_{C,P}$ =6.9 Hz, POCH ₂ CH ₃), 63.46 (d, $^2J_{C,P}$ =6.4 Hz, POCH ₂ CH ₃), 66.37 (d, $^3J_{C,P}$ =14.1 Hz, OCH ₂ C=O), 76.25 (OCH ₂ Ph), 76.82 (d, $^1J_{C,P}$ =167.8 Hz, PCH), 117.21 (dd, $^2J_{C,F}$ =17.4 Hz, $^3J_{C,F}$ = $^4J_{C,P}$ =1.7 Hz, C ₆ H ₃ F ₂ : C5), 117.29 (dd, $^2J_{C,F}$ =18.0 Hz, $^3J_{C,F}$ = $^3J_{C,P}$ =5.3 Hz, C ₆ H ₃ F ₂ : C2), 124.50 (ddd, $^3J_{C,P}$ = $^3J_{C,F}$ =6.1 Hz, $^4J_{C,F}$ =3.6 Hz, C ₆ H ₃ F ₂ : C6), 128.73 (2C, C ₆ H ₅), 129.21 (C ₆ H ₅), 129.37 (2C, C ₆ H ₅), 131.34 (m, C ₆ H ₃ F ₂ : C1), 133.91 (C ₆ H ₅), 150.32 (ddd, $^1J_{C,F}$ =249.0 Hz, $^2J_{C,F}$ =15.1 Hz, $^4J_{C,P}$ =3.0 Hz, C ₆ H ₃ F ₂ : C3), 150.43 (ddd, $^1J_{C,F}$ =248.9 Hz, $^2J_{C,F}$ =12.3 Hz, $^5J_{C,P}$ =2.7 Hz, C ₆ H ₃ F ₂ : C4), 170.90 (C=O)		
C ₂₁ H ₂₆ F ₂ NO ₆ P	(457.40)		
Berechnet (%)	C 55.14	H 5.73	N 3.06
Gefunden (%)	C 54.90	H 5.66	N 3.08

Diethyl-((2-((benzyloxy)(methyl)amino)-2-oxoethoxy)(3,4-dichlorophenyl)methyl)-phosphonat **20h**

Hergestellt aus 0,74 g **18h** (2 mmol) und 0,27 g *N*-Methyl-*O*-benzylhydroxylamin (2 mmol) nach **AAV 7**.

Ausbeute 92%, gelbliches Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 2983 (C-H_{aliph.}), 1681 (C=O), 1253 (P=O), 1051/1029 (P-O)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.26 (t, *J*=7.1 Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.28 (t, *J*=7.1 Hz, 3H, POCH₂CH₃), 3.19 (s, 3H, NCH₃), 3.91 (d, *J*=16.3 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.07–4.18 (m, 4H, POCH₂CH₃), 4.32 (dd, *J*=16.2, 1.2 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.72 (dd, *J*=23.4, 10.9 Hz, 2H, OCH₂Ph), 4.91 (d, ²*J*_{H,P}=15.1 Hz, 1H, PCH), 7.21–7.33 (m, 6H, C₆H₅, C₆H₄Cl₂), 7.43 (d, *J*=8.3 Hz, 1H, C₆H₄Cl₂), 7.48 (t, *J*=2.0 Hz, 1H, C₆H₄Cl₂)

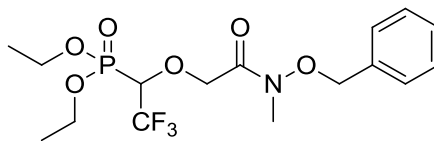
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 16.76 (d, ³*J*_{C,P}=5.7 Hz, POCH₂CH₃), 16.81 (d, ³*J*_{C,P}=6.0 Hz, POCH₂CH₃), 33.77 (NCH₃), 63.66 (d, ²*J*_{C,P}=6.5 Hz, POCH₂CH₃), 63.93 (d, ²*J*_{C,P}=7.0 Hz, POCH₂CH₃), 66.82 (d, ³*J*_{C,P}=11.8 Hz, OCH₂C=O), 76.56 (OCH₂Ph), 77.12 (d, ¹*J*_{C,P}=166.9 Hz, PCH), 127.93 (d, ³*J*_{C,P}=5.4 Hz, C₆H₄Cl₂: C6), 129.11 (C₆H₅, 2C), 129.62 (C₆H₅), 129.81 (C₆H₅, 2C), 130.46 (d, ³*J*_{C,P}=5.7 Hz, C₆H₄Cl₂: C2), 130.82 (d, *J*_{C,P}=2.5 Hz, C₆H₄Cl₂), 132.95 (d, *J*_{C,P}=3.6 Hz, C₆H₄Cl₂), 133.02 (d, *J*_{C,P}=2.6 Hz, C₆H₄Cl₂), 134.25 (C₆H₅), 135.08 (d, ⁵*J*_{C,P}=1.8 Hz, C₆H₄Cl₂: C4), 171.26 (C=O)

C₂₁H₂₅Cl₂NO₆P (490.31)

Berechnet (%) C 51.44 H 5.34 N 2.86

Gefunden (%) C 51.35 H 5.50 N 2.76

Diethyl-(1-(2-((benzyloxy)(methyl)amino)-2-oxoethoxy)-2,2,2-trifluorethyl)phosphonat **20i**



Hergestellt aus 1,12 g **18i** (3,8 mmol) und 0,52 g *N*-Methyl-*O*-benzylhydroxylamin (3,8 mmol) nach **AAV 7**.

Ausbeute 86 %, farbloses Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 2986 (C-H_{aliph.}), 1682 (C=O), 1266 (P=O), 1048/1025 (P-O)

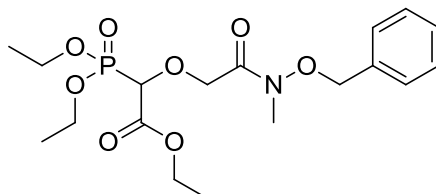
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.35 (t, $J=7.1$ Hz, 6H, POCH₂CH₃), 1.36 (t, $J=7.1$ Hz, 6H, POCH₂CH₃), 3.21 (s, 3H, NCH₃), 4.20–4.32 (m, 4H, POCH₂CH₃), 4.38 (dq, $^2J_{H,P}=12.6$ Hz, $^3J_{H,F}=7.8$ Hz, 1H, PCH), 4.45 (d, $J=15.6$ Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.63 (d, $J=15.6$ Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.83 (s, 2H, OCH₂Ph), 7.33–7.45 (m, 5H, arom.)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 16.35 (d, $^3J_{C,P}=5.9$ Hz, POCH₂CH₃), 33.50 (NCH₃), 63.83 (d, $^2J_{C,P}=7.1$ Hz, POCH₂CH₃), 64.16 (d, $^2J_{C,P}=6.6$ Hz, POCH₂CH₃), 69.08 (d, $^3J_{C,P}=2.6$ Hz, OCH₂C=O), 74.03 (dq, $^1J_{C,P}=165.6$ Hz, $^2J_{C,F}=31.9$ Hz, PCH), 76.54 (OCH₂Ph), 122.86 (qd, $^1J_{C,F}=282.5$ Hz, $^2J_{C,P}=6.2$ Hz, 128.85 (2C), 129.28, 129.42 (2C), 133.98, 169.84 (C=O)

C₁₆H₂₃F₃NO₆P (413.33)

Berechnet (%) C 46.49 H 5.61 N 3.39

Gefunden (%) C 46.20 H 5.84 N 3.37

Ethyl-2-(2-((benzyloxy)(methyl)amino)-2-oxoethoxy)-2-(diethoxyphosphoryl)acetat **20j**

Hergestellt aus 0,66 g **18j** (2,2 mmol) und 0,30 g *N*-Methyl-*O*-benzylhydroxylamin (2,2 mmol) nach **AAV 7**.

Ausbeute 75 %, farbloses Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 2984 (C-H_{aliph.}), 1746 (C=O Ester), 1680 (C=O Hydroxamat), 1262 (P=O), 1025 (P-O)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.32 (t, J =7.1 Hz, 3H, COOCH₂CH₃), 1.34 (t, J =6.8 Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.35 (t, J =6.9 Hz, POCH₂CH₃), 3.19 (s, 3H, NCH₃), 4.17–4.36 (m, 7H, COOCH₂CH₃ + POCH₂CH₃ + OCH₂C=O), 4.54 (d, J =17.2 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.67 (d, $^2J_{\text{H,P}}$ =17.9 Hz, 1H, PCH), 4.81 (s, 2H, OCH₂Ph), 7.33–7.43 (m, 5H, arom.)

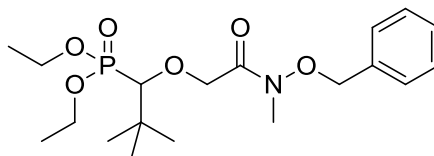
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 14.07 (COOCH₂CH₃), 16.32 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ =6.1 Hz, POCH₂CH₃), 33.45 (NCH₃), 61.79 (COOCH₂CH₃), 63.65 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ =6.7 Hz, POCH₂CH₃), 63.78 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ =6.4 Hz, POCH₂CH₃), 68.13 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ =10.7 Hz, OCH₂C=O), 76.00 (d, $^1J_{\text{C,P}}$ =154.1 Hz, PCH), 67.40 (OCH₂Ph), 128.76 (2C), 129.17, 129.37 (2C), 133.93, 166.90 (C=O, Hydroxamat), 170.73 (C=O, Ester)

C₁₈H₂₈NO₈P (417.39)

Berechnet (%) C 51.80 H 6.76 N 3.36

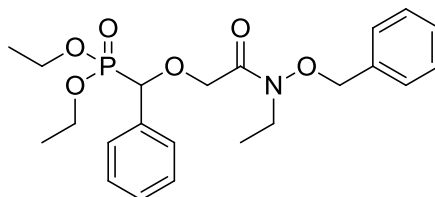
Gefunden (%) C 52.03 H 6.48 N 3.38

Diethyl-(1-(2-((benzyloxy)(methyl)amino)-2-oxoethoxy)-2,2-dimethylpropyl)phosphonat **20k**



Hergestellt aus 0,37 g **18k** (1,3 mmol) und 0,17 g *N*-Methyl-*O*-benzylhydroxylamin (1,3 mmol) nach **AAV 7**.

Ausbeute	86 %, farbloses Öl		
IR $\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹)	2979 (C-H _{aliph.}), 1687 (C=O), 1240 (P=O), 1051/1023 (P-O)		
¹ H-NMR	(500 MHz, CDCl ₃) = δ (ppm) 1.09 (s, 9H, C(CH ₃) ₃), 1.31 (t, J =7.1 Hz, 3H, POCH ₂ CH ₃), 1.32 (t, J =7.1 Hz, 3H, POCH ₂ CH ₃), 3.20 (s, 3H, NCH ₃), 3.32 (d, $^2J_{H,P}$ =6.0 Hz, 1H, PCH), 4.10–4.23 (m, 4H, POCH ₂ CH ₃), 4.24 (d, J =14.3 Hz, 1H, OCH ₂ C=O), 4.61 (d, J =14.7 Hz, 1H, OCH ₂ C=O), 4.85 (s, 2H, OCH ₂ Ph), 7.33–7.42 (m, 5H, arom.)		
¹³ C-NMR	(125 MHz, CDCl ₃) = δ (ppm) 16.54 (d, $^3J_{C,P}$ =5.8 Hz, POCH ₂ CH ₃), 26.89 (d, $^3J_{C,P}$ =6.3 Hz, C(CH ₃) ₃), 33.65 (NCH ₃), 35.51 (d, $^2J_{C,P}$ =4.6 Hz, C(CH ₃) ₃), 62.00 (d, $^2J_{C,P}$ =6.9 Hz, POCH ₂ CH ₃), 62.33 (d, $^2J_{C,P}$ =7.5 Hz, POCH ₂ CH ₃), 71.09 (OCH ₂ C=O), 76.48 (OCH ₂ Ph), 85.75 (d, $^1J_{C,P}$ =158.3 Hz, PCH), 128.75 (2C), 129.08, 129.35 (2C), 134.37, 170.86 (C=O)		
C ₁₉ H ₃₂ NO ₆ P	(401.43)		
Berechnet (%)	C 56.85	H 8.03	N 3.49
Gefunden (%)	C 56.65	H 8.02	N 3.62

Diethyl-((2-((benzyloxy)(ethyl)amino)-2-oxoethoxy)(phenyl)methyl)phosphonat **21**

Hergestellt aus 1,51 g **18a** (5 mmol) und 0,76 g *N*-Ethyl-*O*-benzylhydroxylamin (5 mmol) nach **AAV 7**.

Ausbeute 94 %, farblose Kristalle

Schmelzpunkt 75 °C

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 2980 (C-H_{aliph.}), 1676 (C=O), 1259 (P=O), 1017 (P-O)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 1.05 (t, *J*=7.0 Hz, 3H, NCH₂CH₃), 1.11 (t, *J*=7.0 Hz, POCH₂CH₃), 1.19 (t, *J*=7.0 Hz, POCH₂CH₃), 3.65 (q, *J*=6.6 Hz, 2H, NCH₂CH₃), 3.83–3.93 (m, 1H, POCH₂CH₃), 3.93–4.00 (m, 1H, POCH₂CH₃), 4.00–4.09 (m, 2H, POCH₂CH₃), 4.10 (d, *J*=15.7 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.25 (d, *J*=15.7 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.74 (dd, *J*=32.9, 10.1 Hz, 2H, OCH₂Ph), 4.97 (d, ²*J*_{H,P}=14.2 Hz, 1H, PCH), 7.19–7.30 (m, 2H, arom.), 7.30–7.47 (m, 8H, arom.)

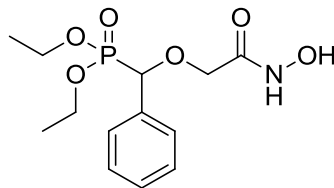
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 11.72 (NCH₂CH₃), 16.03 (d, ³*J*_{C,P}=5.5 Hz, POCH₂CH₃), 16.16 (d, ³*J*_{C,P}=5.6 Hz, POCH₂CH₃), (unter DMSO-Signal: NCH₂CH₃), 62.12 (d, ²*J*_{C,P}=6.5 Hz, POCH₂CH₃), 62.47 (d, ²*J*_{C,P}=6.6 Hz, POCH₂CH₃), 66.34 (d, ³*J*_{C,P}=12.8 Hz, OCH₂C=O), 75.53 (OCH₂Ph), 77.09 (d, ¹*J*_{C,P}=164.9 Hz, PCH), 128.08 (d, *J*_{C,P}=1.3 Hz, 2C), 128.23, 128.26 (d, *J*_{C,P}=2.7 Hz, 2C), 128.34 (2C), 128.67, 129.32 (2C), 134.24 (d, ²*J*_{C,P}=1.6 Hz), 134.33, 169.28 (C=O)

C₂₂H₃₀NO₆P (435.45)

Berechnet (%) C 60.86 H 6.94 N 3.22

Gefunden (%) C 60.62 H 6.93 N 3.19

Diethyl-((2-(hydroxyamino)-2-oxoethoxy)(phenyl)methyl)phosphonat **22a**



Hergestellt aus 0,61 g **19a** (1,5 mmol) nach **AAV 8**.

Ausbeute 87 %, gelbes Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3377 (N-H), 3214 (O-H), 1674 (C=O), 1241/1216 (P=O), 1049/1025 (P-O)

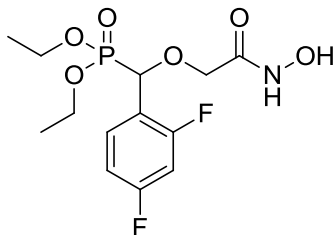
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 1.13 (t, J =7.0 Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.19 (t, J =7.1 Hz, 3H, POCH₂CH₃), 3.79 (d, J =13.6 Hz, 1H, OCH₂C=O), 3.86–4.06 (m, 4H, POCH₂CH₃), 3.89 (d, J =13.8 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.97 (d, $^2J_{H,P}$ =14.9 Hz, 0.9H, PCH, Z-Isomer), 5.04 (d, $^2J_{H,P}$ =13.7 Hz, 0.1H, PCH, E-Isomer) 7.32–7.45 (m, 5H, arom.), 8.94 (br. s, 0.9H, OH, Z-Isomer), 8.96 (br. s, 0.1H, OH, E-Isomer) 10.01 (s, 0.1H, NH, E-Isomer), 10.51 (s, 0.9H, NH, Z-Isomer)

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 16.06 (d, $^3J_{C,P}$ =5.4 Hz, POCH₂CH₃), 16.15 (d, $^3J_{C,P}$ =5.6 Hz, POCH₂CH₃), 62.29 (d, $^2J_{C,P}$ =6.6 Hz, POCH₂CH₃), 62.53 (d, $^2J_{C,P}$ =6.6 Hz, POCH₂CH₃), 67.56 (d, $^3J_{C,P}$ =12.7 Hz, OCH₂C=O), 77.47 (d, $^1J_{C,P}$ =164.9 Hz, PCH), 127.95, 128.00, 128.05 (2C) (d, $J_{C,P}$ =1.5 Hz), 128.20 (d, $J_{C,P}$ =2.4 Hz), 134.27 (d, $^2J_{C,P}$ =1.2 Hz), 164.66 (C=O)

C₁₃H₂₀NO₆P (317.27)

Berechnet (%) C 49.21 H 6.35 N 4.41

Gefunden (%) C 49.38 H 6.36 N 4.34

Diethyl-((2,4-difluorphenyl)(2-(hydroxyamino)-2-oxoethoxy)methyl)phosphonat **22b**

Hergestellt aus 0,89 g **19d** (2 mmol) nach **AAV 8**.

Ausbeute 100 %, gelbliches Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3208 (br., N-H, O-H), 1681 (C=O), 1242/1219 (P=O), 1050/1026 (P-O)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 1.14 (t, $J=7.0$ Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.21 (t, $J=7.0$ Hz, POCH₂CH₃), 3.83 (d, $J=13.6$ Hz, 1H, OCH₂C=O), 3.91 (d, $J=13.6$ Hz, 1H, OCH₂C=O), 3.92–4.03 (m, 2H, POCH₂CH₃), 4.07 (dq, $^3J_{\text{H,H}}=^3J_{\text{H,P}}=7.3$ Hz, 2H, POCH₂CH₃), 5.18 (d, $^2J_{\text{H,P}}=14.3$ Hz, 0.9H, PCH, Z-Isomer), 5.28 (d, $^2J_{\text{H,P}}=14.2$ Hz, 0.1H, PCH, E-Isomer), 7.17 (dt, $^3J_{\text{H,F}}=8.5$ Hz, $^5J_{\text{H,P}}=1.9$ Hz, 1H, C₆H₃F₂: H3), 7.28 (dt, $^3J_{\text{H,H}}=^3J_{\text{H,F}}=9.9$ Hz, $^5J_{\text{H,P}}=2.1$ Hz, 1H, C₆H₃F₂: H5), 7.61 (ddt, $^3J_{\text{H,H}}=^4J_{\text{H,F}}=8.1$ Hz, $^4J_{\text{H,F}}=6.6$ Hz, $^4J_{\text{H,P}}=1.6$ Hz, 1H, arom. H6), 8.94 (s, 0.9H, OH, Z-Isomer), 8.98 (s, 0.1H, OH, E-Isomer), 10.05 (s, 0.1H, NH, E-Isomer), 10.54 (s, 0.9H, NH, Z-Isomer)

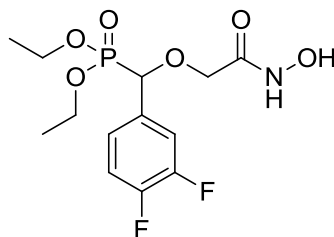
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-dCl₃) = δ (ppm) 16.03 (d, $^3J_{\text{C,P}}=5.4$ Hz, POCH₂CH₃), 16.13 (d, $^3J_{\text{C,P}}=5.6$ Hz, POCH₂CH₃), 62.55 (d, $^2J_{\text{C,P}}=7.0$ Hz, POCH₂CH₃), 62.80 (d, $^2J_{\text{C,P}}=6.8$ Hz, POCH₂CH₃), 67.47 (d, $^3J_{\text{C,P}}=11.8$ Hz, OCH₂C=O), 70.05 (d, $^1J_{\text{C,P}}=169.8$ Hz, PCH), 103.61 (t, $^2J_{\text{C,F}}=^2J_{\text{C,F'}}=26.1$ Hz, C₆H₃F₂: C3), 111.73 (t, $^2J_{\text{C,F}}=21.5$ Hz, C₆H₃F₂: C5), 118.15 (dd, $^2J_{\text{C,F}}=13.5$ Hz, $^4J_{\text{C,F}}=1.5$ Hz, C₆H₃F₂: C1), 130.77 (ddd, $^3J_{\text{C,F}}=^3J_{\text{C,F'}}=8.6$ Hz, $^3J_{\text{C,P}}=4.4$ Hz, C₆H₃F₂: C6), 160.01 (ddd, $^1J_{\text{C,F}}=249.0$ Hz, $^3J_{\text{C,F}}=12.5$ Hz, $^3J_{\text{C,P}}=6.4$ Hz, C₆H₃F₂: C2), 162.13 (ddd, $^1J_{\text{C,F}}=247.2$ Hz, $^3J_{\text{C,F}}=12.0$ Hz, $^5J_{\text{C,P}}=2.9$ Hz, C₆H₃F₂: C4), 164.43 (C=O)

C₁₃H₁₈F₂NO₆P (353.26)

Berechnet (%) C 44.20 H 5.14 N 3.96

Gefunden (%) C 44.44 H 5.06 N 3.78

Diethyl-((3,4-difluorophenyl)(2-(hydroxyamino)-2-oxoethoxy)methyl)phosphonat **22c**



Hergestellt aus 0,67 g **19e** (1,5 mmol) nach **AAV 8**.

Ausbeute 99 %, gelbliche Kristalle

Schmelzpunkt 84 °C

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3204 (O-H), 2988 (C-H_{aliph.}), 1665 (C=O), 1281 (P=O), 1030 (P-O)

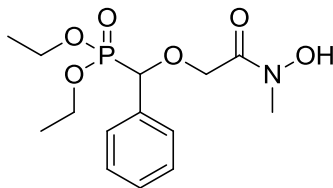
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 1.15 (t, $J=7.0$ Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.20 (t, $J=7.0$ Hz, POCH₂CH₃), 3.86 (d, $J=13.5$ Hz, 1H, OCH₂C=O), 3.91 (d, $J=13.4$ Hz, 1H, OCH₂C=O), 3.93–4.01 (m, 2H, POCH₂CH₃), 4.04 (dq, $^3J_{H,H}=^3J_{H,P}=7.2$ Hz, 2H, POCH₂CH₃), 5.03 (d, $^2J_{H,P}=14.6$ Hz, 0.85H, PCH, *Z*-Isomer), 5.09 ($^2J_{H,P}=13.9$ Hz, 0.15H, PCH, *E*-Isomer), 7.22–7.31 (m, 1H, C₆H₃F₂: H6), 7.41–7.54 (m, 2H, C₆H₃F₂: H2, H5), 8.98 (br. s, 1H, OH), 10.03 (br. s, 0.15H, NH, *E*-Isomer), 10.42 (br. s, 0.85H, NH, *Z*-Isomer)

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 16.08 (d, $^3J_{C,P}=6.0$ Hz, POCH₂CH₃), 16.14 (d, $^3J_{C,P}=5.8$ Hz, POCH₂CH₃), 62.51 (d, $^2J_{C,P}=6.6$ Hz, POCH₂CH₃), 62.73 (d, $^2J_{C,P}=6.9$ Hz, POCH₂CH₃), 68.09 (d, $^3J_{C,P}=11.8$ Hz, OCH₂C=O), 76.28 (d, $^1J_{C,P}=165.3$ Hz, PCH), 116.86 (dd, $^2J_{C,F}=18.0$ Hz, $^3J_{C,F}=^3J_{C,P}=5.2$ Hz, C₆H₃F₂: C2), 117.15 (dd, $^2J_{C,F}=17.4$ Hz, $^3J_{C,F}=^4J_{C,P}=1.1$ Hz, C₆H₃F₂: C5), 124.90 (m, C₆H₃F₂: C6), 132.40 (m, C₆H₃F₂: C1), 149.09 (ddd, $^1J_{C,F}=244.9$ Hz, $^2J_{C,F}=9.4$ Hz, $^5J_{C,P}=2.6$ Hz, C₆H₃F₂: C4), 149.17 (ddd, $^1J_{C,F}=245.6$ Hz, $^2J_{C,F}=11.5$ Hz, $^4J_{C,P}=2.9$ Hz, C₆H₃F₂: C3), 164.38 (C=O)

C₁₃H₁₈F₂NO₆P (353.26)

Berechnet (%) C 44.20 H 5.14 N 3.96

Gefunden (%) C 44.35 H 5.05 N 3.85

Diethyl-((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethoxy)(phenyl)methyl)phosphonat **23a**

Hergestellt aus 0,42 g **20a** (1 mmol) nach **AAV 8**.

Ausbeute 75 %, farblose Kristalle

Schmelzpunkt 97 °C

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3113 (O-H), 2908 (C-H_{aliph.}), 1667 (C=O), 1207 (P=O), 1034 (P-O)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 1.12 (t, $J=7.0$ Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.19 (t, $J=7.0$ Hz, POCH₂CH₃), 3.05 (s, 3H, NCH₃), 3.85–4.00 (m, 2H, POCH₂CH₃), 4.01–4.11 (m, 2H, POCH₂CH₃), 4.11 (d, $J=16.1$ Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.26 (d, $J=16.2$, 1H, OCH₂C=O), 5.03 (d, $^2J_{H,P}=14.6$ Hz, 1H, PCH), 7.31–7.43 (m, 5H, arom.), 9.74 (s, 1H, OH)

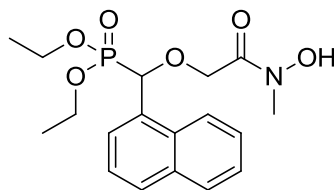
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 16.04 (d, $^3J_{C,P}=5.6$ Hz, POCH₂CH₃), 16.16 (d, $^3J_{C,P}=5.8$ Hz, POCH₂CH₃), 35.52 (NCH₃), 62.10 (d, $^2J_{C,P}=6.5$ Hz, POCH₂CH₃), 62.49 (d, $^2J_{C,P}=6.6$ Hz, POCH₂CH₃), 65.69 (d, $^3J_{C,P}=14.2$ Hz, OCH₂C=O), 76.83 (d, $^1J_{C,P}=164.5$ Hz, PCH), 128.05 (d, $J_{C,P}=1.5$ Hz, 2C), 128.16 (2C), 128.21, 134.38 (d, $^2J_{C,P}=1.1$ Hz), 168.56 (C=O)

C₁₄H₂₂NO₆P (331.30)

Berechnet (%) C 50.76 H 6.69 N 4.23

Gefunden (%) C 50.92 H 6.77 N 4.15

Diethyl-((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethoxy)-(1-naphthyl)-methyl)phosphonat **23b**



Hergestellt aus 0,47 g **20b** (1 mmol) nach **AAV 8**.

Ausbeute 73 %, farblose Kristalle

Schmelzpunkt 138 °C

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3121 (O-H), 2984/2913 (C-H_{aliph.}), 1670 (C=O), 1224 (P=O), 1044/1024 (P-O)

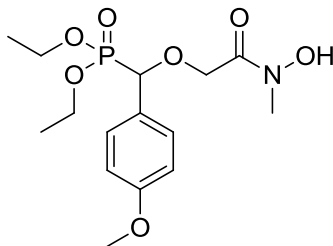
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.07 (t, J =7.0 Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.14 (t, J =7.0 Hz, 3H, POCH₂CH₃), 3.30 (s, 3H, NCH₃), 3.85–4.15 (m, 5H, POCH₂CH₃), 4.11 (d, J =14.7 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.64 (d, J =14.4 Hz, 1H, OCH₂C=O), 5.79 (d, $^2J_{\text{H,P}}$ =16.7 Hz, 1H, PCH), 7.48–7.55 (m, 3H, arom.), 7.73 (dd, J =6.5, 2.4 Hz, 1H, arom.), 7.83–7.91 (m, 2H, arom.), 8.07 (d, J =7.1 Hz, 1H, arom.), 9.48 (br. s, 1H, OH)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 16.11 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ =5.6 Hz, POCH₂CH₃), 16.20 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ =6.2 Hz, POCH₂CH₃), 35.98 (NCH₃), 63.61 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ =7.2 Hz, POCH₂CH₃), 64.05 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ =6.9 Hz, POCH₂CH₃), 68.27 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ =13.9 Hz, OCH₂C=O), 74.99 (d, $^1J_{\text{C,P}}$ =171.8 Hz, PCH), 123.68, 125.34 (d, $J_{\text{C,P}}$ =2.8 Hz), 125.80, 126.24, 126.37 (d, $J_{\text{C,P}}$ =6.1 Hz), 128.72, 129.30 (d, $J_{\text{C,P}}$ =3.0 Hz), 129.56 (d, $J_{\text{C,P}}$ =2.7 Hz), 131.55 (d, $J_{\text{C,P}}$ =5.3 Hz), 133.70 (d, $J_{\text{C,P}}$ =1.9 Hz), 169.82 (C=O)

C₁₈H₂₄NO₆P (381.36)

Berechnet (%) C 56.69 H 6.34 N 3.67

Gefunden (%) C 56.86 H 6.13 N 3.68

Diethyl-((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethoxy)(4-methoxyphenyl)methyl)phosphonat **23c**

Hergestellt aus 1,08 g **20c** (2,4 mmol) nach **AAV 8**.

Ausbeute 98 %, farbloses Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3124 (O-H), 2912 (C-H_{aliph.}), 1671 (C=O), 1227 (P=O), 1035 (P-O)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 1.11 (t, $J=7.0$ Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.21 (t, $J=7.1$ Hz, 3H, POCH₂CH₃), 3.04 (s, 3H, NCH₃), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 3.82–3.91 (m, 1H, POCH₂CH₃), 3.91–3.99 (m, 1H, POCH₂CH₃), 4.02–4.13 (m, 2H, POCH₂CH₃ + 1H, OCH₂C=O), 4.22 (d, $J=16.2$ Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.95 (d, $^2J_{\text{H,P}}=14.1$ Hz, 1H, PCH), 6.95 (d, $J=8.6$ Hz, 2H, arom.), 7.32 (dd, $J=8.6, 1.7$ Hz, 2H, arom.), 9.72 (s, 1H, OH)

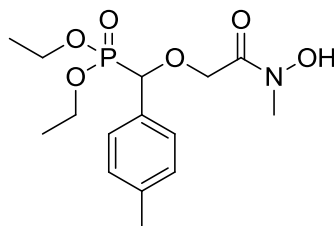
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 16.07 (d, $^3J_{\text{C,P}}=5.5$ Hz, POCH₂CH₃), 16.20 (d, $^3J_{\text{C,P}}=5.8$ Hz, POCH₂CH₃), 35.52 (NCH₃), 54.99 (OCH₃), 62.00 (d, $^2J_{\text{C,P}}=6.4$ Hz, POCH₂CH₃), 62.40 (d, $^2J_{\text{C,P}}=6.6$ Hz, POCH₂CH₃), 65.22 (d, $^3J_{\text{C,P}}=13.1$ Hz, POCH₂CH₃), 76.25 (d, $^1J_{\text{C,P}}=167.2$ Hz, PCH), 113.55 (2C), 125.93, 129.70 (d, $^3J_{\text{C,P}}=6.0$ Hz, 2C), 159.23 (d, $^5J_{\text{C,P}}=2.4$ Hz), 168.67 (C=O)

C₁₅H₂₄NO₇P (361.33)

Berechnet (%) C 49.86 H 6.69 N 3.88

Gefunden (%) C 49.58 H 6.77 N 3.69

Diethyl-((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethoxy)(*p*-tolyl)methyl)phosphonat **23d**



Hergestellt aus 1,05 g **20d** (2,4 mmol) nach **AAV 8**.

Ausbeute 97 %, farblose Kristalle

Schmelzpunkt 101 °C

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3119 (O-H), 2982 (C-H_{aliph.}), 1672 (C=O), 1224 (P=O), 1038 (P-O)

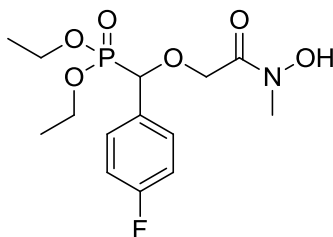
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 1.12 (t, $J=7.1$ Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.20 (t, $J=7.1$ Hz, POCH₂CH₃), 2.31 (s, 1H, CH₃), 3.04 (s, 3H, NCH₃), 3.84–3.92 (m, 1H, POCH₂CH₃), 3.92–4.00 (m, 1H, POCH₂CH₃), 4.00–4.10 (m, 2H, POCH₂CH₃ + 1H, OCH₂C=O), 4.23 (d, $J=16.2$ Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.98 (d, $^2J_{\text{H,P}}=14.4$ Hz, 1H, PCH), 7.19 (d, $J=7.9$, 2H, arom.), 7.28 (dd, $J=7.9$, 1.4 Hz, 2H, arom.)

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 16.06 (d, $^3J_{\text{C,P}}=5.5$ Hz, POCH₂CH₃), 16.18 (d, $^3J_{\text{C,P}}=5.7$ Hz, POCH₂CH₃), 20.68 (CH₃), 35.51 (NCH₃), 62.02 (d, $^2J_{\text{C,P}}=6.4$ Hz, POCH₂CH₃), 62.43 (d, $^2J_{\text{C,P}}=6.6$ Hz, POCH₂CH₃), 65.43 (d, $^3J_{\text{C,P}}=12.8$), 76.61 (d, $^1J_{\text{C,P}}=165.7$ Hz, PCH), 128.22 (d, $^3J_{\text{C,P}}=5.9$ Hz, 2C), 128.67 (d, $^4J_{\text{P,C}}=1.4$ Hz, 2C), 131.23, 137.50 (d, $^5J_{\text{C,P}}=2.9$ Hz), 168.62 (C=O)

C₁₅H₂₄NO₆P (345.33)

Berechnet (%) C 52.17 H 7.01 N 4.06

Gefunden (%) C 51.94 H 6.86 N 4.09

Diethyl-((4-fluorophenyl)(2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethoxy)methyl)phosphonat **23e**

Hergestellt aus 1,65 g **20e** (3,8 mmol) nach **AAV 8**.

Ausbeute 94 %, farblose Kristalle

Schmelzpunkt 76 °C

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3163 (O-H), 2917 (C-H_{aliph.}), 1667 (C=O), 1229 (P=O), 1030 (P-O)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 1.13 (t, $J=7.1$ Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.20 (t, $J=7.1$ Hz, POCH₂CH₃), 3.05 (s, 3H, NCH₃), 3.88–4.02 (m, 2H, POCH₂CH₃), 4.06 (dq, $^3J_{H,H}=^3J_{H,P}=7.0$ Hz, 2H, POCH₂CH₃), 4.12 (d, $J=16.1$ Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.26 (d, $J=16.1$ Hz, 1H, OCH₂C=O), 15.05 (d, $^2J_{H,P}=14.2$ Hz, 1H, PCH), 7.22 (t, $^3J_{H,H}=^3J_{H,F}=8.8$ Hz, 2H, C₆H₄F: H3, H5), 7.44 (ddd, $^3J_{H,H}=8.2$ Hz, $^4J_{H,F}=6.1$ Hz, $^4J_{H,P}=2.0$ Hz, 2H, C₆H₄F: H2, H6), 9.76 (s, 1H, OH)

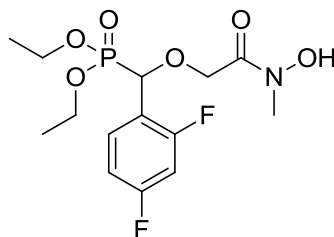
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 16.06 (d, $^3J_{C,P}=5.5$ Hz, POCH₂CH₃), 16.17 (d, $^3J_{C,P}=5.8$ Hz, POCH₂CH₃), 35.54 (NCH₃), 62.16 (d, $^2J_{C,P}=6.5$ Hz, POCH₂CH₃), 62.55 (d, $^2J_{C,P}=6.6$ Hz, POCH₂CH₃), 65.80 (d, $^3J_{C,P}=13.0$ Hz, OCH₂C=O), 76.10 (d, $^1J_{C,P}=165.7$ Hz, PCH), 114.96 (dd, $^2J_{C,F}=21.7$ Hz, $^4J_{C,P}=1.5$ Hz, C₆H₄F: C3, C5), 130.25 (dd, $^3J_{C,F}=8.1$ Hz, $^3J_{C,P}=5.9$ Hz, C₆H₄F: C2, C6), 130.71 (C₆H₄F: C1), 161.95 (dd, $^1J_{C,F}=244.3$ Hz, $^5J_{C,P}=3.0$ Hz, C₆H₄F: C4), 168.50 (C=O)

C₁₄H₂₁FNO₆P (349.29)

Berechnet (%) C 48.14 H 6.06 N 4.01

Gefunden (%) C 48.03 H 6.27 N 3.91

Diethyl-((2,4-difluorphenyl)(2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethoxy)methyl)phosphonat **23f**



Hergestellt aus 1,87 g **20f** (4,1 mmol) nach **AAV 8**.

