

# **Synthese und biologische Evaluation inverser $\beta$ -thia-isosterer Fosmidomycin-Analoga**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

**Claudia Lienau**  
aus Münster

Düsseldorf, August 2015



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 Stark

Tag der mündlichen Prüfung: 11.02.2016



Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Die Dissertation ist von mir in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Fakultät eingereicht worden. Bisher wurden von mir keine Promotionsversuche (weder erfolglos noch erfolgreich) unternommen.

Düsseldorf, den 18.08.2015

(Claudia Lienau)



Die vorliegende Arbeit entstand von November 2010 bis März 2015 am Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Universität Düsseldorf unter der Leitung von *Herrn Prof. Dr. Thomas Kurz*.

Ich möchte an erster Stelle *Thomas Kurz* für die umfassende wissenschaftliche Betreuung und allen aktuellen sowie ehemaligen Mitgliedern seines Arbeitskreises für die schöne Arbeitsatmosphäre danken.

Für die Übernahme des Korreferats möchte ich herzlich *Herrn Prof. Dr. Holger Stark* danken.

Darüber hinaus gilt mein besonderer Dank *Sarah Konzuch, Michael Leven, Ido Ben-Shalom* und *Lukas Spanier* für ihre Freundschaft, den Zusammenhalt, die jahrelange Zusammenarbeit, die vielen Gespräche und die gemütlichen Stunden nach Feierabend. Besonders möchte ich hierbei *Sarah Konzuch*, die sich mit mir lange Zeit ein Labor und die ein oder andere Sorge geteilt hat, für das Zuhören und Mut machen danken. *Linda Marek* danke ich für die intensive und schöne, aber leider zu kurze Zeit ihrer Freundschaft. *Karin Brücher* möchte ich besonders dafür danken, dass ich mit meinen Problemen immer zu ihr kommen durfte und sie mir jedes Mal mit wertvollen Ratschlägen weiter geholfen hat. *Saskia Hähn* danke ich für die vielen chemischen Tipps und lustigen Stunden im Labor. *Katharina Stenzel, Tanja Knaab* und *Leandro Avelar* möchte ich dafür danken, dass sie mir gezeigt haben, dass man das Leben ab und an nicht zu ernst nehmen sollte. *Dr. Finn Hansen, Daniela Diedrich* und *Viktoria Syntschewsk* danke ich für die schöne Zusammenarbeit. *Petra Stahlke, Beate Lungerich* und *Krystina Kuna* danke ich dafür, dass sie uns mit ihrer Arbeit so gut unterstützten und immer für uns da waren.

Ich habe mich in der freundschaftlichen Atmosphäre des Arbeitskreises sehr wohl gefühlt und die gemeinsame Zeit mit Euch allen sehr genossen.

Zudem möchte ich allen Kooperationspartnern für die kollegiale Zusammenarbeit danken:

*Dr. Boris Illarionov, Dr. Tobias Gräwert, Prof. Dr. Markus Fischer* und seinem Arbeitskreis (Hamburg School of Food Science, Universität Hamburg);

*Dr. Jana Held, Dr. Benjamin Mordmüller* und seinem Arbeitskreis (Institut für Tropenmedizin, Eberhard Karls Universität Tübingen);

*Dr. Andrea Kunfermann, Prof. Dr. Michael Groll* und seinem Arbeitskreis (Center for Integrated Protein Science, Technische Universität München);

*Dr. Sergio Wittlin* und seinem Arbeitskreis (Swiss Tropical and Public Health Institute, Basel).

Ein besonderer Dank gilt auch *Elisabeth, Manfred* und *Andreas Lienau* für ihre Liebe, ihre Unterstützung, ihre Geduld und dafür, dass sie mich immer ermutigt haben, weiterzumachen. *Melanie Heßmer* und *Friederike Morfeld* danke ich für ihre jahrelange tiefe Freundschaft. *Melanie Heßmer* möchte ich insbesondere dafür danken, dass ich immer auf ein Kölsch zu ihr kommen konnte, sie immer ein offenes Ohr für mich hatte und mir Mut gemacht hat, wenn ich nicht mehr weiter wusste.

Meinem Lebensgefährten *Martin Mohr* danke ich für seine Liebe, seinen Rückhalt und die Kraft, die er mir gibt.

FÜR MEINE ELTERN ELISABETH UND MANFRED



„*WITHOUT PATIENCE I COULD NEVER HAVE SUCCEEDED.*“

JANE GOODALL



## Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
ACT	artemisinin based combination therapy
arom.	aromatisch
AUC	area under the curve
Bn	Benzyl
br. s	broad signal (NMR-Spektren)
<i>n</i> -BuLi	<i>n</i> -Butyllithium
c	Konzentration
Cbz	Benzyloxycarbonyl
CDI	1,1'-Carbonyldiimidazol
CHN	Elementaranalyse
<sup>13</sup> C-NMR	carbon nuclear magnetic resonance
δ	chemische Verschiebung (NMR-Spektren)
d	Dublett (NMR-Spektren)
DC	Dünnschichtchromatographie
DEET	Diethyltoluamid
DMAP	<i>N,N</i> -Dimethylpyridin-4-amin
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
DMEM	Dulbecco's Minimum Essential Medium
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
[D <sub>6</sub> ]DMSO	Dimethylsulfoxid, deuteriert

DNA	desoxyribonucleic acid
DOXP	1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat
DRL	Dxr-like
DTT	(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> )-1,4-Dimercaptobutan-2,3-diol
Dxr	1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat- Reduktoisomerase
<i>E. coli, Ec</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> - ethylcarbodiimid
ee	enantiomeric excess = Enantiomeren- überschuss
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EMA	European Medicines Agency
ESI	electrospray ionization
Et	Ethyl
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
EtOH	Ethanol
h	hours = Stunden
<sup>1</sup> H-NMR	proton nuclear magnetic resonance
HeLa-Zellen	menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (benannt nach der Patientin <i>Henrietta Lacks</i> )
HPLC	Hochleistungsflüssigkeits- chromatographie
HRMS	high-resolution mass spectrometry
HRP2	histidine-rich protein 2
Hz	Hertz

IC <sub>50</sub>	Konzentration bei halbmaximaler Inhibition
IPP	Isopentenylidiphosphat
IR	Infrarot
<i>J</i>	Kopplungskonstante (NMR-Spektren)
K	Kelvin
LB-Medium	lysogeny broth Medium
LC/MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
m	Multiplett (NMR-Spektren)
M	Mol pro Liter
<i>m</i> CPBA	3-Chlorperoxybenzoesäure
MeOH	Methanol
MEP	2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat
MMV	Medicines for Malaria Venture
MOM	Methoxymethyl
MPD	2-Methyl-2,4-pentandiol
<i>M. tuberculosis, Mt</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MVA	Mevalonat
NADPH	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduzierte Form)
n.b.	nicht bestimmt
<i>n</i> -BuLi	<i>n</i> -Butyllithium
NMM	4-Methylmorpholin
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy

<i>P.</i>	Plasmodium
PDB	protein data bank
PEG	Polyethylenglycol
<i>Pf</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
Ph	Phenyl
pH	potentia Hydrogenii
POM	Pivaloyloxymethyl
ppm	parts per million
q	Quartett (NMR-Spektren)
RCSB	Research Collaboratory for Structural Bioinformatics at Rutgers University
rpm	revolutions per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
s	Singulett (NMR-Spektren)
SBET	stand-by emergency treatment
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SG	Schutzgruppe
<i>spp.</i>	species pluralis
<i>Syn.</i>	<i>Synechocystis</i>
t	Triplett (NMR-Spektren)
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TEA	Triethylamin
IV	

TEP	Triethylphosphit
<i>tert</i>	<i>tertiär</i>
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMSBr	Trimethylsilylbromid
UV	Ultraviolett
WHO	World Health Organization
1, 2, 3, ...	Mit arabischen Ziffern bezeichnete Verbindungen werden im Rahmen dieser Arbeit erstmalig beschrieben.
I, II, III, ...	Mit römischen Ziffern bezeichnete Verbindungen wurden zuvor schon von anderen Autoren beschrieben oder von der Autorin nicht in ausreichender Reinheit gewonnen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Malaria.....	1
1.1.1 Bedeutung .....	1
1.1.2 Der Malaria-Erreger und die Erkrankung .....	1
1.2 Therapie von Malaria.....	3
1.2.1 Etablierte Arzneistoffe .....	3
1.2.2 Prävention von Malariainfektionen.....	5
1.2.3 Therapie von Malariainfektionen.....	6
1.2.4 Entwicklung neuer Arzneistoffe gegen Malaria .....	9
1.3 Fosmidomycin .....	12
1.4 Strukturvariationen von Fosmidomycin .....	16
1.4.1 Modifizierung der Phosphonsäurefunktionalität.....	17
1.4.2 Modifizierung der Hydroxamsäurefunktionalität .....	18
1.4.3 Modifizierung der Spacerregion .....	21
1.5 Aufgabenstellung.....	25
<b>2 Synthese der <math>\beta</math>-thia-isosteren Fosmidomycin-Analoga</b> .....	<b>28</b>
2.1 Synthese der $\beta$ -thia-isosteren Fosmidomycin-Analoga mit Sulfidpartialstruktur .....	28
2.1.1 Synthese als Diethylphosphonate .....	28
2.1.2 Synthese als Di- <i>tert</i> -butylphosphonate .....	44
2.2 Synthese der $\beta$ -thia-isosteren Fosmidomycin-Analoga mit Sulfoxid- und Sulfonpartialstruktur .....	49
<b>3 Spektroskopische Eigenschaften</b> .....	<b>54</b>
3.1 $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie .....	54
3.2 NOE-Spektroskopie.....	61
3.3 $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie .....	66
3.4 IR-Spektroskopie .....	71
<b>4 Kristallstrukturanalysen</b> .....	<b>73</b>

4.1 Kristallstrukturen der Komplexe aus carba- sowie oxa-isosteren Fosmidomycin-Analoga und IspC-Enzymen.....	73
4.1.1 Aufbau des <i>PfIspC</i> -Enzyms.....	73
4.1.2 Quarternärer Komplex aus <i>PfIspC</i> , NADPH, $Mg^{2+}$ und Fosmidomycin bzw. FR900098.....	74
4.1.3 Kristallstruktur des Komplexes aus <i>PfIspC</i> , $Mn^{2+}$ , NADPH und carba- bzw. oxa-isosteren Fosmidomycin-Analoga .....	76
4.1.4 Kristallstruktur des Komplexes aus XLII-46C, $Mn^{2+}$ und <i>EcIspC</i> .....	79
4.2 Kristallstrukturanalyse des Komplexes aus Thia-Isoster 43, $Mn^{2+}$ , NADPH und <i>PfIspC</i> .....	80
<b>5 Biologische Evaluation.....</b>	<b>85</b>
5.1. <i>PfIspC</i> -inhibitorische und antiplasmodiale Aktivität der $\beta$ -thia-isosteren Fosmidomycin-Analoga mit Sulfidpartialstruktur.....	90
5.1.1 Target-basiertes Screening – <i>in vitro</i> -Aktivität gegenüber dem Enzym <i>PfIspC</i> .....	90
5.1.2 Phänotypisches Screening – <i>in vitro</i> -Aktivität gegenüber den Plasmodienstämmen <i>Pf3D7</i> und <i>PfDd2</i> .....	94
5.2 <i>PfIspC</i> -inhibitorische und antiplasmodiale Aktivität der $\beta$ -thia-isosteren Fosmidomycin-Analoga mit Sulfonpartialstruktur .....	99
5.3 Kinetik und Inhibitionsmodus .....	101
5.4 Evaluation der Zytotoxizität – <i>in vitro</i> -Untersuchung an HeLa-Zellen .....	102
5.5 Untersuchung der antiplasmodialen <i>in vivo</i> -Aktivität an mit <i>P. berghei</i> infizierten Mäusen.....	103
5.6 Inhibitorische Aktivität gegenüber nicht-plasmodialen IspC-Enzymen .....	104
5.7 Enantioselektivität von IspC.....	108
5.8 Vergleich der Aktivitäten gegen Plasmodien von carba-, oxa- und thia-isosteren Fosmidomycin-Analoga .....	110
<b>6 Zusammenfassung.....</b>	<b>115</b>
<b>7 Summary.....</b>	<b>121</b>
<b>8 Experimentalteil .....</b>	<b>127</b>

8.1 Verzeichnis der Geräte und Analysenmethoden .....	127
8.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften .....	130
8.3 Analytische Daten.....	136
8.4 Biologische Evaluation.....	209
8.4.1 Untersuchungen zur <i>in vitro</i> -Aktivität .....	209
8.4.2 Kristallisation und Strukturaufklärung .....	211
8.4.3 Zytotoxizitätsuntersuchungen an HeLa-Zellen.....	212
8.4.4 Standard-Peters-Test zur Untersuchung der antiplasmodialen <i>in vivo</i> -Aktivität an mit <i>P. berghei</i> infizierten Mäusen .....	213
8.4.5 Racematspaltung .....	213
<b>9 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>215</b>

# **1 Einleitung**

## **1.1 Malaria**

### **1.1.1 Bedeutung**

3,3 Milliarden Menschen sind laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) davon bedroht, an Malaria zu erkranken. Malaria stellt somit eine der bedeutendsten Infektionskrankheiten weltweit dar. In ihrem World Malaria Report (aktueller Stand: 2014) stellt die WHO für das Jahr 2013 fest, dass es 198 Millionen Fälle von Malaria gab wovon insgesamt 584000 tödlich verliefen. Von diesen Todesfällen traten 90 % in Afrika und 78 % bei Kindern unter 5 Jahren auf.<sup>[1]</sup> Allein aus den Zahlen wird ersichtlich, dass Malaria hauptsächlich ein Problem der Entwicklungsländer, der Armut und der körperlich Schwachen ist.<sup>[2]</sup>

### **1.1.2 Der Malaria-Erreger und die Erkrankung**

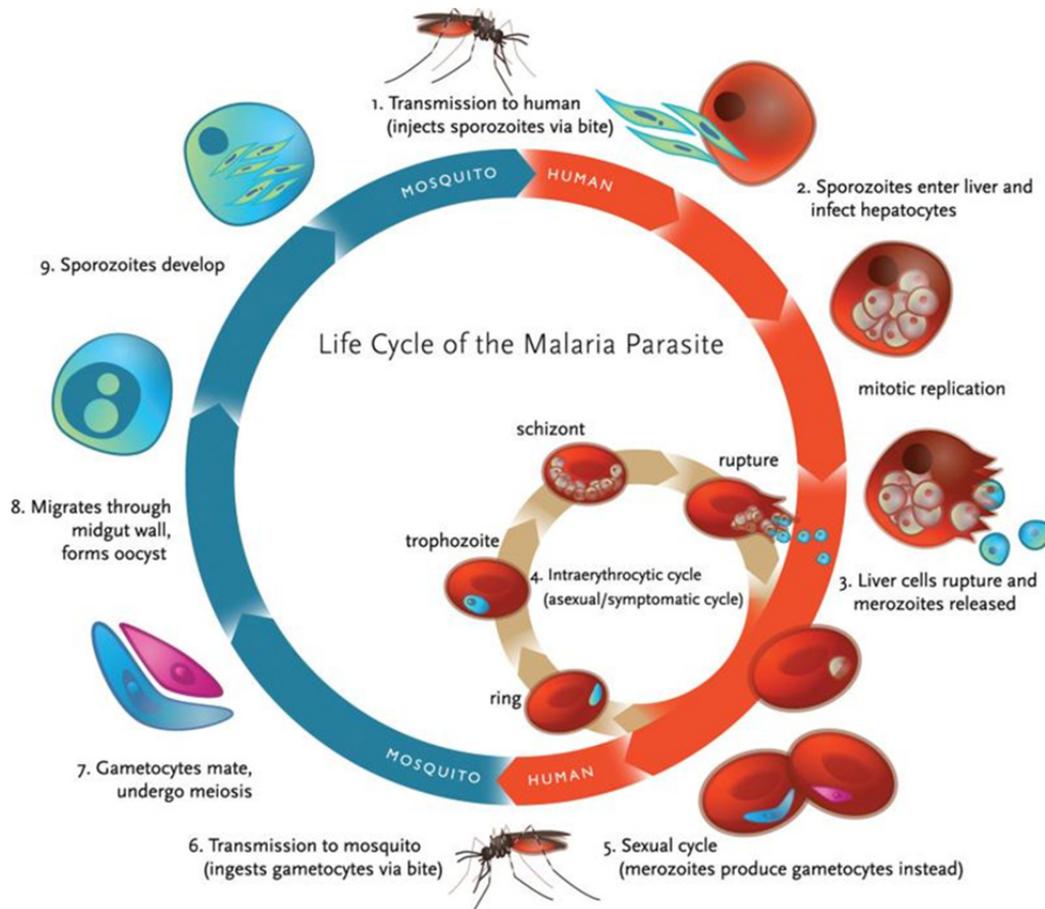
Die Malaria-Erreger sind einzellige, den Apikomplexa zugehörige Eukaryoten der Gattung *Plasmodium*.<sup>[3]</sup> Hiervon lösen fünf Spezies im menschlichen Organismus Malaria aus, wobei weibliche Stechmücken der Gattung *Anopheles* als Vektoren für die Parasiten fungieren. Bei den fünf humanpathogenen Parasiten handelt es sich um *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. falciparum* und *P. knowlesi*.<sup>[4-5]</sup> Plasmodien lösen unterschiedliche Formen von Malaria aus. So verursachen *P. vivax* und *P. ovale* *Malaria tertiana*, *P. malariae* *Malaria quartana* und *P. falciparum* *Malaria tropica*. *P. knowlesi* ist der Erreger der *P. knowlesi*-Malaria. Fieber, Schüttelfrost und Krämpfe des Magen-Darm-Trakts treten bei allen Malariaformen auf.<sup>[4]</sup> Charakteristisch für einige Malariaarten ist die jeweilige Fiebrerrhythmik, die bei der schwerwiegendsten Form, *Malaria tropica*, nicht zwangsläufig auftreten muss. *Malaria tropica* zeichnet sich durch starke Anämie und lebensgefährliche Komplikationen wie beispielsweise Organversagen aus. Dieses wird dadurch ausgelöst, dass die mit *P. falciparum* infizierten Erythrozyten kleine Blutgefäße obstruieren oder verschließen. Es kommt zu Perfusionsstörungen des Gewebes. Tritt dies im zentralen Nervensystem auf, entwickelt sich cerebrale Malaria.<sup>[4]</sup> *Malaria tropica* ist die Haupttodesursache für Kinder unter 5 Jahren auf dem afrikanischen Kontinent.<sup>[5]</sup>

Zur Diagnose von Malaria werden klinische Symptome, die Anamnese und diagnostische Tests herangezogen.<sup>[4]</sup> Blutausstriche zum mikroskopischen Nachweis des Erregers und Schnelltests auf plasmodiale Antigene kommen hier zum Einsatz. Nachteilig ist unter anderem, dass die Analyse von Blutausstrichen Ausrüstung und geschultes Personal

erfordert und die Schnelltests teuer sind. Deshalb wird häufig aufgrund der unspezifischen klinischen Symptome eine Diagnose gestellt. Da Malaria nur gut behandelbar ist, wenn schnell und sachgemäß die Chemotherapie eingeleitet wird, können Fehldiagnosen fatale Folgen haben.<sup>[4, 6]</sup> Malaria-Infektionen werden von der WHO je nach Schweregrad der auftretenden Symptome in unkomplizierte und komplizierte Malaria unterteilt.<sup>[7]</sup> Dies wird in Abschnitt 1.2 „Therapie von Malaria“ näher erläutert.

### Lebenszyklus von *Plasmodium spp.*

Der Lebenszyklus des Malariaerregers kann in zwei Phasen unterteilt werden, die geschlechtliche Vermehrung im Moskito (Sporogonie) und die ungeschlechtliche im Menschen (Schizogonie) (s. Abbildung 1).<sup>[4-5]</sup>



**Abbildung 1** Lebenszyklus des Malariaparasiten (übernommen aus Klein 2013<sup>[5]</sup>).

Während einer Blutmahlzeit findet die Transmission des Erregers von dem Vektor Mücke auf den Wirt Mensch statt (1). Die Stechmücke infiziert hierbei den Menschen mit Sporozoiten, von denen nur ca. 100 in die menschliche Blutbahn gelangen<sup>[8]</sup>. Diese befallen in der Leber Hepatozyten und vermehren sich in den Zellen asexuell durch Mitose (2). Nach 6-15 Tagen platzen diese Leberschizonten und geben tausende Merozoiten frei, die im Blut Erythrozyten

befallen (3). Bei Infektionen mit *Plasmodium vivax* und *Plasmodium ovale* persistieren Dauerformen, sogenannte Hypnozoiten, in den Leberzellen. Sie können auch Jahre nach der Primärinfektion zu Rezidiven führen.<sup>[9]</sup> Nach Invasion der Erythrozyten durch die Merozoiten kommt es zur asexuellen Vermehrung, wobei der Erreger mehrere Stadien durchläuft. Vom Ringstadium reift er zum Trophozoiten und schließlich zum Schizonten heran. Währenddessen ernähren sich die Erreger hauptsächlich von Glucose und Hämoglobin.<sup>[4]</sup> In ihrer sauren Nahrungsvakuole bauen sie Hämoglobin zu kleineren Peptiden sowie freien Aminosäuren ab. Toxisches Häm wird in Hämozoin umgewandelt.<sup>[10]</sup> Pro Schizont werden durchschnittlich 16 neue Merozoiten gebildet. Die Schizonten platzen und geben die Merozoiten frei, was die charakteristischen Fieberschübe auslöst (4). Dieser Zyklus dauert bei *P. vivax*, *ovale* und *falciparum* 48 h und bei *P. malariae* 72 h. Mit Ausnahme von *P. falciparum* sind die Zyklen synchronisiert und es tritt die für die jeweilige Infektion typische Fiebrerrhythmik auf.<sup>[11]</sup> Die Merozoiten können nun ihrerseits wieder Erythrozyten befallen und ein neuer Zyklus beginnt. Einige Merozoiten entwickeln sich jedoch zu Gametozyten (5). Der Reifeprozess der Gametozyten umfasst 5 morphologisch unterschiedliche Stadien (I-V).<sup>[12]</sup> Während einer erneuten Blutmahlzeit kann nun die Transmission der reifen Gametozyten vom Menschen auf den Vektor erfolgen (6). Es beginnt die Phase der geschlechtlichen Vermehrung. Die Gametozyten gelangen in den Darm der Mücke und entwickeln sich zu Gameten. Dort verschmelzen sie (7) und über das Stadium der Zygote und des Ookineten wird schließlich im Gewebe des Darms eine Oozyste gebildet (8). In ihr reifen tausende Sporozoiten heran (9), die wiederum während der nächsten Blutmahlzeit auf den Menschen übertragen werden.

## **1.2 Therapie von Malaria**

### **1.2.1 Etablierte Arzneistoffe**

Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über Wirkstoffe, die zur Therapie und Prävention von Malaria eingesetzt werden. Bei vielen Arzneistoffen sind die Wirkungsmechanismen auf molekularer Ebene nicht vollständig geklärt und das genaue Target somit unbekannt, wie beispielsweise bei den 4-Aminochinolinen, den 8-Aminochinolinen und den Arylaminoalkoholen.

Die Arzneistoffe unterscheiden sich stark in ihren Halbwertszeiten, in dem Ausmaß der plasmodialen Resistenzentwicklung, in ihrem Nebenwirkungsprofil und in ihrer Aktivität gegenüber den verschiedenen Stadien des Lebenszyklus von Plasmodien.<sup>[13-15]</sup> Die WHO gibt basierend auf diesen unterschiedlichen Eigenschaften regelmäßig aktualisierte Richtlinien heraus, welche Arzneistoffe zur Prävention und Therapie der einzelnen Malariainfektionen

eingesetzt werden sollten.<sup>[1, 7, 16]</sup> Die aktuellen Richtlinien werden im folgenden Abschnitt dargestellt.

Arzneistoffklasse	Beispiele	Anmerkung	wirksam gegen
<b>Endoperoxide/ Artemisinine</b>	Dihydroartemisinin, Artesunat, Artemether	Fe(II) des Hämproteins führt zur Radikalbildung durch Spaltung der Endoperoxidstruktur; Hemmung einer Ca <sup>2+</sup> -abhängigen ATPase wird auch angenommen; Artemisinine sind schnell wirkend <sup>[17]</sup> und werden mit langsam wirkenden Arzneistoffen kombiniert	<b>B</b> <b>S</b> <sup>[18]</sup>
<b>Arylaminoalkohole</b>	Lumefantrin, Halofantrin, Mefloquin, Chinin	Inhibition des Hämoglobinabbaus; Mefloquin hat Nebenwirkungen wie Depressionen, Psychosen, Alpträume <sup>[19]</sup> ; Chinin zentralnervöse Nebenwirkungen, Herzrhythmusstörungen <sup>[20]</sup> ; Halofantrin auch Herzrhythmusstörungen <sup>[21]</sup>	<b>B</b> Mefloquin, Chinin, Halofantrin auch <b>S</b> <sup>[8]</sup>
<b>4-Aminochinoline</b>	Piperaquin, Chloroquin, Amodiaquin, Pyronaridin	Inhibition des Hämabbaus im Parasiten zu ungiftigem Hämozoin <sup>[22-24]</sup>	<b>B</b> Pyronaridin auch <b>S</b>
<b>8-Aminochinoline</b>	Primaquin	Beeinträchtigt mitochondriale Funktionen der Parasiten; Mittel der Wahl zur Elimination von Hypnozoiten <sup>[25]</sup>	<b>B</b> <b>S</b> <b>L</b>
<b>Sulfonamide</b>	Sulfadoxin	Wird mit Pyrimethamin kombiniert	<b>B</b> <b>S</b>
<b>Diaminopyrimidine, Biguanide</b>	Pyrimethamin (Diaminopyrimidin), Proguanil (Biguanid)	Proguanil in Kombination mit Atovaquon <sup>[26]</sup> auch Elimination von Leberstadien	<b>B</b> <b>S</b> <sup>[27]</sup> <b>L</b>
<b>Naphthochinone</b>	Atovaquon	Target: Cytochrom b1 Komplex der parasitären Mitochondrien; Atovaquon ist aktiv gegen Leberstadien, tötet diese aber nicht	<b>B</b> <b>S</b> <b>L</b>
<b>Antibiotika</b>	Clindamycin, Doxycyclin, Tetracyclin	Target der drei Antibiotika: Ribosomen des Apikoplasten <sup>[a] [14]</sup>	<b>B</b> <b>L</b>

**Tabelle 1** Arzneistoffe, die zur Behandlung oder Prophylaxe von Malaria-Infektionen eingesetzt werden.<sup>[13-15, 28]</sup>  
**B** = Blutstadien, **S** = Sexualstadien, **L** = Leberstadien von *Plasmodium*; [a] Näheres zum Thema Apikoplast siehe Abschnitt 1.3.