Ausbeute 95 %, gelbe Kristalle

Schmelzpunkt 97 °C

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3169 (O-H), 2910 (C-H_{aliph.}), 1675 (C=O), 1245 (P=O), 1049/1029 (P-O)

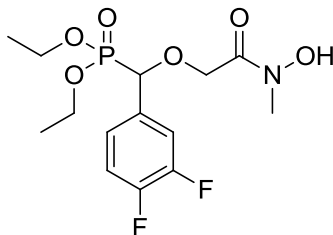
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 1.14 (t, J =7.0 Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.22 (t, J =7.1 Hz, POCH₂CH₃), 3.05 (s, 3H, NCH₃), 3.92–4.06 (m, 2H, POCH₂CH₃), 4.10 (dq, $^3J_{\text{H,H}}=^3J_{\text{H,P}}=7.2$ Hz, 2H, POCH₂CH₃), 4.13 (d, J =16.7 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.32 (d, J =16.2 Hz, 1H, OCH₂C=O), 5.27 (d, $^2J_{\text{H,P}}=14.2$ Hz, 1H, PCH), 6.81 (dt, $^3J_{\text{H,F}}=8.5$ Hz, $^5J_{\text{H,P}}=2.2$ Hz, 1H, C₆H₃F₂: H3), 6.93 (dt, $^3J_{\text{H,H}}=^3J_{\text{H,F}}=9.9$ Hz, $^5J_{\text{H,P}}=1.9$ Hz, 1H, C₆H₃F₂: H5), 7.62 (ddt, $^3J_{\text{H,H}}=^4J_{\text{H,F}}=8.3$ Hz, $^4J_{\text{H,F}}=6.6$ Hz, $^4J_{\text{H,P}}=1.7$ Hz, 1H, C₆H₃F₂: H6), 9.79 (s, 1H, OH)

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 16.01 (d, $^3J_{\text{C,P}}=5.5$ Hz, POCH₂CH₃), 16.14 (d, $^3J_{\text{C,P}}=5.7$ Hz, POCH₂CH₃), 35.52 (NCH₃), 62.39 (d, $^2J_{\text{C,P}}=6.5$ Hz, POCH₂CH₃), 62.77 (d, $^2J_{\text{C,P}}=6.6$ Hz, POCH₂CH₃), 65.83 (d, $^3J_{\text{C,P}}=12.4$ Hz, OCH₂C=O), 69.31 (d, $^1J_{\text{C,P}}=169.3$ Hz, PCH), 103.63 (t, $^2J_{\text{C,F}}=^2J_{\text{C,F}'}=25.7$ Hz, C₆H₃F₂: C3), 111.75 (d, $^2J_{\text{C,F}}=21.3$ Hz, C₆H₃F₂: C5), 118.25 (d, $^2J_{\text{C,F}}=13.1$ Hz, C₆H₃F₂: C1), 130.81 (ddd, $^3J_{\text{C,F}}=^3J_{\text{C,F}'}=9.0$ Hz, $^3J_{\text{C,P}}=4.9$ Hz, C₆H₃F₂: C6), 160.15 (dm, $^1J_{\text{C,F}}=248.1$ Hz, C₆H₃F₂: C2), 162.07 (dd, $^1J_{\text{C,F}}=247.2$ Hz, $^3J_{\text{C,F}}=12.5$ Hz, C₆H₃F₂: C4), 168.34 (C=O)

C₁₄H₂₀F₂NO₆P (367.28)

Berechnet (%) C 45.78 H 5.49 N 3.81

Gefunden (%) C 45.55 H 5.56 N 3.80

Diethyl-((3,4-difluorphenyl)(2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethoxy)methyl)phosphonat **23g**

Hergestellt aus 2,29 g **20g** (5 mmol) nach **AAV 8**.

Ausbeute 100 %, gelbliches Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3154 (O-H), 2985/2913 (C-H_{aliph.}), 1665 (C=O), 1286 (P=O), 1050/1028 (P-O)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.26 (t, J =7.2 Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.29 (t, J =7.1 Hz, POCH₂CH₃), 3.27 (s, 3H, NCH₃), 4.05–4.20 (m, 4H, POCH₂CH₃), 4.12 (d, J =14.6 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.61 (d, J =14.6 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.89 (d, $^2J_{H,P}$ =15.9 Hz, 1H, PCH), 7.08–7.29 (m, 3H, C₆H₃F₂), 9.36 (br. s, 1H, OH)

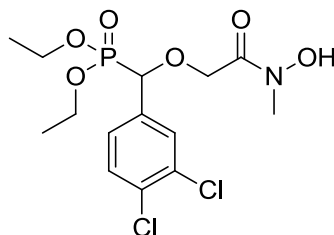
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 16.31 (d, $^3J_{C,P}$ =5.6 Hz, POCH₂CH₃), 16.33 (d, $^3J_{C,P}$ =5.4 Hz, POCH₂CH₃), 35.99 (NCH₃), 63.66 (d, $^2J_{C,P}$ =7.2 Hz, POCH₂CH₃), 64.17 (d, $^2J_{C,P}$ =6.7 Hz, POCH₂CH₃), 68.42 (d, $^3J_{C,P}$ =13.5 Hz, OCH₂C=O), 76.84 (d, $^1J_{C,P}$ =170.9 Hz, PCH), 116.83 (dd, $^2J_{C,F}$ =18.4 Hz, $^3J_{C,F}$ = $^3J_{C,P}$ =4.7 Hz, C₆H₃F₂: C2), 117.37 (dd, $^2J_{C,F}$ =17.3 Hz, $^3J_{C,F}$ = $^4J_{C,P}$ =1.1 Hz, C₆H₃F₂: C5), 124.09 (m, C₆H₃F₂: C6), 131.04 (m, C₆H₃F₂: C1), 150.38 (ddd, $^1J_{C,F}$ =248.5 Hz, $^2J_{C,F}$ =12.7 Hz, $^5J_{C,P}$ =2.1 Hz, C₆H₃F₂: C4), 150.48 (ddd, $^1J_{C,F}$ =248.5 Hz, $^2J_{C,F}$ =12.5 Hz, $^4J_{C,P}$ =2.5 Hz, C₆H₃F₂: C3), 169.36 (C=O)

C₁₄H₂₀F₂NO₆P (367.28)

Berechnet (%) C 45.78 H 5.49 N 3.81

Gefunden (%) C 46.00 H 5.38 N 3.68

Diethyl-((2-((benzyloxy)(methyl)amino)-2-oxoethoxy)(3,4-dichlorophenyl)methyl)-phosphonat **23h**



Hergestellt aus 0,62 g **20h** (1,3 mmol) nach **AAV 8**.

Ausbeute 94%, gelbliches Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3161 (br., O-H), 2983/2911 (C-H_{aliph.}), 1668/1651 (C=O), 1238/1199 (P=O), 1050/1029 (P-O)

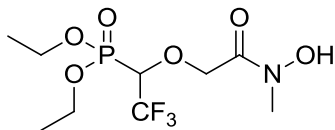
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.16 (t, $J=7.1$ Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.20 (t, $J=7.1$ Hz, 3H, POCH₂CH₃), 3.06 (s, 3H, NCH₃), 3.95–4.11 (m, 4H, POCH₂CH₃), 4.20 (d, $J=16.0$ Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.31 (d, $J=16.0$ Hz, 1H, OCH₂C=O), 5.11 (d, $^2J_{H,P}=14.7$ Hz, 1H, PCH), 7.40 (dt, $J=8.3$, 1.9 Hz, 1H, arom.), 7.63 (t, $J=1.8$ Hz, 1H, arom.), 7.67 (d, $J=8.3$ Hz, 1H, arom.), 9.80 (br. s, 1H, OH)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 16.06 (d, $^3J_{C,P}=5.6$ Hz, POCH₂CH₃), 16.13 (d, $^3J_{C,P}=5.6$ Hz, POCH₂CH₃), 35.56 (NCH₃), 62.41 (d, $^2J_{C,P}=6.7$ Hz, POCH₂CH₃), 62.78 (d, $^2J_{C,P}=6.7$ Hz, POCH₂CH₃), 66.54 (d, $^3J_{C,P}=12.6$ Hz, OCH₂C=O), 75.71 (d, $^1J_{C,P}=164.1$ Hz, PCH), 128.20 (d, $^3J_{C,P}=5.4$ Hz), 129.78 (d, $^3J_{C,P}=5.6$ Hz), 130.28 (d, $J_{C,P}=1.8$ Hz), 130.65 (d, $J_{C,P}=3.4$ Hz), 130.73 (d, $J_{C,P}=2.5$ Hz), 136.21, 168.33 (C=O)

C₁₄H₂₀Cl₂NO₆P (400.19)

Berechnet (%) C 42.02 H 5.04 N 3.50

Gefunden (%) C 42.21 H 5.22 N 3.37

Diethyl-(2,2,2-trifluor-1-(2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethoxy)ethyl)phosphonat **23i**

Hergestellt aus 1,16 g **20i** (2,8 mmol) nach **AAV 8**.

Ausbeute 99 %, gelbliches Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3176 (O-H), 2986/2917 (C-H_{aliph.}), 1660 (C=O), 1266/1242 (P=O), 1027 (P-O)

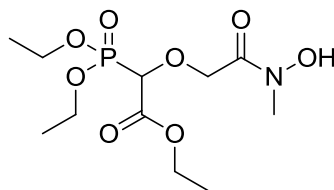
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 1.25 (t, J =7.3 Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.26 (t, J =7.1 Hz, 3H, POCH₂CH₃), 3.09 (s, 3H, NCH₃), 4.08–4.28 (m, 4H, POCH₂CH₃), 4.54 (d, J =15.7 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.58 (d, J =16.1 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.97 (dq, $^2J_{\text{H,P}}$ =13.0 Hz, $^3J_{\text{H,F}}$ =8.3 Hz, 1H, PCH), 9.90 (s, 1H, OH)

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 16.09 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ =4.9 Hz, POCH₂CH₃), 16.12 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ =5.3 Hz, POCH₂CH₃), 35.57 (NCH₃), 63.20 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ =6.5 Hz, POCH₂CH₃), 63.39 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ =6.6 Hz, POCH₂CH₃), 69.57 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ =4.5 Hz, OCH₂C=O), 74.03 (dq, $^1J_{\text{C,P}}$ =162.5 Hz, $^2J_{\text{C,F}}$ =30.7 Hz, PCH), 122.86 (qd, $^1J_{\text{C,F}}$ =282.4 Hz, $^2J_{\text{C,P}}$ =7.4 Hz, C=O)

C₉H₁₇F₃NO₆P (323.20)

Berechnet (%) C 33.45 H 5.30 N 4.33

Gefunden (%) C 33.29 H 5.58 N 4.15

Ethyl-2-(diethoxyphosphoryl)-2-(2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethoxy)acetat **23j**

Hergestellt aus 0,58 g **20j** (1,4 mmol) nach **AAV 8**.

Ausbeute 99 %, farblose Kristalle

Schmelzpunkt 84 °C

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3163 (O-H), 2985 (C-H_{aliph.}), 1747 (C=O, Ester), 1665 (C=O, Hydroxamsäure), 1246 (P=O), 1026 (P-O)

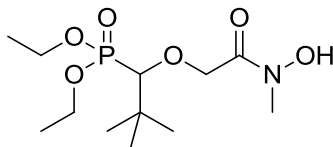
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 1.21 (t, J =7.1 Hz, 3H, COOCH₂CH₃), 1.23 (t, J =6.9 Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.25 (t, J =7.0 Hz, POCH₂CH₃), 3.07 (s, 3H, NCH₃), 4.07–4.23 (m, 6H, COOCH₂CH₃ + POCH₂CH₃), 4.30 (d, J =16.4 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.45 (d, J =16.3 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.75 (d, $^2J_{\text{H,P}}$ =18.2 Hz, 1H, PCH), 9.83 (s, 1H, OH)

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 13.85 (COOCH₂CH₃), 16.08 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ =5.8 Hz, POCH₂CH₃), 35.54 (NCH₃), 60.97 (COOCH₂CH₃), 62.83 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ =6.4 Hz, POCH₂CH₃), 63.03 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ =6.4 Hz, POCH₂CH₃), 67.36 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ =10.7 Hz, OCH₂C=O), 75.31 (d, $^1J_{\text{C,P}}$ =152.9 Hz, PCH), 166.57 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ =1.2 Hz, C=O), 168.40 (C=O)

C₁₁H₂₂NO₈P (327.27)

Berechnet (%) C 40.37 H 6.78 N 4.28

Gefunden (%) C 40.40 H 6.68 N 4.20

Diethyl-(1-(2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethoxy)-2,2-dimethylpropyl)phosphonat **23k**

Hergestellt aus 0,35 g **20k** (0,9 mmol) nach **AAV 8**.

Ausbeute 99 %, farbloses Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 2980 (C-H_{aliph.}), 1654 (C=O), 1229 (P=O), 1052/1025 (P-O)

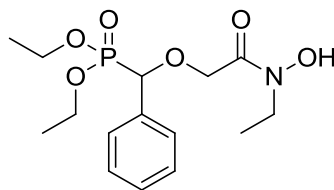
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 1.01 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.23 (t, $J=7.0$ Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.24 (t, $J=7.0$ Hz, 3H, POCH₂CH₃), 3.07 (s, 3H, NCH₃), 3.45 (d, $^2J_{H,P}=6.7$ Hz, 1H, PCH), 4.00–4.12 (m, 4H, POCH₂CH₃), 4.25 (d, $J=15.0$ Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.50 (d, $J=15.0$ Hz, 1H, OCH₂C=O), 9.84 (br. s, 1H, OH)

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 16.20 (d, $^3J_{C,P}=5.5$ Hz, POCH₂CH₃), 16.29 (d, $^3J_{C,P}=5.5$ Hz, POCH₂CH₃), 26.42 (d, $^3J_{C,P}=6.3$ Hz, C(CH₃)₃), 35.04 (d, $^2J_{C,P}=5.4$ Hz, C(CH₃)₃), 35.54 (NCH₃), 60.99 (d, $^2J_{C,P}=6.8$ Hz, POCH₂CH₃), 61.86 (d, $^2J_{C,P}=7.3$ Hz, POCH₂CH₃), 70.29 (OCH₂C=O), 83.63 (d, $^1J_{C,P}=157.4$ Hz, PCH), 168.48 (C=O)

C₁₂H₂₆NO₆P (311.31)

Berechnet (%) C 46.30 H 8.42 N 4.50

Gefunden (%) C 46.06 H 8.14 N 4.60

Diethyl-((2-(ethyl(hydroxy)amino)-2-oxoethoxy)(phenyl)methyl)phosphonat **24**

Hergestellt aus 0,44 g **21** (1 mmol) nach **AAV 8**.

Ausbeute 80 %, farblose Kristalle

Schmelzpunkt 79 °C

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3118 (O-H), 2984/2905 (C-H_{aliph.}), 1659 (C=O), 1240/1215 (P=O), 1030 (P-O)

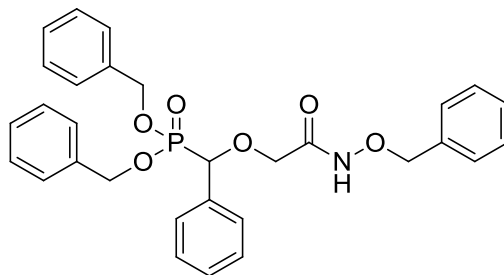
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 1.03 (t, J =7.1 Hz, 3H, NCH₂CH₃), 1.12 (t, J =7.1 Hz, POCH₂CH₃), 1.19 (t, J =7.1 Hz, POCH₂CH₃), 3.47 (ddq, J =14.1, 7.1 Hz, 2H, NCH₂CH₃), 3.86–4.00 (m, 2H, POCH₂CH₃), 4.01–4.08 (m, 2H, POCH₂CH₃), 4.11 (d, J =16.2 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.25 (d, J =16.1, 1H, OCH₂C=O), 5.03 (d, $J_{\text{H,P}}$ =14.6 Hz, 1H, PCH), 7.30–7.45 (m, 5H, arom.), 9.54 (s, 1H, OH)

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 11.61 (NCH₂CH₃), 16.04 (d, $J_{\text{C,P}}$ =5.6 Hz, POCH₂CH₃), 16.16 (d, $J_{\text{C,P}}$ =5.7 Hz, POCH₂CH₃), 42.07 (NCH₂CH₃), 62.10 (d, $J_{\text{C,P}}$ =6.5 Hz, POCH₂CH₃), 62.48 (d, $J_{\text{C,P}}$ =6.8 Hz, POCH₂CH₃), 65.85 (d, $J_{\text{C,P}}$ =13.5 Hz, OCH₂C=O), 76.86 (d, $J_{\text{C,P}}$ =164.7 Hz, PCH), 128.06 (d, $J_{\text{C,P}}$ =1.4 Hz, 2C), 128.17 (2C), 128.21, 134.41 (d, $J_{\text{C,P}}$ =1.0 Hz), 168.21 (C=O)

C₁₅H₂₄NO₆P (345.33)

Berechnet (%) C 52.17 H 7.01 N 4.06

Gefunden (%) C 51.90 H 6.96 N 3.96

Dibenzyl-((2-((benzyloxy)amino)-2-oxoethoxy)(phenyl)methyl)phosphonat **25a**

Hergestellt aus 1,05 g **19a** (3 mmol) nach **AAV 9**.

Ausbeute 25 %, farbloses teilkristallines Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3406 (br., N-H), 1703 (C=O), 1256/1214 (P=O), 1053/1010 (P-O)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 3.83 (d, J = 13.9 Hz, 1H, OCH₂C=O), 3.93 (d, J = 13.9 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.78 (s, 2H, NOCH₂Ph), 4.90 (dd, J = 12.0, 8.1 Hz, 1H, POCH₂Ph), 4.98 (dd, J = 12.0, 7.0 Hz, 1H, POCH₂Ph), 5.06 (d, J = 7.4 Hz, 2H, POCH₂Ph), 5.13 (d, $^2J_{\text{H,P}}$ = 14.9 Hz, 1H, PCH), 7.10–7.66 (m, 20H, arom.), 10.79 (s, 0.1H, NH, *E*-Isomer), 11.14 (s, 0.9H, NH, *Z*-Isomer)

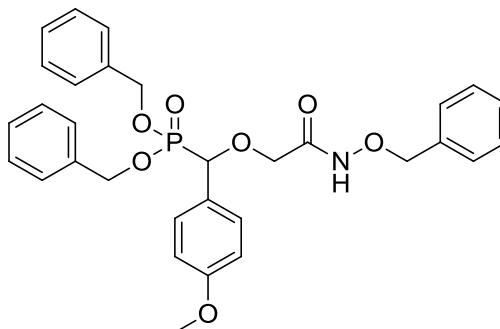
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 67.30 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ = 6.4 Hz, POCH₂Ph), 67.33 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ = 13.0 Hz, OCH₂C=O), 67.71 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ = 6.5 Hz, POCH₂Ph), 76.86 (NOCH₂Ph), 77.55 (d, $^1J_{\text{C,P}}$ = 165.2 Hz, PCH), 127.47 (2C), 127.60 (2C), 128.04, 128.11, 128.16 (2C), 128.20 (3C), 128.26 (3C), 128.29 (3C), 128.40 (d, $J_{\text{P,C}}$ = 3.3 Hz), 128.71 (2C), 133.90, 135.64, 136.21 (d, $^3J_{\text{P,C}}$ = 5.9 Hz), 136.33 (d, $^3J_{\text{P,C}}$ = 5.8 Hz), 164.97 (C=O)

C₃₀H₃₀NO₆P (531.54)

Berechnet (%) C 67.79 H 5.69 N 2.64

Gefunden (%) C 67.60 H 5.47 N 2.67

Dibenzyl-((2-((benzyloxy)amino)-2-oxoethoxy)(4-methoxyphenyl)methyl)phosphonat **25b**



Hergestellt aus 1,53 g **19b** (3,5 mmol) nach **AAV 9**.

Ausbeute 35 %, gelbliches Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3443 (N-H), 1693 (C=O), 1251 (P=O), 1024 (P-O)

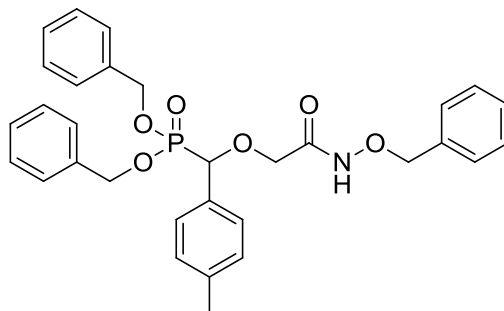
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 3.77 (s, 3H, CH₃), 3.78 (d, überlagert von CH₃, 1H, OCH₂C=O), 3.88 (d, *J*=13.8 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.78 (s, 2H, NOCH₂Ph), 4.87 (dd, *J*=11.8, 8.2 Hz, 1H, POCH₂Ph), 4.96 (dd, *J*=11.9, 7.0 Hz, 1H, POCH₂Ph), 5.04 (d, ²*J*_{H,P}=14.1 Hz, 1H, PCH), 5.07 (d, *J*=7.4 Hz, 2H, POCH₂Ph), 6.94 (d, *J*=8.2 Hz, 2H, arom.), 7.21–7.25 (m, 2H, arom.), 7.29–7.40 (m, 15H, arom.), 10.78 (s, 0.1H, NH, *E*-Isomer), 11.11 (s, 0.9H, NH, *Z*-Isomer)

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 55.70 (CH₃), 66.88 (d, ³*J*_{C,P}=13.6 Hz, OCH₂C=O), 67.22 (d, ²*J*_{C,P}=6.2 Hz, POCH₂Ph), 67.64 (d, ²*J*_{C,P}=6.5 Hz, POCH₂Ph), 76.87 (NOCH₂Ph), 77.01 (d, ¹*J*_{C,P}=167.0 Hz, PCH), 113.65 (2C), 125.45, 127.47 (2C), 127.63 (2C), 128.05 (d, ³*J*_{C,P}=5.3 Hz, 2C), 128.21 (2C), 128.25 (3C), 128.29 (3C), 128.70 (2C), 129.72 (d, *J*_{C,P}=5.8 Hz), 135.65, 136.25 (d, *J*_{C,P}=5.8 Hz), 136.40 (d, ³*J*_{C,P}=6.2 Hz), 159.43 (d, 5*J*_{C,P}=2.1 Hz), 165.05 (C=O)

C₃₁H₃₂NO₇P (561.56)

Berechnet (%) C 66.30 H 5.74 N 2.49

Gefunden (%) C 66.10 H 5.97 N 2.32

Dibenzyl-((2-((benzyloxy)amino)-2-oxoethoxy)(*p*-tolyl)methyl)phosphonat **25c**

Hergestellt aus 1,48 g **19c** (3,5 mmol) nach **AAV 9**.

Ausbeute 25 %, farbloses teilkristallines Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3375 (N-H), 1695 (C=O), 1249 (P=O), 1020 (P-O)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 2.31 (s, 3H, CH₃), 3.80 (d, *J*=13.9 Hz, 1H, OCH₂C=O), 3.90 (d, *J*=13.9 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.78 (s, 2H, NOCH₂Ph), 4.90 (dd, *J*=12.0, 8.1 Hz, 1H, POCH₂Ph), 4.97 (dd, *J*=12.0, 7.0 Hz, 1H, POCH₂Ph), 5.06 (d, *J*=8.0 Hz, 2H, POCH₂Ph), 5.06 (d, ²*J*_{H,P}=12.7 Hz, 1H, PCH), 7.18 (d, *J*=7.9 Hz, 2H, arom.), 7.24 (dd, *J*=6.9, 2.5 Hz, 2H, arom.), 7.27–7.40 (m, 15H, arom.), 10.78 (s, 0.1H, NH, *E*-Isomer), 11.12 (s, 0.9H, NH, *Z*-Isomer)

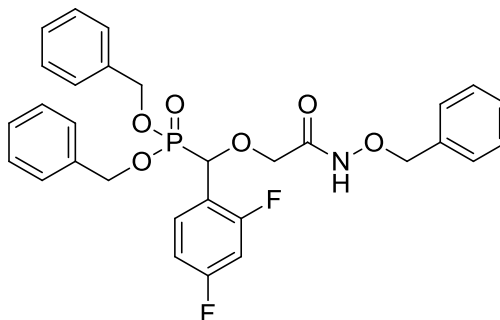
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 20.70 (CH₃), 67.30 (d, ³*J*_{C,P}=13.3 Hz, OCH₂C=O), 67.26 (d, ²*J*_{C,P}=6.3 Hz, POCH₂Ph), 67.67 (d, ²*J*_{C,P}=6.5 Hz, POCH₂Ph), 76.86 (NOCH₂Ph), 77.37 (d, ¹*J*_{C,P}=166.3 Hz, PCH), 127.49 (2C), 127.62 (3C), 128.05 (d, ⁴*J*_{C,P}=4.7 Hz, 2C), 128.16, 128.20 (4C), 128.25 (2C), 128.29 (2C), 128.73 (d, ³*J*_{P,C}=6.8 Hz, 2C), 128.76, 130.76 (d, ²*J*_{P,C}=1.4 Hz), 135.64, 136.24 (d, ³*J*_{P,C}=6.1 Hz), 136.37 (d, ³*J*_{P,C}=5.9 Hz), 137.81 (d, ⁵*J*_{P,C}=2.7 Hz), 165.00 (C=O)

C₃₁H₃₂NO₆P (545.56)

Berechnet (%) C 68.25 H 5.91 N 2.57

Gefunden (%) C 68.06 H 6.13 N 2.61

Dibenzyl-((2-((benzyloxy)amino)-2-oxoethoxy)(2,4-difluorophenyl)methyl)phosphonat **25d**



Hergestellt aus 1,33 g **19d** (3 mmol) nach **AAV 9**.

Ausbeute 26 %, gelbliches Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3199 (N-H), 3034 (C-H_{arom.}), 2955 (C-H_{aliph.}), 1694/1683 (C=O), 1253 (P=O), 1019 (P-O)

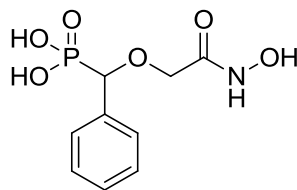
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 3.89 (d, J =13.9 Hz, 1H, OCH₂C=O), 3.95 (d, J =13.8 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.77 (s, 2H, NOCH₂Ph), 4.99 (ddd, J =17.7, 12.0, 8.3 Hz, 2H, POCH₂Ph), 5.10 (d, J =7.6 Hz, 2H, POCH₂Ph), 5.34 (d, $^2J_{H,P}$ =14.5 Hz, 1H, PCH), 7.15 (t, $^3J_{H,F}$ =8.1 Hz, 1H, C₆H₃F₂: H3), 7.21–7.28 (m, 3H, C₆H₅, C₆H₃F₂: H5), 7.30–7.40 (m, 13H, C₆H₅), 7.57–7.67 (m, 1H, C₆H₃F₂: H6), 10.82 (s, 0.1H, NH, E-Isomer), 11.20 (s, 0.9H, NH, Z-Isomer)

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 67.38 (d, $^3J_{C,P}$ =13.0 Hz, OCH₂C=O), 67.52 (d, $^2J_{C,P}$ =6.2 Hz, POCH₂Ph), 67.91 (d, $^2J_{C,P}$ =6.7 Hz, POCH₂Ph), 70.30 (d, $^1J_{C,P}$ =167.0 Hz, PCH), 76.90 (NOCH₂Ph), 103.73 (t, $^2J_{C,F}$ = $^2J_{C,F'}$ =25.6 Hz, C₆H₃F₂: C3), 111.79 (d, $^2J_{C,F}$ =20.1 Hz, C₆H₃F₂: C5), 117.75 (dd, $^2J_{C,F}$ =12.8 Hz, $^2J_{C,P}$ =2.2 Hz, C₆H₃F₂: C1), 127.51 (2C), 127.64 (2C), 128.13, 128.16, 128.22 (2C), 128.29 (3C), 128.33 (3C), 128.73, 130.83 (m, C₆H₃F₂: C6), 135.59, 136.05 (d, $^3J_{C,P}$ =5.9 Hz), 136.19 (d, $^3J_{C,P}$ =6.0 Hz), 160.07 (dd, $^1J_{C,F}$ =243.8 Hz, $^3J_{C,F}$ =12.9 Hz, C₆H₃F₂: C2), 162.28 (dd, $^1J_{C,F}$ =250.1 Hz, $^3J_{C,F}$ =11.7 Hz, C₆H₃F₂: C4), 164.81 (C=O)

C₃₀H₂₈F₂NO₆P (567.16)

HPLC Retentionszeit: 3.33 min

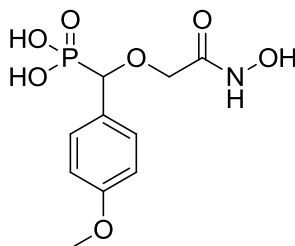
Methode C AUC: 96.9 %

((2-(Hydroxyamino)-2-oxoethoxy)(phenyl)methyl)phosphonsäure **26a**

Hergestellt aus 0,27 g **25a** (0,5 mmol) nach **AAV 10** und anschließender Kristallisation des öligen Rohproduktes aus Isopropanol.

Ausbeute	quantitativ, farbloser amorpher Feststoff
Schmelzpunkt	105 °C
IR $\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹)	3269 (br., N-H, O-H), 2901 (C-H _{aliph.}), 1657 (C=O), 1116 (P=O), 1016 (P-O)
¹ H-NMR	(500 MHz, DMSO-d ₆) = δ (ppm) 3.79 (d, J =14.9 Hz, 1H, OCH ₂ C=O), 3.92 (d, J =14.6 Hz, 1H, OCH ₂ C=O), 4.53 (d, $^2J_{H,P}$ =15.6 Hz, 0.8H, PCH, <i>Z</i> -Isomer), 4.59 (d, $^2J_{H,P}$ =13.3 Hz, 0.2H, PCH, <i>E</i> -Isomer), 7.24–7.30 (m, 1H, arom.), 7.30–7.43 (m, 1H, arom.), 9.01 (s, 1H, OH), 10.41 (s, 0.05H, NH, <i>E</i> -Isomer), 10.79 (s, 0.95H, NH, <i>Z</i> -Isomer)
¹³ C-NMR	(125 MHz, DMSO-d ₆) = δ (ppm) 68.48 (d, $^3J_{C,P}$ =11.8 Hz, OCH ₂ C=O), 80.08 (d, $^1J_{C,P}$ =161.7 Hz, PCH), 127.19 (d, $^5J_{C,P}$ =1.7 Hz), 127.65 (2C), 127.80 (d, $^3J_{C,P}$ =4.5 Hz, 2C), 136.57, 165.31 (C=O)
C ₉ H ₁₂ NO ₆ P	(261.17)
HPLC	Retentionszeit: 1.76 min
Methode D	AUC: 99.1 %

((2-(Hydroxyamino)-2-oxoethoxy)(4-methoxyphenyl)methyl)phosphonsäure **26b**



Hergestellt aus 0,30 g **25b** (0,5 mmol) nach AAV **10**.

Ausbeute quantitativ, farbloses Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3197 (br., N-H, O-H), 1666 (C=O), 1252 (P=O), 1026 (P-O)

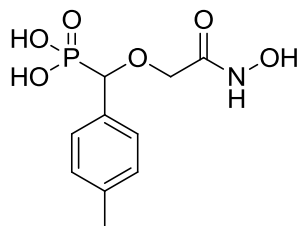
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 3.74 (s, 3H, CH₃), 3.75 (d, überlagert von CH₃, 0.9H, CH₂C=O, Z-Isomer), 3.88 (d, *J*=14.7 Hz, 0.9H, OCH₂C=O, Z-Isomer), 4.06 (d, *J*=16.1 Hz, 0.1H, OCH₂C=O, E-Isomer), 4.12 (d, *J*=16.1 Hz, 0.1H, OCH₂C=O, E-Isomer) 4.45 (d, ²*J*_{H,P}=15.0 Hz, 0.9H, PCH, Z-Isomer), 4.53 (d, ²*J*_{H,P}=13.2 Hz, 0.1H, PCH, E-Isomer), 6.90 (d, *J*=8.5, 2H, arom.), 7.28 (d, *J*=7.4 Hz, 2H, arom.), 8.96 (br. s, 0.2H, OH, Z-Isomer), 10.20 (br. s., 0.01H, OH, E-Isomer), 10.41 (br. s., 0.01H, NH, E-Isomer), 10.73 (s, 0.9H, NH, Z-Isomer)

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 54.95 (CH₃), 68.23 (d, ³*J*_{C,P}=12.8), 79.18 (d, ¹*J*_{C,P}=161.7 Hz, PCH), 113.27 (2C), 127.79, 129.20 (d, ³*J*_{C,P}=5.3 Hz, 2C), 158.78 (d, ⁵*J*_{P,C}=2.0 Hz), 165.27 (C=O)

C₁₀H₁₄NO₆P (291.19)

HPLC Retentionszeit: 1.85 min

Methode B AUC: 96.7 %

((2-(Hydroxyamino)-2-oxoethoxy)(*p*-tolyl)methyl)phosphonsäure **26c**

Hergestellt aus 0,26 g **25c** (0,5 mmol) nach **AAV 10**.

Ausbeute quantitativ, farbloses Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3226 (br., N-H, O-H), 1666 (C=O), 1018 (P-O)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 2.29 (s, 3H, CH₃), 3.76 (d, *J*=14.7 Hz, 0.8H, CH₂C=O, *Z*-Isomer), 3.90 (d, *J*=14.7 Hz, 0.8H, OCH₂C=O, *Z*-Isomer), 4.08 (d, *J*=16.1 Hz, 0.2H, OCH₂C=O, *E*-Isomer), 4.13 (d, *J*=16.1 Hz, 0.2H, OCH₂C=O, *E*-Isomer) 4.46 (d, ²*J*_{H,P}=15.4 Hz, 0.8H, PCH, *Z*-Isomer), 4.54 (d, ²*J*_{H,P}=13.4 Hz, 0.2H, PCH, *E*-Isomer), 7.14 (d, *J*=7.9, 2H, arom.), 7.25 (dd, *J*=7.7, 1.1 Hz, 2H, arom.), 8.98 (br. s, 1H, OH), 10.20 (br. s, 0.02H, NH, *E*-Isomer), 10.76 (s, 0.8H, NH, *Z*-Isomer)

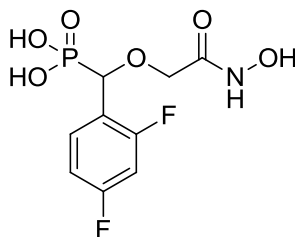
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 20.64 (CH₃), 66.54 (d, ³*J*_{C,P}=10.5 *E*), 68.41 (d, ³*J*_{C,P}=12.8), 79.55 (d, ¹*J*_{C,P}=160.2 Hz, PCH), 127.77 (d, ³*J*_{C,P}=5.0 Hz, 2C), 128.35 (2C), 133.00, 136.60 (d, ⁵*J*_{P,C}=1.9 Hz), 165.25 (C=O)

C₁₀H₁₄NO₆P (275.20)

HPLC Retentionszeit: 1.58 min

Methode D AUC: 95.0 %

((2,4-Difluorphenyl)(2-(hydroxyamino)-2-oxoethoxy)methyl)phosphonsäure **26d**



Hergestellt aus 0,26 g **25d** (0,5 mmol) nach **AAV 10**.