### 1.2.2 Prävention von Malariainfektionen

Die Richtlinien zur Prävention von Malariainfektionen werden von der WHO in „International Travel and Health“ publiziert.<sup>[16]</sup> Die Prävention besteht aus zwei wesentlichen Elementen, der Vermeidung von Mückenstichen und der Chemoprophylaxe. Die Chemoprophylaxe bietet keinen kompletten Schutz vor einer Malariainfektion, reduziert aber signifikant das Risiko an einer komplizierten Malaria zu erkranken. Tabelle 2 zeigt die von der WHO empfohlene Art der Chemoprophylaxe in Abhängigkeit vom Infektionsrisiko.<sup>[16]</sup>

Typ	Risiko	Prävention
A	Geringes Infektionsrisiko	Prävention von Mückenstichen
B	Nur Infektionsrisiko mit <i>P. vivax</i>	Prävention von Mückenstichen und Chemoprophylaxe mit Chloroquin
C/D	Infektionsrisiko mit <i>P. falciparum</i> und Chloroquin- sowie Sulfadoxin/Pyrimethamin-Resistenz oder einer anderen Resistenz	Prävention von Mückenstichen und Chemoprophylaxe mit Doxycyclin oder Atovaquon/Proguanil oder Mefloquin (entsprechend des Resistenzschemas)

**Tabelle 2** Prävention von Malaria-Infektionen nach WHO.<sup>[16]</sup>

Die zur Prävention von Mückenstichen eingesetzten Maßnahmen sind unter anderem der Einsatz von Insektiziden bzw. Repellenzien wie z.B. Pyrethroide, DEET oder Icaridin, die Benutzung von Moskitonetzen oder das Tragen langer Kleidung.<sup>[29]</sup> Die Chemoprophylaxe muss je nach Arzneistoff zu unterschiedlichen Zeitpunkten vor der Reise begonnen werden und auch die Einnahmehäufigkeit variiert. So muss Chloroquin einmal wöchentlich eingenommen werden und mit der Chemoprophylaxe wird eine Woche vor Ankunft im Zielland begonnen. Die wöchentliche Einnahme von Mefloquin beginnt beispielsweise schon 2-3 Wochen vor Ankunft, um unter anderem einen ausreichenden Blutspiegel aufzubauen. Alle prophylaktisch eingesetzten Arzneimittel werden für die Dauer des Aufenthalts weiter regelmäßig eingenommen und die Einnahme sollte bis vier Wochen nach der Rückreise fortgeführt werden, da noch Parasiten aus dem Lebergewebe emigrieren könnten. Lediglich mit der Einnahme von Atovaquon/Proguanil kann schon eine Woche nach der Rückreise aufgehört werden, da beide Arzneistoffe gegen Leberschizonten wirksam sind.<sup>[16]</sup>

Zudem gibt es noch das sogenannte „stand-by emergency treatment“ (SBET), welches beispielsweise für Reisende empfohlen wird, die sich beim Auftreten von Fieber nicht unverzüglich in medizinische Behandlung begeben können. Es dient der Erstbehandlung der Infektion durch den Patienten selbst. Für das SBET stehen dieselben Arzneistoffe zur Verfügung wie für die Behandlung der unkomplizierten Malaria (s. Tabelle 3).

### 1.2.3 Therapie von Malariainfektionen

Die hier vorgestellten Therapieleitlinien wurden von der WHO 2015 in „Guidelines for the Treatment of Malaria- 3rd Edition“ veröffentlicht.<sup>[7]</sup> Tabelle 3 gibt einen Überblick über die einzelnen Therapierichtlinien bei den unterschiedlichen Malariainfektionen.

Arzneistoffe	Behandlungsdauer	Anmerkung
<b>Behandlung unkomplizierter <i>P. falciparum</i> Malaria</b>		
Artemether, Lumefantrin	mind. 3 Tage	Schnell wirkendes Artemisinin-Derivat in Kombination mit einem länger wirkenden Partner
Artesunat, Amodiaquin		
Artesunat, Mefloquin		
Dihydroartemisinin, Piperaquin		
Artesunat, Sulfadoxin + Pyrimethamin		
<b>Behandlung unkomplizierter <i>P. vivax</i>, <i>P. ovale</i>, <i>P. malariae</i>, <i>P. knowlesi</i> Malaria</b>		
Wie unkomplizierte <i>P. falciparum</i> Malaria	mind. 3 Tage	Wenn Malariaspezies unbekannt oder unsicher
ACT <sup>[a]</sup> oder Chloroquin		In Gegenden ohne Chloroquinresistenz
ACT <sup>[a]</sup>		In Gegenden mit Chloroquinresistenz
<b>Rückfall-Prävention <i>P. vivax</i> und <i>P. ovale</i></b>		
Primaquin	14 Tage	Wenn kein G6PD <sup>[b]</sup> -Mangel vorliegt
Primaquin in geringer Dosis 1x pro Woche	8 Wochen	Bei G6PD <sup>[b]</sup> -Mangel und unter hämatologischem Monitoring
<b>Behandlung komplizierter Malaria</b>		
Initial: 1. Wahl Artesunat 2. Wahl Artemether 3. Wahl Chinin	Mind. 24h und bis perorale Therapie toleriert wird	Intravenös oder intramuskulär
Anschließend: ACT	3 Tage	peroral

**Tabelle 3** Therapieoptionen bei Malaria-Infektionen nach den WHO-Leitlinien 2015.<sup>[7]</sup> [a] ACT = artemisinin based combination therapy (Näheres siehe Text); [b] G6PD = Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase

Eine unkomplizierte Malariainfektion liegt laut Definition der WHO vor, wenn der Patient Malariasymptome aufweist, der Erreger nachgewiesen werden konnte und keine Symptome komplizierter Malaria vorhanden sind.<sup>[7]</sup> Die Behandlung von unkomplizierter Malaria hat zum Ziel, die Krankheit schnellstmöglich zu heilen und eine Entwicklung einer komplizierten Malaria zu verhindern. Zudem sollen eine weitere Transmission der Parasiten und die Entwicklung von Resistenzen unterbunden werden. Deswegen ist die Parasitenfreiheit des

Patienten Behandlungsziel. Bei der sogenannten „artemisinin based combination therapy“ (ACT) wird ein schnell wirkendes Artemisinin-Derivat in Verbindung mit einem länger wirkenden Arzneistoff genutzt. Durch das Artemisinin-Derivat kann eine schnelle Eliminierung der Parasiten aus dem Blut erreicht werden. Der langwirksame Kombinationspartner führt zur Abtötung der verbliebenen Parasiten und schützt vor Resistenzentwicklung gegenüber dem Artemisinin. Durch Arzneistoffe mit längerer Halbwertszeit kann zudem eine Prophylaxe nach der Behandlung gewährleistet werden.<sup>[7]</sup>

Die Therapie von unkomplizierter Malaria durch Infektionen mit *P. vivax* und *P. ovale* hat zum Ziel, sowohl Blut- als auch Leberstadien des Parasiten zu eliminieren. Dadurch sollen Rückfälle vermieden werden. Bei Chloroquin-sensitiven *P. vivax*- und *P. ovale*-Infektion kann Chloroquin eingesetzt werden, da es effektiv und gut verträglich ist. Es muss aber darauf geachtet werden, dass der Arzneistoff in ausreichender Dosierung (25 mg/kg KG) gegeben wird. Niedrigere Dosen fördern die Resistenzentwicklung. Restliches, im Körper verbliebenes Chloroquin führt zu einer Verzögerung von Rückfällen. Sie treten erst nach 5-7 Wochen statt schon nach 3 Wochen auf. Alternativ zur Behandlung mit Chloroquin kann auch eine ACT herangezogen werden. Diese ist sehr effektiv, da sie bei allen Typen von Malariainfektionen wirksam ist und das Therapieschema so vereinfacht werden kann. Allerdings ist zu bemerken, dass bei *P. vivax* und *P. ovale* abhängig von der Eliminationskinetik des Kombinationspartners des Artesunats nach einiger Zeit Rückfälle auftreten. Primaquin ist für die Therapie der akuten Malaria und für die Prophylaxe wegen seiner pharmakokinetischen Eigenschaften ungeeignet. Eine Therapie mit Primaquin führt aber zur Eradikation der Erreger, sodass ein durch Hypnozoiten verursachter Rückfall vermieden wird. Bei Vorliegen einer Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Insuffizienz (G6PD) führt eine Behandlung mit Primaquin zur Methämoglobinbildung und Hämolyse. In Gebieten mit endemischer Malaria ist die Prävalenz für G6PD-Mangel erhöht, da sie einen gewissen Schutz vor *P. vivax*- und *P. falciparum*-Infektionen bietet. Vor Behandlung mit Primaquin muss deshalb der G6PD-Status des Patienten ermittelt werden. Die WHO empfiehlt entgegen früheren Richtlinien in jedem Fall eine Rückfallprävention mit Primaquin, da die gesundheitlichen Gefahren durch multiple Rückfälle vor allem bei Kindern nicht unterschätzt werden dürfen und die Vorteile für Malariakontrolle und –elimination überwiegen. Deshalb sollte eine Behandlung mit Primaquin auch bei bekanntem G6PD-Mangel durchgeführt werden, allerdings unter Monitoring des Blutbildes.<sup>[7]</sup>

Infektionen mit *P. malariae* und *P. knowlesi* können sowohl mit Chloroquin als auch

mit einer ACT behandelt werden. Diese Spezies sind im Allgemeinen sensibel gegenüber Chloroquin.

Eine komplizierte Malariainfektion liegt laut WHO vor, wenn eines oder mehrere der folgenden Symptome auftritt, es keine andere Ursache für diese Symptome gibt und die Parasiten beim Patienten nachgewiesen werden konnten.<sup>[7]</sup>

Bewusstseinsstörungen, Krämpfe, Acidose, starke Erschöpfung, Hypoglycämie, starke Anämie, Nierenfunktionsstörungen, Gelbsucht, Lungenödem, starke Blutungen, Schock, Hyperparasitämie

Komplizierte Malaria muss initial unverzüglich mit einer parenteralen Therapie behandelt werden, der eine orale ACT folgt. Für die parenterale Behandlung stehen zwei Wirkstoffklassen zur Verfügung: Artemisinin-Derivate (Artesunat oder Artemether) und Cinchona-Alkaloide (Chinin und Chinidin). Das Mittel der ersten Wahl bei komplizierter Malaria ist parenterales Artesunat, welches einfacher und sicherer zu handhaben ist und sich in Studien gegenüber parenteralem Chinin als effektiver erwiesen hat.<sup>[7, 30]</sup>

### **Transmissionsblockade**

Die Übertragung von Plasmodien und somit die Verbreitung von Malaria wird entscheidend dadurch bestimmt, mit welcher Häufigkeit ein *Anopheles*-Moskito mit Gametozyten infiziertes Blut aufnimmt. Gegen Gametozyten wirksame Arzneistoffe können somit zu einer Reduktion der Parasitentransmission beitragen. Primaquin wirkt gegen reife Gametozyten der Phase V, welche während einer Blutmahlzeit von der Stechmücke aufgenommen werden. Artemisinine sind nur schwach gegen Gametozyten dieser Phase aktiv. Sie wirken hauptsächlich gegen frühere Stadien.<sup>[31-32]</sup> Die WHO empfiehlt deshalb zur effizienten Transmissionsblockade die einmalige Gabe von Primaquin zusätzlich zur ACT.<sup>[7, 33]</sup>