Ausbeute quantitativ, farbloser Schaum

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3381 (br., N-H, O-H), 2919 (C-H_{aliph.}), 1618 (C=O), 1114 (P=O), 1011 (P-O)

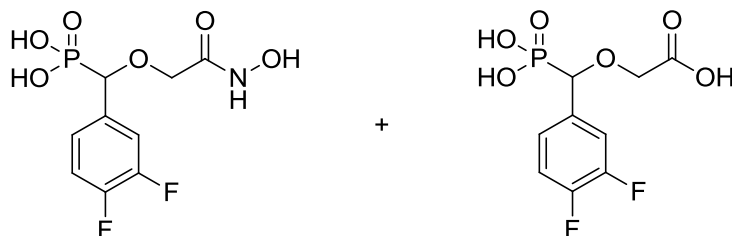
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 3.83 (d, J =14.4 Hz, 0.8H, OCH₂C=O, *Z*-Isomer), 3.92 (d, J =14.4 Hz, 0.8H, OCH₂C=O, *Z*-Isomer), 4.16 (d, J =16.2 Hz, 0.2H, OCH₂C=O, *E*-Isomer), 4.21 (d, J =16.2 Hz, 0.2H, OCH₂C=O, *E*-Isomer), 4.76 (d, $^2J_{H,P}$ =14.8 Hz, 1H, PCH, *Z*-Isomer), 4.85 (d, $^2J_{H,P}$ =13.1 Hz, 0.2H, PCH, *E*-Isomer), 7.12 (dt, $^3J_{H,F}$ =8.5 Hz, $^5J_{H,P}$ =1.8 Hz, 1H, C₆H₃F₂: H3), 7.19 (dt, $^3J_{H,H}$ = $^3J_{H,F}$ =9.7 Hz, $^5J_{H,P}$ =2.2 Hz, 1H, C₆H₃F₂: H5), 7.47–7.58 (m, 1H, C₆H₃F₂: H6), 8.95 (br.s, 1H, OH), 10.12 (br. s, 0.2H, NH, *E*-Isomer), 10.72 (br. s, 0.8H, NH, *Z*-Isomer)

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 66.93 (d, $^3J_{C,P}$ =9.7 Hz, OCH₂C=O, *E*-Isomer), 68.52 (d, $^3J_{C,P}$ =11.6 Hz, OCH₂C=O, *Z*-Isomer), 71.09 (d, $^1J_{C,P}$ =162.9 Hz, PCH, *E*-Isomer), 72.06 (d, $^1J_{C,P}$ =162.2 Hz, PCH, *Z*-Isomer), 103.16 (t, $^2J_{C,F}$ = $^2J_{C,F}$ =26.3 Hz, C₆H₃F₂: C3, *E*-Isomer), 103.26 (t, $^2J_{C,F}$ = $^2J_{C,F}$ =26.1 Hz, C₆H₃F₂: C3, *Z*-Isomer), 111.20 (d, $^2J_{C,F}$ =25.0 Hz, C₆H₃F₂: C5, *E*-Isomer), 111.31 (d, $^2J_{C,F}$ =21.1 Hz, C₆H₃F₂: C5, *Z*-Isomer), 120.23 (dd, $^2J_{C,F}$ =14.7 Hz, $^2J_{P,C}$ =2.4 Hz, C₆H₃F₂: C1), 130.48 (m, C₆H₃F₂: C6, *Z*-Isomer), 130.83 (m, C₆H₃F₂: C6, *E*-Isomer), 160.01 (ddd, $^1J_{C,F}$ =248.5 Hz, $^3J_{C,F}$ =12.7 Hz, $^3J_{C,P}$ =5.8 Hz, C₆H₃F₂: C2), 161.69 (ddd, $^1J_{C,F}$ =245.6 Hz, $^3J_{C,F}$ =12.0 Hz, $^5J_{C,P}$ =2.3 Hz, C₆H₃F₂: C4), 164.89 (C=O, *Z*-Isomer), 169.73 (C=O, *E*-Isomer)

C₉H₁₀F₂NO₆P (297.02)

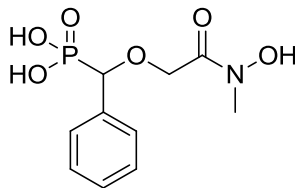
HPLC Retentionszeit: 1.65 min

Methode D AUC: 96.6 %

((3,4-Difluorphenyl)(2-(hydroxyamino)-2-oxoethoxy)methyl)phosphonsäure **26e**im Gemisch mit 2-((3,4-difluorphenyl)(phosphono)methoxy)essigsäure **31**

Hergestellt aus 0,42 g **22c** (1,2 mmol) nach **AAV 11**.

Ausbeute	85 % (bezogen auf 26e), gelbliches Öl
IR $\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹)	3474 (O-H), 2927 (C-H _{aliph.}), 1732 (C=O, 31), 1617 (C=O, 26e), 1284/1232 (P=O), 1019 (P-O)
¹ H-NMR	(500 MHz, DMSO-d ₆) = δ (ppm) 4.04-4.21 (m, 2H, enthält: 4.07 (d, $J=16.2$ Hz, 1H, OCH ₂ C=O und 4.12 (d, $J=16.4$ Hz, 1H, OCH ₂ C=O)), 4.70 (d, $^2J_{H,P}=13.6$ Hz, 0.45H, PCH), 4.71 (d, $^2J_{H,P}=13.6$ Hz, 0.55H, PCH), 6.09 (br. s, OH), 7.19–7.26 (m, 1H, C ₆ H ₃ F ₂), 7.34–7.46 (m, 2H, C ₆ H ₃ F ₂), 10.13 (br. s, NH), 10.66 (br. s, NH)
¹³ C-NMR	(125 MHz, DMSO-d ₆) = δ (ppm) 67.05 (d, $^3J_{C,P}=10.1$ Hz, OCH ₂ C=O), 67.25 (d, $^3J_{C,P}=10.1$ Hz, OCH ₂ C=O), 77.44 (d, $^1J_{C,P}=160.2$ Hz, PCH), 77.62 (d, $^1J_{C,P}=160.4$ Hz, PCH), 116.75 (m, C ₆ H ₃ F ₂ : C2, C5), 124.83 (m, C ₆ H ₃ F ₂ : C6), 134.24 (m, C ₆ H ₃ F ₂ : C1), 148.82 (ddd, $^1J_{C,F}=244.1$ Hz, $^2J_{C,F}=11.4$ Hz, C ₆ H ₃ F ₂ : C-F), 148.92 (ddd, $^1J_{C,F}=245.8$ Hz, $^2J_{C,F}=11.9$ Hz, C ₆ H ₃ F ₂ : C-F), 164.98 (C=O), 169.29 (d, $^4J_{C,P}=10.7$ Hz, C=O, 26e), 171.95 (C=O, 31)
C ₉ H ₁₀ F ₂ NO ₆ P (26e)	(297.15)
C ₉ H ₉ F ₂ O ₆ P (31)	(282.13)
FAB-HRMS (31)	[M + H] ⁺ berechnet: 283.0183 [M + H] ⁺ gefunden: 283,0188
HPLC	Retentionszeit: 1.70 min / 3.14 min
Methode D	AUC: 90.5 % / 9.5 %

((2-(Hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethoxy)(phenyl)methyl)phosphonsäure **27a**

Hergestellt aus 0,33 g **23a** (1 mmol) nach **AAV 11**.

Ausbeute 85 %, farblose Kristalle

Schmelzpunkt 169 °C

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3172 (O-H), 2868 (C-H_{aliph.}), 1628 (C=O), 1204 (P=O), 1024 (P-O)

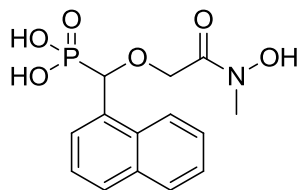
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 3.07 (s, 3H, NCH₃), 4.20 (d, J =16.1 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.34 (d, J =16.1 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.68 (d, $^2J_{H,P}$ =14.4 Hz, 1H, PCH), 7.25–7.40 (m, 5H, arom.), 9.86 (s, 1H, OH)

¹³C-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 35.63 (NCH₃), 66.75 (d, $^3J_{C,P}$ =10.8 Hz, OCH₂C=O), 78.65 (d, $^1J_{C,P}$ =159.0 Hz, PCH), 127.35, 127.68 (2C), 127.97 (d, $J_{C,P}$ =5.4 Hz, 2C), 136.17, 169.49 (C=O)

C₁₀H₁₄NO₆P (275.20)

Berechnet (%) C 43.65 H 5.13 N 5.09

Gefunden (%) C 43.40 H 5.05 N 4.91

((2-(Hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethoxy)(1-naphthyl)methyl)phosphonsäure **27b**

Hergestellt aus 0,23 g **23b** (0,6 mmol) nach **AAV 11**.

Ausbeute 48 %, farblose Kristalle

Schmelzpunkt 165 °C

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3423 (O-H), 2930 (C-H_{aliph.}), 1632 (C=O), 1206 (P=O), 1027 (P-O)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 3.04 (s, 3H, NCH₃), 4.19 (d, J =16.2 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.33 (d, J =16.2 Hz, 1H, OCH₂C=O), 5.55 (d, $^2J_{\text{H,P}}$ =15.2 Hz, 1H, PCH), 7.45–7.55 (m, 3H, arom.), 7.68 (dd, J =7.0, 1.6 Hz, 1H, arom.), 7.87 (d, J =8.2 Hz, 1H, arom.), 7.92 (dd, J =6.0, 3.5 Hz, 1H, arom.), 8.21 (dd, J =5.8, 3.6 Hz, 1H, arom.), 9.79 (br. s, 1H, OH)

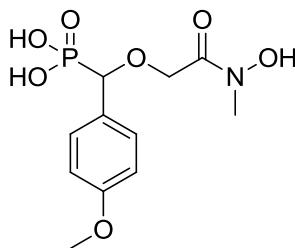
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 35.60 (NCH₃), 66.56 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ =11.6 Hz, OCH₂C=O), 75.60 (d, $^1J_{\text{C,P}}$ =160.5 Hz, PCH), 124.69, 125.14 (d, $J_{\text{C,P}}$ =2.2 Hz), 125.30, 125.51, 126.32 (d, $J_{\text{C,P}}$ =5.4 Hz), 127.83 (d, $J_{\text{C,P}}$ =2.5 Hz, 128.08, 131.33 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ =4.7 Hz), 132.31, 133.11 (d, $J_{\text{C,P}}$ =1.1 Hz), 169.47 (C=O)

C₁₄H₁₆NO₆P (325.25)

Berechnet (%) C 51.70 H 4.96 N 4.31

Gefunden (%) C 51.94 H 5.18 N 4.25

((2-(Hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethoxy)(4-methoxyphenyl)methyl)phosphonsäure 27c



Hergestellt aus 0,43 g **23c** (1,2 mmol) nach **AAV 11**.

Ausbeute 25 %, farblose Kristalle

Schmelzpunkt 143 °C

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3423 (O-H), 2934 (C-H_{aliph.}), 1614 (C=O), 1253 (P=O), 1025 (P-O)

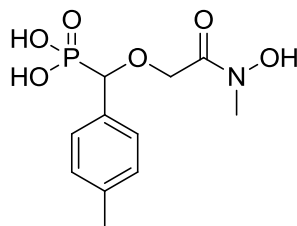
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 3.05 (s, 3H, NCH₃), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 4.15 (d, J =16.1 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.29 (d, J =16.1 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.61 (d, $^2J_{\text{H,P}}$ =13.9 Hz, 1H, PCH), 6.90 (d, J =8.6 Hz, 2H, arom.), 7.30 (dd, J =8.6, 1.6 Hz, 2H, arom.), 9.85 (br. s, 1H, OH)

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 35.64 (NCH₃), 54.97 (OCH₃), 66.37 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ =10.8 Hz, 78.11 (d, $^1J_{\text{C,P}}$ =161.5 Hz, PCH), 113.21 (2C), 127.87, 129.41 (d, $J_{\text{C,P}}$ =5.5 Hz, 2C), 158.76 (d, $J_{\text{C,P}}$ =2.1 Hz), 169.58 (C=O)

C₁₁H₁₆NO₇P (305.22)

Berechnet (%) C 43.29 H 5.28 N 4.59

Gefunden (%) C 43.15 H 5.30 N 4.47

((2-(Hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethoxy)(*p*-tolyl)methyl)phosphonsäure **27d**

Hergestellt aus 0,41 g **23d** (1,2 mmol) nach **AAV 11**.

Ausbeute 63 %, farblose Kristalle

Schmelzpunkt 164 °C

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3137 (O-H), 2926 (C-H_{aliph.}), 1627 (C=O), 1202 (P=O), 1025 (P-O)

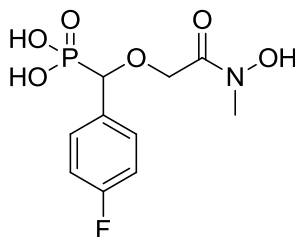
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 2.29 (s, 1H, CH₃), 3.06 (s, 3H, NCH₃), 4.16 (d, *J*=16.1 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.30 (d, *J*=16.1 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.62 (d, ²*J*_{H,P}=14.3 Hz, 1H, PCH), 7.14 (d, *J*=7.8, 2H, arom.), 7.26 (d, *J*=7.9 Hz, 2H, arom.), 9.84 (s, 1H, OH)

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 20.64 (CH₃), 35.63 (NCH₃), 66.55 (d, ³*J*_{C,P}=11.1), 78.47 (d, ¹*J*_{C,P}=160.0 Hz, PCH), 128.02 (d, ³*J*_{C,P}=5.4 Hz, 2C), 128.19 (2C), 133.03, 136.59 (d, ⁵*J*_{P,C}=1.3 Hz), 169.53 (C=O)

C₁₁H₁₆NO₆P (289.22)

Berechnet (%) C 45.68 H 5.58 N 4.84

Gefunden (%) C 45.46 H 5.72 N 4.93

((4-Fluorphenyl)(2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethoxy)methyl)phosphonsäure 27e

Hergestellt aus 0,70 g **23e** (2 mmol) nach **AAV 11**.

Ausbeute 37 %, farblose Kristalle

Schmelzpunkt 131 °C

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3127 (br., O-H), 2871 (C-H_{aliph.}), 1635 (C=O), 1225 (P=O), 1016 (P-O)

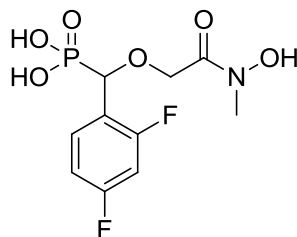
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 3.07 (s, 3H, NCH₃), 4.21 (d, J =16.1 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.33 (d, J =16.1 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.69 (d, $^2J_{H,P}$ =13.9 Hz, 1H, PCH), 7.22 (t, $^3J_{H,H}$ = $^3J_{H,F}$ =7.2 Hz, 2H, C₆H₄F: H3, H5), 7.44 (ddd, $^3J_{H,H}$ =7.8 Hz, $^4J_{H,F}$ =5.8 Hz, $^4J_{H,P}$ =1.8 Hz, 2H, C₆H₄F: H2, H6), 9.86 (s, 1H, OH)

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 35.64 (NCH₃), 66.79 (d, $^3J_{C,P}$ =12.9 Hz, OCH₂C=O), 77.91 (d, $^1J_{C,P}$ =159.7 Hz, PCH), 114.49 (d, $^2J_{C,F}$ =21.6 Hz, C₆H₄F: C3, C5), 129.92 (dd, $^3J_{C,F}$ =7.8 Hz, $^3J_{C,P}$ =5.8 Hz, C₆H₄F: C2, C6), 132.49 (C₆H₄F: C1), 161.59 (dd, $^1J_{C,F}$ =243.2 Hz, $^5J_{C,P}$ =2.8 Hz, C₆H₄F: C4), 169.42 (C=O)

C₁₀H₁₃FNO₆P (293.19)

Berechnet (%) C 40.97 H 4.47 N 4.78

Gefunden (%) C 40.70 H 4.33 N 4.73

((2,4-Difluorphenyl)(2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethoxy)methyl)phosphonsäure 27f

Hergestellt aus 0,74 g **23f** (2 mmol) nach **AAV 11**.

Ausbeute 47 %, farblose Kristalle

Schmelzpunkt 155 °C

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3430 (O-H), 2904 (C-H_{aliph.}), 1621 (C=O), 1205 (P=O), 1017 (P-O)

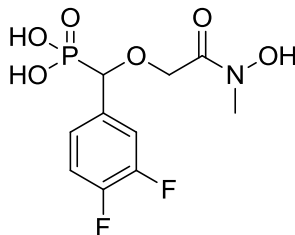
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 3.06 (s, 3H, NCH₃), 4.22 (d, J =16.1 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.35 (d, J =16.0 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.93 (d, $^2J_{H,P}$ =13.5 Hz, 1H, PCH), 7.12 (dt, $^3J_{H,F}$ =8.6 Hz, $^5J_{H,P}$ =2.2 Hz, 1H, C₆H₃F₂: H3), 7.19 (dt, $^3J_{H,H}$ = $^3J_{H,F}$ =9.8 Hz, $^5J_{H,P}$ =2.1 Hz, 1H, C₆H₃F₂: H5), 7.54 (ddt, $^3J_{H,H}$ = $^4J_{H,F}$ =8.4 Hz, $^4J_{H,F}$ =6.8 Hz, $^4J_{H,P}$ =1.6 Hz, 1H, C₆H₃F₂: H6), 9.82 (s, 1H, OH)

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 35.58 (NCH₃), 66.77 (d, $^3J_{C,P}$ =8.8 Hz, OCH₂C=O), 70.93 (d, $^1J_{C,P}$ =162.9 Hz, PCH), 103.18 (t, $^2J_{C,F}$ = $^2J_{C,F'}$ =26.5 Hz, C₆H₃F₂: C3), 111.20 (d, $^2J_{C,F}$ =21.2 Hz, C₆H₃F₂: C5), 120.23 (dd, $^2J_{C,F}$ =14.8 Hz, $^2J_{C,P}$ =2.5 Hz, C₆H₃F₂: C1), 130.76 (m, C₆H₃F₂: C6), 159.94 (ddd, $^1J_{C,F}$ =248.2 Hz, $^3J_{C,F}$ =12.5 Hz, $^3J_{C,P}$ =6.5 Hz, C₆H₃F₂: C2), 161.14 (ddd, $^1J_{C,F}$ =245.3 Hz, $^3J_{C,F}$ =12.4 Hz, $^5J_{C,P}$ =2.7 Hz, C₆H₃F₂: C4), 169.02 (C=O)

C₁₀H₁₂F₂NO₆P (311.18)

Berechnet (%) C 38.60 H 3.89 N 4.50

Gefunden (%) C 38.83 H 3.79 N 4.40

((3,4-Difluorophenyl)(2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethoxy)methyl)phosphonsäure 27g

Hergestellt aus 1,84 g **23g** (5 mmol) nach **AAV 11**.

Ausbeute 55 %, farblose Kristalle

Schmelzpunkt 160 °C

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3138 (O-H), 2877 (C-H_{aliph.}), 1621 (C=O), 1206 (P=O), 1031 (P-O)

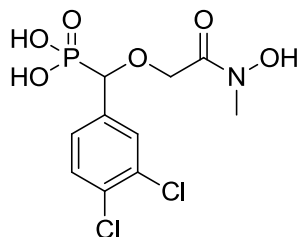
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 3.07 (s, 3H, NCH₃), 4.26 (d, J =16.1 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.36 (d, J =16.1 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.72 (d, $^2J_{H,P}$ =14.1 Hz, 1H, PCH), 7.19–7.25 (m, 1H, C₆H₃F₂), 7.34–7.46 (m, 2H, C₆H₃F₂), 9.88 (br. s, 1H, OH)

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 35.65 (NCH₃), 67.14 (d, $^3J_{C,P}$ =8.5 Hz, OCH₂C=O), 77.51 (d, $^1J_{C,P}$ =158.7 Hz, PCH), 116.63 (m, C₆H₃F₂: C2, C5), 124.68 (m, C₆H₃F₂: C6), 134.42 (m, C₆H₃F₂: C1), 148.73 (ddd, $^1J_{C,F}$ =244.2 Hz, $^2J_{C,F}$ =12.6 Hz, $^5J_{C,P}$ =2.6 Hz, C₆H₃F₂: C3), 148.89 (ddd, $^1J_{C,F}$ =244.9 Hz, $^2J_{C,F}$ =12.6 Hz, $^4J_{C,P}$ =2.1 Hz, C₆H₃F₂: C4), 169.27 (C=O)

C₁₀H₁₂F₂NO₆P (311.18)

Berechnet (%) C 38.60 H 3.89 N 4.50

Gefunden (%) C 38.85 H 4.08 N 4.58

((3,4-Dichlorophenyl)(2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethoxy)methyl)phosphonsäure 27h

Hergestellt aus 0,40 g **23h** (1 mmol) nach **AAV 11**.

Ausbeute 21%, farblose Kristalle

Schmelzpunkt 154 °C

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3425 (O-H), 2928 (C-H_{aliph.}), 1633 (C=O), 1198 (P=O), 1030 (P-O)

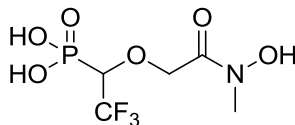
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 3.07 (s, 3H, NCH₃), 4.20 (d, J =16.0 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.37 (d, J =16.2 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.74 (d, $^2J_{H,P}$ =14.2 Hz, 1H, PCH), 7.36 (dt, J =8.2, 1.7 Hz, 1H, arom.), 7.59 (t, J =1.9 Hz, 1H, arom.), 7.62 (d, J =8.3 Hz, 1H, arom.), 9.87 (br. s, 1H, OH)

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 35.63 (NCH₃), 67.30 (d, $^3J_{C,P}$ =9.3 Hz, OCH₂C=O), 77.45 (d, $^1J_{C,P}$ =157.4 Hz, PCH), 128.10 (d, $^3J_{C,P}$ =5.1 Hz, C₆H₃Cl₂: C6), 129.48 (d, $^3J_{C,P}$ =5.1 Hz, C₆H₃Cl₂: C2), 129.85 (m, 2C), 130.36 (d, $J_{C,P}$ =1.9 Hz), 138.01, 169.19 (C=O)

C₁₀H₁₂Cl₂NO₆P (344.09)

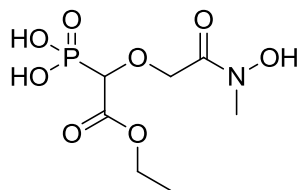
Berechnet (%) C 34.91 H 3.52 N 4.07

Gefunden (%) C 35.10 H 3.45 N 4.18

(2,2,2-Trifluor-1-(2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethoxy)ethyl)phosphonsäure 27i

Hergestellt aus 0,31 g **23i** (1 mmol) nach **AAV 11** und anschließender Kristallisation des öligen Rohprodukts aus Dichlormethan.

Ausbeute	66 %, farblose Kristalle		
Schmelzpunkt	118 °C		
IR $\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹)	3133 (br., O-H), 2924 (C-H _{aliph.}), 1626 (C=O), 1273 (P=O)		
¹ H-NMR	(500 MHz, DMSO-d ₆) = δ (ppm) 3.11 (s, 3H, NCH ₃), 4.38 (dq, ² J _{H,P} =3.3 Hz, ³ J _{H,F} =8.6 Hz, 1H, PCH), 4.56 (d, J=16.0 Hz, 1H, OCH ₂ C=O), 4.63 (d, J=16.1 Hz, 1H, OCH ₂ C=O), 10.03 (s, 1H, OH)		
¹³ C-NMR	(125 MHz, DMSO-d ₆) = δ (ppm) 35.72 (NCH ₃), 69.46 (d, ³ J _{C,P} =2.6 Hz, OCH ₂ C=O), 74.03 (dq, ¹ J _{C,P} =153.5 Hz, ² J _{C,F} =29.8 Hz, PCH), 122.86 (qd, ¹ J _{C,F} =281.7 Hz, ² J _{C,P} =5.9 168.98 (C=O)		
C ₅ H ₉ F ₃ NO ₆ P	(267.10)		
FAB-HRMS	[M + H] ⁺ berechnet:	268.0198	
	[M + H] ⁺ gefunden:	268.0191	
Berechnet (%)	C 22.48	H 3.40	N 5.24
Gefunden (%)	C 22.30	H 3.45	N 4.44

(2-Ethoxy-1-(2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethoxy)-2-oxoethyl)phosphonsäure 27j

Hergestellt aus 0,36 g **23j** (1,1 mmol) nach **AAV 11**.

Ausbeute 58 %, farblose Kristalle

Schmelzpunkt 151 °C

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3156 (O-H), 2907 (C-H_{aliph.}), 1747 (C=O, Ester), 1562 (C=O, Hydroxamsäure), 1228/1200 (P=O), 1035 (P-O)

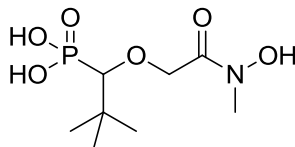
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 1.20 (t, J =7.1 Hz, 3H, COOCH₂CH₃), 3.08 (s, 3H, NCH₃), 4.03–4.17 (m, 2H, COOCH₂CH₃), 4.33 (d, J =16.6 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.37 (d, $^2J_{H,P}$ =17.2 Hz, 1H, PCH), 4.46 (d, J =16.4 Hz, 1H, OCH₂C=O), 9.90 (br. s, 1H, OH)

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 13.91 (COOCH₂CH₃), 35.60 (NCH₃), 60.40 (COOCH₂CH₃), 67.49 (d, $^3J_{C,P}$ =8.0 Hz, OCH₂C=O), 77.00 (d, $^1J_{C,P}$ =146.7 Hz, PCH), 167.51 (C=O), 169.14 (C=O)

C₇H₁₄NO₈P (271.16)

Berechnet (%) C 31.01 H 5.20 N 5.17

Gefunden (%) C 30.73 H 5.13 N 5.10

(1-(2-(Hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethoxy)-2,2-dimethylpropyl)phosphonsäure 27k

Hergestellt aus 0,20 g **23k** (0,6 mmol) nach **AAV 11**.

Ausbeute 72 %, farblose Kristalle

Schmelzpunkt 175 °C

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3136 (O-H), 2963 (C-H_{aliph.}), 1576 (C=O), 1208 (P=O), 1040 (P-O)

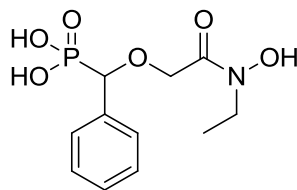
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 1.02 (s, 9H, C(CH₃)₃), 3.12 (s, 3H, NCH₃), 3.22 (d, ²J_{H,P}=8.6 Hz, 1H, PCH), 4.46 (d, J=16.3 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.50 (d, J=15.8 Hz, 1H, OCH₂C=O), 10.10 (br. s, 1H, OH)

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 26.73 (d, ³J_{C,P}=5.8 Hz, C(CH₃)₃), 35.02 (d, ²J_{C,P}=4.7 Hz, C(CH₃)₃), 35.81 (NCH₃), 70.89 (d, ³J_{C,P}=3.1 Hz, OCH₂C=O), 86.27 (d, ¹J_{C,P}=152.7 Hz, PCH), 170.67 (C=O)

C₈H₁₈NO₆P (255.21)

Berechnet (%) C 37.65 H 7.11 N 5.49

Gefunden (%) C 37.47 H 6.83 N 5.25

((2-(Ethyl(hydroxy)amino)-2-oxoethoxy)(phenyl)methyl)phosphonsäure **28**

Hergestellt aus 0,35 g **24** (1 mmol) nach **AAV 11**.

Ausbeute 48 %, farblose Kristalle

Schmelzpunkt 172 °C

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3184 (O-H), 2874 (C-H_{aliph.}), 1623 (C=O), 1186 (P=O), 1019/998 (P-O)

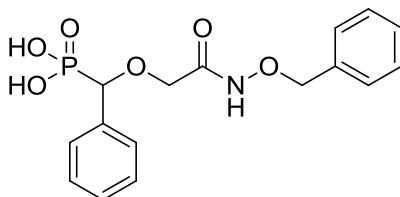
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 1.05 (t, $J=7.1$ Hz, 3H, NCH₂CH₃), 3.49 (q, $J=7.1$ Hz 2H, NCH₂CH₃), 4.19 (d, $J=16.3$ Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.33 (d, $J=16.1$, 1H, OCH₂C=O), 4.68 (d, $^2J_{H,P}=14.4$ Hz, 1H, PCH), 7.25–7.40 (m, 5H, arom.), 9.67 (s, 1H, OH)

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 11.59 (NCH₂CH₃), 42.24 (NCH₂CH₃), 66.94 (d, $^2J_{C,P}=8.2$ Hz, POCH₂CH₃), 76.66 (d, $^1J_{C,P}=158.9$ Hz, PCH), 127.34, 127.68 (2C), 127.97 (d, $J_{C,P}=5.3$ Hz, 2C), 136.21, 169.13 (C=O)

C₁₁H₁₆NO₆P (289.22)

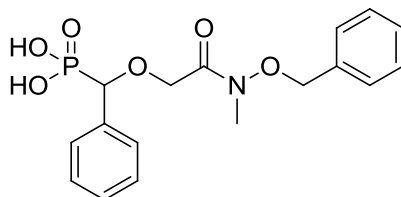
Berechnet (%) C 45.68 H 5.58 N 4.84

Gefunden (%) C 45.81 H 5.58 N 4.61

((2-((Benzyloxy)amino)-2-oxoethoxy)(phenyl)methyl)phosphonsäure **29a**

Hergestellt aus 0,41 g **19a** (1 mmol) nach **AAV 11** und anschließender Umkristallisation aus Isopropanol/Ethylacetat.

Ausbeute	65 %, farblose Kristalle		
Schmelzpunkt	179 °C		
IR $\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹)	1659 (C=O), 1109 (P=O), 1016 (P-O)		
¹ H-NMR	(500 MHz, DMSO-d ₆) = δ (ppm) 3.84 (d, J = 14.7 Hz, 1H, OCH ₂ C=O), 3.98 (d, J = 14.7 Hz, 1H, OCH ₂ C=O), 4.63 (d, $^2J_{H,P}$ = 15.3 Hz, 1H, PCH), 4.84 (s, 2H, OCH ₂ Ph), 7.26–7.32 (m, 1H, arom.), 7.32–7.43 (m, 9H, arom.), 11.37 (s, 1H, NH)		
¹³ C-NMR	(125 MHz, DMSO-d ₆) = δ (ppm) 68.43 (d, $^3J_{C,P}$ = 12.2 Hz, OCH ₂ C=O), 77.01 (OCH ₂ Ph), 79.36 (d, $^1J_{C,P}$ = 159.5 Hz, PCH), 127.56, 127.80 (2C), 127.82 (d, $^3J_{C,P}$ = 4.9 Hz, 2C), 128.24 (3C), 128.67 (2C), 135.59, 135.72, 165.59 (C=O)		
C ₁₆ H ₁₈ NO ₆ P	(351.29)		
Berechnet (%)	C 54.71	H 5.16	N 3.99
Gefunden (%)	C 54.68	H 5.42	N 3.99

((2-((Benzyloxy)(methyl)amino)-2-oxoethoxy)(phenyl)methyl)phosphonsäure **29b**

Hergestellt aus 0,42 g **20a** (1 mmol) nach **AAV 11**.

Ausbeute 30 %, farblose Kristalle

Schmelzpunkt 139 °C

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3062/3033 (C-H_{arom.}), 2884 (C-H_{aliph.}), 1637 (C=O), 1191 (P=O), 1016 (P-O)

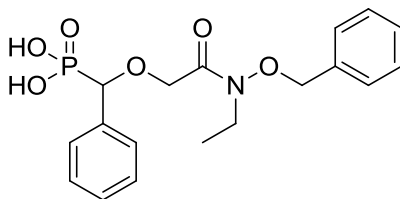
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 3.13 (s, 3H, NCH₃), 4.18 (d, J =15.6 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.31 (d, J =15.6 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.64 (d, $^2J_{H,P}$ =13.6 Hz, 1H, PCH), 4.79 (dd, J =17.1, 10.1 Hz, 2H, OCH₂Ph), 7.23–7.46 (m, 10H, arom.)

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm), 32.82 (NCH₃), 66.76 (OCH₂C=O), 75.22 (OCH₂Ph), 78.63 (d, $^1J_{C,P}$ =159.6 Hz, PCH), 127.38 (d, $^5J_{C,P}$ =1.2 Hz), 127.67 (d, $^4J_{C,P}$ =1.1 Hz, 2C), 128.10 (d, $^3J_{C,P}$ =5.3 Hz, 2C), 128.34 (2C), 128.69, 129.45 (2C), 134.29, 136.14, 170.22 (C=O)

C₁₇H₂₀NO₆P (365.32)

Berechnet (%) C 55.89 H 5.52 N 3.83

Gefunden (%) C 55.62 H 5.43 N 3.69

((2-((Benzyloxy)(ethyl)amino)-2-oxoethoxy)(phenyl)methyl)phosphonsäure **29c**

Hergestellt aus 0,44 g **21** (1 mmol) nach **AAV 11**.

Ausbeute 29 %, farblose Kristalle

Schmelzpunkt 115 °C

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3436 (O-H), 2938 (C-H_{aliph.}), 1653 (C=O), 998 (P-O)

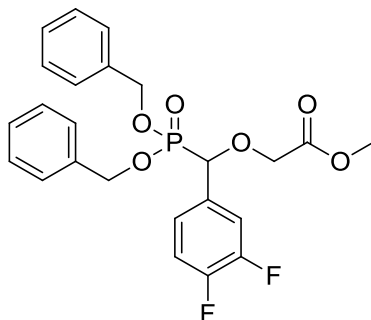
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 1.06 (t, J =7.0 Hz, 3H, NCH₂CH₃), 3.61 (q, J =7.0 Hz, 2H, NCH₂CH₃), 4.20 (d, J =15.7 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.32 (d, J =15.6, 1H, OCH₂C=O), 4.65 (d, $^2J_{H,P}$ =13.5 Hz, 1H, PCH), 4.77 (dd, J =16.8, 10.0 Hz 2H, OCH₂Ph), 7.25–7.45 (m, 10H, arom.)

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) = δ (ppm) 11.74 (NCH₂CH₃), (unter DMSO-Signal: NCH₂CH₃, 77.00 (d, $^3J_{C,P}$ =10.3 Hz, OCH₂C=O), 75.54 (OCH₂Ph), 78.65 (d, $^1J_{C,P}$ =159.5 Hz, PCH), 127.38 (d, $J_{C,P}$ =1.4 Hz), 127.67 (d, $J_{C,P}$ =1.2 Hz, 2C), 128.13 (d, $J_{C,P}$ =5.4 Hz, 2C), 128.35 (2C), 128.65, 129.36 (2C), 134.39, 136.18, 170.00 (C=O)

C₁₈H₂₂NO₆P (379.34)

HPLC Retentionszeit: 1.83 min

Methode D AUC: 94.6 %

Methyl-2-((bis(benzyloxy)phosphoryl)-(3,4-difluorophenyl)methoxy)acetat **30**

Hergestellt aus 1,33 g **19e** (3 mmol) nach **AAV 9**.

Ausbeute 21 %, farblose Kristalle

Schmelzpunkt 63 °C

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 2955 (C-H_{aliph.}), 1756 (C=O), 1284/1257 (P=O), 1010 (P-O)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 3.70 (s, 3H, OCH₃), 3.98 (d, J =16.4 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.22 (dd, J =16.4, 0.8 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.88 (d, $^2J_{\text{H,P}}$ =14.6 Hz, 1H, PCH), 5.01 (d, J =8.1 Hz, 2H, POCH₂Ph), 5.05 (dd, J =11.7, 7.6 Hz, 1H, POCH₂Ph), 5.11 (dd, J =11.7, 8.6 Hz, 1H, POCH₂Ph), 7.04–7.12 (m, 2H, C₆H₃F₂), 7.18–7.26 (m, 3H, C₆H₅), 7.28–7.38 (m, 3H, C₆H₅, C₆H₃F₂)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 51.94 (OCH₃), 66.66 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ =13.0 Hz, OCH₂C=O), 68.59 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ =6.6 Hz, POCH₂Ph), 68.89 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ =7.0 Hz, POCH₂Ph), 77.57 (d, $^1J_{\text{C,P}}$ =169.7 Hz, PCH), 117.31 (m, C₆H₃F₂: C2, C5), 124.46 (ddd, $^3J_{\text{C,P}}$ = $^3J_{\text{C,F}}$ =6.4 Hz, $^4J_{\text{C,F}}$ =4.3 Hz, C₆H₃F₂: C6), 128.04 (2C), 128.08 (2C), 128.50 (2C), 128.53 (2C), 128.55 (2C), 130.54 (m, C₆H₃F₂: C1), 135.86 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ =5.9 Hz), 136.01 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ =6.3 Hz), 150.30 (dd, $^1J_{\text{C,F}}$ =248.7 Hz, $^2J_{\text{C,F}}$ =12.2 Hz, C₆H₃F₂: C-F), 150.55 (dd, $^1J_{\text{C,F}}$ =246.7 Hz, $^2J_{\text{C,F}}$ =16.6 Hz, $^5J_{\text{C,P}}$ =2.7 Hz, C₆H₃F₂: C-F), 169.72 (C=O)

C₂₄H₂₃F₂NO₆P (476.41)

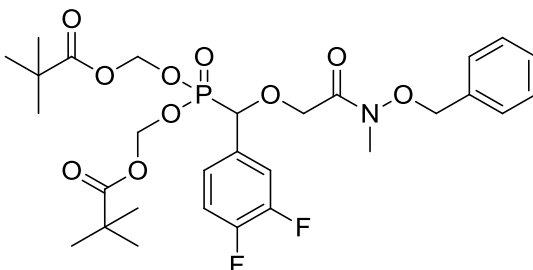
EI-MS (m/z) 477 [M+H]⁺

Berechnet (%) C 60.51 H 4.87

Gefunden (%) C 60.51 H 5.01

5.5 Analytische Daten der Verbindungen aus Kapitel 4

(((2-((Benzyloxy)(methyl)amino)-2-oxoethoxy)(3,4-difluorphenyl)methyl)phosphoryl)-bis(oxy))bis(methylen)bis(2,2-dimethylpropanoat) **32a**



Hergestellt aus 1,83 g **20g** (4 mmol) nach **AAV 12**.

Ausbeute 37 %, gelbliches Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 2977 (C-H_{aliph.}), 1754 (C=O, Ester), 1681 (C=O, Hydroxamat), 1281 (P=O), 1025/1003 (P-O)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.20, 1.23 (2s, 18H, C(CH₃)₃), 3.18 (s, 3H, NCH₃), 3.99 (d, J =16.2 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.33 (d, J =16.1 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.74 (dd, J =16.3, 10.9 Hz, 2H, CH₂Ph), 4.95 (d, $^2J_{H,P}$ =14.2 Hz, 1H, PCH), 5.60–5.73 (m, 4H, POCH₂), 7.11–7.18 (m, 2H, C₆H₃F₂), 7.22–7.28 (m, 3H, C₆H₅, C₆H₃F₂), 7.30–7.35 (m, 3H, C₆H₅, C₆H₃F₂)

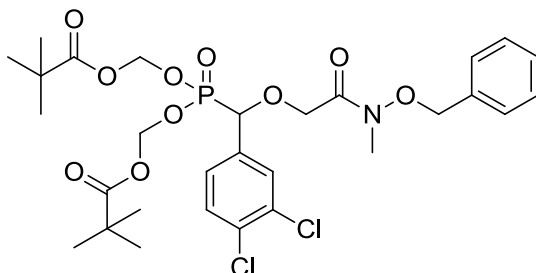
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 26.79, 27.05 (2s, C(CH₃)₃), 33.41 (NCH₃), 38.67 (C(CH₃)₃), 66.77 (d, $^3J_{C,P}$ =11.8 Hz, OCH₂C=O), 76.23 (OCH₂Ph), 76.61 (d, $^1J_{C,P}$ =158.7 Hz, PCH), 82.13 (d, $^2J_{C,P}$ =6.3 Hz, POCH₂), 82.41 (d, $^2J_{C,P}$ =6.5 Hz, POCH₂), 117.37 (m, C₆H₃F₂: C2, C5), 124.56 (m, C₆H₃F₂: C6), 128.75 (C₆H₅, 2C), 129.36 (C₆H₅), 129.44 (C₆H₅, 2C), 130.17 (m, C₆H₃F₂: C1), 133.88 (C₆H₅), 150.31 (d, $^1J_{C,F}$ =251.2 Hz, C₆H₃F₂: C-F), 150.65 (d, $^1J_{C,F}$ =249.7 Hz, C₆H₃F₂: C-F), 170.54 (C=O, Hydroxamat), 176.71 (C=O, Ester), 176.75 (C=O, Ester)

C₂₉H₃₈F₂NO₁₀P (629.58)

Berechnet (%) C 55.32 H 6.08 N 2.22

Gefunden (%) C 55.49 H 6.06 N 2.17

(((2-((Benzyloxy)(methyl)amino)-2-oxoethoxy)(3,4-dichlorphenyl)methyl)phosphoryl)-bis(oxy))bis(methylen)-bis(2,2-dimethylpropanoat) **32b**



Hergestellt aus 2,16 g **20h** (4,4 mmol) nach **AAV 12**.

Ausbeute 38 %, gelbes Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 2976 (C-H_{aliph.}), 1755 (C=O, Ester), 1682 (C=O, Hydroxamsäure), 1278 (P=O), 1025/1003 (P-O)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.19, 1.23 (2s, 18H, C(CH₃)₃), 3.18 (s, 3H, NCH₃), 3.95 (d, J =16.2 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.32 (dd, J =16.2, 0.9 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.73 (dd, J =18.1, 11.0 Hz, 2H, OCH₂Ph), 4.94 (d, ² $J_{H,P}$ =14.6 Hz, 1H, PCH), 5.58–5.74 (m, 4H, POCH₂), 7.23–7.28 (m, 3H, C₆H₄Cl₂, C₆H₅), 7.29–7.34 (m, 3H, C₆H₅), 7.43 (d, J =8.4 Hz, 1H, C₆H₄Cl₂), 7.47 (d, J =2.0 Hz, 1H, C₆H₄Cl₂)

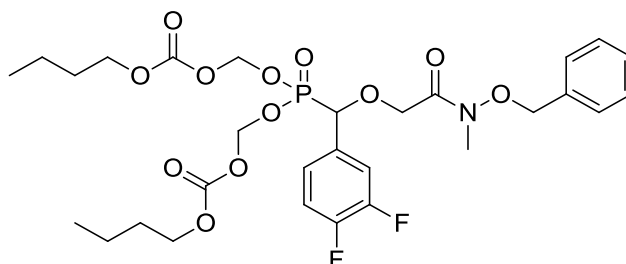
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 26.79, 27.05 (2s, C(CH₃)₃), 33.39 (NCH₃), 38.68 (C(CH₃)₃), 66.84 (d, ³ $J_{C,P}$ =12.1 Hz, OCH₂C=O), 76.18 (OCH₂Ph), 76.58 (d, ¹ $J_{C,P}$ =165.4 Hz, PCH), 82.17 (d, ² $J_{C,P}$ =6.4 Hz, POCH₂), 82.44 (d, ² $J_{C,P}$ =6.5 Hz, POCH₂), 127.55 (d, $J_{C,P}$ =5.7 Hz, C₆H₃Cl₂), 128.73 (C₆H₅, 2C), 129.24 (C₆H₅), 129.45 (C₆H₅, 2C), 130.06 (d, $J_{C,P}$ =6.3 Hz, C₆H₃Cl₂), 130.52 (d, $J_{C,P}$ =2.4 Hz, C₆H₃Cl₂), 132.79 (d, $J_{C,P}$ =2.7 Hz, C₆H₃Cl₂), 133.01 (d, $J_{C,P}$ =4.1 Hz, C₆H₃Cl₂), 133.54 (d, $J_{C,P}$ =1.9 Hz, C₆H₃Cl₂), 133.87, (C₆H₅), 170.55 (C=O, Hydroxamsäure), 176.70 (C=O, Ester), 176.73 (C=O, Ester)

C₂₉H₃₈Cl₂NO₁₀P (662.49)

Berechnet (%) C 52.58 H 5.78 N 2.11

Gefunden (%) C 52.42 H 5.93 N 2.01

(((2-((Benzyloxy)(methyl)amino)-2-oxoethoxy)(3,4-difluorophenyl)methyl)phosphoryl)bis-(oxy))bis(methylen)-dibutyldicarbonat **33**



Hergestellt aus 1,42 g **20g** (3,1 mmol) nach **AAV 12**.

Ausbeute 17 %, gelbliches Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 2963 (C-H_{aliph.}), 1765 (C=O, Carbonat), 1682 (C=O, Hydroxamat) 1258 (P=O), 1038 (P-O)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 0.94 (t, $J=7.4$ Hz, 3H, OCH₂CH₂CH₂CH₃), 0.94 (t, $J=7.4$ Hz, 3H, OCH₂CH₂CH₂CH₃), 1.40 (ddq, $J=7.4, 2.3$ Hz, 4H, OCH₂CH₂CH₂CH₃), 1.65 (ddt, $J=9.1, 6.9, 2.4$ Hz, 4H, OCH₂CH₂CH₂CH₃), 3.18 (s, 2.7H, NCH₃), 3.22 (s, 0.3H, NCH₃), 4.00 (d, $J=16.2$ Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.16 (t, $J=6.6$ Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂CH₃), 4.17 (t, $J=6.6$ Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂CH₃), 4.34 (dd, $J=16.1, 1.1$ Hz, 0.9H, OCH₂C=O), 4.36 (dd, $J=16.6, 1.6$ Hz, 0.1H, OCH₂C=O), 4.74 (dd, $J=15.5, 10.9$ Hz, 2H, OCH₂Ph), 4.97 (d, $^2J_{\text{H,P}}=14.2$ Hz, 0.9H, PCH), 5.07 (d, $^2J_{\text{H,P}}=15.0$ Hz, 0.1H, PCH), 5.63 (dd, $J=12.5, 5.3$ Hz, 1H, POCH₂), 5.68 (dd, $J=11.9, 5.4$ Hz, 1H, POCH₂), 5.69 (d, $J=12.1$ Hz, 2H, POCH₂), 7.10–7.20 (m, 2H, C₆H₃F₂), 7.22–7.42 (m, 6H, C₆H₅, C₆H₃F₂)

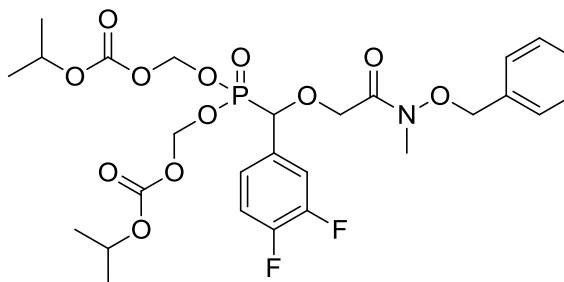
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 13.62 (OCH₂CH₂CH₂CH₃), 18.83 (OCH₂CH₂CH₂CH₃), 30.44 (OCH₂CH₂CH₂CH₃), 33.40 (NCH₃), 66.80 (d, $^3J_{\text{C,P}}=12.3$ Hz, OCH₂C=O), 68.77 (OCH₂CH₂CH₂CH₃), 76.24 (OCH₂Ph), 76.61 (d, $^1J_{\text{C,P}}=159.1$ Hz, PCH), 84.76 (d, $^2J_{\text{C,P}}=6.5$ Hz, POCH₂), 84.89 (d, $^2J_{\text{C,P}}=6.6$ Hz, POCH₂), 117.40 (m, C₆H₃F₂: C2, C5), 124.60 (m, C₆H₃F₂: C6), 128.75 (C₆H₅, 2C), 129.23 (C₆H₅), 129.44 (C₆H₅, 2C), 129.85 (m, C₆H₃F₂: C1), 133.89 (C₆H₅), 150.34 (dd, $^1J_{\text{C,F}}=248.8$ Hz, $^2J_{\text{C,F}}=10.9$ Hz, $^5J_{\text{C,P}}=2.6$ Hz, C₆H₃F₂: C4), 150.68 (ddd, $^1J_{\text{C,F}}=249.7$ Hz, $^2J_{\text{C,F}}=12.1$ Hz, $^4J_{\text{C,P}}=3.5$ Hz C₆H₃F₂: C3), 153.70 (C=O, Carbonat), 170.50 (C=O, Hydroxamat)

$\text{C}_{29}\text{H}_{38}\text{F}_2\text{NO}_{12}\text{P}$ (661.58)

Berechnet (%) C 52.65 H 5.79 N 2.12

Gefunden (%) C 52.84 H 5.97 N 2.27

(((2-((Benzyloxy)(methyl)amino)-2-oxoethoxy)(3,4-difluorphenyl)methyl)phosphoryl)bis-(oxy))bis(methylen)-diisopropyldicarbonat **34**



Hergestellt aus 0,41 g **20g** (3,1 mmol) nach **AAV 12**.

Ausbeute 20 %, gelbes Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 2986 (C-H_{aliph.}), 1760 (C=O), 1266 (P=O), 1030 (P-O)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.30 (d, J =6.3 Hz, 6H, CH(CH₃)₂), 1.31 (d, J =6.2 Hz, 6H, CH(CH₃)₂), 3.18 (s, 3H, NCH₃), 4.02 (d, J =16.2 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.35 (dd, J =16.1, 0.9 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.74 (dd, J =15.7, 10.9 Hz, 2H, OCH₂Ph), 4.90 (dq, J =12.1, 6.1 Hz, CH(CH₃)₂), 4.97 (d, $^2J_{H,P}$ =14.0 Hz, 1H, PCH), 5.62 (dd, J =12.4, 5.3 Hz, 1H, POCH₂), 5.68 (dd, J =11.6, 5.5 Hz, 1H, POCH₂), 5.68 (d, J =11.7 Hz, 2H, POCH₂), 7.10–7.18 (m, 2H, C₆H₃F₂), 7.22–7.36 (m, 6H, C₆H₅, C₆H₃F₂)

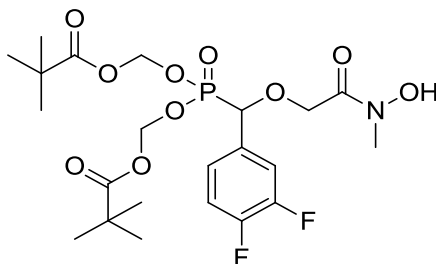
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 21.61 (CH(CH₃)₂), 33.44 (NCH₃), 66.85 (d, $^3J_{C,P}$ =12.3 Hz, OCH₂C=O), 73.25 (CH(CH₃)₂), 76.25 (OCH₂Ph), 76.62 (d, $^1J_{C,P}$ =156.6 Hz, PCH), 84.67 (d, $^2J_{C,P}$ =6.5 Hz, POCH₂), 84.80 (d, $^2J_{C,P}$ =6.5 Hz, POCH₂), 117.40 (m, C₆H₃F₂: C2, C5), 124.57 (m, C₆H₃F₂: C6), 128.75 (C₆H₅, 2C), 129.23 (C₆H₅), 129.44 (C₆H₅, 2C), 129.94 (m, C₆H₃F₂: C1), 133.91 (C₆H₅), 150.32 (ddd, $^1J_{C,F}$ =248.2 Hz, $^2J_{C,F}$ =12.08 Hz, $^5J_{C,P}$ =2.4 Hz, C₆H₃F₂: C4), 150.66 (ddd, $^1J_{C,F}$ =251.1 Hz, $^2J_{C,F}$ =12.2 Hz, $^4J_{C,P}$ =3.4 Hz, C₆H₃F₂: C3), 153.03 (C=O, Carbonat), 153.06 (C=O, Carbonat), 170.51 (C=O, Hydroxamat)

C₂₇H₃₄F₂NO₁₂P (633.53)

Berechnet (%) C 51.19 H 5.41 N 2.21

Gefunden (%) C 51.17 H 5.27 N 2.27

(((3,4-Difluorphenyl)(2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethoxy)methyl)phosphoryl)-bis(oxy))bis(methylen)-bis(2,2-dimethylpropanoat) **35a**



Hergestellt aus 0,32 g **32a** (0,5 mmol) nach **AAV 13**.

Ausbeute 99 %, gelbliches Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3196 (O-H), 2978 (C-H_{aliph.}), 1756 (C=O, Ester), 1666 (C=O, Hydroxamsäure), 1283 (P=O), 1024/1007 (P-O)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.20, 1.22 (2s, 18H, C(CH₃)₃), 3.26 (s, 3H, NCH₃), 4.16 (d, J =14.5 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.57 (d, J =14.5 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.95 (d, $^2J_{H,P}$ =15.2 Hz, 1H, PCH), 5.58–5.73 (m, 4H, POCH₂), 7.09–7.20 (m, 2H, C₆H₃F₂), 7.22–7.32 (m, 1H, C₆H₃F₂), 8.74 (br. s, 1H, OH)

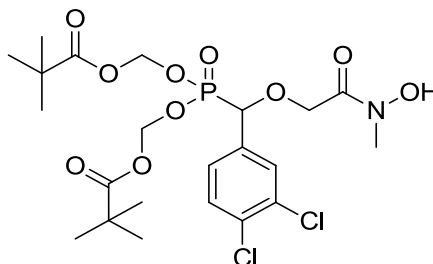
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 26.76, 27.07 (2s, C(CH₃)₃), 36.04 (NCH₃), 38.72 (C(CH₃)₃), 68.68 (d, $^3J_{C,P}$ =12.9 Hz, OCH₂C=O), 76.59 (d, $^1J_{C,P}$ =163.1 Hz, PCH), 82.28 (d, $^2J_{C,P}$ =6.6 Hz, POCH₂), 82.36 (d, $^2J_{C,P}$ =7.2 Hz, POCH₂), 117.10 (dd, $^2J_{C,F}$ =18.5 Hz, $^3J_{C,F}$ = $^3J_{C,P}$ =5.6 Hz, C₆H₃F₂: C2), 117.50 (d, $^2J_{C,F}$ =16.7 Hz, C₆H₃F₂: C5), 124.35 (m, C₆H₃F₂: C6), 129.86 (m, C₆H₃F₂: C1), 150.39 (dd, $^1J_{C,F}$ =245.8 Hz, $^2J_{C,F}$ =11.4 Hz, C₆H₃F₂: C-F), 150.70 (dd, $^1J_{C,F}$ =249.4 Hz, $^2J_{C,F}$ =12.1 Hz, C₆H₃F₂: C-F), 169.06 (C=O, Hydroxamsäure), 176.81 (C=O, Ester), 176.90 (C=O, Ester)

C₂₂H₃₂F₂NO₁₀P (539.46)

Berechnet (%) C 48.98 H 5.98 N 2.60

Gefunden (%) C 49.19 H 6.17 N 2.51

(((3,4-Dichlorphenyl)(2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethoxy)methyl)phosphoryl)-bis(oxy))bis(methylen)-bis(2,2-dimethylpropanoat) **35b**



Hergestellt aus 0,33 g **32b** (0,5 mmol) nach **AAV 13**.

Ausbeute 91 %, gelbliches Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 2977 (C-H_{aliph.}), 1756 (C=O, Ester), 1667 (C=O, Hydroxamsäure), 1280 (P=O), 1024/1004 (P-O)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.20, 1.22 (2s, 18H, C(CH₃)₃), 3.26 (s, 3H, NCH₃), 4.16 (d, J =14.5 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.57 (d, J =14.5 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.95 (d, $^2J_{H,P}$ =15.2 Hz, 1H, PCH), 5.58–5.73 (m, 4H, POCH₂), 7.36 (dt, J =8.2, 1.7 Hz, 1H, arom.), 7.59 (t, J =1.9 Hz, 1H, arom.), 7.62 (d, J =8.3 Hz, 1H, arom.), 9.87 (br. s, 1H, OH)

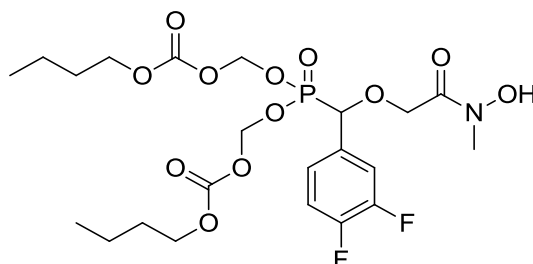
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 26.76, 27.07 (2s, C(CH₃)₃), 36.04 (NCH₃), 38.72 (C(CH₃)₃), 68.68 (d, $^3J_{C,P}$ =12.9 Hz, OCH₂C=O), 76.59 (d, $^1J_{C,P}$ =163.1 Hz, PCH), 82.28 (d, $^2J_{C,P}$ =6.6 Hz, POCH₂), 82.36 (d, $^2J_{C,P}$ =7.2 Hz, POCH₂), 128.20 (d, $^3J_{C,P}$ =5.4 Hz), 129.78 (d, $^3J_{C,P}$ =5.6 Hz), 130.28 (d, $J_{C,P}$ =1.8 Hz), 130.65 (d, $J_{C,P}$ =3.4 Hz), 130.73 (d, $J_{C,P}$ =2.5 Hz), 136.21, 169.06 (C=O, Hydroxamsäure), 176.81 (C=O, Ester), 176.90 (C=O, Ester)

C₂₂H₃₂Cl₂NO₁₀P (572.37)

Berechnet (%) C 46.17 H 5.64 N 2.45

Gefunden (%) C 46.37 H 5.46 N 2.32

Dibutyl-((((3,4-difluorphenyl)(2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethoxy)methyl)-phosphoryl)bis(oxy))bis(methylen))-dicarbonat **36**



Hergestellt aus 0,24 g **33** (0,4 mmol) nach **AAV 13**.

Ausbeute 93 %, farbloses Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3201 (O-H), 2965 (C-H_{aliph.}), 1767 (C=O, Carbonat), 1664/1649 (C=O, Hydroxamsäure, 1276/1249 (P=O), 1037 (P-O)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 0.94 (t, $J=7.4$ Hz, 3H, OCH₂CH₂CH₂CH₃), 0.95 (t, $J=7.4$ Hz, 3H, OCH₂CH₂CH₂CH₃), 1.40 (ddq, $J=7.4$, 2.3 Hz, 4H, OCH₂CH₂CH₂CH₃), 1.67 (ddt, $J=9.4$, 6.8, 2.7 Hz, 4H, OCH₂CH₂CH₂CH₃), 3.27 (s, 3H, NCH₃), 4.15 (d, $J=14.0$ Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.19 (t, $J=6.6$ Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂CH₃), 4.20 (t, $J=6.6$ Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂CH₃), 4.57 (d, $J=14.3$ Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.95 (d, $^2J_{H,P}=15.3$ Hz, 0.9H, PCH), 5.06 (d, $^2J_{H,P}=15.6$ Hz, 0.1H, PCH), 5.60–5.73 (m, 4H, POCH₂), 7.10–7.20 (m, 2H, C₆H₃F₂), 7.22–7.31 (m, 1H, C₆H₃F₂), 8.45 (br. s, 1H, OH)

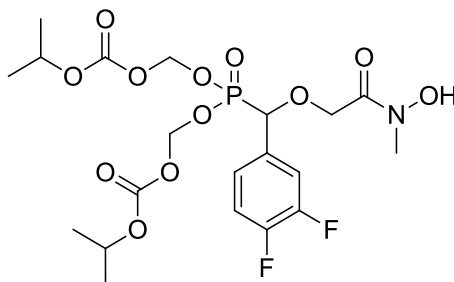
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 13.60 (OCH₂CH₂CH₂CH₃), 18.81 (OCH₂CH₂CH₂CH₃), 30.42 (OCH₂CH₂CH₂CH₃), 35.98 (NCH₃), 68.47 (d, $^3J_{C,P}=13.8$ Hz, OCH₂C=O), 69.00 (OCH₂CH₂CH₂CH₃), 69.06 (OCH₂CH₂CH₂CH₃), 76.59 (d, $^1J_{C,P}=164.1$ Hz, PCH), 84.88 (d, $^2J_{C,P}=6.4$ Hz, POCH₂), 84.93 (d, $^2J_{C,P}=6.6$ Hz, POCH₂), 117.19 (dd, $^2J_{C,F}=18.0$ Hz, $^3J_{C,F}=^3J_{C,P}=5.1$ Hz, C₆H₃F₂: C2), 117.55 (d, $^2J_{C,F}=16.9$ Hz, C₆H₃F₂: C5), 124.41 (m, C₆H₃F₂: C6), 129.56 (m, C₆H₃F₂: C1), 150.42 (dd, $^1J_{C,F}=253.7$ Hz, $^2J_{C,F}=17.4$ Hz, C₆H₃F₂: C-F), 150.77 (d, $^1J_{C,F}=247.2$ Hz, C₆H₃F₂: C-F), 153.67 (C=O, Carbonat), 169.06 (C=O, Hydroxamsäure)

C₂₂H₃₂F₂NO₁₂P (571.46)

Berechnet (%) C 46.24 H 5.64 N 2.45

Gefunden (%) C 46.30 H 5.70 N 2.37

(((3,4-Difluorphenyl)(2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethoxy)methyl)phosphoryl)bis-(oxy))bis(methylen)-diisopropyldicarbonat **37**



Hergestellt aus 0,29 g **34** (0,45 mmol) nach **AAV 13**.

Ausbeute 97 %, gelbes Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3204 (O-H), 2988 (C-H_{aliph.}), 1763 (C=O, Carbonat), 1664/1649 (C=O, Hydroxamsäure), 1268 (P=O), 1028 (P-O)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.29–1.36 (m, 12H, CH(CH₃)₂), 3.27 (s, 3H, NCH₃), 4.15 (d, J =14.2 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.57 (d, J =14.2 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.91 (dq, J =12.7, 6.4 Hz, CH(CH₃)₂), 4.95 (d, $^2J_{H,P}$ =13.4 Hz, 1H, PCH), 5.58–5.73 (m, 4H, POCH₂), 7.10–7.20 (m, 2H, C₆H₃F₂), 7.23–7.33 (m, 1H, C₆H₃F₂), 8.51 (br. s, 1H, OH)

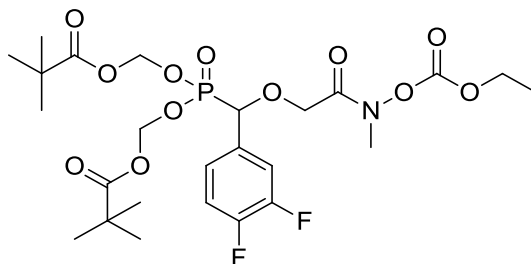
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 21.58 (CH(CH₃)₂), 36.00 (NCH₃), 68.56 (d, $^3J_{C,P}$ =13.0 Hz, OCH₂C=O), 73.60 (CH(CH₃)₂), 73.70 (CH(CH₃)₂), 76.59 (d, $^1J_{C,P}$ =164.0 Hz, PCH), 84.78 (d, $^2J_{C,P}$ =6.5 Hz, POCH₂), 84.83 (d, $^2J_{C,P}$ =6.6 Hz, POCH₂), 117.20 (dd, $^2J_{C,F}$ =17.9 Hz, $^3J_{C,F}$ = $^3J_{C,P}$ =4.7 Hz, C₆H₃F₂: C2), 117.54 (dd, $^2J_{C,F}$ =19.0 Hz, $^4J_{C,P}$ =2.2 Hz, C₆H₃F₂: C5), 124.41 (m, C₆H₃F₂: C6), 129.62 (m, C₆H₃F₂: C1), 150.40 (dd, $^1J_{C,F}$ =243.9 Hz, $^2J_{C,F}$ =8.2 Hz, C₆H₃F₂: C-F), 150.74 (dd, $^1J_{C,F}$ =251.1 Hz, $^2J_{C,F}$ =13.1 Hz, C₆H₃F₂: C-F), 153.03 (C=O, Carbonat), 153.07 (C=O, Carbonat), 169.05 (C=O, Hydroxamsäure)

C₂₀H₂₈F₂NO₁₂P (543.41)

Berechnet (%) C 44.21 H 5.19 N 2.58

Gefunden (%) C 43.99 H 5.25 N 2.57

(((3,4-Difluorphenyl)(2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethoxy)methyl)phosphoryl)-bis(oxy))bis(methylen)-bis(2,2-dimethylpropanoat) **38**



Hergestellt aus 0,16 g **35a** (0,3 mmol) nach **AAV 14**.

Ausbeute 98 %, farbloses Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 2979 (C-H_{aliph.}), 1792 (C=O, Carbonat), 1755 (C=O, Ester), 1700 (C=O, Hydroxamat), 1280/1246 (P=O), 1025 (P-O)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 1.20, 1.21 (2s, 18H, C(CH₃)₃), 1.35 (t, J =7.1 Hz, 3H, OCH₂CH₃), 3.31 (s, 3H, NCH₃), 4.11 (d, J =15.6 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.33 (dq, J =6.9, 1.3 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 4.35 (d, J =16.6 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.97 (d, $^2J_{\text{H,P}}$ =14.1 Hz, 1H, PCH), 5.60–5.75 (m, 4H, POCH₂), 7.10–7.23 (m, 2H, C₆H₃F₂), 7.28–7.36 (m, 1H, C₆H₃F₂)

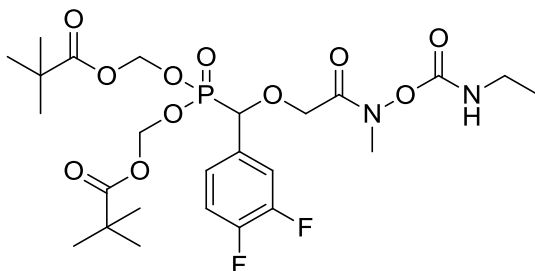
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 14.05 (OCH₂CH₃), 26.79 (C(CH₃)₃), 35.36 (NCH₃), 38.69 (C(CH₃)₃), 66.68 (d, OCH₂C=O, überlappend mit OCH₂CH₃), 66.78 (OCH₂CH₃), 76.94 (d, $^1J_{\text{C,P}}$ =170.1 Hz, PCH), 82.10 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ =6.4 Hz, POCH₂), 82.41 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ =6.5 Hz, POCH₂), 117.42 (m, C₆H₃F₂: C2, C5), 124.70 (m, C₆H₃F₂: C6), 129.89 (m, C₆H₃F₂: C1), 150.35 (dd, $^1J_{\text{C,F}}$ =248.1 Hz, $^2J_{\text{C,F}}$ =12.0 Hz, C₆H₃F₂: C-F), 150.71 (dd, $^1J_{\text{C,F}}$ =252.7 Hz, $^2J_{\text{C,F}}$ =15.4 Hz, C₆H₃F₂: C-F), 153.34 (C=O, Carbonat), 168.93 (C=O, Hydroxamat), 176.73 (C=O, Ester)

C₂₅H₃₆F₂NO₁₂P (611.52)

Berechnet (%) C 49.10 H 5.93 N 2.29

Gefunden (%) C 49.14 H 6.09 N 2.12

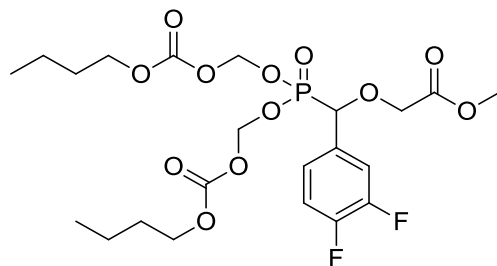
(((1-(3,4-Difluorphenyl)-5-methyl-4,7-dioxo-2,6-dioxa-5,8-diazadecyl)phosphoryl)-bis(oxy))bis(methylen)-bis(2,2-dimethylpropanoat) 39



Hergestellt aus 0,11 g **35a** (0,2 mmol) nach **AAV 14**.

Ausbeute	93 %, farbloses Öl		
IR $\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹)	2978 (C-H _{aliph.}), 1756 (C=O, Ester/Carbamat), 1692 (C=O, Hydroxamat), 1281 (P=O), 1024 (P-O)		
¹ H-NMR	(500 MHz, CDCl ₃) = δ (ppm) 1.18 (t, J =7.3 Hz, 3H, NCH ₂ CH ₃), 1.20, 1.21 (2s, 18H, C(CH ₃) ₃), 3.22–3.33 (m, 5H, NCH ₃ , NCH ₂ CH ₃), 4.08 (d, J =15.4 Hz, 0.8H, OCH ₂ C=O), 4.15 (d, J =16.8 Hz, 0.2H, OCH ₂ C=O), 4.33 (d, J =15.3 Hz, 0.8H, OCH ₂ C=O), 4.38 (dd, J =16.8, 1.3 Hz, 0.2H, OCH ₂ C=O), 4.96 (d, $^2J_{\text{H,P}}$ =13.9 Hz, 0.8H, PCH), 5.04 (d, $^2J_{\text{H,P}}$ =14.7 Hz, 0.2H, PCH), 5.23 (br. s, 1H, NH), 5.59–5.74 (m, 4H, POCH ₂), 7.12–7.23 (m, 2H, C ₆ H ₃ F ₂), 7.29–7.36 (m, 1H, C ₆ H ₃ F ₂)		
¹³ C-NMR	(125 MHz, CDCl ₃) = δ (ppm) 14.87 (NCH ₂ CH ₃), 26.79 (C(CH ₃) ₃), 36.66 (NCH ₃), 38.70 (C(CH ₃) ₃), 65.86 (NCH ₂ CH ₃), 66.85 (d, $^3J_{\text{C,P}}$ = 11.1 Hz, OCH ₂ C=O), 76.88 (d, $^1J_{\text{C,P}}$ =170.4 Hz, PCH), 82.13 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ =6.4 Hz, POCH ₂), 82.42 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ =6.3 Hz, POCH ₂), 117.36 (m, C ₆ H ₃ F ₂ : C2, C5), 124.68 (m, C ₆ H ₃ F ₂ : C6), 130.03 (m, C ₆ H ₃ F ₂ : C1), 150.32 (dd, $^1J_{\text{C,F}}$ =248.7 Hz, $^2J_{\text{C,F}}$ =11.0 Hz, C ₆ H ₃ F ₂ : C-F), 150.68 (dd, $^1J_{\text{C,F}}$ =248.1 Hz, $^2J_{\text{C,F}}$ =12.6 Hz, C ₆ H ₃ F ₂ : C-F), 153.34 (C=O, Carbamat), 168.96 (C=O, Hydroxamat), 176.83 (C=O, Ester)		
C ₂₅ H ₃₇ F ₂ N ₂ O ₁₁ P	(610.54)		
Berechnet (%)	C 49.18	H 6.11	N 4.59
Gefunden (%)	C 49.15	H 6.31	N 4.41

Methyl-2-((bis(((butoxycarbonyl)oxy)methoxy)phosphoryl)(3,4-difluorophenyl)methoxy)-acetat **40**



Hergestellt aus 1,77 g **19e** (4 mmol) nach **AAV 12**.