### **Impfstoffe gegen Malariainfektionen**

Bis heute gibt es keinen zugelassenen Impfstoff gegen Malaria, obwohl sich zahlreiche Projekte in Entwicklung gegen unterschiedliche Stadien des plasmodialen Lebenszyklus befinden.<sup>[34]</sup> Der am weitesten entwickelte Impfstoff ist RTS,S/AS01, der von GlaxoSmithKline bei der European Medicines Agency (EMA) zur Zulassung angemeldet wurde und sich gegen die parasitäre Infektion von Leberzellen richtet.<sup>[1, 35-37]</sup> Die finalen Ergebnisse der klinischen Phase III wurden im April 2015 veröffentlicht.<sup>[38]</sup> Fälle komplizierter Malaria traten bei Kindern (Alter: 5-17 Monate) um 46 % und bei Säuglingen (Alter: 6-12 Wochen) um 27 % weniger auf als bei der Kontrollgruppe.<sup>[1, 38]</sup> Der Impfstoff

wird von der WHO als Ergänzung zur Malariaprävention und –behandlung angesehen, nicht als Ersatz hierfür.<sup>[35]</sup>

### **Resistenzentwicklung**

Chloroquin war ab Ende des 2. Weltkrieges<sup>[39]</sup> das First-Line-Therapeutikum gegen Malariainfektionen, aber schon Ende der 1950er Jahre wurde Resistenzentwicklung gegen diesen Arzneistoff in West-Kambodscha und Südamerika beobachtet.<sup>[40-41]</sup> Von Südostasien aus verbreitete sich die Resistenz nach Afrika und später lösten Sulfadoxin/Pyrimethamin Chloroquin als First-Line-Therapeutika ab.<sup>[5]</sup> Resistenzen sowohl gegen Sulfadoxin/Pyrimethamin als auch gegen Mefloquin entstanden in den 1970er bzw. 1990er Jahren ebenfalls in Südostasien. Artemisinine in Form von ACTs ersetzten deshalb wiederum Sulfadoxin/Pyrimethamin als First-Line-Therapeutika. In den letzten Jahren wurden allerdings in West-Kambodscha gegenüber Artemisininen als Monotherapie und gegenüber ACTs wie Dihydroartemisinin/Piperaquin resistente Plasmodien (*P. falciparum*) nachgewiesen.<sup>[42-43]</sup> Die WHO berichtet, dass mittlerweile Resistenzen von *P. falciparum* gegenüber Artemisininen in Kambodscha, Laos, Myanmar, Thailand und Vietnam auftreten. Die WHO empfiehlt, dass Artemisinine nicht in Form von Monotherapien verwendet werden sollen.<sup>[1]</sup>

Besonders dramatisch ist die Resistenzsituation dadurch, dass mindestens ein Jahrzehnt vergehen wird, bis ein adäquates First-Line-Therapeutikum gefunden wird, das Artemisinine ersetzen kann.<sup>[5]</sup> Stoffe mit neuartigen Wirkmechanismen und Targets werden also dringend benötigt.

### **1.2.4 Entwicklung neuer Arzneistoffe gegen Malaria**

Eine wichtige Institution zur Förderung der Entwicklung neuer Arzneistoffe gegen Malaria ist Medicines for Malaria Venture (MMV). MMV ist eine 1999 in der Schweiz als Stiftung gegründete Non-Profit-Organisation. Ziel von MMV ist es, durch sogenannte Public Private Partnerships die Entdeckung, Entwicklung und Verbreitung von neuartigen effizienten Antimalariamitteln voranzutreiben.<sup>[44]</sup> Um dies zu erreichen ist ein Netzwerk mit aktuell 375 Partnern aus Industrie, Wissenschaft und Ländern mit endemischer Malaria entstanden.<sup>[45]</sup> Eines der Projekte ist die Malariabox, eine Bibliothek von 400 antiplasmodial aktiven Substanzen, die von Forschern bei MMV angefordert und zur Entwicklung neuer Wirkstoffe herangezogen werden kann.<sup>[46]</sup> In ihrem Global Malaria Portfolio zeigt MMV den Entwicklungsstand neuer wichtiger Arzneistoffe bzw. Arzneistoffkombinationen zur Bekämpfung von Malariainfektionen (s. Abbildung 2).<sup>[47]</sup>

# Global Malaria Portfolio, 2Q 2015

## Classified by therapeutic type

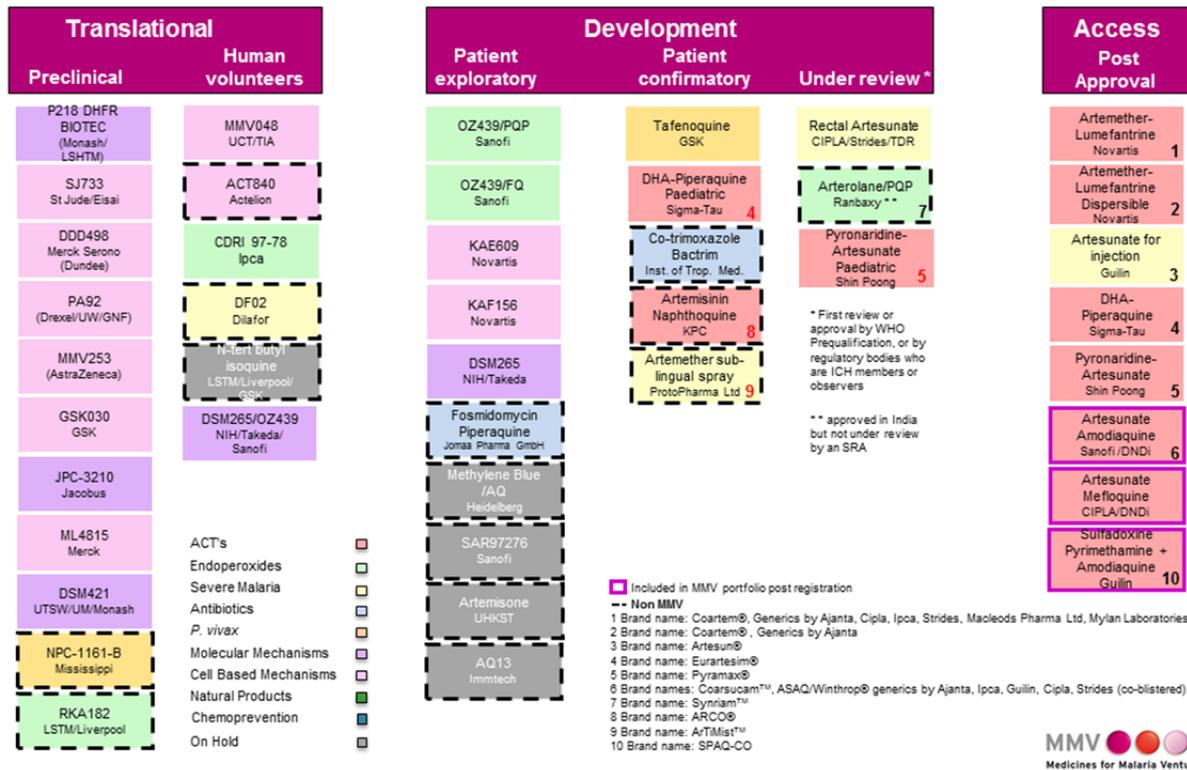
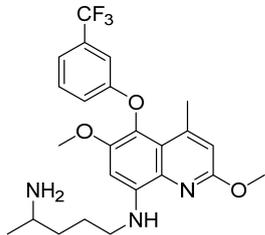
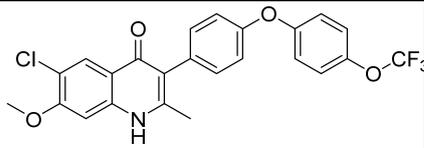
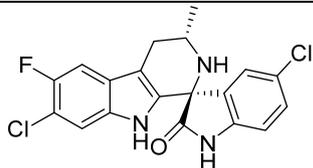
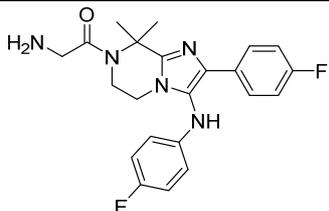
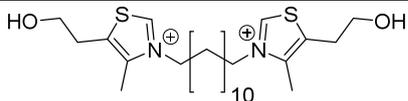
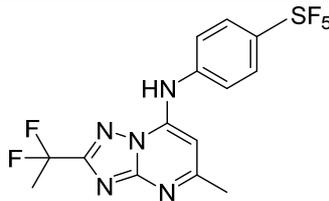
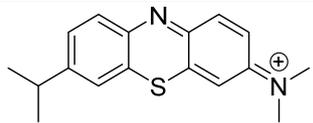


Abbildung 2 Global Malaria Portfolio 2. Quartal 2015.<sup>[47]</sup>

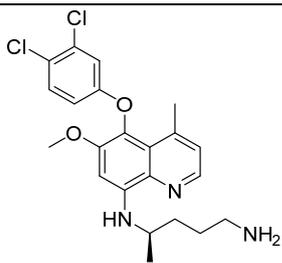
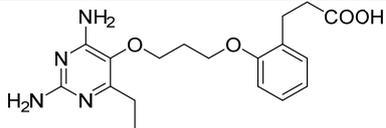
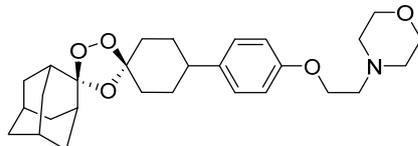
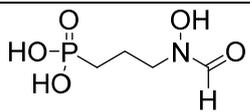
Das Malariaportfolio von MMV legt den Schwerpunkt auf Arzneimittel, die für den Gebrauch in Ländern mit endemischer Malaria besonders geeignet sind. Dies bedeutet, dass sie kostengünstig und gut zugänglich sein müssen. Zudem sollten sie gegen resistente *P. falciparum*-Stämme und gegen Hypnozoiten aktiv, für Kinder im Säuglingsalter und in der Schwangerschaft verträglich und zur Behandlung komplizierter Malaria sowie für die Transmissionsblockade geeignet sein.<sup>[47]</sup>

Tabelle 4 zeigt die Strukturen von Wirkstoffen mit antiplasmodialen Eigenschaften, die sich zurzeit generell in präklinischer und klinischer Entwicklung befinden. Die Mehrheit der bereits klinisch genutzten Antimalariamittel und der Arzneistoffe in klinischer Entwicklung adressiert den Hämoglobinabbau oder die Häm-Entgiftung, den Folsäurestoffwechsel und mitochondriale Biosynthesewege.<sup>[13]</sup> Screenings im Ganzzellassay (phänotypisches Screening) und Screenings an isolierten Proteinen (Target-basiertes Screening, Näheres hierzu s. Abschnitt 5) in Kooperation mit MMV führten zur Entdeckung von Substanzen mit neuartigen Wirkmechanismen. So inhibiert DSM265 die parasitäre Dihydroorotatdehydrogenase und KAE609 die parasitäre ATPase<sup>4</sup>. Auch das Antibiotikum

Fosmidomycin stellt, sowohl bezüglich des Targets als auch der Lokalisation des Targets, eine der wenigen neuartigen Ausnahmen dar (s. Abschnitt 1.3).

Name, klinische Phase	Struktur	Anmerkung
<b>Tafenoquin</b> (8-Aminoquinolin) <b>Phase III</b>		Primaquin-Analogen, das ebenfalls gegen Hypnozoiten aktiv ist <sup>[48]</sup>
<b>ELQ-300</b> (4(1H)-Chinolon-3-diarylether) <b>Präklinische Entwicklung</b> <sup>[49]</sup>		Aktiv gegen Chloroquin- und Atovaquon-resistente Parasiten in allen Vermehrungsstadien; Inhibition der parasitären Pyrimidin- Biosynthese <sup>[50]</sup>
<b>NITD609</b> , anderer Name: <b>KAE609</b> (Spiroindolon) <b>Phase II</b>		Inhibition von ATPase4 (Kationkanal für den Natrium-Efflux) <sup>[51]</sup>
<b>GNF156</b> , anderer Name: <b>KAF156</b> (Imidazol-Piperazin) <b>Phase II</b>		Wirkmechanismus unbekannt, aktiv gegen Blut-/Leberstadien und Transmissionsblockade <sup>[52]</sup>
<b>Albitiazolium</b> (Bisthiazolium) <b>Phase II</b>		Parenterale Gabe notwendig; Inhibition des Cholin-Imports in den Parasiten <sup>[53-54]</sup>
<b>DSM 265</b> (Triazolopyrimidin) <b>Phase I</b>		Inhibition der parasitären Dihydroorotat-dehydrogenase <sup>[55]</sup>
<b>Methylenblau</b> <b>Phase II</b>		In Kombination mit Dihydroartemisinin Schutz vor cerebraler Malaria; Inhibition der parasitären Monoaminoxidase und Glutathionreduktase und Hämolymerisation <sup>[56-57]</sup>