Ausbeute 14 %, gelbes Öl

IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 2963 (C-H_{aliph.}), 1767/1761 (C=O, Ester, Carbonat), 1277/1257 (P=O), 1038 (P-O)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 0.95 (t, J =7.4 Hz, 6H, OCH₂CH₂CH₂CH₃), 1.40 (ddq, J =7.5, 1.6 Hz, 4H, OCH₂CH₂CH₂CH₃), 1.67 (ddt, J =8.4, 7.0, 1.4 Hz, 4H, OCH₂CH₂CH₂CH₃), 3.73 (s, 3H, OCH₃), 4.07 (d, J =16.5 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.18 (t, J =6.6 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂CH₃), 4.19 (t, J =6.7 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂CH₃), 4.27 (dd, J =16.5, 1.3 Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.95 (d, $^2J_{H,P}$ =14.4 Hz, 1H, PCH), 5.64 (dd, J =12.5, 5.3 Hz, 1H, POCH₂), 5.68 (dd, J =12.1, 5.3 Hz, 1H, POCH₂), 5.70 (d, J =12.3 Hz, 2H, POCH₂), 7.13–7.23 (m, 2H, C₆H₃F₂), 7.28–7.36 (m, 1H, C₆H₃F₂)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) = δ (ppm) 13.62 (OCH₂CH₂CH₂CH₃), 18.83 (OCH₂CH₂CH₂CH₃), 30.45 (OCH₂CH₂CH₂CH₃), 52.01 (OCH₃), 66.84 (d, $^3J_{C,P}$ =12.8 Hz, OCH₂C=O), 68.86 (OCH₂CH₂CH₂CH₃), 77.04 (d, $^1J_{C,P}$ =170.7 Hz, PCH), 84.74 (d, $^2J_{C,P}$ =6.5 Hz, POCH₂), 84.87 (d, $^2J_{C,P}$ =6.7 Hz, POCH₂), 117.47 (m, C₆H₃F₂: C2, C5), 124.59 (ddd, $^3J_{C,P}$ = $^3J_{C,F}$ =6.5 Hz, $^4J_{C,F}$ =3.8 Hz, C₆H₃F₂: C6), 129.49 (m, C₆H₃F₂: C1), 150.43 (dd, $^1J_{C,F}$ =256.2 Hz, $^2J_{C,F}$ =21.1 Hz, C₆H₃F₂: C-F), 150.80 (dd, $^1J_{C,F}$ =246.9 Hz, $^2J_{C,F}$ =9.2 Hz, $^5J_{C,P}$ =2.7 Hz, C₆H₃F₂: C-F), 153.70 (C=O, Carbonat), 169.53 (C=O, Ester)

C₂₂H₃₁F₂O₁₂P (556.44)

Berechnet (%) C 47.49 H 5.62

Gefunden (%) C 47.64 H 5.50

5.6 Untersuchungen zur *in vitro*-Aktivität

5.6.1 Untersuchung der Dxr-Enzymhemmung

Die Untersuchungen an den rekombinanten Dxr-Proteinen von *P. falciparum* (PfDxr), *E. coli* (EcDxr) und *M. tuberculosis* (MtDxr) wurden am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hamburg im Arbeitskreis von Prof. Dr. Markus Fischer durchgeführt.

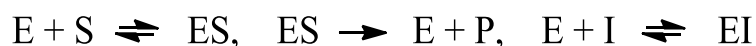
Material und Methoden

Rekombinante PfDxr wurde nach einer Methode gewonnen, die 2010 von Behrendt et al. beschrieben wurde.²¹⁷ Nach einer von Hecht und Mitarbeitern publizierten Methode erfolgte die Herstellung der rekombinanten EcDxr.⁴⁴² Die Reinigung von MtDxr erfolgte mittels Affinitätschromatographie an einer Ni-NTA-Säule entsprechend der für PfDxr beschriebenen Vorgehensweise.²¹⁷ NADPH wurde von BioMol (Hamburg) und Fosmidomycin wurde von Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg) erworben.

IC₅₀-Bestimmung im photometrischen Assay

Die photometrischen Assays wurden in 96-Well-Mikrotiterplatten (Nunc) mit transparentem flachem Boden durchgeführt. Die Assay-Lösungen mit einem Gesamtvolumen von 200 µL enthielten 100 mM Tris-Hydrochlorid* (pH = 7,6), 5 mM MnCl₂, 5 mM Dithiothreitol, 0,5 mM NADPH und 10–50 nM rekombinantes Dxr-Protein (*P. falciparum*, *E. coli* oder *M. tuberculosis*). Die Inhibitoren wurden in 7–13 verschiedenen Verdünnungen im Bereich von 200 µM – 1 nM zugegeben. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (1 mM) gestartet. Der NADPH-Umsatz wurde bei Raumtemperatur über 15–60 Minuten photometrisch (Wellenlänge: 340 nM) in einem Mikroplattenleser (Multiscan Spectrum, Thermo Scientific) verfolgt. Die IC₅₀-Werte wurden aus den initialen Umsetzungsraten durch nichtlineare Regression mit Hilfe des Programms Dynafit berechnet.^{319,320}

Der Auswertung wurde folgendes Modell zugrunde gelegt:



E = Enzym, S = Substrat, P = Reaktionsprodukt, ES = Enzym-Substrat-Komplex, EI = Enzym-Inhibitor-Komplex

* Tris = Tris(hydroxymethyl)-aminomethan.

5.6.2 Untersuchung der antiplasmodialen Aktivität

In vitro-Untersuchungen am *P. falciparum*-Stamm K1, Zytotoxizitäts-Bestimmung an MRC-5-Zellen

Die in Kapitel 2 vorgestellten Benzamide wurden im LMPH* an der Universität Antwerpen (Belgien) durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Louis Maes auf ihre biologische Aktivität gegenüber dem multiresistenten *P. falciparum*-Stamm K1 untersucht. Hier erfolgte auch die Bestimmung der Zytotoxizität der Benzamide und zwei oxasteren Fosmidomycin-Analoga gegenüber MRC-5-SV2-Zellen.† Beide Methoden sind in der oben erwähnten Publikation von Behrendt et al. beschrieben.²¹⁷

In vitro-Untersuchungen an den *P. falciparum*-Stämmen 3D7 und Dd2

Die antiplasmodiale Aktivität der in Kapitel 3 und 4 beschriebenen oxasteren Fosmidomycin-Analoga und Prodrugs wurde gegenüber dem Chloroquin-sensitiven *P. falciparum*-Stamm 3D7 und dem multiresistenten *P. falciparum*-Stamm Dd2‡ untersucht. Die Durchführung dieser Versuche erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Benjamin Mordmüller am Institut für Tropenmedizin des Universitätsklinikums Tübingen.

P. falciparum-Laborstämme 3D7 und Dd2 wurden in Dauerkultur gehalten. Von den Testsubstanzen wurden Stammlösungen (100 mM) in DMSO hergestellt, die Vorverdünnung auf die maximale Testkonzentration von 50 oder 100 µM erfolgte zusammen mit Kulturmedium (RPMI 1640§, 25 mM HEPES**, 2,4 mM L-Glutamin, 50 µg/mL Gentamycin und 0,5 % [w/v] AlbuMAX®). Die Untersuchungslösungen wurden auf 96-Well-Mikrotiterplatten mittels serieller Dreifach-Verdünnung in 11 verschiedenen Konzentrationen vorgelegt und bis zur Untersuchung bei -20 °C gelagert. Anschließend erfolgte die Zugabe von *P. falciparum*-Ringstadien im kompletten Kulturmedium (1,5 % Hämatokrit, 0,05 % Parasitämie). Als Wachstumskontrolle wurden Ringstadien in Abwesenheit einer Testverbindung kultiviert. Nach dreitägiger Inkubation der Mikrotiterplatten bei 37 °C unter sauerstoffarmen Bedingungen (5 % O₂, 5 % CO₂, 90 % N₂) wurden die Kulturen bei -20 °C eingefroren. Die Auswertung erfolgte mittels HRP2-ELISA†† nach einem Standardverfahren.⁴⁴³ Die IC₅₀-Werte wurden mittels nichtlinearer Regressionsanalyse der Dosis-Response-Kurven mit dem drc-Paket (v0.9.0) der Software R (v2.6.1) ermittelt.^{444,445} Jede Verbindung wurde mindestens zweimal im Duplikat getestet.

* LMPH = Laboratory for Microbiology, Parasitology and Hygiene.

† MRC-5-SV-2 = humane, fetale Lungen-Fibroblasten.

‡ Der *P. falciparum*-Stamm Dd2 ist resistent gegen Chloroquin, Chinin, Pyrimethamin und Sulfadoxin.

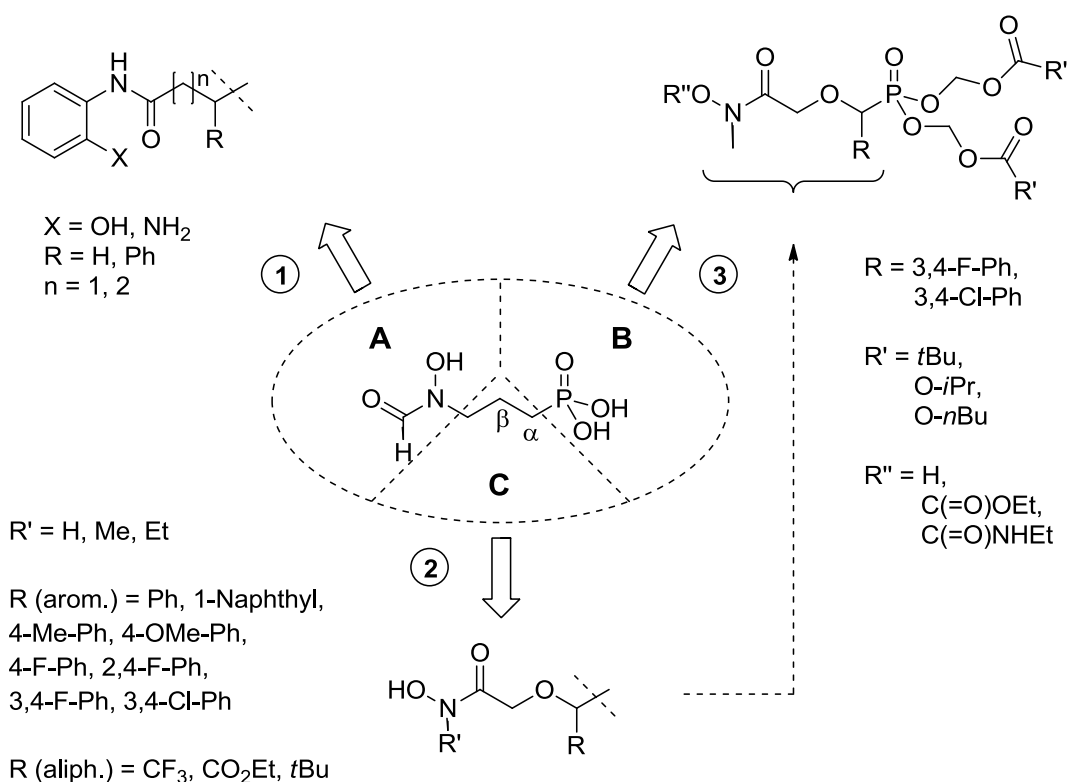
§ RPMI: Zellkulturmedium für normale und neoplastische Leukozyten sowie andere humane und tierische Zelltypen, Mitte der 1960er Jahre von G. E. Moore und Kollegen am Roswell Park Memorial Institute entwickelt (<http://de.wikipedia.org/wiki/RPMI>).

** HEPES = 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure, Puffersubstanz für den pH-Bereich 6,8–8,2.

†† HRP2 = histidine rich protein 2. Die in einer *P. falciparum*-Kultur produzierte Menge an HRP2 steht in direktem Zusammenhang mit der Parasitämie und kann daher zur Wachstumskontrolle *in vitro* herangezogen werden (H. Noedl, <http://malaria.farch.net>). ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay.

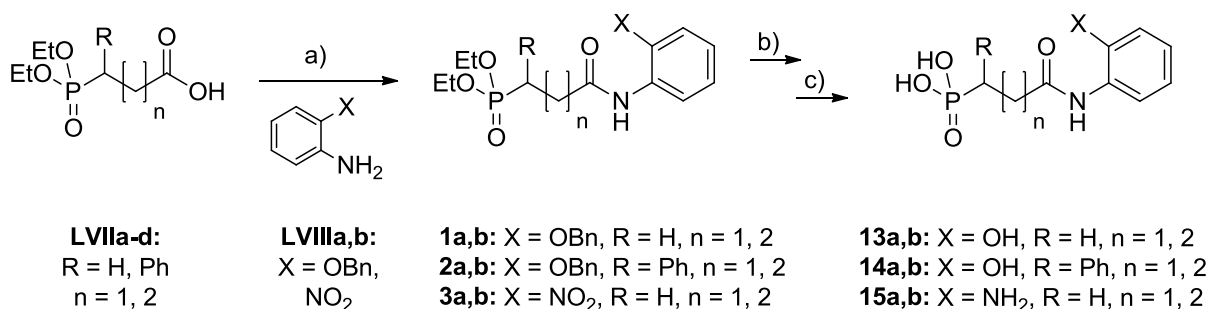
6 Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich mit Strukturmodifikationen des antiplasmodial und antibakteriell wirksamen Naturstoffs Fosmidomycin (**Schema 29**). Fosmidomycin zeichnet sich gegenüber etablierten Malariatherapeutika durch einen neuartigen Wirkmechanismus aus und wird derzeit in Kombination mit Clindamycin zur Behandlung unkomplizierter *Malaria tropica* in Klinischen Phase II-Studien evaluiert. Vor Beginn der eigenen Arbeiten wurden bereits zahlreiche Strukturvariationen zur Verbesserung der pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften Fosmidomycins unternommen. Im Rahmen dieser Dissertation sollten weiterführende Struktur-Wirkungs-Beziehungen aufgeklärt und Fosmidomycin-Analoga mit verbesserter antiplasmodialer Aktivität entwickelt werden.



Schema 29: Im Rahmen der Dissertation durchgeführte Strukturvariationen an Fosmidomycin.

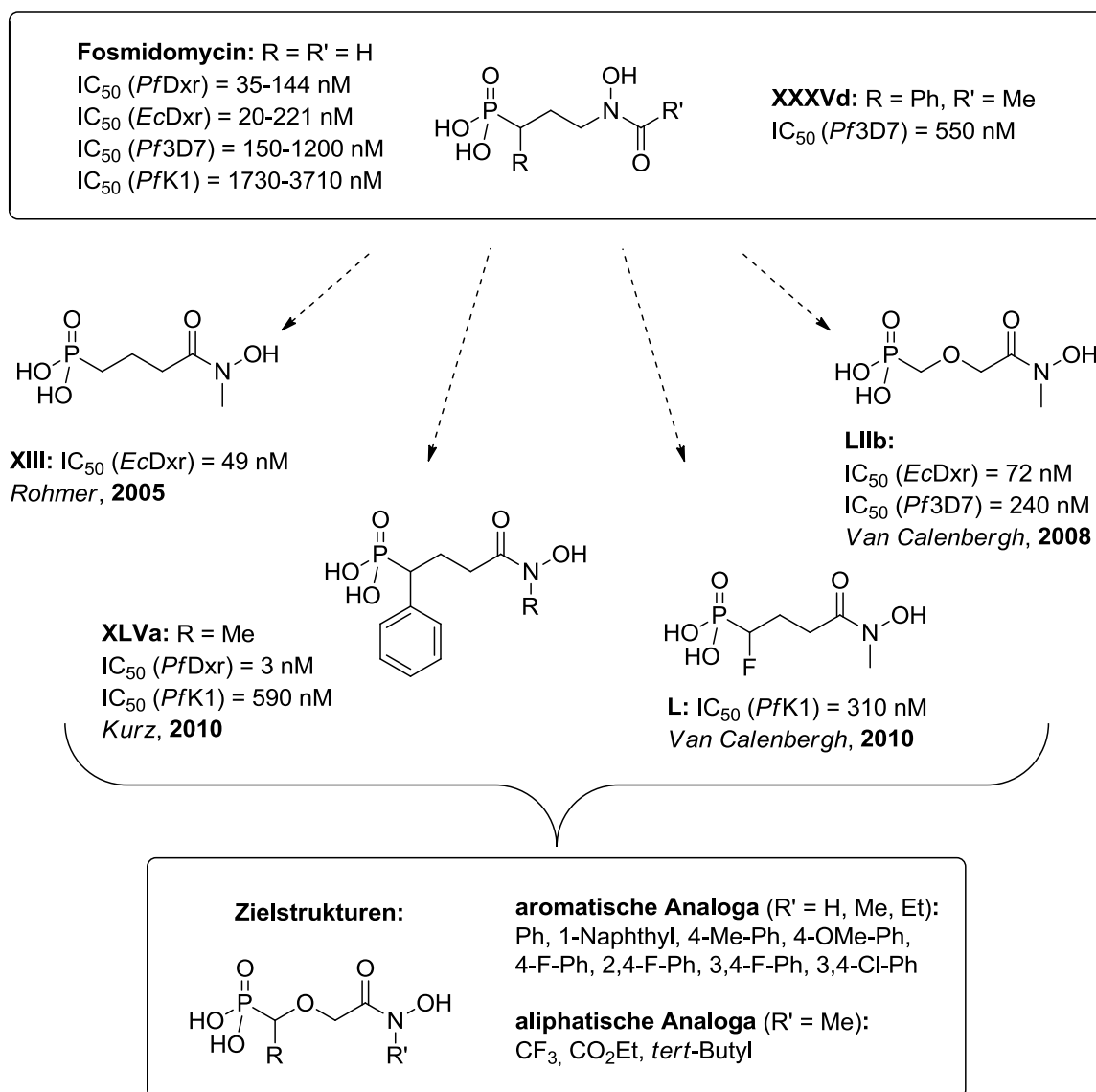
Im ersten Teil der Arbeit wurde die Hydroxamsäurefunktionalität Fosmidomycins gegen *ortho*-Hydroxy- und *ortho*-Aminobenzamid-Strukturen ausgetauscht, die bei HDAC-Inhibitoren bereits mit Erfolg eingeführt worden waren. Die Synthese der geschützten Vorstufen **1-4** gelang durch Aktivierung der Carbonsäuren **LVIIa-d** zu Säurechloriden und anschließende Umsetzung mit den *ortho*-funktionalisierten Anilinen **LVIIIa** und **b** (**Schema 30**). Die katalytische Hydrogenolyse bzw. Reduktion und anschließende TMSBr-vermittelte Desalkylierung der Diethylphosphonate führte zu den Zielverbindungen **13-15**. Die Fosmidomycin-Analoga **13-15** zeigen *in vitro* weder gegenüber den rekombinanten DOXP-Reduktoisomerasen von *P. falciparum* (PfDxr), *E. coli* (EcDxr) und *M. tuberculosis* (MtDxr) noch gegenüber dem *P. falciparum*-Laborstamm K1 inhibitorische Aktivität.



Schema 30: Synthese der Fosmidomycin-Analoga **13a,b-15a,b**.

Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) 1. CO₂Cl₂/DMF, Toluol, RT, 1 h; 2. Pyridin, CH₂Cl₂, **LXIX**, RT, 1 h; **13a,b, 14a**: b) H₂/Pd-C, 2 bar, MeOH, RT, 1-2 h; c) 1. TMSBr (5 eq.), CH₂Cl₂; 2. THF/H₂O; **14b, 15a,b**: 1.c), 2.b).

Im Hauptteil der Arbeit wurden mehrere Strukturvariationen Fosmidomycins, die sich im Vorfeld der Dissertation als aktivitätssteigernd erwiesen hatten, in einer Zielstruktur kombiniert (**Schema 31**).

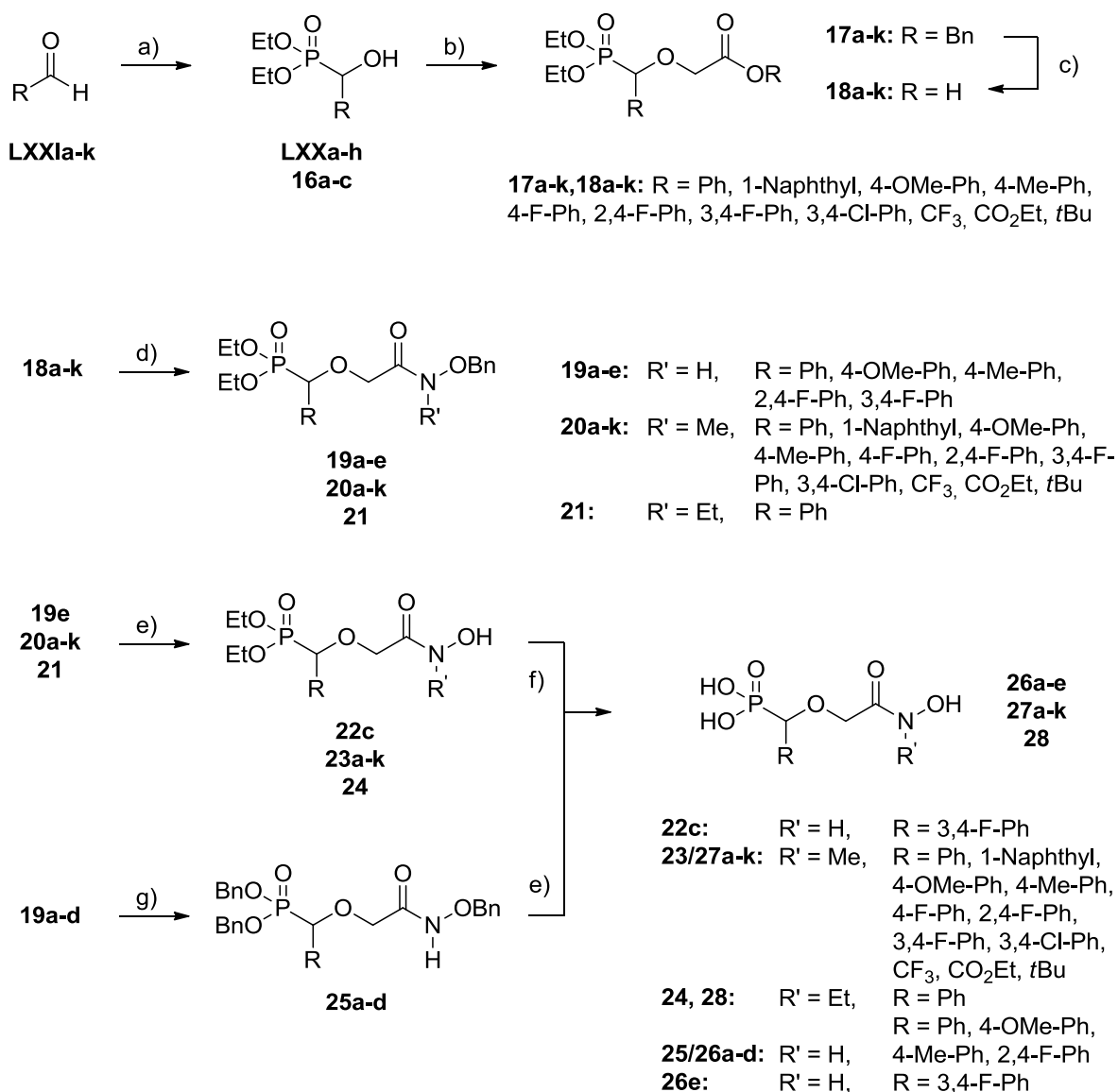


Schema 31: Entwicklung der Zielstruktur α -substituierter, β -oxa-isosterer Fosmidomycin-Analoga.

Die antiplasmodiale *in vitro*-Aktivität Fosmidomycins kann durch die Einführung eines Phenylsubstituenten in α -Position relativ zur Phosphonsäurefunktionalität deutlich gesteigert werden, wie *Kurz* und *Van Calenbergh* unabhängig voneinander gezeigt hatten (z. B. **XXXVd**).^{250,251} In einem unabhängigen Ansatz wurden durch die Arbeitsgruppe von *Rohmer* Fosmidomycin-Analoga mit inverser Hydroxamsäurefunktionalität entwickelt, die gegenüber der *EcDxr* äquipotent zu Fosmidomycin sind (**XIII**).²³¹ Durch die Arbeiten von *Behrendt* war mit der Kombination der beiden oben genannten Ansätze gezeigt worden, dass α -arylsubstituierte, inverse Fosmidomycin-Analoga die stärksten bisher bekannten *PfDxr*-Inhibitoren sind und Fosmidomycin in ihren antiplasmodialen Eigenschaften *in vitro*, nicht aber *in vivo*, übertreffen (**XLVa**).²¹⁷ Die Arbeitsgruppe von *Van Calenbergh* hatte durch den Austausch der zentralen β -Methylengruppe des Spacers gegen ein Sauerstoffatom ebenfalls Fosmidomycin-Analoga mit verbesserter antiplasmodialer Aktivität entwickelt (**LIIfb**) und in einer späteren Studie gezeigt, dass auch α -halogenierte Fosmidomycin-Analoga (**L**) antiplasmodial aktiver sind als die Leitstruktur.^{258,259} Daraus ergab sich die Zielstruktur β -oxasterer, inverser Fosmidomycin-Analoga mit aromatischen und aliphatischen Substituenten in α -Position relativ zur Phosphonsäurefunktionalität.

Die Synthese der oxasteren Fosmidomycin-Analoga **26-28** ist in **Schema 32** dargestellt. Ausgehend von den Aldehyden **LXXIa-k** wurden durch Umsetzung mit Diethylphosphit die α -Hydroxyphosphonate **LXXa-h** und **16a-c** erhalten, die mit Benzylbromoacetat zu den Benzylestern **17a-k** alkyliert wurden. Durch katalytische Hydrogenolyse konnten **17a-k** in die korrespondierenden Carbonsäuren **18a-k** überführt werden. Die 1,1'-Carbonyldiimidazol-vermittelte Kupplung von **18a-k** mit *O*-benzylgeschützten, unterschiedlich *N*-substituierten Hydroxylaminen führte zu den geschützten Phosphonohydroxamsäuren **19a-e**, **20a-k** und **21**. Aus den *N*-alkylierten Derivaten **20a-k** und **21** wurden mittels katalytischer Hydrogenolyse zunächst die Hydroxamsäuren **23a-k** und **24** freigesetzt, die durch anschließende TMSBr-vermittelte Desalkylierung in die Zielverbindungen **27a-k** und **28** überführt wurden. Die Synthese freier Hydroxamsäure-Derivate war auf diesem Weg nicht in zufriedenstellender Reinheit möglich. Ausgehend von **19a-d** wurde daher zunächst eine Umesterung der Phosphonsäurediethylester in die korrespondierenden Dibenzylester **25a-d** durchgeführt, aus denen die Zielverbindungen **26a-d** durch katalytische Hydrogenolyse in guter Reinheit erhalten wurden. Die Umesterung von **19e** gelang dagegen nicht.

26a-e, **27a-k** und **28** wurden auf ihre inhibierende Wirkung gegenüber *PfDxr*, *EcDxr* und *MtDxr* untersucht. Außerdem wurde die antiplasmodiale Aktivität der Verbindungen *in vitro* gegenüber den *P. falciparum*-Laborstämmen Dd2 und 3D7 evaluiert (**Tabelle 9**). Alle Fosmidomycin-Analoga inhibieren die *PfDxr* deutlich stärker als *EcDxr* und *MtDxr*. Die *PfDxr*-Inhibition korreliert gut mit der *P. falciparum*-Wachstumsinhibition *in vitro*.



Schema 32: Synthese der β -oxasteren, inversen Fosmidomycin-Analoga **26-28**.

Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) Diethylphosphit, Et₃N, RT, 1-2 h; b) Benzylbromoacetat, Ag₂O, DMF, RT, 12 h; c) H₂/Pd-C, MeOH (EtOAc), 1 bar, RT, 1-2 h; d) R'NHOBN (R' = H, Me, Et), 1,1'-Carbonyldiimidazol, CH₂Cl₂, RT, 12 h; e) H₂/Pd-C, 1 bar, MeOH, RT, 1-2 h; f) 1. TMSBr, CH₂Cl₂; 2. THF/H₂O; g) 1. TMSBr (5 eq.), CH₂Cl₂; 2. THF/H₂O; 3. *O*-Benzyl-*N,N'*-dicyclohexylisoharnstoff (2 eq.), C₆H₆, 80 °C, 4 h.

Zusammengefasst ergeben sich folgende Erkenntnisse über Struktur-Wirkungs-Beziehungen:

Die stärksten Dxr-Inhibitoren unter den synthetisierten Fosmidomycin-Analoga weisen als gemeinsames Strukturmerkmal eine *N*-methylsubstituierte Hydroxamsäurefunktionalität und einen aromatischen Substituenten in α -Position auf (**27a-h**). Die *N*-Ethylsubstitution der Hydroxamsäurefunktionalität in Verbindung **28** führt zur Aktivitätsminderung. Im Vergleich zu **27-28** sind die freien Hydroxamsäure-Derivate **26a-e** deutlich schwächere Dxr-Inhibitoren und vermögen das Wachstum von *P. falciparum* unterhalb Konzentrationen von 50 μ M nicht zu hemmen. Alle Fosmidomycin-Analoga inhibieren die plasmodiale Dxr stärker als die *Ec*Dxr- und *Mt*Dxr-Enzyme.

Mit IC₅₀-Werten im Konzentrationsbereich von 12–65 nM sind die aromatischen, *N*-methylierten Analoga **27a-h** bis zu zehnfach stärkere *Pf*Dxr-Inhibitoren als Fosmidomycin. Besonders eine 3,4-Dihalogenierung sowie eine *para*-Methylsubstitution des α -Phenylrestes von **27a** führen zu einer effizienteren *Pf*Dxr-Hemmung und einer deutlichen Verbesserung der *P. falciparum*-Wachstumsinhibition (**27d,g,h**). Die antiplasmodiale *in vitro*-Aktivität Fosmidomycins wird von den aromatischen, *N*-methylierten Analoga **27b-e,g** und **h** gegenüber beiden Laborstämmen übertroffen.

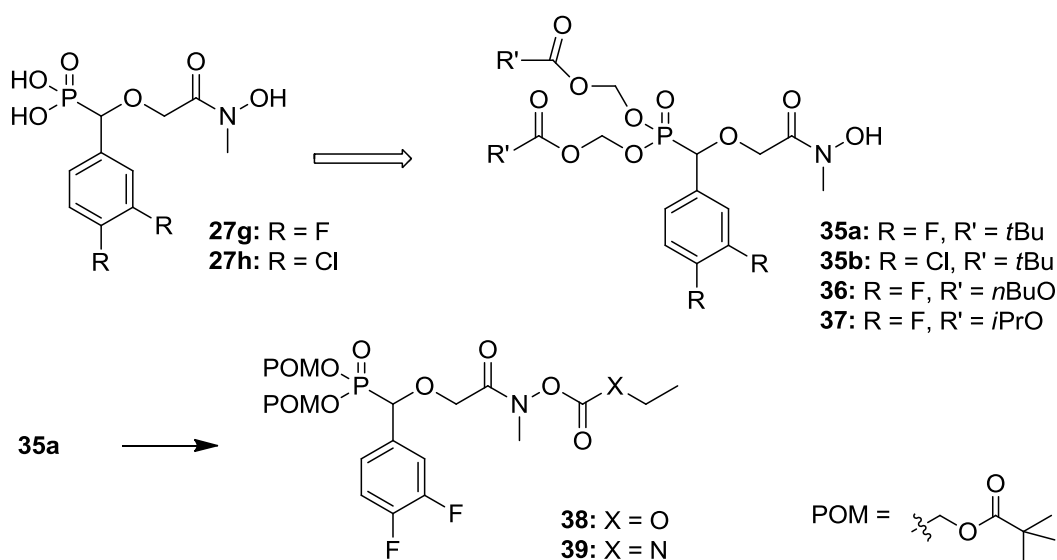
Die aliphatisch substituierten Analoga **27i-k** zeigen eine geringere enzym- und wachstumsinhibierende Wirkung als die aromatischen Derivate. Das α -trifluormethylierte Analogon **27i** besitzt allerdings gegenüber *Pf*Dxr, *Ec*Dxr und *Mt*Dxr ähnliche Aktivität wie Fosmidomycin und zeigt *in vitro* ähnlich gute antiplasmodiale Aktivität wie einige aromatische Analoga.

	Enzymassay			Zellkulturassay	
	<i>Pf</i> Dxr IC ₅₀ (μM)	<i>Ec</i> Dxr IC ₅₀ (μM)	<i>Mt</i> Dxr IC ₅₀ (μM)	<i>P.f.</i> Dd2 IC ₅₀ (μM)	<i>P.f.</i> 3D7 IC ₅₀ (μM)
26a	1.5 +/- 0.1	20 +/- 2	466 +/- 60	n. b.	> 50
26b	2.2 +/- 0.1	17 +/- 1	352 +/- 29	n. b.	> 50
26c	1.8 +/- 0.1	12 +/- 1	348 +/- 29	n. b.	> 50
26d	1.7 +/- 0.1	9.3 +/- 0.3	192 +/- 16	n. b.	> 50
26e	3.9 +/- 0.2	49 +/- 2	> 500	n. b.	> 50
27a	0.037 +/- 0.002	0.94 +/- 0.05	16 +/- 1	0.70	1.2
27b	0.039 +/- 0.004	4.6 +/- 0.3	15 +/- 1	0.35	0.52
27c	0.046 +/- 0.004	0.45 +/- 0.04	2.8 +/- 0.2	0.34	0.31
27d	0.025 +/- 0.003	0.32 +/- 0.02	4.0 +/- 0.2	0.19	0.18
27e	0.027 +/- 0.001	0.16 +/- 0.01	5.1 +/- 0.4	0.35	0.48
27f	0.065 +/- 0.005	0.73 +/- 0.07	12 +/- 1	1.2	1.3
27g	0.012 +/- 0.001	0.24 +/- 0.01	4.6 +/- 0.2	0.13	0.54
27h	0.014 +/- 0.001	0.20 +/- 0.02	1.6 +/- 0.1	0.14	0.24
27i	0.15 +/- 0.01	0.16 +/- 0.01	4.2 +/- 0.3	0.81	1.1
27j	1.9 +/- 0.2	5.7 +/- 0.2	178 +/- 15	9.2	14
27k	> 500	22 +/- 1	> 500	> 50	> 50
28	0.205 +/- 0.009	25 +/- 2	287 +/- 21	3.8	8.1
Fos-Na	0.16 +/- 0.02	0.12 +/- 0.01	0.23 +/- 0.01	0.81	0.88

Tabelle 9: Ergebnisse der biologischen Untersuchungen von **26-28**. Die Aktivitätsuntersuchungen gegenüber *Pf*Dxr, *Ec*Dxr und *Mt*Dxr erfolgte durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Markus Fischer am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hamburg. Die Zellkulturassays wurden durch die Arbeitsgruppe von Dr. Benjamin Mordmüller am Institut für Tropenmedizin der Universität Tübingen durchgeführt.

Die Stukturaufklärung des Bindungsmodus der aromatischen, *N*-methylierten Inhibitoren (**27a-h**) gelang nicht. Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Groll (Lehrstuhl für Biochemie, Technische Universität München) erhielt aus einem Kristallisationsansatz mit *PfDxr*, **27g**, Mg^{2+} und NADPH Kristalle, deren Röntgenstrukturanalyse nicht unterhalb einer Auflösung von 3 Å möglich war. Aus dem erhaltenen Datensatz konnte keine Aussage über die Lage des Inhibitors im katalytischen Zentrum des Enzyms getroffen werden.

Im dritten Teil der Dissertation wurden ausgehend von den stärksten *PfDxr*-Inhibitoren **27g** und **h** die Prodrugs **35-39** synthetisiert (**Schema 33**). Durch Derivatisierung eines oder beider Pharmakophore in lipophile Prodrug-Gruppen konnte die antiplasmodiale *in vitro*-Aktivität im Vergleich zu den freien Phosphonohydroxamsäuren beträchtlich gesteigert werden (vergleiche z. B. **36**: IC_{50} (*PfDd2*) = 9 nM) und **38**: IC_{50} (*PfDd2*) = 19 nM) mit **27g**: IC_{50} (*PfDd2*) = 130 nM).

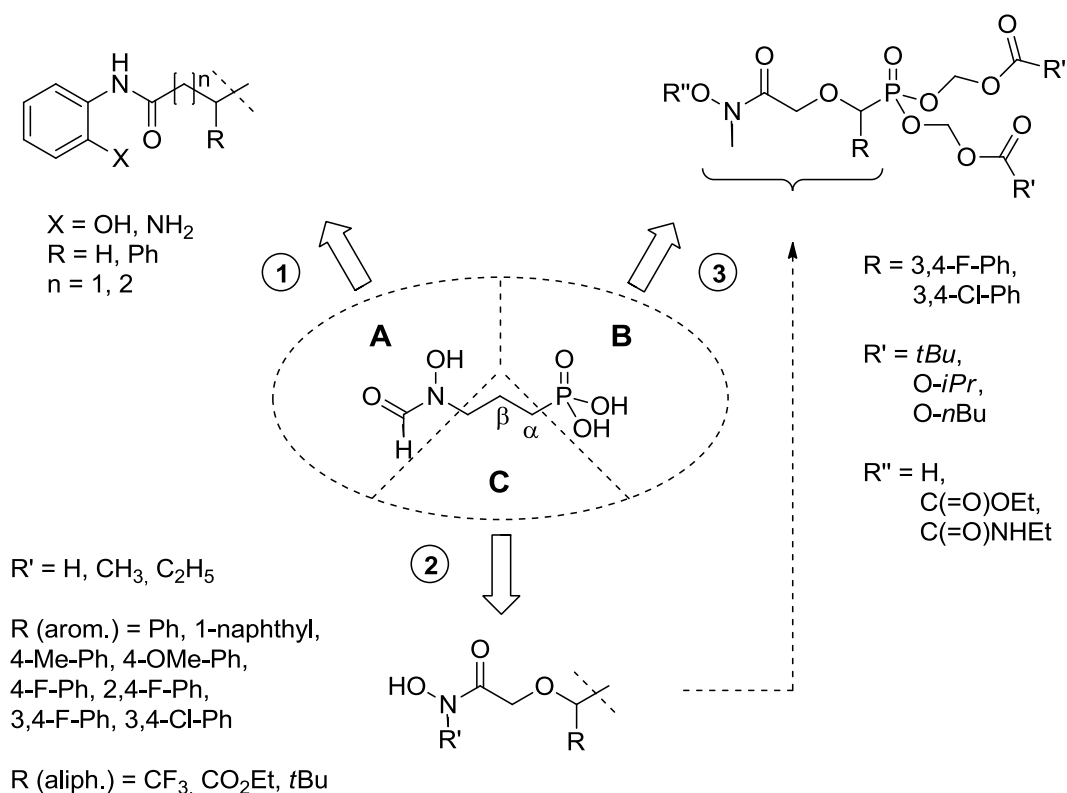


Schema 33: Übersicht der ausgehend von **27g** und **27h** synthetisierten Prodrugs.

Im Anschluss an derzeit laufende Untersuchungen gegenüber *P. falciparum*-Patientenisolaten soll die *in vivo*-Aktivität ausgewählter Fosmidomycin-Analoga und Prodrugs ermittelt werden. Für eine weitere, zielgerichtete Entwicklung von Fosmidomycin-Analoga als Antimalariamittel ist eine Strukturaufklärung des Bindungsmodus von Inhibitoren an die plasmodiale Dxr notwendig, auf deren Basis aktivitätssteigernde Strukturmodifikationen vorausgesagt werden könnten. Bei chiralen Dxr-Inhibitoren wie α -monosubstituierten Fosmidomycin-Analoga sollte durch stereoselektive Synthese des wirksameren Enantiomers oder dessen Isolation mittels Racemattrennung eine weitere Aktivitätssteigerung erreichbar sein, sofern auch der α -Substituent direkte Wechselwirkung zur *PfDxr* aufweist oder die Stereochemie Einfluss auf den Transport zur Zielstruktur nimmt.

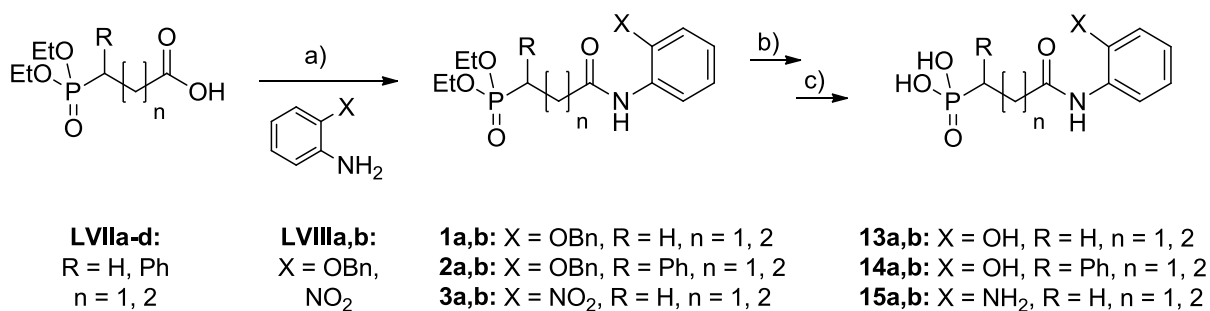
7 Summary

This dissertation focuses on structural modifications of the natural product fosmidomycin (**Scheme 1**), which shows strong antiplasmodial activity and a different mode of action compared to established antimalarials. In combination with clindamycin, fosmidomycin is currently evaluated in phase II clinical trials for the treatment of uncomplicated *Malaria tropica*. In order to improve fosmidomycin's pharmacokinetic and pharmacodynamic properties, various structural modifications have been accomplished prior to this work. The aims of this work were to elucidate advanced structure-activity relationships and to develop new fosmidomycin analogues with improved antiplasmodial activity.



Scheme 1: Structural variations of fosmidomycin described in this work.

In the first approach, fosmidomycin's hydroxamate moiety was replaced by an *ortho*-hydroxy- or *ortho*-aminobenzamide moiety. Previously, these structural motifs had been successfully applied in HDAC inhibitors. The protected precursors **1-4** were synthesized by conversion of the carboxylic acids **LVIIa-d** into acid chlorides and subsequent treatment with *ortho*-functionalized anilines **LVIIIa** and **b** (**Scheme 2**, p. 269). Palladium-catalyzed hydrogenolysis or reduction and TMSBr-mediated dealkylation of diethylphosphonates afforded target compounds **13-15**.



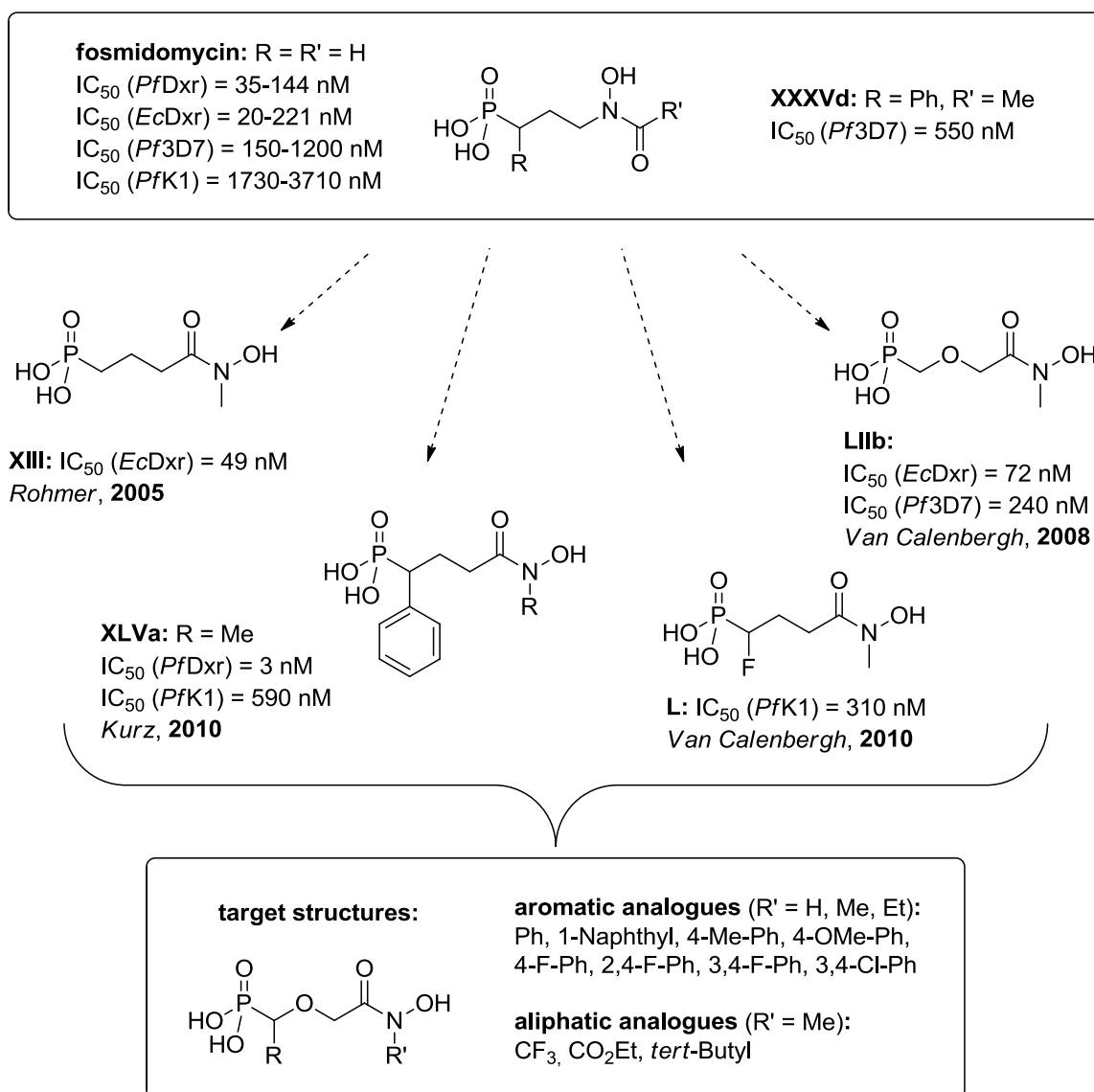
Scheme 2: Synthesis of fosmidomycin analogues **13a,b-15a,b**.

Reagents and conditions: a) 1. CO₂Cl₂/DMF, toluene, RT, 1 h; 2. pyridine, CH₂Cl₂, **LVIII**, RT, 1 h; **13a,b, 14a**: b) H₂/Pd-C, 2 bar, MeOH, RT, 1–2 h; c) 1. TMSBr (5 eq.), CH₂Cl₂; 2. THF/H₂O; **14b, 15a,b**: 1.c), 2.b).

In vitro, **13-15** showed neither inhibitory activity towards Dxr enzymes of *P. falciparum* (*PfDxr*), *E. coli* (*EcDxr*) and *M. tuberculosis* (*MtDxr*) nor growth inhibition of the *P. falciparum* K1 strain.

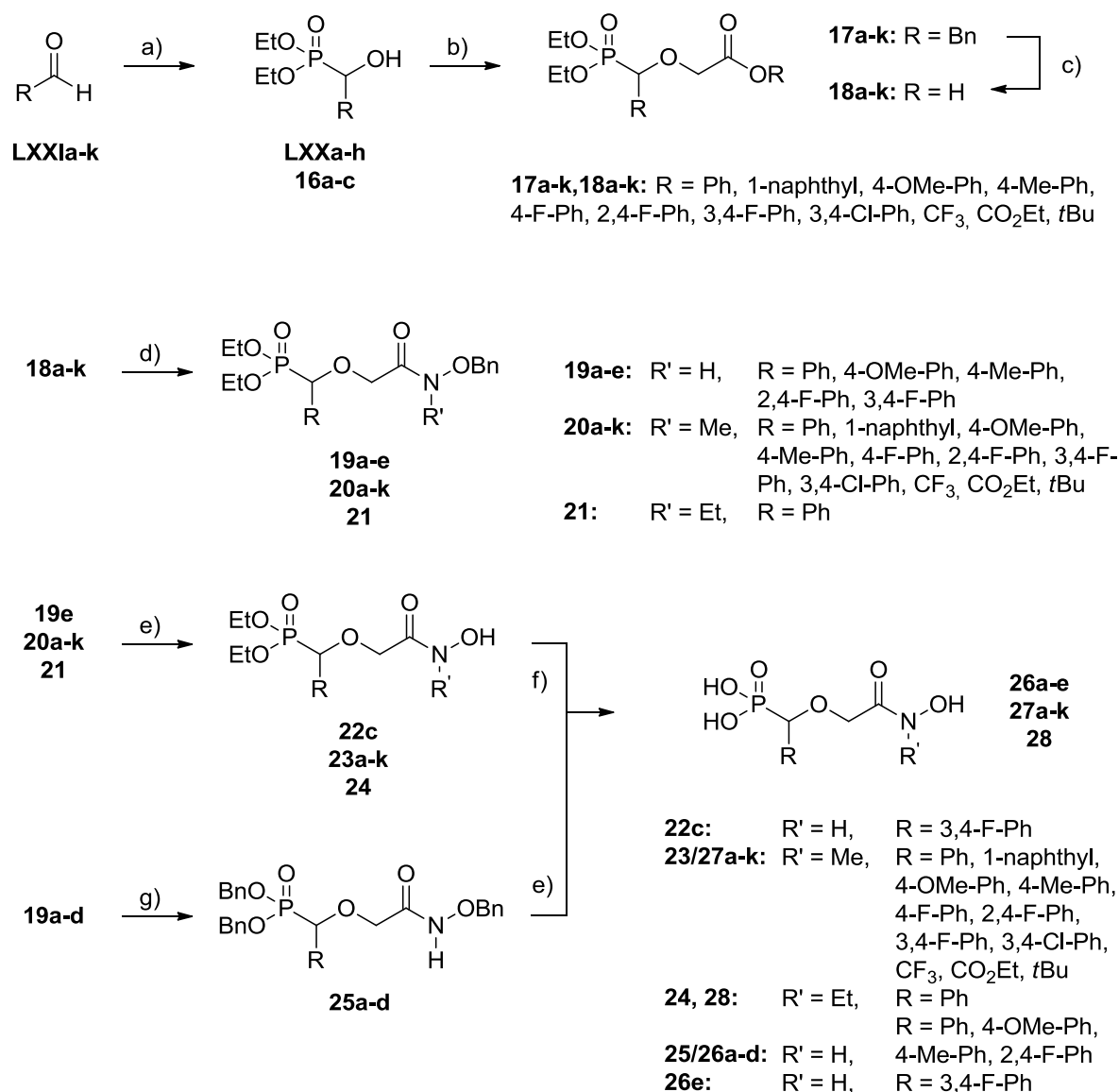
In the main part of this work, several structural modifications of fosmidomycin that were evaluated independently from each other previous to this work were combined into a new target structure (**Scheme 3**), p. 270). Kurz and Van Calenbergh developed independently α -phenyl substituted fosmidomycin analogues that exhibit considerably improved antiparasmodial activity (for example, **XXXVd**).^{250,251} In an independent approach, Rohmer's group demonstrated that inversion of the hydroxamate group leads to analogues with equal potency towards *EcDxr* with regard to fosmidomycin (**XIII**).²³¹ Later, Behrendt combined both approaches and showed α -aryl substituted reverse fosmidomycin analogues to be the strongest *PfDxr* inhibitors known so far (**XLVa**).²¹⁷ These analogues also exhibit stronger antiparasmodial potency than fosmidomycin *in vitro*, but not *in vivo*. Van Calenbergh's group developed spacer-modified fosmidomycin analogs with improved antiparasmodial activity by isosteric replacement of the β -methylene group by an oxygen atom (**LIIb**).²⁵⁹ In a more recent study this group presented α -halogenated analogues that exceed fosmidomycin's antiparasmodial activity (**L**).²⁵⁸

Based on these findings, in this work β -oxa-isostere, α -substituted reverse fosmidomycin analogues were developed as new target structures. **Scheme 4** (p. 271) shows the synthesis of fosmidomycin analogues **26-28**. Starting from aldehydes **LXXIa-k**, α -hydroxy phosphonates **LXXa-h** and **16a-c** were accessible by treatment with diethyl phosphite in the presence of triethylamine. Alkylation with benzyl bromoacetate afforded benzyl esters **17a-k**, and subsequent catalytic hydrogenolysis led to carboxylic acids **18a-k**.



Scheme 3: Structural modifications of fosmidomycin done prior to this work as starting points for the development of a new target structure.

The protected phosphonohydroxamic acids **19a-e**, **20a-k** and **21** were synthesized by 1,1'-carbonyldiimidazole-mediated coupling of **18a-k** with *O*-benzyl-protected hydroxylamines (R'NHOBn, R' = H, CH₃, C₂H₅). The benzyl protecting groups of *N*-alkylated intermediates **20a-k** and **21** were removed by catalytic hydrogenolysis to yield hydroxamic acids **23a-k** and **24**. TMSBr-mediated cleavage of ethyl phosphonates followed by hydrolysis finally led to target compounds **27a-k** and **28**. Because the synthesis of free hydroxamate derivatives was not successful following this protocol, intermediates **19a-d** were converted into benzyl phosphonates **25a-d** by a three step transesterification method. Finally, phosphonohydroxamic acids **26a-d** were obtained by catalytic hydrogenolysis. However, conversion of **19e** into the corresponding benzyl phosphonate failed.



Scheme 4: Synthesis of oxa-isostere fosmidomycin analogues **26-28**.

Reagents and conditions: a) diethyl phosphite, Et₃N, RT, 1–2 h; b) benzyl bromoacetate, Ag₂O, DMF, RT, 12 h; c) H₂/Pd-C, MeOH (EtOAc), 1 bar, RT, 1–2 h; d) R'NHOBn (R' = H, Me, Et), 1,1'-carbonyldiimidazole, CH₂Cl₂, RT, 12 h; e) H₂/Pd-C, 1 bar, MeOH, RT, 1–2 h; f) 1. TMSBr, CH₂Cl₂; 2. THF/H₂O; g) 1. TMSBr (5 eq.), CH₂Cl₂; 2. THF/H₂O; 3. *O*-benzyl-*N,N'*-dicyclohexylisourea (2 eq.), C₆H₆, 80 °C, 4 h.

The inhibitory activity of target compounds **26a-e**, **27a-k** and **28** was evaluated *in vitro* towards *Pf*Dxr, *Ec*Dxr and *Mt*Dxr. Furthermore, **26-28** were tested on growth inhibition of *P. falciparum* laboratory strains Dd2 and 3D7 (for results, see **Table 1**, p. 272). All screened fosmidomycin analogues inhibit *Pf*Dxr stronger than *Ec*Dxr or *Mt*Dxr. Notably, there is a good correlation between inhibition of isolated *Pf*Dxr enzyme and *P. falciparum* growth inhibition.

	enzyme assay			whole-cell assay	
	<i>Pf</i> Dxr IC ₅₀ (μM)	<i>Ec</i> Dxr IC ₅₀ (μM)	<i>Mt</i> Dxr IC ₅₀ (μM)	<i>P.f.</i> Dd2 IC ₅₀ (μM)	<i>P.f.</i> 3D7 IC ₅₀ (μM)
26a	1.5 +/- 0.1	20 +/- 2	466 +/- 60	n. b.	> 50
26b	2.2 +/- 0.1	17 +/- 1	352 +/- 29	n. b.	> 50
26c	1.8 +/- 0.1	12 +/- 1	348 +/- 29	n. b.	> 50
26d	1.7 +/- 0.1	9.3 +/- 0.3	192 +/- 16	n. b.	> 50
26e	3.9 +/- 0.2	49 +/- 2	> 500	n. b.	> 50
27a	0.037 +/- 0.002	0.94 +/- 0.05	16 +/- 1	0.70	1.2
27b	0.039 +/- 0.004	4.6 +/- 0.3	15 +/- 1	0.35	0.52
27c	0.046 +/- 0.004	0.45 +/- 0.04	2.8 +/- 0.2	0.34	0.31
27d	0.025 +/- 0.003	0.32 +/- 0.02	4.0 +/- 0.2	0.19	0.18
27e	0.027 +/- 0.001	0.16 +/- 0.01	5.1 +/- 0.4	0.35	0.48
27f	0.065 +/- 0.005	0.73 +/- 0.07	12 +/- 1	1.2	1.3
27g	0.012 +/- 0.001	0.24 +/- 0.01	4.6 +/- 0.2	0.13	0.54
27h	0.014 +/- 0.001	0.20 +/- 0.02	1.6 +/- 0.1	0.14	0.24
27i	0.15 +/- 0.01	0.16 +/- 0.01	4.2 +/- 0.3	0.81	1.1
27j	1.9 +/- 0.2	5.7 +/- 0.2	178 +/- 15	9.2	14
27k	> 500	22 +/- 1	> 500	> 50	> 50
28	0.205 +/- 0.009	25 +/- 2	287 +/- 21	3.8	8.1
Fos-Na	0.16 +/- 0.02	0.12 +/- 0.01	0.23 +/- 0.01	0.81	0.88

Table 1: Biological activity of fosmidomycin analogues **26-28**. Enzyme assays were performed by the group of *Prof. Dr. Markus Fischer* (Hamburg School of Food Science, Universität Hamburg). Growth inhibition of *P. falciparum* strains was determined by *Dr. Benjamin Mordmüller's* group (Institut für Tropenmedizin, Universität Tübingen).

In summary, the following structure activity relationships can be deduced from the biological data:

The strongest Dxr inhibitors evaluated in this study are the aromatic compounds with *N*-methylated hydroxamate moiety (**27a-h**). *N*-ethylated phosphonohydroxamic acid **28** shows lower inhibitory activity compared to **27a-h**. In contrast to *N*-alkylated derivatives **27-28**, free hydroxamic acids **26a-e** are weaker Dxr inhibitors and do not show any antiplasmodial effect below concentrations of 50 μM. All fosmidomycin analogues inhibit *Pf*Dxr stronger than *Ec*Dxr and *Mt*Dxr.

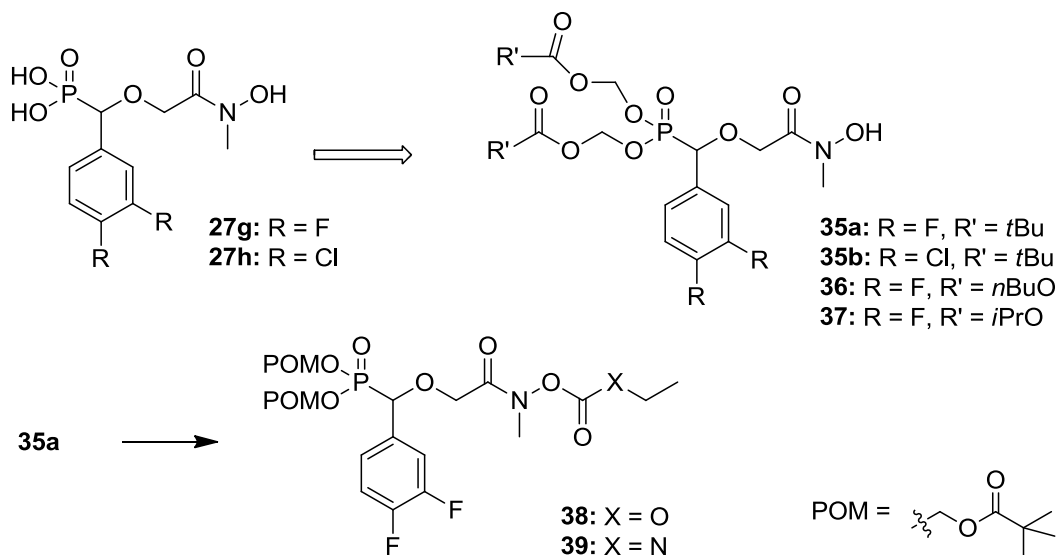
With IC₅₀ values in the low nanomolar concentration range, aromatic, *N*-methylated analogues **27a-h** show up to ten times stronger *Pf*Dxr inhibition than fosmidomycin. In particular, 3,4-dihalogenation and *para*-methylation of the α-phenyl residue of **27a** leads to a stronger *Pf*Dxr inhibition and a considerable improvement in *P. falciparum*. Most of the aromatic, *N*-methylated analogues (**27b-e,g,h**) outperform fosmidomycin regarding its *in vitro* activity towards both *P. falciparum* strains.

Aliphatic *N*-methyl derivatives **27i-k** are weaker inhibitors of Dxr and *P. falciparum* growth than α-aryl substituted compounds **27a-h**. Remarkably, the most potent member of this group, trifluoromethylated analogue **27i**, inhibits recombinant *Pf*Dxr, *Ec*Dxr and *Mt*Dxr still as effective as

fosmidomycin and shows *in vitro* antiplasmodial activity comparable to that of some aromatic analogues.

Cocrystallization attempts and X-ray analysis performed by *Prof. Dr. Michael Groll's* group (Lehrstuhl für Biochemie, Technische Universität München) did not lead to the elucidation of the binding mode of aromatic, *N*-methylated fosmidomycin analogues (**27a-h**). X-ray analysis of crystals obtained from a mixture of *PfDxr*, **27g**, Mn^{2+} and NADPH was possible only at 3 Å resolution, so inhibitor **27g** could not be located inside the catalytic center of *PfDxr*.

The last part of this work deals with the synthesis and biological evaluation of prodrugs derived from the strongest *PfDxr* inhibitors **27g** and **h** (Scheme 5). Conversion of one or both pharmacophors into a lipophilic prodrug moiety led to considerably improved *in vitro* antiplasmodial potency, as exemplified by comparison of prodrugs **36** (IC_{50} (*PfDd2*) = 9 nM) and **38** (IC_{50} (*PfDd2*) = 19 nM) to parent compound **27g** (IC_{50} (*PfDd2*) = 130 nM).



Scheme 5: Prodrugs of fosmidomycin analogues **27g** and **h**.

Selected fosmidomycin analogues and prodrugs are currently evaluated towards *P. falciparum* field isolates. In the next step, *in vivo* experiments should be conducted. In order to develop more efficient fosmidomycin analogues for the use as antimalarial drugs, structural information about the binding mode of inhibitors to plasmodial Dxr is desirable. This could serve as the basis for the prediction of structural modifications that increase antiplasmodial activity. In the case of chiral compounds like α -monosubstituted fosmidomycin analogues, activity towards Dxr enzyme should be improvable by stereoselective synthesis or racemic resolution to yield the more potent enantiomer. This will be the case if there is a direct interaction of the α -residue to *PfDxr* or if the stereochemical conformation of the inhibitor has an effect on its transport to its target.

8 Literaturverzeichnis

1. World Health Organization. World Malaria Report: **2010**. URL: http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2010/worldmalariareport2010.pdf (20.04.2012)
2. Tuteja, R. Malaria - an overview. *FEBS J.* **2007**, 274, 4670-4679.
3. Bell, D., Wongsrichanalai, C., Barnwell, J. W. Ensuring quality and access for malaria diagnosis: how can it be achieved? *Nat. Rev. Microbiol.* **2006**, 4, 682-695.
4. Wells, T. N., Alonso, P. L., Gutteridge, W. E. New medicines to improve control and contribute to the eradication of malaria. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2009**, 8, 879-891.
5. Trouiller, P., Olliaro, P., Torreele, E., Orbinski, J., Laing, R., Ford, N. Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. *Lancet* **2002**, 359, 2188-2194.
6. World Health Organization. *Global Health Observatory Map Gallery: Malaria risk areas, 2010*. URL: http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_Malaria_2010.png (20.04.2011).
7. Stich, A. Malaria. Die wichtigste tropische Infektionskrankheit. *Pharm. Unserer Zeit* **2009**, 38, 508-511.
8. Stock, I. Treatment for malaria. *Med. Monatsschr. Pharm.* **2001**, 27, 260.
9. 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.
10. Nair, S. C., Striepen, B. What Do Human Parasites Do with a Chloroplast Anyway? *PLoS Biol.* **2011**, 9, 1-4.
11. Stich, A., Schlitzer, M. Wirkstoffe zur Therapie und Prophylaxe der Malaria. *Chemother. J.* **2008**, 17, 37-56.
12. Galinski, M., Barnwell, J. Plasmodium vivax: who cares? *Malar. J.* **2008**, 7(Suppl.1), S9.
13. 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.
14. Cox-Singh, J., Singh, B. Knowlesi malaria: newly emergent and of public health importance? *Trends Parasitol.* **2008**, 24, 406-410.
15. Mota, M. M., Rodriguez, A. Migration through host cells: the first steps of Plasmodium sporozoites in the mammalian host. *Cell. Microbiol.* **2004**, 6, 1113-1118.
16. Warsame, M., Olumese, P., Mendis, K. Role of medicines in malaria control and elimination. *Drug Dev. Res.* **2010**, 71, 4-11.
17. Mayxay, M., Pukrittayakamee, S., Newton, P. N., White, N. J. Mixed-species malaria infections in humans. *Trends Parasitol.* **2004**, 20, 233-240.
18. Pasternak, N. D., Dzikowski, R. PfEMP1: An antigen that plays a key role in the pathogenicity and immune evasion of the malaria parasite Plasmodium falciparum. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2009**, 41, 1463-1466.
19. Miller, L. H., Baruch, D. I., Marsh, K., Doumbo, O. K. The pathogenic basis of malaria. *Nature* **2002**, 415, 673-679.

20. Newbold, C., Craig, A., Kyes, S., Rowe, A., Fernandez-Reyes, D., Fagan, T. Cytoadherence, pathogenesis and the infected red cell surface in *Plasmodium falciparum*. *Int. J. Parasitol.* **1999**, *29*, 927-937.
21. Stich, A., Fischer, K., Lanzer, M. Die Überlebensstrategie des Malariaerregers. *Biol. Unserer Zeit* **2000**, *30*, 194-201.
22. Wiesner, J., Ortmann, R., Jomaa, H., Schlitzer, M. New antimalarial drugs. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2003**, *42*, 5274-5293.
23. Schlitzer, M. Malaria chemotherapeutics part 1: History of antimalarial drug development, currently used therapeutics, and drugs in clinical development. *ChemMedChem* **2007**, *2*, 944-986.
24. Schlitzer, M. Antimalarial drugs - what is in use and what is in the pipeline. *Arch. Pharm.* **2008**, *341*, 149-163.
25. Wellems, T. E., Plowe, C. V. Chloroquine-Resistant Malaria. *J. Infect. Dis.* **2001**, *184*, 770-776.
26. Rosenthal, P. J., Meshnick, S. R. Hemoglobin catabolism and iron utilization by malaria parasites. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1996**, *83*, 131-139.
27. Ridley, R. G. Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. *Nature* **2002**, *415*, 686-693.
28. Famin, O., Krugliak, M., Ginsburg, H. Kinetics of inhibition of glutathione-mediated degradation of ferriprotoporphyrin IX by antimalarial drugs. *Biochem. Pharmacol.* **1999**, *58*, 59-68.
29. Bray, P. G., Martin, R. E., Tilley, L., Ward, S. A., Kirk, K., Fidock, D. A. Defining the role of PfCRT in *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance. *Mol. Microbiol.* **2005**, *56*, 323-333.
30. Olliaro, P., Nevill, C., LeBras, J., Ringwald, P., Mussano, P., Garner, P., Brasseur, P. Systematic review of amodiaquine treatment in uncomplicated malaria. *Lancet* **1996**, *348*, 1196-1201.
31. Naisbitt, D. J., Ruscoe, J. E., Williams, D., O'Neill, P. M., Pirmohamed, M., Park, B. K. Disposition of Amodiaquine and Related Antimalarial Agents in Human Neutrophils: Implications for Drug Design. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1997**, *280*, 884-893.
32. Naisbitt, D. J., Williams, D. P., O'Neill, P. M., Maggs, J. L., Willock, D. J., Pirmohamed, M., Park, B. K. Metabolism-Dependent Neutrophil Cytotoxicity of Amodiaquine: A Comparison with Pyronaridine and Related Antimalarial Drugs. *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, *11*, 1586-1595.
33. Kurth, F., B  lard, S., Basra, A., Ramharter, M. Pyronaridine-artesunate combination therapy for the treatment of malaria. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2011**, *24*, 564-569.
34. Olliaro, P., Wells, T. N. The global portfolio of new antimalarial medicines under development. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2009**, *85*, 584-595.
35. Schlitzer, M. Wirkstoffe gegen Malaria: Was ist in der Pipeline? *Pharm. Unserer Zeit* **2009**, *38*, 522-526.
36. Fitch, C. D. Ferriprotoporphyrin IX, phospholipids, and the antimalarial actions of quinoline drugs. *Life Sci.* **2004**, *74*, 1957-1972.
37. Berman, J. Toxicity of commonly-used antimalarial drugs. *Travel Med. Infect. Dis.* **2004**, *2*, 171-184.