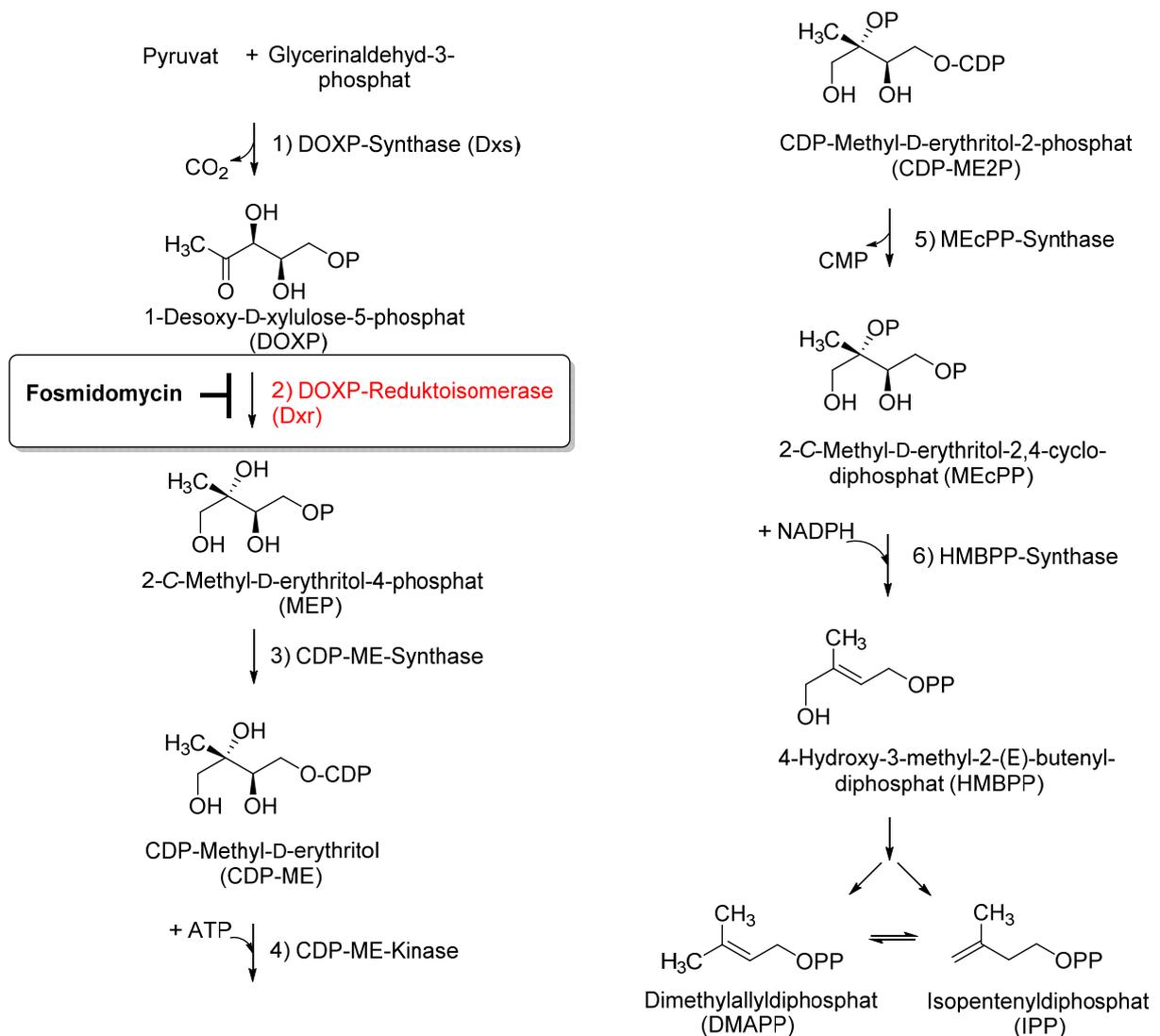
**Tabelle 4** Arzneistoffe mit antiplasmodialen Eigenschaften, die sich derzeit in klinischer und präklinischer Entwicklung befinden nach Kumar *et al.*<sup>[13]</sup> (Fortsetzung auf Seite 12).

Name, klinische Phase	Struktur	Anmerkung
<b>NPC-1161B</b> (8-Aminoquinolin)  <b>Präklinische Entwicklung</b>		Primaquingartige Verbindung, die gegen Leberstadien aktiv ist und Sporogonie inhibiert <sup>[58]</sup>
<b>P218</b> (Antifolat)  <b>Präklinische Entwicklung</b>		Inhibition der Dihydrofolat-Reduktase, wirkt auch bei Pyrimethamin-resistenten Parasiten
<b>OZ439</b> (Endoperoxid)  <b>Phase II</b>		Wirkt auch gegen Artemisinin-resistente Parasiten; inhibiert Gametenbildung und Sporogonie <sup>[59-61]</sup>
<b>Fosmidomycin</b>  Monotherapie: <b>Phase II</b> <sup>[62-63]</sup> + Clindamycin: <b>Phase II</b> <sup>[64-66]</sup> + Artesunat: <b>Phase II</b> <sup>[67]</sup> + Piperaquin: <b>Phase II</b>		Inhibition des Mevalonat-unabhängigen Biosynthesewegs

**Tabelle 4** Arzneistoffe mit antiplasmodialen Eigenschaften, die sich derzeit in klinischer und präklinischer Entwicklung befinden nach Kumar *et al.*<sup>[13]</sup> (Fortsetzung von Seite 11).

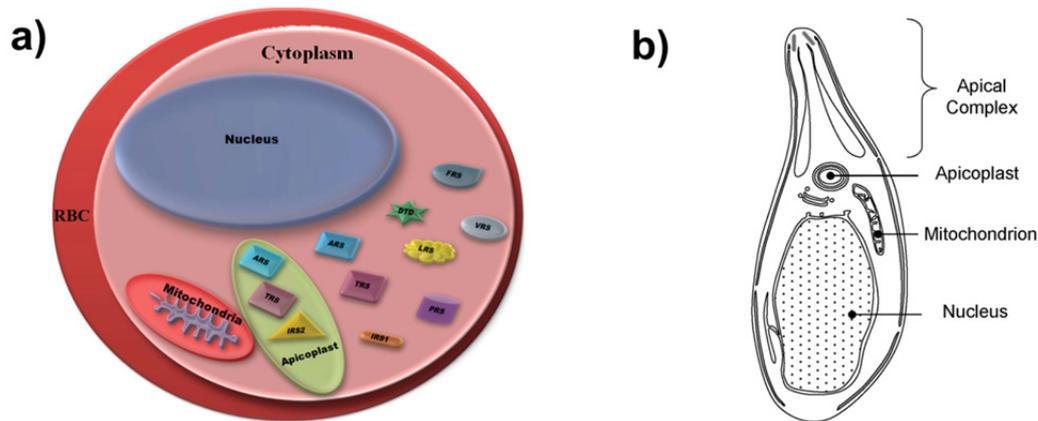
### 1.3 Fosmidomycin

Fosmidomycin ist ein natürliches Antibiotikum mit Phosphonohydroxamsäurestruktur, was Ende der 1970er Jahre aus *Streptomyces lavendulae* isoliert werden konnte.<sup>[68-69]</sup> Neben seinen antibiotischen Eigenschaften wirkt es herbizid und antiplasmodial. Es inhibiert das Enzym 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase (alternative Namen: Dxr, IspC, MEP-Synthase, DOXP-Reduktoisomerase).<sup>[70]</sup> Dieses Enzym katalysiert den zweiten Schritt im von Rohmer und Mitarbeitern 1993 entdeckten Mevalonat-unabhängigen Biosyntheseweg zur Generierung der C<sub>5</sub>-Isoprenoid-Vorstufen Isopentenylidiphosphat (IPP) und Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) (s. Abbildung 3).<sup>[70-73]</sup> Dieser Biosyntheseweg wird auch DOXP = 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Weg, MEP = 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat-Weg oder Rohmer-Weg genannt. Jomaa und Mitarbeiter entdeckten 1999, dass *P. falciparum* ebenfalls den MEP-Weg nutzt und dass Fosmidomycin IspC inhibiert.<sup>[74]</sup>



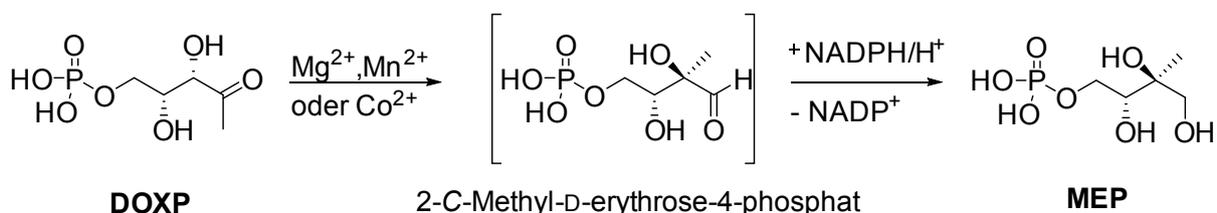
**Abbildung 3** Der Mevalonat-unabhängige Biosyntheseweg. Der  $\text{C}_2$ -Baustein Pyruvat und der  $\text{C}_3$ -Baustein Glycerinaldehyd-3-phosphat bilden die Ausgangsstoffe, während der MVA-Weg vom  $\text{C}_2$ -Baustein Acetat ausgeht.<sup>[73]</sup>

Der MEP-Weg kommt in Menschen nicht vor, wohl aber in Algen, Pflanzen, Apikomplexa wie Plasmodien und (pathogenen) Bakterien wie *Escherichia coli* und *Mycobacterium tuberculosis*.<sup>[75-77]</sup> Säugetiere nutzen wie die meisten Eukaryoten den Mevalonat-abhängigen Biosyntheseweg (MVA-Weg), um die Isoprenoid-Vorstufen zu generieren.<sup>[78]</sup> Die Enzyme des MEP-Wegs stellen ein attraktives Target für neue antiparasitäre, antibakterielle und herbizide Wirkstoffe dar, weil sie hochkonserviert vorliegen und es keine Homologien zu menschlichen Enzymen gibt.<sup>[78]</sup> Dies bedeutet, dass diese Wirkstoffe ein breites Wirkspektrum und gleichzeitig eine für den menschlichen Organismus geringe Toxizität aufweisen sollten.<sup>[75, 78-79]</sup> Bei *Plasmodium spp.* ist der MEP-Weg in einem speziellen plastidartigen Organell, dem Apikoplasten, lokalisiert<sup>[80]</sup> (s. Abbildung 4).



**Abbildung 4** Aufbau von *Plasmodium spp.* **a)** Erythrozyt mit Parasit (übernommen aus Khan 2011<sup>[81]</sup> (modifiziert); **b)** *P. falciparum* und seine drei DNA enthaltenden Organellen (Nukleus, Mitochondrien, Apikoplast) (übernommen aus Botté 2011<sup>[82]</sup> (modifiziert)).

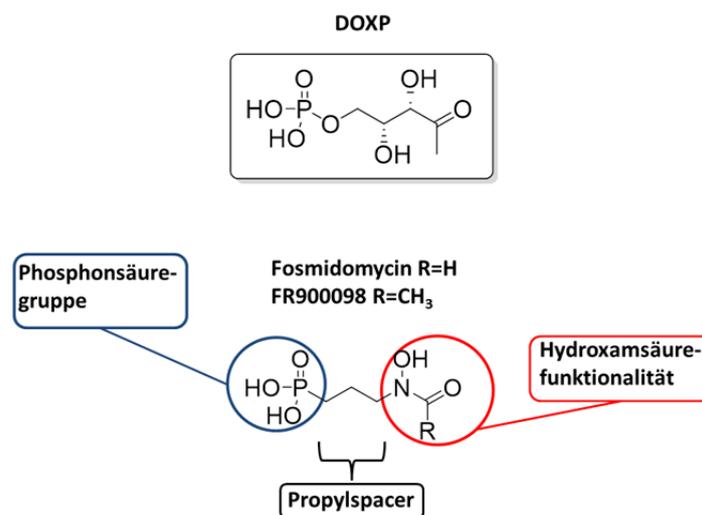
Der Apikoplast besitzt zumeist vier Membranen und während der erythrozytären Phase des Parasitenlebens besteht seine wesentliche Funktion darin, Isoprenoide zu synthetisieren.<sup>[83-85]</sup> Für intraerythrozytäre Lebensstadien der Plasmodien sind der MEP-Weg und somit das Enzym IspC essenziell für das Überleben.<sup>[85-86]</sup> Die DOXP-Reduktoisomerase katalysiert die Umsetzung von DOXP über das postulierte Intermediat 2-C-Methylerythrose-4-phosphat zu MEP (s. Abbildung 5). Dieser Vorgang benötigt die Anwesenheit von NADPH und eines der zweiwertigen Metallionen  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  oder  $Co^{2+}$ .<sup>[70]</sup> Die Umsetzung erfolgt in zwei Schritten, der Umlagerung von DOXP zu 2-C-Methylerythrose-4-phosphat und der NADPH-abhängigen Reduktion dieses Intermediats zu MEP. Für den ersten Schritt, die Umlagerungsreaktion, wurden Theorien wie etwa eine  $\alpha$ -Ketol-Umlagerung oder eine Retroaldol-Umlagerung für den Mechanismus aufgestellt, aber bisher keine zweifelsfrei bewiesen.<sup>[70]</sup> Beim zweiten Schritt, der Reduktion, wird das pro-S-Hydrid des NADPHs auf die re-Seite des Aldehyds übertragen.<sup>[70]</sup> Das zweiwertige Metallkation dient wahrscheinlich bei beiden Reaktionsschritten der Orientierung und Polarisierung von DOXP bzw. des Intermediats.<sup>[87-88]</sup>