38. Wesche, D. L., Schuster, B. G., Wang, W.-X., Woosley, R. L. Mechanism of cardiotoxicity of halofantrine. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2000**, *67*, 521-529.
39. Ezzet, F., van Vugt, M., Nosten, F., Looareesuwan, S., White, N. J. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Lumefantrine (Benflumetol) in Acute Falciparum Malaria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44*, 697-704.
40. Rohrbach, P., Sanchez, C. P., Hayton, K., Friedrich, O., Patel, J., Sidhu, A. B. S., Ferdig, M. T., Fidock, D. A., Lanzer, M. Genetic linkage of pfmdr1 with food vacuolar solute import in Plasmodium falciparum. *EMBO J.* **2006**, *25*, 3000-3011.
41. Price, R. N., Uhlemann, A.-C., Brockman, A., McGready, R., Ashley, E., Phaipun, L., Patel, R., Laing, K., Looareesuwan, S., White, N. J., Nosten, F., Krishna, S. Mefloquine resistance in Plasmodium falciparum and increased pfmdr1 gene copy number. *Lancet* **2004**, *364*, 438-447.
42. Schlitzer, M. Medizinische Chemie der Wirkstoffe gegen Malaria. Wirk- und Resistenzmechanismen. *Pharm. Unserer Zeit* **2009**, *38*, 512-520.
43. Taylor, W. R. J., White, N. J. Antimalarial Drug Toxicity: A Review. *Drug Saf.* **2004**, *24*, 25-61.
44. 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.
45. Lell, B., Faucher, J.-F., Missinou, M. A., Borrmann, S., Dangelmaier, O., Horton, J., Kremsner, P. G. Malaria chemoprophylaxis with tafenoquine: a randomised study. *Lancet* **2000**, *355*, 2041-2045.
46. Tekwani, B. L., Walker, L. A. 8-Aminoquinolines: future role as antiprotozoal drugs. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2006**, *19*, 623-631.
47. Woodrow, C. J., Haynes, R. K., Krishna, S. Artemisinins. *Postgrad. Med. J.* **2005**, *81*, 71-78.
48. Haynes, R. K., Vonwiller, S. C. From Qinghao, Marvelous Herb of Antiquity, to the Antimalarial Trioxane Qinghaosu – and Some Remarkable New Chemistry. *Acc. Chem. Res.* **1997**, *30*, 73-79.
49. Nzila, A., Chilengi, R. Modulators of the efficacy and toxicity of drugs in malaria treatment. *Trends Pharmacol. Sci.* **2010**, *31*, 277-283.
50. Eckstein-Ludwig, U., Webb, R. J., van Goethem, I. D. A., East, J. M., Lee, A. G., Kimura, M., O'Neill, P. M., Bray, P. G., Ward, S. A., Krishna, S. Artemisinins target the SERCA of Plasmodium falciparum. *Nature* **2003**, *424*, 957-961.
51. Dondorp, A. M., Nosten, F., Yi, P., Das, D., Phyto, A. P., Tarning, J., Lwin, K. M., Arie, 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. J., Lindegardh, N., Socheat, D., White, N. J. Artemisinin Resistance in Plasmodium falciparum Malaria. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *361*, 455-467.
52. O'Neill, P. M., Posner, G. H. A Medicinal Chemistry Perspective on Artemisinin and Related Endoperoxides. *J. Med. Chem.* **2004**, *74*, 2945-2964.
53. Charman, S. A., Arbe-Barnes, S., Bathurst, I. C., Brun, R., Campbell, M., Charman, W. N., Chiu, F. C. K., Chollet, J., Craft, J. C., Creek, D. J., Dong, Y., Matile, H., Maurer, M., Morizzi, J., Nguyen, T., Papastogiannidis, P., Scheurer, C., Shackleford, D. M., Sriraghavan,

- K., Stingelin, L., Tang, Y., Urwyler, H., Wang, X., White, K. L., Wittlin, S., Zhou, L., Vennerstrom, J. L. Synthetic ozonide drug candidate OZ439 offers new hope for a single-dose cure of uncomplicated malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 4400-4405.
54. Davis, T. M. E., Hung, T.-Y., Sim, I.-K., Karunajeewa, H. A., Ilett, K. F. Piperaquine: A Resurgent Antimalarial Drug. *Drugs* **2005**, *65*, 75-87.
 55. Hartwig, C. L., Lauterwasser, E. M. W., Mahajan, S. S., Hoke, J. M., Cooper, R. A., Renslo, A. R. Investigating the Antimalarial Action of 1,2,4-Trioxolanes with Fluorescent Chemical Probes. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 8207-8213.
 56. Nzila, A. The past, present and future of antifolates in the treatment of Plasmodium falciparum infection. *J. Antimicrob. Chemother.* **2006**, *57*, 1043-1054.
 57. Parenti, M. D., Pacchioni, S., Ferrari, A. M., Rastelli, G. Three-Dimensional Quantitative Structure–Activity Relationship Analysis of a Set of Plasmodium falciparum Dihydrofolate Reductase Inhibitors Using a Pharmacophore Generation Approach. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 4258-4267.
 58. de Beer, T. A. P., Louw, A. I., Joubert, F. Elucidation of sulfadoxine resistance with structural models of the bifunctional Plasmodium falciparum dihydropterin pyrophosphokinase-dihydropteroate synthase. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 4433-4443.
 59. Baird, J. K. Effectiveness of Antimalarial Drugs. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 1565-1577.
 60. Lucio, L. The rise and fall of the antimalarial Lapdap: a lesson in pharmacogenetics. *Lancet* **2010**, *376*, 739-741.
 61. Kessl, J. J., Lange, B. B., Merbitz-Zahradnik, T., Zwicker, K., Hill, P., Meunier, B., Pálsdóttir, H., Hunte, C., Meshnick, S., Trumpower, B. L. Molecular Basis for Atovaquone Binding to the Cytochrome bc1 Complex. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 31312-31318.
 62. Looareesuwan, S., Chulay, J. D., Canfield, C. J., Hutchinson, D. B. Malarone (atovaquone and proguanil hydrochloride): a review of its clinical development for treatment of malaria. Malarone Clinical Trials Study Group. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1999**, *60*, 533-541.
 63. Delves, M., Plouffe, D., Scheurer, C., Meister, S., Wittlin, S., Winzeler, E. A., Sinden, R. E., Leroy, D. The Activities of Current Antimalarial Drugs on the Life Cycle Stages of Plasmodium: A Comparative Study with Human and Rodent Parasites. *PLoS Med* **2012**, *9*, e1001169.
 64. Mazier, D., Renia, L., Snounou, G. A pre-emptive strike against malaria's stealthy hepatic forms. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2009**, *8*, 854-864.
 65. Schlitzer, M. Wirkstoffe gegen Malaria: Was ist in der Pipeline? Wenig Neues im Kampf gegen die Malaria. *Pharm. Unserer Zeit* **2009**, *38*, 522-526.
 66. Alberge, B., Gannoun-Zaki, L., Bascunana, C., Tran van Ba, C., Vial, H., Cerdan, R. Comparison of the cellular and biochemical properties of Plasmodium falciparum choline and ethanolamine kinases. *Biochem. J.* **2009**, *425*, 149-158.
 67. Roggero, R., Zufferey, R., Minca, M., Richier, E., Calas, M., Vial, H., Ben Mamoun, C. Unraveling the Mode of Action of the Antimalarial Choline Analog G25 in Plasmodium falciparum and Saccharomyces cerevisiae. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 2816-2824.

68. 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.
69. Nair, S. C., Brooks, C. F., Goodman, C. D., Strum, A., McFadden, G. I., Sundriyal, S., Anglin, J. L., Song, Y., Moreno, S. N. J., Striepen, B. Apicoplast isoprenoid precursor synthesis and the molecular basis of fosmidomycin resistance in *Toxoplasma gondii*. *J. Exp. Med.* **2011**, *208*, 1547-1559.
70. Pradel, G., Schlitzer, M. Antibiotics in malaria therapy and their effect on the parasite apicoplast. *Curr. Mol. Med.* **2010**, *10*, 335-349.
71. MMV. *Global malaria portfolio, classified by therapeutic type at end of 1st quarter, 2012*. URL: <http://www.mmv.org/research-development/science-portfolio> (21.04.2012).
72. 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.
73. D'Alessandro, U. Existing antimalarial agents and malaria-treatment strategies. *Expert Opin. Pharmacother.* **2009**, *10*, 1291-1306.
74. Hatz, C. F. R. Prophylaxis and therapy of malaria. *Internist* **2004**, *45*, 677-683.
75. Greenwood, B. M., Fidock, D. A., Kyle, D. E., Kappe, S. H., Alonso, P. L., Collins, F. H., Duffy, P. E. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *J. Clin. Invest.* **2008**, *118*, 1266-1276.
76. Ballou, W. R. The development of the RTS,S malaria vaccine candidate: challenges and lessons. *Parasite Immunol.* **2009**, *31*, 492-500.
77. 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**, *365*, 1863-1875.
78. Kar, S., Kar, S. Control of malaria. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2010**, *9*, 511-512.
79. 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.
80. Sutherland, C. J. Surface antigens of *Plasmodium falciparum* gametocytes—A new class of transmission-blocking vaccine targets? *Mol. Biochem. Parasitol.* **2009**, *166*, 93-98.
81. Castelli, F., Odolini, S., Autino, B., Foca, E., Russo, R. Malaria Prophylaxis: A Comprehensive Review. *Pharmaceuticals* **2010**, *3*, 3212-3239.
82. Radek, R. Acidocalcisomen, Mitosomen und Apicoplasten. Neu entdeckte Zellorganellen. *Biol. Unserer Zeit* **2009**, *39*, 242-248.
83. Ralph, S. A., D'Ombrain, M. C., McFadden, G. I. The apicoplast as an antimalarial drug target. *Drug Resist. Updates* **2001**, *4*, 145-151.
84. McFadden, G. The apicoplast. *Protoplasma* **2011**, *248*, 641-650.
85. Sato, S. The apicomplexan plastid and its evolution. *Cell. Mol. Life Sci.* **2011**, *68*, 1285-1296.
86. Waller, R. F., McFadden, G. I. The apicoplast: A review of the derived plastid of apicomplexan parasites. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2005**, *7*, 57-79.

87. Parsons, M., Karnataki, A., Feagin, J. E., DeRocher, A. Protein Trafficking to the Apicoplast: Deciphering the Apicomplexan Solution to Secondary Endosymbiosis. *Eukaryotic Cell* **2007**, *6*, 1081-1088.
88. Yeh, E., DeRisi, J. L. Chemical Rescue of Malaria Parasites Lacking an Apicoplast Defines Organelle Function in Blood-Stage Plasmodium falciparum. *PLoS Biol.* **2011**, *9*, e1001138.
89. Lim, L., McFadden, G. I. The evolution, metabolism and functions of the apicoplast. *Philos. Trans. R. Soc., B* **2010**, *365*, 749-763.
90. 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.
91. 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.
92. Haussig, J. M., Matuschewski, K., Kooij, T. W. A. Inactivation of a Plasmodium apicoplast protein attenuates formation of liver merozoites. *Mol. Microbiol.* **2011**, *81*, 1511-1525.
93. Botté, C. Y., Dubar, F., McFadden, G. I., Maréchal, E., Biot, C. Plasmodium falciparum Apicoplast Drugs: Targets or Off-Targets? *Chem. Rev.* **2011**, *112*, 1269-1283.
94. Foth, B. J., McFadden, G. I. The apicoplast: A plastid in Plasmodium falciparum and other apicomplexan parasites. *Int. Rev. Cytol.* **2003**, *224*, 57-110.
95. Wiesner, J., Seeber, F. The plastid-derived organelle of protozoan human parasites as a target of established and emerging drugs. *Expert Opin. Ther. Targets* **2005**, *9*, 23-44.
96. 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.
97. Dahl, E. L., Rosenthal, P. J. Apicoplast translation, transcription and genome replication: targets for antimalarial antibiotics. *Trends Parasitol.* **2008**, *24*, 279-284.
98. Noedl, H. ABC - antibiotics-based combinations for the treatment of severe malaria? *Trends Parasitol.* **2009**, *25*, 540-544.
99. 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.
100. 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.
101. 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* **13**, 1161-1177 (2007).
102. 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.
103. McGarvey, D. J., Croteau, R. Terpenoid Metabolism. *Plant Cell* **1995**, *7*, 1015-1026.
104. Bloch, K. Sterol molecule: structure, biosynthesis, and function. *Steroids* **1992**, *57*, 378-383.

105. Banthorpe, D. V., Charlwood, B. V., Francis, M. J. O. Biosynthesis of monoterpenes. *Chem. Rev.* **1972**, 72, 115-155.
106. Zhou, D., White, R. H. Early steps of isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **1991**, 273, 627-634.
107. Bach, T. J. Some new aspects of isoprenoid biosynthesis in plants—a review. *Lipids* **1995**, 30, 191-202.
108. 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, 517-524.
109. Rohmer, M., Seemann, M., Horbach, S., Bringer-Meyer, S., Sahm, H. Glyceraldehyde 3-Phosphate and Pyruvate as Precursors of Isoprenic Units in an Alternative Non-mevalonate Pathway for Terpenoid Biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 2564-2566.
110. Rohmer, M., Bouvier-Nave, P., Ourisson, G. Distribution of Hopanoid Triterpenes in Prokaryotes. *J. Gen. Microbiol.* **1984**, 130, 1137-1150.
111. Koppisch, A. T., Fox, D. T., Blagg, B. S. J., Poulter, C. D. E-coli MEP synthase: Steady-state kinetic analysis and substrate binding. *Biochemistry* **2002**, 41, 236-243.
112. Wiesner, J., Jomaa, H. Isoprenoid biosynthesis of the apicoplast as drug target. *Curr. Drug Targets* **2007**, 8, 3-13.
113. Hirsch, A. K. H., Diederich, F. The non-mevalonate pathway to isoprenoid biosynthesis: A potential source of new drug targets. *Chimia* **2008**, 62, 226-230.
114. 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.
115. Sprenger, G. A., Schörken, U., Wiegert, T., Grolle, S., de Graaf, A. A., Taylor, S. V., Begley, T. P., Bringer-Meyer, S., Sahm, H. Identification of a thiamin-dependent synthase in *Escherichia coli* required for the formation of the 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin, and pyridoxol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, 94, 12857-12862.
116. Hunter, W. N. The non-mevalonate pathway of isoprenoid precursor biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 21573-21577.
117. Ershov, Y. 2-C-methylerythritol phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis as a target in identifying new antibiotics, herbicides, and immunomodulators: A review. *Appl. Biochem. Microbiol.* **2007**, 43, 115-138.
118. Matsue, Y., Mizuno, H., Tomita, T., Asami, T., Nishiyama, M., Kuzuyama, T. The herbicide ketoclozazole 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.* **2010**, 63, 583-588.
119. Eubanks, L. M., Poulter, C. D. *Rhodobacter capsulatus* 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase: Steady-state kinetics and substrate binding. *Biochemistry* **2003**, 42, 1140-1149.
120. Smith, J. M., Vierling, R. J., Meyers, C. F. Selective inhibition of *E. coli* 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate synthase by acetylphosphonates. *MedChemComm* **2012**, 3, 65-67.
121. Proteau, P. J. 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase: an overview. *Bioorg. Chem.* **2004**, 32, 483-493.

122. Kuzuyama, T., Takahashi, S., Watanabe, H., Seto, H. Direct formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate from 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate by 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, a new enzyme in the non-mevalonate pathway to isopentenyl diphosphate. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 4509-4512.
123. 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.
124. 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, 95, 9879-9884.
125. 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.
126. 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.
127. 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.
128. 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.
129. Witschel, M. C., Höffken, H. W., Seet, M., Parra, L., Mietzner, T., Thater, F., Niggeweg, R., Röhl, F., Illarionov, B., Rohdich, F., Kaiser, J., Fischer, M., Bacher, A., Diederich, F. Inhibitors of the Herbicidal Target IspD: Allosteric Site Binding. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 7931-7935.
130. 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 antimalarial therapy. *ChemMedChem* **2007**, 2, 806-810.
131. Hirsch, A. K., Alphey, M. S., Lauw, S., Seet, M., Barandun, L., Eisenreich, W., Rohdich, F., Hunter, W. N., Bacher, A., Diederich, F. Inhibitors of the kinase IspE: structure-activity relationships and co-crystal structure analysis. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, 6, 2719-2730.
132. Crane, C. M., Hirsch, A. K., Alphey, M. S., Sgraja, T., Lauw, S., Illarionova, V., Rohdich, F., Eisenreich, W., Hunter, W. N., Bacher, A., Diederich, F. Synthesis and characterization of cytidine derivatives that inhibit the kinase IspE of the non-mevalonate pathway for isoprenoid biosynthesis. *ChemMedChem* **2008**, 3, 91-101.
133. 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. *Helv. Chim. Acta* **2007**, 90, 1043-1068.

134. 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.* **2006**, *45*, 1069-1074.
135. Geist, J. G., Lauw, S., Illarionova, V., Illarionov, B., Fischer, M., Gräwert, T., Rohdich, F., Eisenreich, W., Kaiser, J., Groll, M., Scheurer, C., Wittlin, S., Alonso-Gómez, 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.
136. Wang, W., Wang, K., Liu, Y.-L., No, J.-H., Li, J., Nilges, M. J., Oldfield, E. Bioorganometallic mechanism of action, and inhibition, of IspH. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 4522-4527.
137. Wang, W., Li, J., Wang, K., Huang, C., Zhang, Y., Oldfield, E. Organometallic mechanism of action and inhibition of the 4Fe-4S isoprenoid biosynthesis protein GcpE (IspG). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 11189-11193.
138. Rohdich, F., Hecht, S., Bacher, A., Eisenreich, W. The deoxyxylulose phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. Discovery and function of the *ispDEFGH* genes and their cognate enzymes. *Pure Appl. Chem.* **2003**, *75*, 393-405.
139. Lichtenthaler, H. K., Schwender, J., Disch, A., Rohmer, M. Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Lett.* **1997**, *400*, 271-274.
140. 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.
141. Odom, A. R., Van Voorhis, W. C. Functional genetic analysis of the *Plasmodium falciparum* deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase gene. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2010**, *170*, 108-111.
142. Grellier, P., Valentin, A., Millerioux, V., Schrevel, J., Rigomier, D. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors lovastatin and simvastatin inhibit in vitro development of *Plasmodium falciparum* and *Babesia divergens* in human erythrocytes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **994**, *381*, 1144-1148.
143. 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.
144. 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.
145. Kuzuyama, T., Takahashi, S., Seto, H. Construction and Characterization of *Escherichia coli* Disruptants Defective in the *yaeM* Gene. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **1999**, *63*, 776-778.
146. 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.

147. 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.
148. Obiol Pardo, C. The methylerythritol phosphate (MEP) pathway for isoprenoid biosynthesis as a target for the development of new drugs against tuberculosis. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 1325-1338.
149. 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.
150. Nordqvist, A., Björkelid, C., Andaloussi, M., Jansson, A. M., Mowbray, S. L., Karlén, A., Larhed, M. Synthesis of Functionalized Cinnamaldehyde Derivatives by an Oxidative Heck Reaction and Their Use as Starting Materials for Preparation of Mycobacterium tuberculosis 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate Reductoisomerase Inhibitors. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 8986-8998.
151. Dover, L. G., Coxon, G. D. Current Status and Research Strategies in Tuberculosis Drug Development. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 6157-6165.
152. Eoh, H., Brennan, P. J., Crick, D. C. The Mycobacterium tuberculosis MEP (2C-methyl-D-erythritol 4-phosphate) pathway as a new drug target. *Tuberculosis* **2009**, *89*, 1-11.
153. Ma, Z., Lienhardt, C., McIlleron, H., Nunn, A. J., Wang, X. Global tuberculosis drug development pipeline: the need and the reality. *Lancet* **2010**, *375*, 2100-2109.
154. 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.
155. Nguyen, L., Thompson, C. J. Foundations of antibiotic resistance in bacterial physiology: the mycobacterial paradigm. *Trends Microbiol.* **2006**, *14*, 304-312.
156. Sakamoto, Y., Furukawa, S., Ogihara, H., Yamasaki, M. Fosmidomycin resistance in adenylate cyclase deficient (cya) mutants of Escherichia coli. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **2003**, *67*, 2030-2033.
157. 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.
158. 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*, e19334.
159. Kirk, K. Membrane Transport in the Malaria-Infected Erythrocyte. *Physiol. Rev.* **2001**, *81*, 495-537.
160. Messiaen, A. S., Verbruggen, T., Declerck, C., Ortmann, R., Schlitzer, M., Nelis, H., Van Calenbergh, S., Coenye, T. Resistance of the Burkholderia cepacia complex to fosmidomycin and fosmidomycin derivatives. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2011**, *38*, 261-264.

161. 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.
162. 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.
163. 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.
164. Yin, X. H., Proteau, P. J. Characterization of native and histidine-tagged deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase from the cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC6803. *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics* **2003**, *1652*, 75-81.
165. 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.
166. Schwender, J., Muller, 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.
167. 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.
168. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **1990**, *215*, 403-410.
169. Papadopoulos, J. S., Agarwala, R. COBALT: constraint-based alignment tool for multiple protein sequences. *Bioinformatics* **2007**, *23*, 1073-1079.
170. Benson, D. A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., Sayers, E. W. GenBank. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, D32-D37 (2011).
171. 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 14081-14086.
172. Perez-Gil, J., Calisto, B. M., Behrendt, C., Kurz, T., Fita, I., Rodriguez-Concepcion, M. Crystal structure of the *Brucella abortus* deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase-like (DRL) enzyme involved in isoprenoid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **2012**, DOI: 10.1074/jbc.M112.354811.
173. 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.
174. 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.
175. 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.
 176. 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.
 177. 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.
 178. 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. Crystallogr.* **2006**, 62, 807-813.
 179. 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.
 180. 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-A resolution. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, 1698, 37-44.
 181. 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.
 182. 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.
 183. 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. Commun.* **2010**, 66, 330-332.
 184. Umeda, T., Tanaka, N., Kusakabe, Y., Nakanishi, M., Kitade, Y., Nakamura, K. T. Molecular basis of fosmidomycin's action on the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Sci. Rep.* **2011**, 1, 9.
 185. Kuzuyama, T., Takahashi, S., Takagi, M., Seto, H. Characterization of 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, an enzyme involved in isopentenyl diphosphate biosynthesis, and identification of its catalytic amino acid residues. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 19928-19932.

186. Duvold, T., Bravo, J.-M., Pale-Grosdemange, C., Rohmer, M. Biosynthesis of 2-C-methyl-D-erythritol, a putative C5 intermediate in the mevalonate independent pathway for isoprenoid biosynthesis. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 4769-4772.
187. Dumas, R., Biou, V., Halgand, F., Douce, R., Duggleby, R. G. Enzymology, Structure, and Dynamics of Acetohydroxy Acid Isomeroreductase. *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 399-408.
188. 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.
189. Munos, J. W., Pu, X., Liu, H. W. Synthesis and analysis of a fluorinated product analogue as an inhibitor for 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 3090-3094.
190. Argyrou, A., Blanchard, J. S. Kinetic and chemical mechanism of Mycobacterium tuberculosis 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate isomeroreductase. *Biochemistry* **2004**, *43*, 4375-4384.
191. 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.
192. 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.
193. 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.
194. 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.
195. Kamiya, T., Hemmi, K., Takeno, H., Hashimoto, M. Studies on Phosphonic Acid Antibiotics. I. 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.
196. 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.* **1980**, *33*, 36-43.
197. 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.* **1980**, *33*, 24-28.
198. Kuroda, Y., Okuhara, M., Goto, T., Okamoto, M., Terano, H., Kohsaka, M., Aoki, H., Imanaka, H. Studies on new phosphonic acid antibiotics. IV. Structure determination of FR-33289, FR-31564 and FR-32863. *J. Antibiot.* **1980**, *33*, 29-35.
199. Davey, M. S., Tyrrell, J. M., Howe, R. A., Walsh, T. R., Moser, B., Toleman, M. A., Eberl, M. A. A Promising Target for Treatment of Multidrug-Resistant Bacterial Infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 3635-3636.
200. 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.

201. 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.
202. Kuemmerle, H. P., Murakawa, T., De Santis, F. Pharmacokinetic evaluation of fosmidomycin, a new phosphonic acid antibiotic. *Chemioterapia* **1987**, *6*, 113-119.
203. 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.
204. Kuemmerle, H. P., Murakawa, T., Soneoka, K., Konishi, T. Fosmidomycin - a New Phosphonic Acid Antibiotic. I. Phase-I Tolerance Studies. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **1985**, *23*, 515-520.
205. Kuemmerle, H. P., Murakawa, T., Sakamoto, H., Sato, N., Konishi, T., Desantis, F. Fosmidomycin, a New Phosphonic Acid Antibiotic. Part II: 1. Human Pharmacokinetics. 2. Preliminary Early Phase-IIa Clinical-Studies. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **1985**, *23*, 521-528.
206. Shigi, Y. Inhibition of bacterial isoprenoid synthesis by fosmidomycin, a phosphonic acid-containing antibiotic. *J. Antimicrob. Chemother.* **1989**, *24*, 131-145.
207. Wiesner, J., Borrmann, S., Jomaa, H. Fosmidomycin for the treatment of malaria. *Parasitol. Res.* **2003**, *90*, S71-76.
208. Lell, B., Ruangwearayut, 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.
209. Missinou, M. A., Borrmann, S., Schindler, A., Issifou, S., Adegnika, A. A., Matsiegui, P. B., Binder, R., Lell, B., Wiesner, J., Baranek, T., Jomaa, H., Kremsner, P. G. Fosmidomycin for malaria. *Lancet* **2002**, *360*, 1941-1942.
210. Lell, B., Kremsner, P. G. Clindamycin as an Antimalarial Drug: Review of Clinical Trials. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 2315-2320.
211. 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.
212. 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.
213. 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.
214. Na-Bangchang, K., Ruengwearayut, R., Karbwang, J., Chauemung, A., Hutchinson, D. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of fosmidomycin monotherapy and combination therapy with clindamycin in the treatment of multidrug resistant falciparum malaria. *Malaria Journal* **2007**, *6*, 1.

215. Borrmann, S., Adegnik, 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.
216. Jomaa And MMV Working on New Anti-Malarial. *Drug Discovery Dev.* **2011**, 15.02.2011. URL: <http://www.dddmag.com/news-Jomaa-And-MMV-Working-on-New-Anti-Malarial-21511.aspx> (21.04.2012).
217. Behrendt, C. T., Kunfermann, A., Illarionova, V., Matheussen, A., Grawert, T., Groll, M., Rohdich, F., Bacher, A., Eisenreich, W., Fischer, M., Maes, L., Kurz, T. Synthesis and antiparasitic activity of highly active reverse analogues of the antimalarial drug candidate fosmidomycin. *ChemMedChem* **2010**, *5*, 1673-1676.
218. Behrendt, C. T., Kunfermann, A., Illarionova, V., Matheussen, A., Pein, M. K., Gräwert, T., Kaiser, J., 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*, 6796-6802.
219. Kaula, U. Synthese und Antimalaria-Aktivität von Fosmidomycin-Derivaten. Dissertationsschrift; Universität Hamburg, **2005**.
220. Ortmann, R., Wiesner, J., Silber, K., Klebe, G., Jomaa, H., Schlitzer, M. Novel deoxyxylulosephosphate-reductoisomerase inhibitors: Fosmidomycin derivatives with spacious acyl residues. *Arch. Pharm.* **2007**, *340*, 483-490.
221. 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.
222. Kurz, T., Geffken, D., Wackendorff, C. Hydroxyurea analogues of fosmidomycin. *Z. Naturforsch., B: J. Chem. Sci.* **2003**, *58*, 106-110.
223. Chung, S. J., Kim, D. H. N-(Hydroxyaminocarbonyl)phenylalanine: a novel class of inhibitor for carboxypeptidase A. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 185-189.
224. Greco, M. N., Hageman, W. E., Powell, E. T., Tighe, J. J., Persico, F. J. Benzothiazole hydroxy ureas as inhibitors of 5-lipoxygenase – use of the hydroxyurea moiety as a replacement for hydroxamic acid. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 3180-3183.
225. 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.
226. Khan, A. R., Parrish, J. C., Fraser, M. E., Smith, W. W., Bartlett, P. A., James, M. N. G. Lowering the Entropic Barrier for Binding Conformationally Flexible Inhibitors to Enzymes. *Biochemistry* **1998**, *37*, 16839-16845.
227. Van der Jeught, S., Stevens, C. V., Dieltiens, N. Synthesis of oxazinyll analogues of fosmidomycin using RCM methodology. *Synlett.* **2007**, *20*, 3183-3187.
228. 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.
229. Lima, L. M., Barreiro, E. J. Bioisosterism: a useful strategy for molecular modification and drug design. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 23-49.

230. Summers, J. B., Gunn, B. P., Martin, J. G., Martin, M. B., Mazdiasni, H., Stewart, A. O., Young, P. R., Bouska, J. B., Goetze, A. M. Structure-activity analysis of a class of orally active hydroxamic acid inhibitors of leukotriene biosynthesis. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 1960-1964.
231. 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.
232. Zingle, C., Kuntz, L., Tritsch, D., Grosdemange-Billiard, C., Rohmer, M. Isoprenoid biosynthesis via the methylerythritol phosphate pathway: structural variations around phosphonate anchor and spacer of fosmidomycin, a potent inhibitor of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 3203-3207.
233. Kurz, T., Geffken, D., Wackendorff, C. Carboxylic acid analogues of fosmidomycin. *Z. Naturforsch., B: J. Chem. Sci.* **2003**, *58*, 457-461.
234. 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.
235. 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.
236. 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.
237. 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.* **2005**, *338*, 305-314.
238. Wiesner, J., Ortmann, R., Jomaa, H., Schlitzer, M. Double ester prodrugs of FR900098 display enhanced in-vitro antimalarial activity. *Arch. Pharm.* **2007**, *340*, 667-669.
239. Kurz, T., Schluter, 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.
240. Schluter, 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.
241. Kurz, T., Behrendt, C., Kaula, U., Bergmann, B., Walter, R. D. α -Phenylethyl substituted bis(pivaloyloxymethyl) ester analogues of fosmidomycin and FR900098. *Aust. J. Chem.* **2007**, *60*, 154-158.
242. Kurz, T., Behrendt, C., Pein, M., Kaula, U., Bergmann, B., Walter, R. D. γ -Substituted bis(pivaloyloxymethyl)ester analogues of fosmidomycin and FR900098. *Arch. Pharm.* **2007**, *340*, 661-666.
243. Kurz, T., Schluter, K., Pein, M., Behrendt, C., Bergmann, B., Walter, R. D. Conformationally restrained aromatic analogues of fosmidomycin and FR900098. *Arch. Pharm.* **2007**, *340*, 339-344.

244. Uh, E., Jackson, E. R., San Jose, G., Maddox, M., Lee, R. E., Lee, R. E., Boshoff, H. I., Dowd, C. S. Antibacterial and antitubercular activity of fosmidomycin, FR900098, and their lipophilic analogs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 6973-6976.
245. Hemmi, K., Takeno, H., Hashimoto, M., Kamiya, T. Studies on Phosphonic Acid Antibiotics. III. Structure and Synthesis of 3-(N-Acetyl-N-Hydroxyamino)Propylphosphonic Acid (FR-900098) and 3-(N-Acetyl-N-Hydroxyamino)-2(R)-Hydroxypropylphosphonic Acid (FR-33289). *Chem. Pharm. Bull.* **1981**, *29*, 646-650.
246. 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.* **1982**, *30*, 111-118.
247. DeSieno, M. A., van der Donk, W. A., Zhao, H. Characterization and application of the Fe(II)- and α -ketoglutarate dependent hydroxylase FrbJ. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 10025-10027.
248. 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.
249. Haemers, T., Wiesner, J., Busson, R., Jomaa, H., Van Calenbergh, S. Synthesis of α -aryl-substituted and conformationally restricted fosmidomycin analogues as promising antimalarials. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, *17*, 3856-3863.
250. Kurz, T., Geffken, D., Kaula, U., (Bioagency AG), Phosphororganische Verbindungen und deren Verwendung. DE 10356410 A1 (**2005**).
251. Haemers, T., Wiesner, J., Van Poecke, S., Goeman, J., Henschker, D., Beck, E., Jomaa, H., Van Calenbergh, S. Synthesis of α -substituted fosmidomycin analogues as highly potent Plasmodium falciparum growth inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1888-1891.
252. Topliss, J. G. Utilization of operational schemes for analog synthesis in drug design. *J. Med. Chem.* **1972**, *15*, 1006-1011.
253. Topliss, J. G. A manual method for applying the Hansch approach to drug design. *J. Med. Chem.* **1977**, *20*, 463-469.
254. Devreux, V., Wiesner, J., Jomaa, H., Rozenski, J., Van der Eycken, J., Van Calenbergh, S. Divergent strategy for the synthesis of α -aryl-substituted fosmidomycin analogues. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 3783-3789.
255. Andaloussi, M., Henriksson, L. M., Więckowska, A., Lindh, M., Björkelid, C., Larsson, A. M., Suresh, S., Iyer, H., Srinivasa, B. R., Bergfors, T., Unge, T., Mowbray, S. L., Larhed, M., Jones, T. A., Karlén, A. Design, Synthesis, and X-ray Crystallographic Studies of α -Aryl Substituted Fosmidomycin Analogues as Inhibitors of Mycobacterium tuberculosis 1-Deoxy-d-xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 4964-4976.
256. Devreux, V., Wiesner, J., Jomaa, H., Van der Eycken, J., Van Calenbergh, S. Synthesis and evaluation of α,β -unsaturated α -aryl-substituted fosmidomycin analogues as DXR inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 4920-4923.
257. Kaplan, E. L., Meier, P. Nonparametric-Estimation from Incomplete Observations. *J. Am. Stat. Assoc.* **1958**, *53*, 457-481.
258. Verbrugghen, T., Cos, P., Maes, L., Van Calenbergh, S. Synthesis and Evaluation of α -Halogenated Analogues of 3-(Acetylhydroxyamino)propylphosphonic Acid (FR900098) as Antimalarials. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 5342-5346.

259. Haemers, T., Wiesner, J., Giessmann, D., Verbrugghen, T., Hillaert, U., Ortmann, R., Jomaa, H., Link, A., Schlitzer, M., Van Calenbergh, S. Synthesis of β - and γ -oxa isosteres of fosmidomycin and FR900098 as antimalarial candidates. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 3361-3371.
260. Jacobsen, J. A., Fullagar, J. L., Miller, M. T., Cohen, S. M. Identifying Chelators for Metalloprotein Inhibitors Using a Fragment-Based Approach. *J. Med. Chem.* **2010**, *54*, 591-602.
261. White, R. J., Margolis, P. S., Trias, J., Yuan, Z. Targeting metalloenzymes: a strategy that works. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2003**, *3*, 502-507.
262. Jacobsen, F. E., Lewis, J. A., Cohen, S. M. The Design of Inhibitors for Medicinally Relevant Metalloproteins. *ChemMedChem* **2007**, *2*, 152-171.
263. Winum, J.-Y., Köhler, S., Scozzafava, A., Montero, J.-L., Supuran, C. T. Targeting Bacterial Metalloenzymes: A New Strategy for the Development of Anti-Infective Agents. *Anti-Infect. Agents Med. Chem.* **2008**, *7*, 169-179.
264. Ondetti, M., Rubin, B., Cushman, D. Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. *Science* **1977**, *196*, 441-444.
265. Petrillo, E. W., Ondetti, M. A. Angiotensin-converting enzyme inhibitors: Medicinal chemistry and biological actions. *Medi. Res. Rev.* **1982**, *2*, 1-41.
266. Heinke, R., Sippl, W. Entwicklung von Histon-Desacetylaseinhibitoren. Potente Wirkstoffe vor allem bei Krebserkrankungen. *Pharm. Unserer Zeit* **2010**, *39*, 183-189.
267. Mercurio, C., Minucci, S., Pelicci, P. G. Histone deacetylases and epigenetic therapies of hematological malignancies. *Pharmacol. Res.* **2010**, *62*, 18-34.
268. Lee, J.-H., Choy, M. L., Ngo, L., Foster, S. S., Marks, P. A. Histone deacetylase inhibitor induces DNA damage, which normal but not transformed cells can repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 14639-14644.
269. Karagiannis, T. C., El-Osta, A. Will broad-spectrum histone deacetylase inhibitors be superseded by more specific compounds? *Leukemia* **2006**, *21*, 61-65.
270. Weichert, W., Röske, A., Niesporek, S., Noske, A., Buckendahl, A.-C., Dietel, M., Gekeler, V., Boehm, M., Beckers, T., Denkert, C. Class I Histone Deacetylase Expression Has Independent Prognostic Impact in Human Colorectal Cancer: Specific Role of Class I Histone Deacetylases In vitro and In vivo. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 1669-1677.
271. Prince, H. M., Bishton, M. J., Harrison, S. J. Clinical Studies of Histone Deacetylase Inhibitors. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 3958-3969.
272. Shi, W., Ma, H., Duan, Y., Aubart, K., Fang, Y., Zonis, R., Yang, L., Hu, W. Design, synthesis and antibacterial activity of 3-methylenepyrrolidine formyl hydroxyamino derivatives as novel peptide deformylase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 1060-1063.
273. Yuan, Z., White, R. J. The evolution of peptide deformylase as a target: Contribution of biochemistry, genetics and genomics. *Biochem. Pharmacol.* **2006**, *71*, 1042-1047.
274. Jain, R., Chen, D., White, R. J., Patel, D. V., Yuan, Z. Bacterial Peptide deformylase inhibitors: a new class of antibacterial agents. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 1607-1621.
275. Lossen, H. Ueber die Oxalohydroxamsäure. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1869**, *150*, 314-322.

276. Bauer, L., Exner, O. Die Chemie der Hydroxamsäuren und N-Hydroxyimide. *Angew. Chem.* **1974**, *86*, 419-428.
277. Mock, W. L., Cheng, H. Principles of hydroxamate inhibition of metalloproteases: carboxypeptidase A. *Biochemistry* **2000**, *39*, 13945-13952.
278. Senent, M. L., Niño, A., Caro, C. M., Ibeas, S., García, B., Leal, J. M., Secco, F., Venturini, M. Deprotonation Sites of Acetohydroxamic Acid Isomers. A Theoretical and Experimental Study. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 6535-6542.
279. Steinberg, G. M., Swidler, R. The Benzohydroxamate Anion. *J. Org. Chem.* **1965**, *30*, 2362-2365.
280. Senthilnithy, R., Weerasinghe, S., Dissanayake, D. P. Stability of hydroxamate ions in aqueous medium. *J. Mol. Struct.: THEOCHEM* **2008**, *851*, 109-114.
281. Marmion, Celine J., Griffith, D., Nolan, Kevin B. Hydroxamic Acids – An Intriguing Family of Enzyme Inhibitors and Biomedical Ligands. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2004**, *15*, 3003-3016.
282. 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.
283. Yang, K., Lou, B. Molecular Diversity of Hydroxamic Acids: Part I. Solution- and Solid-Phase Synthesis. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2003**, *3*, 349-360.
284. 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.
285. Du, L., Musson, D. G., Wang, A. Q. Stability studies of vorinostat and its two metabolites in human plasma, serum and urine. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, *42*, 556-564.
286. Mulder, G. F., Meerman, J. H. Sulfation and glucuronidation as competing pathways in the metabolism of hydroxamic acids: the role of N,O-sulfonation in chemical carcinogenesis of aromatic amines. *Environ. Health Perspect.* **1983**, *49*, 27-32.
287. Mai, A. Hydroxamic Acids: Biological Properties and Potential Uses as Therapeutic Agents. In: *PATAI'S Chemistry of Functional Groups* (John Wiley & Sons, Ltd, **2009**). URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470682531.pat0515/abstract>
288. Wenciewicz, T., Möllmann, U., Long, T., Miller, M. Is drug release necessary for antimicrobial activity of siderophore-drug conjugates? Syntheses and biological studies of the naturally occurring salmycin “Trojan Horse” antibiotics and synthetic desferridanoxamine-antibiotic conjugates. *BioMetals* **2009**, *22*, 633-648.
289. Lou, B., Yang, K. Molecular diversity of hydroxamic acids: part II. Potential therapeutic applications. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2003**, *3*, 609-620.
290. Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M., Beppu, T. Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 17174-17179.
291. Richon, V. M., Emiliani, S., Verdin, E., Webb, Y., Breslow, R., Rifkind, R. A., Marks, P. A. A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 3003-3007.

292. Finnin, M. S., Donigian, J. R., Cohen, A., Richon, V. M., Rifkind, R. A., Marks, P. A., Breslow, R., Pavletich, N. P. Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature* **1999**, *401*, 188-193.
293. Kraker, A. J., Mizzen, C. A., Hartl, B. G., Miin, J., Allis, C. D., Merriman, R. L. Modulation of Histone Acetylation by [4-(Acetylamino)-N-(2-Amino-phenyl) Benzamide] in HCT-8 Colon Carcinoma. *Mol. Cancer Ther.* **2003**, *2*, 401-408.
294. Hubeek, I., Comijn, E. M., Van der Wilt, C. L., Merriman, R. L., Padron, J. M., Kaspers, G. J. L., Peters, G. J. CI-994 (N-acetyl-dinaline) in combination with conventional anti-cancer agents is effective against acute myeloid leukemia in vitro and in vivo. *Oncol. Rep.* **2008**, *19*, 1517-1523.
295. Saito, A., Yamashita, T., Mariko, Y., Nosaka, Y., Tsuchiya, K., Ando, T., Suzuki, T., Tsuruo, T., Nakanishi, O. A synthetic inhibitor of histone deacetylase, MS-27-275, with marked in vivo antitumor activity against human tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 4592-4597.
296. Suzuki, T., Ando, T., Tsuchiya, K., Fukazawa, N., Saito, A., Mariko, Y., Yamashita, T., Nakanishi, O. Synthesis and Histone Deacetylase Inhibitory Activity of New Benzamide Derivatives. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3001-3003.
297. Hess-Stumpff, H., Bracker, T. U., Henderson, D., Politz, O. MS-275, a potent orally available inhibitor of histone deacetylases—The development of an anticancer agent. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**, *39*, 1388-1405.
298. Beckers, T., Burkhardt, C., Wieland, H., Gimmnich, P., Ciossek, T., Maier, T., Sanders, K. Distinct pharmacological properties of second generation HDAC inhibitors with the benzamide or hydroxamate head group. *Int. J. Cancer* **2007**, *121*, 1138-1148.
299. Hu, E., Dul, E., Sung, C.-M., Chen, Z., Kirkpatrick, R., Zhang, G.-F., Johanson, K., Liu, R., Lago, A., Hofmann, G., Macarron, R., De Los Frailes, M., Perez, P., Krawiec, J., Winkler, J., Jaye, M. Identification of Novel Isoform-Selective Inhibitors within Class I Histone Deacetylases. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, *307*, 720-728.
300. Mai, A., Perrone, A., Nebbioso, A., Rotili, D., Valente, S., Tardugno, M., Massa, S., De Bellis, F., Altucci, L. Novel uracil-based 2-aminoanilide and 2-aminoanilide-like derivatives: Histone deacetylase inhibition and in-cell activities. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 2530-2535.
301. Jung, M., Brosch, G., Kölle, D., Scherf, H., Gerhäuser, C., Loidl, P. Amide Analogues of Trichostatin A as Inhibitors of Histone Deacetylase and Inducers of Terminal Cell Differentiation. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4669-4679.
302. Wang, D.-F., Helquist, P., Wiech, N. L., Wiest, O. Toward Selective Histone Deacetylase Inhibitor Design: Homology Modeling, Docking Studies, and Molecular Dynamics Simulations of Human Class I Histone Deacetylases. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6936-6947.
303. Hancock, R. D., Martell, A. E. Ligand design for selective complexation of metal ions in aqueous solution. *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 1875-1914.
304. Ye, Y., Liu, M., Kao, J. L. K., Marshall, G. R. Peptide-bond modification for metal coordination: Peptides containing two hydroxamate groups. *Pept. Sci.* **2003**, *71*, 489-515.
305. Atigadda, V. R., Brouillette, W. J., Duarte, F., Ali, S. M., Babu, Y. S., Bantia, S., Chand, P., Chu, N., Montgomery, J. A., Walsh, D. A., Sudbeck, E. A., Finley, J., Luo, M., Air, G. M.,

- Laver, G. W. Potent Inhibition of Influenza Sialidase by a Benzoic Acid Containing a 2-Pyrrolidinone Substituent. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 2332-2343.
306. Skibo, E. B., Islam, I., Heileman, M. J., Schulz, W. G. Structure-activity studies of benzimidazole-based DNA-cleaving agents. Comparison of benzimidazole, pyrrolo-benzimidazole, and tetrahydropyridobenzimidazole analogs. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 78-92.
 307. Brown, A. D., Bunnage, M. E., Butcher, K. J., Glossop, P. A., James, K., Lane, C. A. L., Lewthwaite, R. A., Price, D. A. Compounds having β -Agonist activity. WO 2005/92841 A1 (**2005**).
 308. McKenna, C. E., Higa, M. T., Cheung, N. H., McKenna, M. C. Facile Dealkylation of Phosphonic Acid Dialkyl Esters by Bromotrimethylsilane. *Tetrahedron Lett.* **1977**, *2*, 155-158.
 309. Mikołajczyk, M., Łuczak, J., Kielbasinski, P. Chemoenzymatic Synthesis of Phosphocarnitine Enantiomers. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 7872-7875.
 310. Dubash, N. P., Mangu, N. K., Satyam, A. Synthesis of 7-Alkoxy/Hydroxy- α -methyltryptamines. *Synth. Commun.* **2004**, *34*, 1791-1799.
 311. O'Leary, B. M., Szabo, T., Svenstrup, N., Schalley, C. A., Lützen, A., Schäfer, M., Rebek, J. "Flexiball" Toolkit: A Modular Approach to Self-Assembling Capsules. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11519-11533.
 312. Auernheimer, J., Zukowski, D., Dahmen, C., Kantlehner, M., Enderle, A., Goodman, S. L., Kessler, H. Titanium Implant Materials with Improved Biocompatibility through Coating with Phosphonate-Anchored Cyclic RGD Peptides. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 2034-2040.
 313. Arbusov, B. A. Michaelis-Arbusow- und Perkow-Reaktionen. *Pure Appl. Chem.* **1964**, *9*, 307-336.
 314. Martin, D. J., Griffin, C. E. The Determination of Polar Substituent Constants for the Dialkoxy- and Diarylphosphono and Trialkyl- and Triarylphosphonium Groups. *J. Org. Chem.* **1965**, *30*, 4034-4038.
 315. Brzasczcz, 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.
 316. Bergeron, R. J., Wiegand, J., Wollenweber, M., McManis, J. S., Algee, S. E., Ratliff-Thompson, K. Synthesis and Biological Evaluation of Naphthyl-desferrithiocin Iron Chelators. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1575-1581.
 317. Hesse, M., Meier, H., Zeeh, B. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie* (8. Aufl.). (Thieme, Stuttgart, **2012**).
 318. 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.
 319. Kuzmic, P. Program DYNAFIT for the analysis of enzyme kinetic data: Application to HIV proteinase. *Anal. Biochem.* **1996**, *237*, 260-273.
 320. Press, W. H., Teukolsky, S. A., Vetterling, W. T., Flannery, B. P. *Numerical Recipes: The art of scientific computing*. (Cambridge University Press, Cambridge, **2007**).

321. 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.
322. Ciapetti, P., Giethlen, B. Molecular Variations Based on Isosteric Replacements. In *The Practice of Medicinal Chemistry (Third Edition)*. Wermuth, C. G., Ed. (Academic Press, **2008**), 290-342.
323. Siebert, C. D. Das Bioisosterie-Konzept: Arzneistoffentwicklung. *Chem. Unserer Zeit* **2004**, *38*, 320-324.
324. Langmuir, I. The Structure of Atoms and the Octet Theory of Valence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1919**, *5*, 252-259.
325. Grimm, H. G. Über Bau und Grösse der Nichtmetallhydride. *Z. Elektrochem. Angew. Phys. Chem.* **1925**, *31*, 474-480.
326. Erlenmeyer, H., Leo, M. Über Pseudoatome. *Helv. Chim. Acta* **1932**, *15*, 1171-1186.
327. Friedman, H. L. Influence of isosteric replacements upon biological activity. *Symposium on Chemical-Biological Correlation* **1951**, 295-358.
328. Thornber, C. W. Isosterism and molecular modification in drug design. *Chem. Soc. Rev.* **1979**, *8*, 563-580.
329. Meanwell, N. A. Synopsis of Some Recent Tactical Application of Bioisosteres in Drug Design. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 2529-2591.
330. Burger, A. Medicinal chemistry. (Wiley-Interscience, New York, **1970**).
331. Engel, R. Phosphonates as analogues of natural phosphates. *Chem. Rev.* **1977**, *77*, 349-367.
332. Lee, W. A., Martin, J. C. Perspectives on the development of acyclic nucleotide analogs as antiviral drugs. *Antiviral Res.* **2006**, *71*, 254-259.
333. Muller, K., Faeh, C., Diederich, F. Fluorine in pharmaceuticals: looking beyond intuition. *Science* **2007**, *317*, 1881-1886.
334. Pesenti, C., Viani, F. The Influence of Fluorinated Molecules (Semiochemicals and Enzyme Substrate Analogues) on the Insect Communication System. *ChemBioChem* **2004**, *5*, 590-613.
335. Chen, D. Z., Patel, D. V., Hackbarth, C. J., Wang, W., Dreyer, G., Young, D. C., Margolis, P. S., Wu, C., Ni, Z.-J., Trias, J., White, R. J., Yuan, Z. Actinonin, a Naturally Occurring Antibacterial Agent, Is a Potent Deformylase Inhibitor. *Biochemistry* **2000**, *39*, 1256-1262.
336. Nieschalk, J., Batsanov, A. S., OHagan, 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 fluoromethylene-phosphonate moiety. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 165-176.
337. Blakemore, P. R. N-Heteroatom-Substituted Alkanamides. *Sci. Synth.* **2005**, *21*, 857.
338. Walz, A. J., Miller, M. J. Synthesis and Biological Activity of Hydroxamic Acid-Derived Vasopeptidase Inhibitor Analogues. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 2047-2050.
339. Nahm, S., Weinreb, S. M. *N*-methoxy-*N*-methylanilides as effective acylating agents. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 3815-3818.
340. 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.

341. Bolger, J. K., Tian, W., Wolter, W. R., Cho, W., Suckow, M. A., Miller, M. J. Synthesis and evaluation of 5-lipoxygenase translocation inhibitors from acylnitroso hetero-Diels-Alder cycloadducts. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, 9, 2999-3010.
342. Morwick, T., Hrapchak, M., DeTuri, M., Campbell, S. A Practical Approach to the Synthesis of 2,4-Disubstituted Oxazoles from Amino Acids. *Org. Lett.* **2002**, 4, 2665-2668.
343. Surman, M. D., Mulvihill, M. J., Miller, M. J. Novel 1,4-Benzodiazepines from Acylnitroso-Derived Hetero-Diels-Alder Cycloadducts. *Org. Lett.* **2001**, 4, 139-141.
344. Xue, C.-B., Voss, M. E., Nelson, D. J., Duan, J. J. W., Cherney, R. J., Jacobson, I. C., He, X., Roderick, J., Chen, L., Corbett, R. L., Wang, L., Meyer, D. T., Kennedy, K., DeGrado, W. F., Hardman, K. D., Teleha, C. A., Jaffee, B. D., Liu, R.-Q., Copeland, R. A., Covington, M. B., Christ, D. D., Trzaskos, J. M., Newton, R. C., Magolda, R. L., Wexler, R. R., Decicco, C. P. Design, Synthesis, and Structure–Activity Relationships of Macrocyclic Hydroxamic Acids That Inhibit Tumor Necrosis Factor α Release in Vitro and in Vivo. *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 2636-2660.
345. Boger, D. L., Chen, J.-H., Saionz, K. W. (–)-Sandramycin: Total Synthesis and Characterization of DNA Binding Properties. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 1629-1644.
346. Hogan, P. C., Corey, E. J. Proteasome Inhibition by a Totally Synthetic β -Lactam Related to Salinosporamide A and Omuralide. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 15386-15387.
347. Schaumann, E., Grabley, F.-F. Darstellung und Eigenschaften von α -Alkoxyalkylphosphonsäureestern. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1977**, 88-100 (1977).
348. Burkhouse, D., Zimmer, H. Synthesis with α -heterosubstituted phosphonates. 14. Novel synthesis of 1-alkoxy-1-arylmethanephosphonic acid-esters. *Synthesis* **1984**, 4, 330-332.
349. Kim, D. Y., Oh, D. Y. A Facile Synthesis of Diethyl 1-Alkoxy-1-Arylmethanephosphonates. *Synth. Commun.* **1986**, 16, 859-863.
350. Drabowicz, J., Kielbasinski, P., Lyzwa, P., Mikolajczyk, M., Zajac, A. Product Class 15: Alkylphosphonic Acids and Derivatives. *Sci. Synth.* **2008**, 42, 687.
351. Yamashita, M. Product Subclass 1: O,P-Acetals. *Sci. Synth.* **2006**, 30, 83.
352. Murphy, P. J. Organophosphorus reagents: a practical approach in chemistry. (Oxford University Press, **2004**), 194-204.
353. Goldman, W., Soroka, M. The Preparation of Dialkyl 1-Hydroxyalkylphosphonates in the Reaction of Trialkyl Phosphites with Oxonium Salts Derived from Aldehydes or Ketones. *Synthesis* **2006**, 18, 3019-3024.
354. Merino, P., Marqués-López, E., Herrera, R. P. Catalytic Enantioselective Hydrophosphonylation of Aldehydes and Imines. *Adv. Synth. Catal.* **2008**, 350, 1195-1208.
355. Kraszewski, A., Stawinski, J. H-Phosphonates: Versatile synthetic precursors to biologically active phosphorus compounds. *Pure Appl. Chem.* **2007**, 79, 2217-2227.
356. Kee, T., Nixon, T. The Asymmetric Phospho-Aldol Reaction. Past, Present and Future New Aspects in Phosphorus Chemistry II. *Top. Curr. Chem.* **2003**, 223, 45-65.
357. Abell, J. P., Yamamoto, H. Catalytic Enantioselective Pudovik Reaction of Aldehydes and Aldimines with Tethered Bis(8-quinolinato) (TBOx) Aluminum Complex. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 10521-10523.

358. Uraguchi, D., Ito, T., Ooi, T. Generation of Chiral Phosphonium Dialkyl Phosphite as a Highly Reactive P-Nucleophile: Application to Asymmetric Hydrophosphonylation of Aldehydes. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3836-3837.
359. Hoffmann, M. Optically active 1-Hydroxy-3-Methylbutanephosphonic Acid and its derivatives. *J. Prakt. Chem.* **1990**, *332*, 251-255.
360. Li, W., Qin, S., Su, Z., Yang, H., Hu, C. Theoretical Study on the Mechanism of Al(salalen)-Catalyzed Hydrophosphonylation of Aldehydes. *Organometallics* **2011**, *30*, 2095-2104.
361. Nesterov, V., Kolodyazhnyi, O. Enantioselective reduction of ketophosphonates using chiral acid adducts with sodium borohydride. *Russ. J. Gen. Chem.* **2006**, *76*, 1022-1030.
362. Li, Y.-F., Hammerschmidt, F. Enzymes in organic chemistry, part 1: Enantioselective hydrolysis of α -(acyloxy)phosphonates by esterolytic enzymes. *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, *4*, 109-120.
363. Welch, J. T., Seper, K. W. Synthesis, regioselective deprotonation, and stereoselective alkylation of fluoro ketimines. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 2991-2999.
364. Wild, J., Goetz, N., Will, W., Kohler, R.-D., Plath, P. Process for preparing O-substituted hydroxylamines. DE 3615473 A1 (**1988**).
365. Ramasamy, K., Olsen, R. K., Emery, T. N-Methylation of O-benzyl- α -N-(alkoxycarbonyl)- α -amino acid hydroxamate derivatives. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 5438-5441.
366. Froneman, M., Modro, T. A., Qaba, L., Vather, S. M. Anchimeric assistance and selectivity in diethylamino group transfer from metals to phosphoryl centres. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 2979-2980.
367. Jung, M. E., Cordova, J., Murakami, M. Total Synthesis of ($\pm$)-Kellermanoldione: Stepwise Cycloaddition of a Functionalized Diene and Allenolate. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 3882-3885.
368. McGeary, R. P., Vella, P., Mak, J. Y. W., Guddat, L. W., Schenk, G. Inhibition of purple acid phosphatase with α -alkoxynaphthylmethylphosphonic acids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 163-166.
369. Wu, D., He, Y., Tang, R., Guan, Z. The First Synthesis of Diethyl α,α -Chlorofluorobenzylphosphonates. *Synlett* **2009**, *13*, 2180-2182.
370. de Noronha, R. G., Costa, P. J., Romão, C. C., Calhorda, M. J., Fernandes, A. C. MoO₂Cl₂ as a Novel Catalyst for C-P Bond Formation and for Hydrophosphonylation of Aldehydes. *Organometallics* **2009**, *28*, 6206-6212.
371. Sardarian, A. R., Kaboudin, B. Surface-Mediated Solid Phase Reactions: Preparation Of Diethyl 1-Hydroxyarylmethylphosphonates on the Surface of Magnesia. *Synth. Commun.* **1997**, *27*, 543-551.
372. Shen, Y., Qi, M. Facile synthesis of trifluoromethylated α -hydroxyphosphonates. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1994**, *9*, 1179-1180.
373. Helmboldt, H., Köhler, D., Hiersemann, M. Synthesis of the Norjatrophone Diterpene (-)-15-Acetyl-3-propionyl-17-norcharaciol. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1573-1576.
374. Drescher, M., Hammerschmidt, F., Kählig, H. Enzymes in Organic Chemistry; Part 3: Enantioselective Hydrolysis of 1-Acyloxyalkylphosphonates by Lipase from *Aspergillus niger* (Lipase AP 6). *Synthesis* **1995**, *10*, 1267-1272.

375. Chen, T., Shen, P., Li, Y., He, H. The Synthesis and Herbicidal Evaluation of Fluorine-Containing Phenoxyacetoxyalkylphosphonate Derivatives. *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.* **2006**, *181*, 2135-2145.
376. Sindt, M., Stephan, B., Schneider, M., Mieloszynski, J. L. Chemical shift prediction of ³¹P-NMR shifts for dialkyl or diaryl phosphonates. *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.* **2001**, *174*, 163-175.
377. Bouzide, A., Sauv , G. Highly selective silver(I) oxide mediated monoprotection of symmetrical diols. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 5945-5948.
378. Cavicchioni, G., D'Angeli, F., Casolari, A., Orlandini, P. Synthesis of O-(α -Aminoacyl)-glycolic and -lactic Amides from 2-Bromoacetamides or -propanamides with N-Protected Amino Acids. *Synthesis* **1988**, *12*, 947-950.
379. Cavicchioni, G. Bromoamides as Starting Materials in the Synthesis of α -Hydroxy- and α -Alkoxy Derivatives. *Synth. Commun.* **1994**, *24*, 2223-2227.
380. Vachal, P., Fletcher, J. M., Hagmann, W. K. A direct functionalization of tertiary alkyl bromides with O-, N-, and C-nucleophiles. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 5761-5765.
381. Grembecka, J., Mucha, A., Cierpicki, T., Kafarski, P. The Most Potent Organophosphorus Inhibitors of Leucine Aminopeptidase. Structure-Based Design, Chemistry, and Activity. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2641-2655.
382. Andr , V., Lahrache, H., Robin, S., Rousseau, G. Reaction of unsaturated phosphonate monoesters with bromo- and iodo(bis-collidine) hexafluorophosphates. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 10059-10066.
383. Schlüter, K. *Prodrugs von Fosmidomycin-Derivaten* Dissertation, Universität Hamburg, **2006**.
384. Staab, H. A. Synthese, Eigenschaften und präparative Verwendung von N,N'-Carbonyl-diimidazol. *Angew. Chem.* **1956**, *68*, 754-754.
385. Staab, H. A., Bauer, H., Schneider, K. M. Reactivity of Azolides. In: *Azolides in Organic Synthesis and Biochemistry* (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2003**), 1-12.
386. Staab, H. A. Synthesen Mit Heterocyclischen Amiden (Azoliden). *Angew. Chem. Int. Ed.* **1962**, *74*, 407-423.
387. Staab, H. A., Bauer, H., Schneider, K. M. Preparation and Properties of Azolides. In: *Azolides in Organic Synthesis and Biochemistry* (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2003**), 13-25.
388. Staab, H. A., Maleck, G.  ber den Mechanismus der Reaktion von N,N'-Carbonyl-di-azolen mit Carbonsäuren zu Carbonsäure-azoliden. *Chemische Berichte* **1966**, *99*, 2955-2961.
389. Mathias, L. J. Esterification and Alkylation Reactions Employing Isoureas. *Synthesis* **1979**, *8*, 561-576.
390. Inoue, Y., Taguchi, M., Hashimoto, H. N-Alkylation of Imides with O-Alkylisourea under Neutral Conditions. *Synthesis* **1986**, *4*, 332-334.
391. 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.

392. Park, J. D., Kim, D. H., Kim, S.-J., Woo, J.-R., Ryu, S. E. Sulfamide-Based Inhibitors for Carboxypeptidase A. Novel Type Transition State Analogue Inhibitors for Zinc Proteases. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 5295-5302.
393. Park, J. D., Kim, D. H. Reversed hydroxamate-Bearing thermolysin inhibitors mimic a high-energy intermediate along the enzyme-Catalyzed proteolytic reaction pathway. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3161-3166.
394. Park, J. D., Kim, D. H. Sulfamide derivatives as transition state analogue inhibitors for carboxypeptidase A. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 2349-2356.
395. Liu, C., Lin, J., Wroblewski, S. T., Lin, S., Hynes, J., Wu, H., Dyckman, A. J., Li, T., Wityak, J., Gillooly, K. M., Pitt, S., Shen, D. R., Zhang, R. F., McIntyre, K. W., Salter-Cid, L., Shuster, D. J., Zhang, H., Marathe, P. H., Doweyko, A. M., Sack, J. S., Kiefer, S. E., Kish, K. F., Newitt, J. A., McKinnon, M., Dodd, J. H., Barrish, J. C., Schieven, G. L., Leftheris, K. Discovery of 4-(5-(Cyclopropylcarbamoyl)-2-methylphenylamino)-5-methyl-N-propylpyrrolo[1,2-f][1,2,4]triazine-6-carboxamide (BMS-582949), a Clinical p38 α MAP Kinase Inhibitor for the Treatment of Inflammatory Diseases. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 6629-6639.
396. Fisher, L. E., Caroon, J. M., Stabler, S. R., Lundberg, S., Zaidi, S., Sorensen, C. M., Sparacino, M. L., Muchowski, J. M. Mild hydrolysis or alcoholysis of amides. Ti(IV) catalyzed conversion of primary carboxamides to carboxylic acids or esters. *Can. J. Chem.* **1994**, *72*, 142-145.
397. Jiménez-Osés, G., Avenzoza, A., Busto, J. H., Rodríguez, F., Peregrina, J. M. A Novel Multistep Mechanism for the Stereocontrolled Ring Opening of Hindered Sulfamidates: Mild, Green, and Efficient Reactivity with Alcohols. *Chem. –Eur. J.* **2009**, *15*, 9810-9823.
398. Miyata, O., Namba, M., Ueda, M., Naito, T. A novel synthesis of amino-1,2-oxazinones as a versatile synthon for β -amino acid derivatives. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 1274-1276.
399. Gordon, E. M., Ondetti, M. A., Pluscec, J., Cimarusti, C. M., Bonner, D. P., Sykes, R. B. O-Sulfated β -lactam hydroxamic acids (monosulfactams). Novel monocyclic β -lactam antibiotics of synthetic origin. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 6053-6060.
400. Shireman, B. T., Miller, M. J., Jonas, M., Wiest, O. Conformational Study and Enantioselective, Regiospecific Syntheses of Novel Aminoxy trans-Proline Analogues Derived from an Acylnitroso Diels–Alder Cycloaddition. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 6046-6056.
401. Fitzpatrick, N. J., Mageswaran, R. Theoretical-Study of Hydroxamic Acids. *Polyhedron* **1989**, *8*, 2255-2263.
402. 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.
403. Brown, D. A., Glass, W. K., Mageswaran, R., Mohammed, S. A. ¹H and ¹³C NMR studies of isomerism in hydroxamic acids. *Magn. Reson. Chem.* **1991**, *29*, 40-45.
404. Kakkar, R., Grover, R., Chadha, P. Conformational behavior of some hydroxamic acids. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 2403-2403.
405. Behrendt, C. T. Synthese und biologische Evaluation inverser α -Aryl-substituierter Fosmidomycin-Analoga. Dissertationsschrift; Heinrich Heine Universität Düsseldorf, **2011**.
406. Montoneri, E., Savarino, P., Quagliotto, P., Adani, F., Ricca, G. Organosulphur Phosphorus Acid Compounds. Part 7. Preparation and Analytical Identification of

- Difluorobenzylphosphono-Sulfonic Acids. *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.* **1998**, *134*, 99-108.
407. Iorga, B., Eymery, F., Savignac, P. Controlled monohalogenation of phosphonates: A new route to pure α -monohalogenated diethyl benzylphosphonates. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 2671-2686.
 408. Green, D. S. C., Gruss, U., Hägele, G., Hudson, H. R., Lindblom, L., Pianka, M. The preparation and characterization of some fluorinated α -aminoarylmethanephosphonic acids. *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.* **1996**, *113*, 179-207.
 409. Agrawal, D. R., Tandon, S. G. Preparation and properties of N-arylhydroxamic acids. *J. Chem. Eng. Data* **1972**, *17*, 257-258.
 410. Fujioka, H., Goto, A., Otake, K., Kubo, O., Yahata, K., Sawama, Y., Maegawa, T. Remarkable effect of phosphine on the reactivity of O,P-acetal-efficient substitution reaction of O,P-acetal. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 3976-3978.
 411. Copeland, R. A. Reversible Inhibitors. In: *Enzymes* (John Wiley & Sons, Inc., **2002**), 266-304.
 412. Chulay, J. D., Haynes, J. D., Diggs, C. L. Plasmodium falciparum: Assessment of in vitro growth by [3H]hypoxanthine incorporation. *Exp. Parasitol.* **1983**, *55*, 138-146.
 413. Andaloussi, M., Lindh, M., Björkelid, C., Suresh, S., Wieckowska, A., Iyer, H., Karlén, A., Larhed, M. Substitution of the phosphonic acid and hydroxamic acid functionalities of the DXR inhibitor FR900098: An attempt to improve the activity against Mycobacterium tuberculosis. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 5403-5407.
 414. Albert, A. Chemical Aspects of Selective Toxicity. *Nature* **1958**, *182*, 421-423.
 415. Huttunen, K. M., Raunio, H., Rautio, J. Prodrugs-from Serendipity to Rational Design. *Pharmacol. Rev.* **2011**, *63*, 750-771.
 416. Rautio, J., Kumpulainen, H., Heimbach, T., Oliyai, R., Oh, D., Jarvinen, T., Savolainen, J. Prodrugs: design and clinical applications. *Nat Rev Drug Discov* **2008**, *7*, 255-270.
 417. Jana, S., Mandlekar, S., Marathe, P. Prodrug Design to Improve Pharmacokinetic and Drug Delivery Properties: Challenges to the Discovery Scientists. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 3874-3908.
 418. Fabian, J., Schepmann, D., Wunsch, B. Prodrugs: Arzneistoffe mit maßgeschneiderten Eigenschaften. *Pharm. Ztg.* **2011**, *26*, 16-21.
 419. Rautio, J. Prodrug Strategies in Drug Design. In: *Prodrugs and Targeted Delivery* (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2010**), 1-30.
 420. Rasheed, A., Kumar, C. Novel approaches on prodrug based drug design. *Pharm. Chem. J.* **2008**, *42*, 677-686.
 421. Ettmayer, P., Amidon, G. L., Clement, B., Testa, B. Lessons Learned from Marketed and Investigational Prodrugs. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2393-2404.
 422. Liederer, B. M., Borchardt, R. T. Enzymes involved in the bioconversion of ester-based prodrugs. *J. Pharm. Sci.* **95**, 1177-1195 (2006).
 423. O'Donnell, J. P. Pharmacokinetic and Biopharmaceutical Considerations in Prodrug Discovery and Development. In: *Prodrugs and Targeted Delivery* (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2010**), 415-452.

424. Krise, J. P., Stella, V. J. Prodrugs of phosphates, phosphonates, and phosphinates. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1996**, *19*, 287-310.
425. Hecker, S. J., Erion, M. D. Prodrugs of Phosphates and Phosphonates. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2328-2345.
426. Guarino, V. R. The Molecular Design of Prodrugs by Functional Group. In: *Prodrugs and Targeted Delivery* (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2010**), 31-60.
427. Schultz, C. Prodrugs of biologically active phosphate esters. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 885-898.
428. Dando, T. M., Plosker, G. L. Adefovir Dipivoxil: A Review of its Use in Chronic Hepatitis B. *Drugs* **2003**, *63*, 2215-2234.
429. Dhareshwar, S. S., Stella, V. J. Your prodrug releases formaldehyde: Should you be concerned? No! *J. Pharm. Sci.* **2008**, *97*, 4184-4193.
430. Brass, E. P. Pivalate-Generating Prodrugs and Carnitine Homeostasis in Man. *Pharmacol. Rev.* **2002**, *54*, 589-598.
431. Sun, C.-Q., Cheng, P. T. W., Stevenson, J., Dejneka, T., Brown, B., Wang, T. C., Robl, J. A., Poss, M. A. A general synthesis of dioxolenone prodrug moieties. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 1161-1164.
432. Périgaud, C., Gosselin, G., Lefebvre, I., Girardet, J.-L., Benzaria, S., Barber, I., Imbach, J.-L. Rational design for cytosolic delivery of nucleoside monophosphates : "SATE" and "DTE" as enzyme-labile transient phosphate protecting groups. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 2521-2526.
433. Erion, M. D., Reddy, K. R., Boyer, S. H., Matelich, M. C., Gomez-Galeno, J., Lemus, R. H., Ugarkar, B. G., Colby, T. J., Schanzer, J., van Poelje, P. D. Design, Synthesis, and Characterization of a Series of Cytochrome P450 3A-Activated Prodrugs (HepDirect Prodrugs) Useful for Targeting Phosph(on)ate-Based Drugs to the Liver. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5154-5163.
434. Meier, C., Balzarini, J. Application of the cycloSal-prodrug approach for improving the biological potential of phosphorylated biomolecules. *Antiviral Res.* **2006**, *71*, 282-292.
435. Vlieghe, P., Bihel, F., Clerc, T., Pannecouque, C., Witvrouw, M., De Clercq, E., Salles, J.-P., Chermann, J.-C., Kraus, J.-L. New 3'-Azido-3'-deoxythymidin-5'-yl O-(ω -Hydroxyalkyl) Carbonate Prodrugs: Synthesis and Anti-HIV Evaluation. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 777-786.
436. Vlieghe, P., Clerc, T., Pannecouque, C., Witvrouw, M., De Clercq, E., Salles, J.-P., Kraus, J.-L. New 3'-Azido-3'-deoxythymidin-5'-yl O-(4-Hydroxyalkyl or -Alkenyl or -Alkylepoxide) Carbonate Prodrugs: Synthesis and Anti-HIV Evaluation. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 3014-3021.
437. Potter, P. M., Wadkins, R. M. Carboxylesterases - Detoxifying Enzymes and Targets for Drug Therapy. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 1045-1054.
438. Slatter, J. G., Schaaf, L. J., Sams, J. P., Feenstra, K. L., Johnson, M. G., Bombardt, P. A., Cathcart, K. S., Verburg, M. T., Pearson, L. K., Compton, L. D., Miller, L. L., Baker, D. S., Pesheck, C. V., Lord, R. S. Pharmacokinetics, Metabolism, and Excretion of Irinotecan (CPT-11) Following I.V. Infusion of [14C]CPT-11 in Cancer Patients. *Drug Metab. Dispos.* **2000**, *28*, 423-433.

439. Schlimme, S., Hauser, A.-T., Carafa, V., Heinke, R., Kannan, S., Stolfa, D. A., Cellamare, S., Carotti, A., Altucci, L., Jung, M., Sippl, W. Carbamate Prodrug Concept for Hydroxamate HDAC Inhibitors. *ChemMedChem* **2011**, 6, 1193-1198.
440. Baudy, R. B., Butera, J. A., Abou-Gharbia, M. A., Chen, H., Harrison, B., Jain, U., Magolda, R., Sze, J. Y., Brandt, M. R., Cummons, T. A., Kowal, D., Pangalos, M. N., Zupan, B., Hoffmann, M., May, M., Mugford, C., Kennedy, J., Childers, W. E. Prodrugs of Perzinfotel with Improved Oral Bioavailability. *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 771-778.
441. Baudy, R. B., Butera, J. A. Derivatives of 2-(8,9-dioxo-2,6-diazabicyclo(5.2.0)non-1(7)-en-2-yl)alkyl phosphonic acid and their use as N-Methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonists. WO 2004/092189 (**2004**).
442. Hecht, S., Wungsintaweeikul, 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.
443. Noedl, H., Bronnert, J., Yingyuen, K., Attlmayr, B., Kollaritsch, H., Fukuda, M. Simple Histidine-Rich Protein 2 Double-Site Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Use in Malaria Drug Sensitivity Testing. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, 49, 3575-3577.
444. Ritz, C., Streibig, J. C. Bioassay Analysis Using R. *J. Stat. Software* **2005**, 12.
445. R Development Core Team. A language and environment for statistical computing (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, **2009**). URL: <http://www.r-project.org/> (22.04.2012).

9 Lebenslauf

Karin Brücher

geboren 07.07.1983 in Essen

08/1989 – 07/1993	Albert-Schweitzer-Schule, Velbert
08/1993 – 07/2002	Nikolaus-Ehlen-Gymnasium, Velbert
22.06.2002	Allgemeine Hochschulreife – Abitur
10/2002 – 07/2007	Grund- und Hauptstudium der Chemie (Diplom II) an der Bergischen Universität Wuppertal
12/2006 – 07/2007	Diplomarbeit „Festphasensynthese Cyclischer Depsptide“ in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Scherkenbeck, Fachbereich C/Bioorganische Chemie, Bergische Universität Wuppertal
11.07.2007	Diplomprüfung
09/2007 – 03/2008	Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Scherkenbeck, Fachbereich C/Bioorganische Chemie, Bergische Universität Wuppertal
04/2008 – 05/2012	Wissenschaftliche Mitarbeiterin und Anfertigung einer Dissertation in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Kurz, Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Heinrich Heine Universität Düsseldorf