**Abbildung 5** Die von IspC katalysierte Umsetzung zu MEP (modifiziert nach Proteau, 2004<sup>[70]</sup>).

Fosmidomycin ist ein langsamer, stark bindender IspC-Inhibitor<sup>[89]</sup>, der als Analogon des Substrats DOXP fungiert<sup>[90]</sup> und als kompetitiver Inhibitor gegenüber diesem an IspC

agiert<sup>[89]</sup>. Seine Struktur kann in drei Subgruppen unterteilt werden. Es besteht aus einer Phosphonsäurefunktion, die über einen Propylspacer aus drei  $sp^3$ -hybridisierten Kohlenstoffatomen mit einer metallchelatisierenden Hydroxamsäurefunktionalität verbunden ist (s. Abbildung 6). Der Ersatz der Phosphatgruppe des Substrats durch die Phosphonsäuregruppe Fosmidomycins führt zu einer höheren (metabolischen) Stabilität. Die Hydroxamsäuregruppe Fosmidomycins ahmt die  $\alpha$ -Hydroxyketonstruktur des DOXP nach.<sup>[90]</sup> Bei FR900098 handelt es sich um das Acetylanalogon von Fosmidomycin. Es ist ebenfalls ein Antibiotikum und stellt zusammen mit Fosmidomycin einen der ersten bekannten Inhibitoren der DOXP-Reduktoisomerase dar.<sup>[74, 91]</sup>



**Abbildung 6** Gegenüberstellung der Strukturen von DOXP und Fosmidomycin.

Fosmidomycin geht substratanaloge Wechselwirkungen mit dem aktiven Zentrum des IspC-Enzyms ein. Die Struktur von IspC und die Wechselwirkungen zwischen Enzym und Inhibitor werden in Abschnitt 4 genauer erläutert. Hier sei nur kurz erwähnt, wie die Region des Enzyms für die Substratbindung aufgebaut ist, an die auch Fosmidomycin bindet. Sie verfügt über eine Bindetasche für die Phosphonsäurefunktion, die zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken mit der Phosphonsäuregruppe befähigt ist. Außerdem gibt es eine hydrophobe Binderegion für den Kohlenstofflinker und eine Bindetasche für die Hydroxamsäuregruppe und das divalente Metallkation.<sup>[92]</sup>

Fosmidomycin ist für Menschen untoxisch, auch in hohen Dosen gut verträglich, akkumuliert nicht im Serum und es wird hauptsächlich renal eliminiert, wobei es unmetabolisiert ausgeschieden wird.<sup>[93-94]</sup> Es kann humane Malariainfektionen heilen, wie Phase II-Studien mit an unkomplizierter *P. falciparum*-Malaria erkrankten Erwachsenen belegen.<sup>[62-63]</sup> Jedoch erwies sich eine Monotherapie mit Fosmidomycin als nicht sinnvoll, da Rezidive auftraten,

die mit der ungünstigen Pharmakokinetik des Wirkstoffs (s. unten) erklärt wurden.<sup>[62-63, 95]</sup> Fosmidomycin wurde in klinischen Studien (Phase II) erfolgreich als Kombinationspartner beispielsweise mit Clindamycin und Artesunat eingesetzt.<sup>[64-67, 96]</sup> Aktuell ist eine Kombinationstherapie aus Fosmidomycin und Piperaquin in klinischer Entwicklung.<sup>[47]</sup> Bei Fosmidomycin ist zudem keine Kreuzresistenz mit den klinisch eingesetzten Antimalariamitteln zu erwarten, da sich sein Target von dem der übrigen Wirkstoffe unterscheidet. Demgegenüber stehen die Nachteile Fosmidomycins. So zeigt es keine signifikante Aktivität gegenüber den Leberstadien oder geschlechtlichen Stadien des Parasiten Plasmodium, die aber zur Eliminierung von Hypnozoiten und für die Transmissionsblockade notwendig ist.<sup>[8]</sup> Zudem zeigt Fosmidomycin pharmakokinetische Defizite. Bei peroraler Gabe beträgt die Bioverfügbarkeit etwa 30 % und es besitzt eine Plasmahalbwertszeit von 1.87 h.<sup>[93-94]</sup>

Zusammengefasst bedeutet dies für die klinische Wirkung Fosmidomycins: Die Wirkung tritt früh ein und die Behandlung führt schnell zu einer Reduktion der Parasitämie und somit zu einer verringerten Anzahl von Fieberschüben.<sup>[95]</sup> Eine vollständige Elimination der Parasiten wird aber nicht erreicht. Dieses klinische Wirkprofil entspricht dem der Artemisinine, die ebenfalls schnell wirken und die deswegen mit länger wirkenden Arzneistoffen (ACT, s. Abschnitt 1.2.3) kombiniert werden. Fosmidomycin kann somit als potentieller Ersatz für die Artemisinine angesehen werden, die wegen der fortschreitenden Resistenzentwicklung in Zukunft voraussichtlich für die Behandlung von Malaria-Infektionen an Bedeutung verlieren werden.

Zur Verbesserung der pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften haben viele Arbeitsgruppen die Struktur Fosmidomycins variiert. Dies soll im folgenden Abschnitt vorgestellt werden.

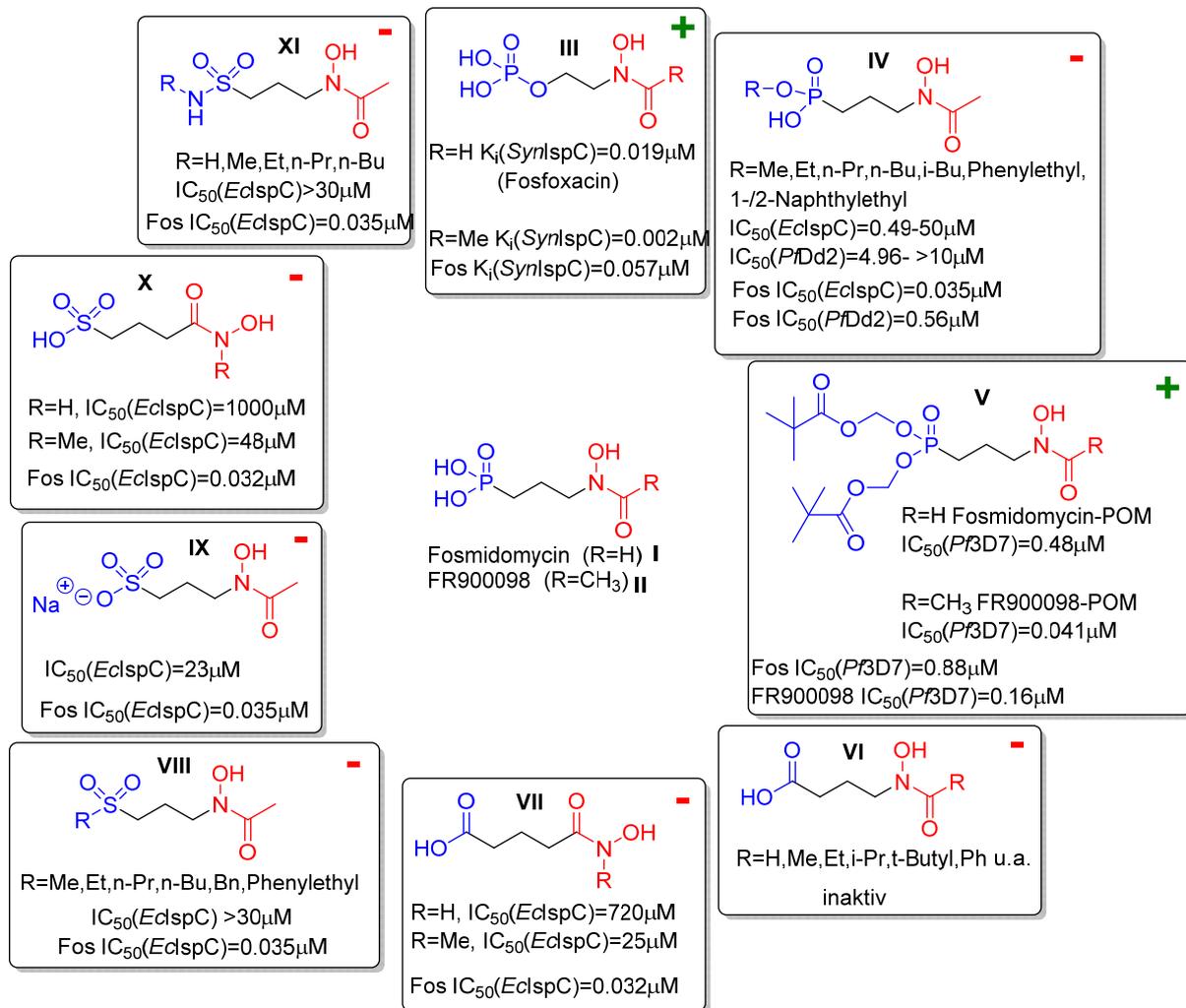
#### **1.4 Strukturvariationen von Fosmidomycin**

Die Leitsubstanz Fosmidomycin ist an allen drei Substrukturen in Form von Derivatisierung oder Austausch der jeweiligen funktionellen Gruppe modifiziert worden. Es folgt ein Überblick über die Variationen, unterteilt nach Modifizierung der Phosphonsäurefunktion, der Hydroxamsäurefunktionalität und des Propylspacers. Von den hier vorgestellten strukturmodifizierten Verbindungen werden die Daten der *in vitro*-Testung gegenüber IspC-Enzymen und der *in vitro*-Wachstumshemmung von Plasmodienstämmen besprochen (Target-basiertes und phänotypisches Screening, s. auch Abschnitt 5). Von fast allen Verbindungen

sind nur *in vitro*-Daten und keine *in vivo*-Untersuchungen publiziert worden. Da die Testungen an unterschiedlichen IspC-Enzymen erfolgten wie *Escherichia coli* IspC (*EcIspC*), *Synechocystis* IspC (*SynIspC*) oder *Plasmodium falciparum* IspC (*PfIspC*) und zudem an unterschiedlichen Plasmodienstämmen wie z.B. *Pf3D7* und *PfK1*, ist die Datenlage sehr uneinheitlich. Vergleichbarkeit ist somit nicht immer gegeben. Deshalb ist als Bezugswert das Ergebnis von Fosmidomycin bzw. FR900098 aus der jeweiligen Testreihe der entsprechenden Publikation angegeben.

#### **1.4.1 Modifizierung der Phosphonsäurefunktionalität**

Abbildung 7 zeigt Strukturvariationen der Phosphonsäurefunktion. Der Ersatz der Phosphonsäuregruppe durch eine andere Säurefunktion wie eine Carbonsäure- (**VI**, **VII**) oder Sulfonsäurefunktionalität (**IX**, **X**) führt zu Aktivitätsverlusten gegenüber *EcIspC*.<sup>[97-99]</sup> Umeda stellte hierzu vor dem Hintergrund von Kristallstrukturanalysen von Fosmidomycin an IspC die folgenden Überlegungen an.<sup>[92]</sup> Phosphonate weisen eine pyramidale Struktur auf, während Carboxylate planar sind. Diese unterschiedliche Geometrie kann ein Grund für die verringerte Affinität zum Enzym sein. Ein wichtiger Unterschied zwischen Carboxylaten und Sulfonsäuren wiederum liegt in der Länge der C-P- bzw. P-O-Bindungen im Vergleich zur Länge der C-S- bzw. S-O-Bindungen. Diese sind in der Sulfonsäure länger und könnten so eine ideale Bindung des Inhibitors im Enzym beeinträchtigen. Zudem bildet die Phosphonsäurefunktion mit der Bindetasche des aktiven Zentrums ein dichtes Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen aus (zu Kristallstrukturanalysen und Wechselwirkungen zwischen Inhibitor und Enzym s. Abschnitt 4). Außerdem ist festzuhalten, dass eine zweifache negative Ladung an der Phosphonsäure für eine optimale Bindung an das Enzym wichtig ist. So zeigen die Phosphonsäuremonoester **IV** eine deutlich niedrigere Aktivität als Fosmidomycin.<sup>[98]</sup>

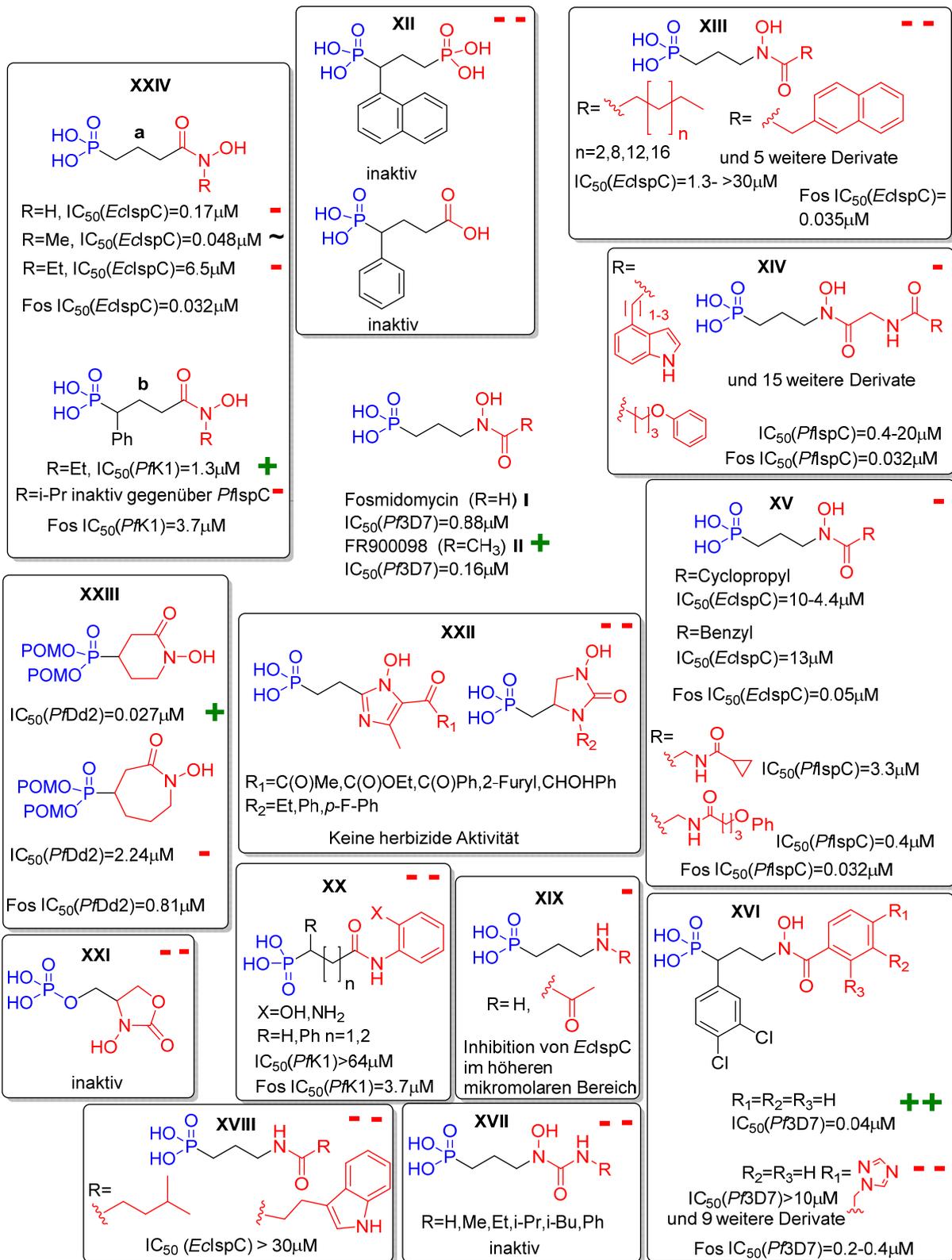


**Abbildung 7** Variation der Phosphorsäurefunktionalität.

Das Phosphorsäure-Analogon Fosfoxacin und sein *N*-Acetyl-Derivat **III** zeigen im Vergleich zu Fosmidomycin eine verbesserte Aktivität, was am IspC-Enzym von *Synechocystis* evaluiert wurde. Der Monophosphat-Ester von **III** wird allerdings durch Phosphatasen *in vivo* rasch hydrolysiert.<sup>[92]</sup> Die andere Modifizierung, die zu einer Aktivitätssteigerung gegenüber Fosmidomycin führt, ist der Einsatz von Prodrugs. Beispielsweise wurden von Fosmidomycin und FR900098 die Bispivaloyloxymethylester (Bis-POM-Ester) **V** entwickelt.<sup>[100]</sup> Prodrugs wie diese zeigen häufig eine erhöhte antiplasmodiale Aktivität im Vergleich zu ihren Muttersubstanzen. Dies wird mit der erleichterten Penetration von Membranen auf dem Weg zum Zielenzym begründet, da die Prodrugs eine höhere Lipophilie aufweisen als die freien Säuren.<sup>[100]</sup>

#### **1.4.2 Modifizierung der Hydroxamsäurefunktionalität**

Unterschiedliche Möglichkeiten zur Modifizierung bzw. zum Austausch der Hydroxamsäurefunktion werden in Abbildung 8 gezeigt.



**Abbildung 8** Variation der Hydroxamsäurefunktionalität (Auswahl).

Der Austausch der Hydroxamsäurefunktionalität gegen eine Carbon- oder Phosphonsäurefunktion (**XII**) führt zur Inaktivität.<sup>[101-102]</sup> Bei den Analoga **XIII-XVI** liegt eine Derivatisierung der Hydroxamsäurefunktionalität durch Einführen größerer Substituenten

am Acylrest vor. Dies führt nur bei dem Phenyl-substituierten Derivat **XVI** zu einer Aktivitätssteigerung.<sup>[103]</sup> Alle übrigen Analoga zeichnen sich durch z. T. starke Aktivitätsverluste bis hin zur Inaktivität aus.<sup>[103-105]</sup>

Die Analoga **XVII-XX** verfügen über andere chelatisierende Gruppen anstelle der Hydroxamsäurefunktionalität.<sup>[105-108]</sup> Diese wurde durch einen Hydroxyharnstoff (**XVII**<sup>[106]</sup>), eine Benzamidfunktionalität (**XX**<sup>[107]</sup>) und eine Amidfunktion (**XVIII**<sup>[105]</sup>) ausgetauscht. Bei **XIX** liegt die Hydroxamsäure als Fragment in Form einer Amino- oder Acetamidofunktionalität vor.<sup>[108]</sup> Bei all diesen funktionellen Gruppen tritt ein Aktivitätsverlust ein. Eine weitere Möglichkeit zur Modifizierung der Hydroxamsäure ist die Inkorporation dieser in ein zyklisches System (**XXI-XXIII**). Das zyklische *N*-Hydroxycarbamat **XXI** ist inaktiv<sup>[108]</sup>, was aber auch in der Instabilität der Phosphatfunktion begründet sein kann. Die in unterschiedlichen Ringgrößen und unter Inkorporation des Spacers vorliegenden zyklischen Hydroxamsäuren **XXIII** verfügen über eine Bis-POM-Ester-Struktur.<sup>[109]</sup> Während das 6-Ring-Derivat antiplasmodial aktiver ist als Fosmidomycin, zeigt das 7-Ring-Analogon einen deutlichen Aktivitätsverlust. Offen bleibt, ob die Aktivitätssteigerung gegenüber Fosmidomycin durch die lipophilen Bis-POM-Gruppen oder durch die Hydroxamsäure im Ringsystem bedingt ist. Bei den Analoga der **XXII**-Reihe handelt es sich um einen zyklischen Hydroxyharnstoff und ein *N*-Hydroxy-Imidazolderivat. Leider wurden diese Derivate nur auf ihre herbizide Aktivität hin untersucht, die bei beiden Derivaten nicht vorhanden war.<sup>[110]</sup>

Als letzte Strategien zur Modifizierung der Hydroxamsäuregruppe sollen hier die Inversion der Hydroxamsäurefunktionalität und die Substitution inverser Hydroxamsäuren in *N*-Position vorgestellt werden (**XXIV**). *Rohmer* berichtete 2005 über die Synthese und Eigenschaften von Fosmidomycin-Analoga mit retroisosterer Hydroxamsäurefunktion (**XXIVa**).<sup>[111]</sup> Das *N*-Methyl-substituierte Derivat der **XXIVa**-Reihe zeigt eine ähnlich hohe inhibitorische Aktivität gegenüber *EcIspC* wie Fosmidomycin. Die *N*-Methyl-substituierten inversen Phosphonohydroxamsäuren **XXV** mit modifizierter Kettenlänge (s. nächster Abschnitt) zeigen ebenfalls höhere Aktivitäten als ihre unsubstituierten Analoga.<sup>[99]</sup> FR900098, das anstelle des Formylprotons eine Methylgruppe trägt, weist an verschiedenen *IspC*-Enzymen und gegenüber Plasmodien eine höhere Aktivität auf als Fosmidomycin.<sup>[74, 100]</sup> *Umeda* erklärte den aktivitätssteigernden Einfluss eines Methylsubstituenten an der Hydroxamsäurefunktion mit zusätzlichen Wechselwirkungsmöglichkeiten zwischen diesem und dem Enzym. Außerdem stabilisiert der Rest die für die Chelatisierung des Metallions notwendige Konformation der Hydroxamsäuregruppe (s. Abschnitt 4).<sup>[92]</sup> *Behrendt* und

*Brücher* gelang es, hochpotente  $\alpha$ -Aryl-substituierte Fosmidomycin-Analoga mit retroisosterer Hydroxamsäurefunktionalität zu synthetisieren (s. unten und Abschnitt 5.2).<sup>[102, 107, 112-114]</sup> Auch bei den Analoga dieser beiden Autoren zeigt sich der Trend, dass die Enzym-inhibitorische und antiplasmodiale Aktivität *N*-Methyl-substituierten Phosphonohydroxamsäuren höher ist (Näheres hierzu in Kapitel 5.8). Größere Substituenten wie ein Isopropyl-Rest verringern die Aktivität. Allerdings ist zu bemerken, dass in einem *in vivo*-Versuch mit *P. berghei* infizierten Mäusen ein nicht am Stickstoff substituiertes Analogon die besten Ergebnisse erzielte. Es war ähnlich aktiv wie die Vergleichssubstanz Chloroquin<sup>[114]</sup> (s. hierzu die Ausführungen unter 1.4.3 „ $\alpha$ -Aryl-substituierte Fosmidomycin-Analoga mit inverser Hydroxamsäurefunktionalität“).

### **1.4.3 Modifizierung der Spacerregion**

Abbildung 9 zeigt eine Auswahl von Modifizierungen der Spacerregion. Durch die Synthese der Fosmidomycin-Analoga **XXV** mit unterschiedlichen Längen der Kohlenstoffkette konnten *Rohmer et al.* die ideale Länge dieser Linkerregion feststellen.<sup>[99]</sup> Diese liegt bei 3 Kohlenstoffatomen, wie dies auch bei Fosmidomycin selbst vorliegt. Längere und kürzere Derivate sind deutlich schwächer aktiv, was dadurch erklärt wird, dass eine zu kurze Kette ein gleichzeitiges Binden des Inhibitors an der Phospon- und Hydroxamsäurebindestelle verhindert. Zu lange Inhibitoren können nicht optimal binden.<sup>[92]</sup> Eine weitere Modifizierung des Spacers ist das Einführen eines Sauerstoffatoms (**XXVI**), wobei sich eine  $\beta$ -oxa-Substitution in Verbindung mit einer *N*-Methyl-substituierten, retroisosteren Hydroxamsäuregruppe als besonders aktivitätssteigernd erwiesen hat.<sup>[115]</sup> Zusätzliche Modifizierungen, die zu Aktivitätsverlusten oder maximal ähnlicher Aktivität wie Fosmidomycin geführt haben, sind Cyclopentyl-<sup>[116]</sup> (**XXVII**) und Cyclopropylreste<sup>[117]</sup> (**XXVIII**) sowie die Einführung von Doppelbindungen<sup>[118]</sup> (**XXIX**). *Kurz et al.* entwickelten mit den Derivaten **XXXIII** Bis-POM-Ester Fosmidomycins, bei denen das  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kohlenstoffatom in einem Phenylring inkorporiert vorliegen.<sup>[119]</sup> Dies führte zu einem deutlichen Aktivitätsverlust gegenüber dem Bis-POM-Ester Fosmidomycins. Die Analogatypen **XXXI-XXXIV** und **XXXVI-XXXIX** tragen Substituenten in  $\alpha$ -Position bei sonst unverändertem Kohlenstoffspacer. Halogensubstituenten<sup>[120]</sup> sowie eine Azidfunktion<sup>[121]</sup> haben einen aktivitätssteigernden Einfluss. Auch Aryl- (**XXXIV**<sup>[116, 122]</sup>) und einige Heteroarylsubstituenten (**XXXVIII**<sup>[123]</sup>, **XXXIX**<sup>[121]</sup>) wirken sich positiv auf die Aktivität aus. Interessanterweise führen aromatische Systeme mit Benzoylamino- bzw. Phenylharnstoff-Struktur (**XXXV**, **XXXVI**)<sup>[101, 121]</sup> zu sehr stark verminderter Aktivität. Das

$\alpha$ -Phenylsubstituierte Analogon **XXXV** ist inaktiv. Dies ist aber auf seinen verlängerten Kohlenstoffspacer zurückzuführen.<sup>[101]</sup>

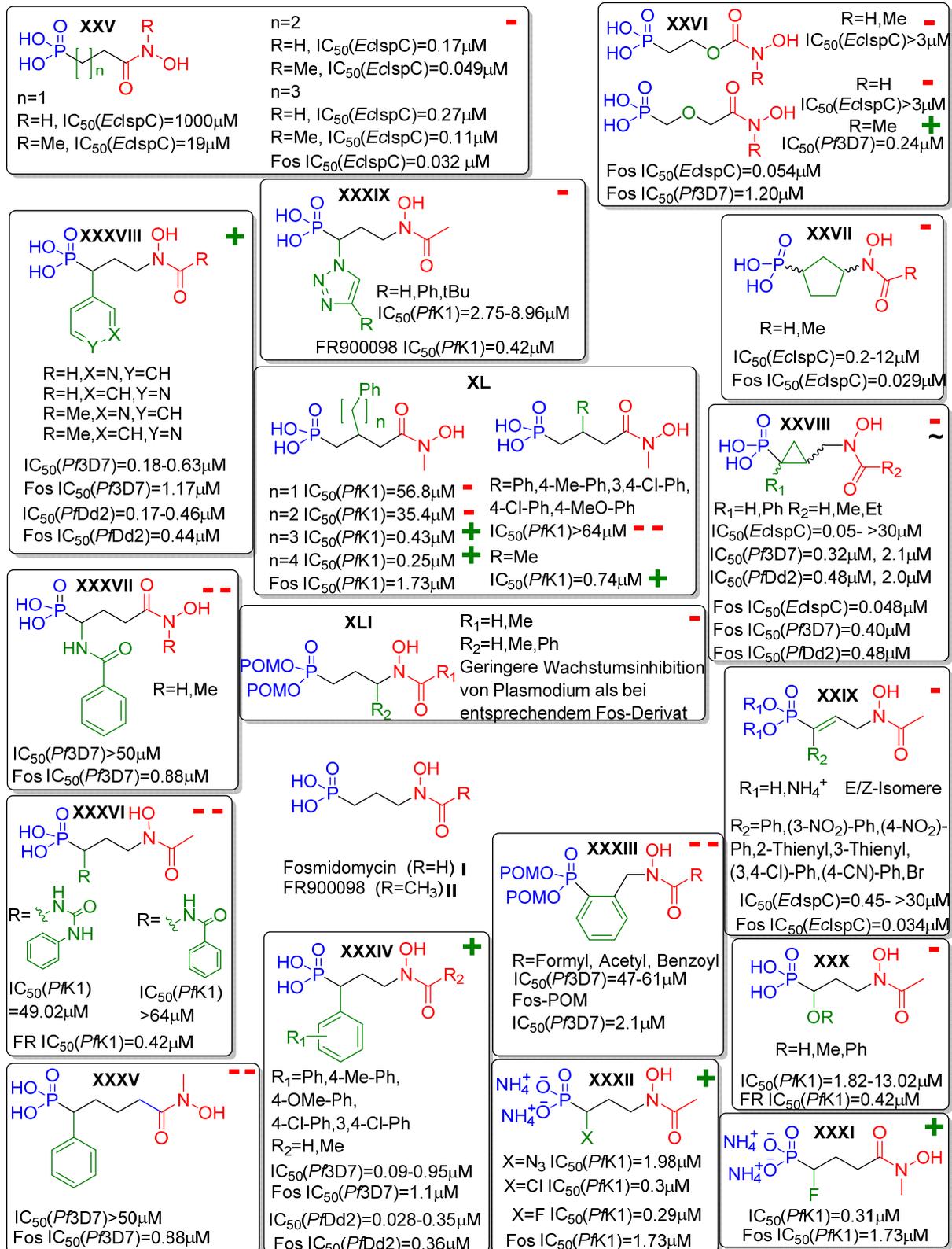
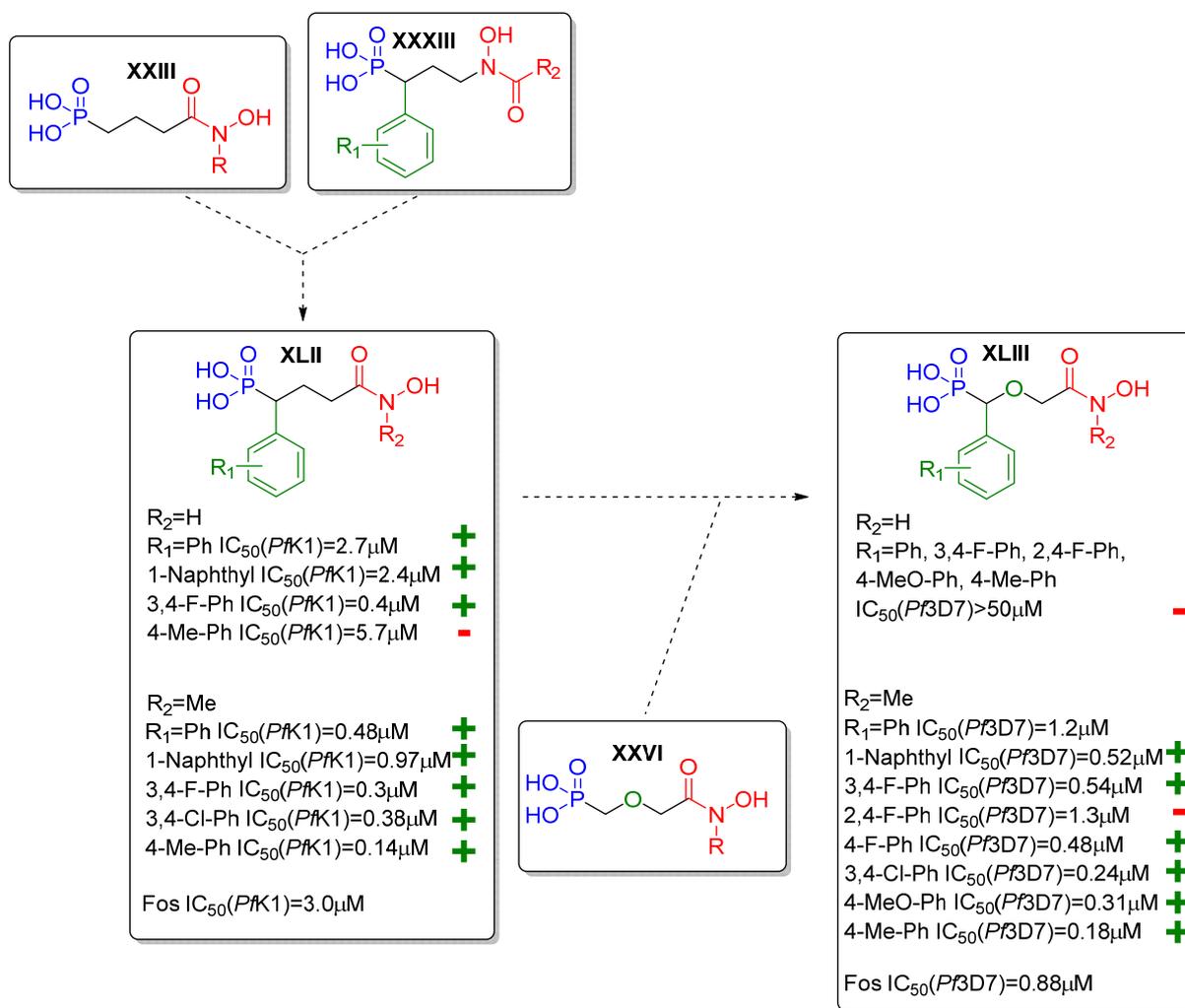


Abbildung 9 Variation der Spacerregion (Auswahl).

*Van Calenbergh* und Mitarbeiter entwickelten auch die Derivate **XL**, die in  $\beta$ -Position substituiert sind.<sup>[124]</sup> Phenylpropyl- und Phenylbutylsubstituenten sowie ein einfacher Methylrest konnten hier eine Aktivitätssteigerung bewirken, während kürzere Phenylalkylketten und Aromaten ohne Alkylrest zu einer Verschlechterung führten. Die von *Kurz et al.* entwickelten Bis-POM-Ester Fosmidomycins **XLI** sind in  $\gamma$ -Position mit Methyl- oder Phenylresten substituiert. Als Bezugssubstanz für die biologische Evaluation diente das  $\alpha$ -Phenyl-substituierte Bis-POM-Fosmidomycin. Alle Derivate zeigen eine geringere Wachstumsinhibition von Plasmodien als die Bezugssubstanz.<sup>[125]</sup>

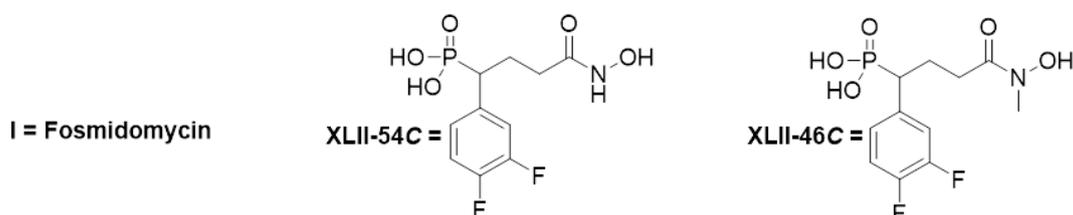
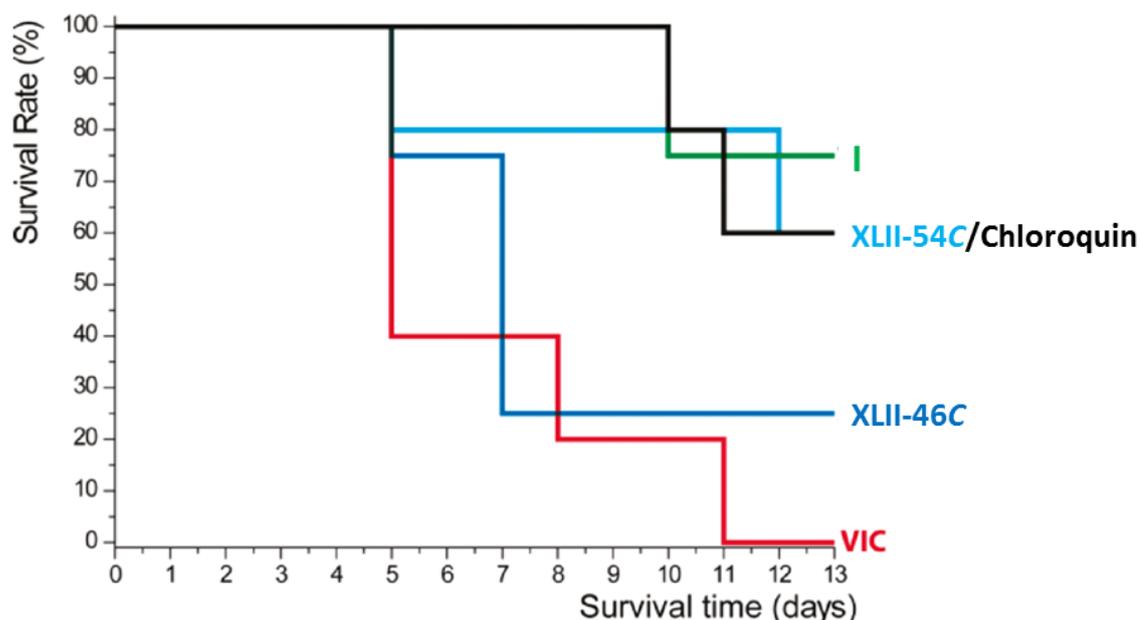
### $\alpha$ -Aryl-substituierte Fosmidomycin-Analoga mit inverser Hydroxamsäurefunktionalität



**Abbildung 10** Entwicklung  $\alpha$ -Aryl-substituierter Fosmidomycin-Analoga mit inverser Hydroxamsäurestruktur.

Durch die Kombination zweier Strukturvariationen, der Inversion der Hydroxamsäurefunktionalität und der Substitution des Spacers mit Arylresten in  $\alpha$ -Position, konnte *Behrendt* die hochpotenten Fosmidomycin-Analoga **XLII** generieren (s. Abbildung

10).<sup>[102, 113-114]</sup> Deren antiplasmodiale *in vitro*-Aktivität, evaluiert am PfK1-Stamm, übersteigt die Fosmidomycins um das bis zu 20-fache. Zur Evaluation der antiplasmodialen Aktivität *in vivo* wurden zwei Verbindungen an mit *P. berghei* infizierten Mäusen getestet (s. Abbildung 11). Eine der Testsubstanzen (in Abbildung 11 „16b“) zeigte eine ähnliche Effektivität wie Chloroquin und Fosmidomycin.



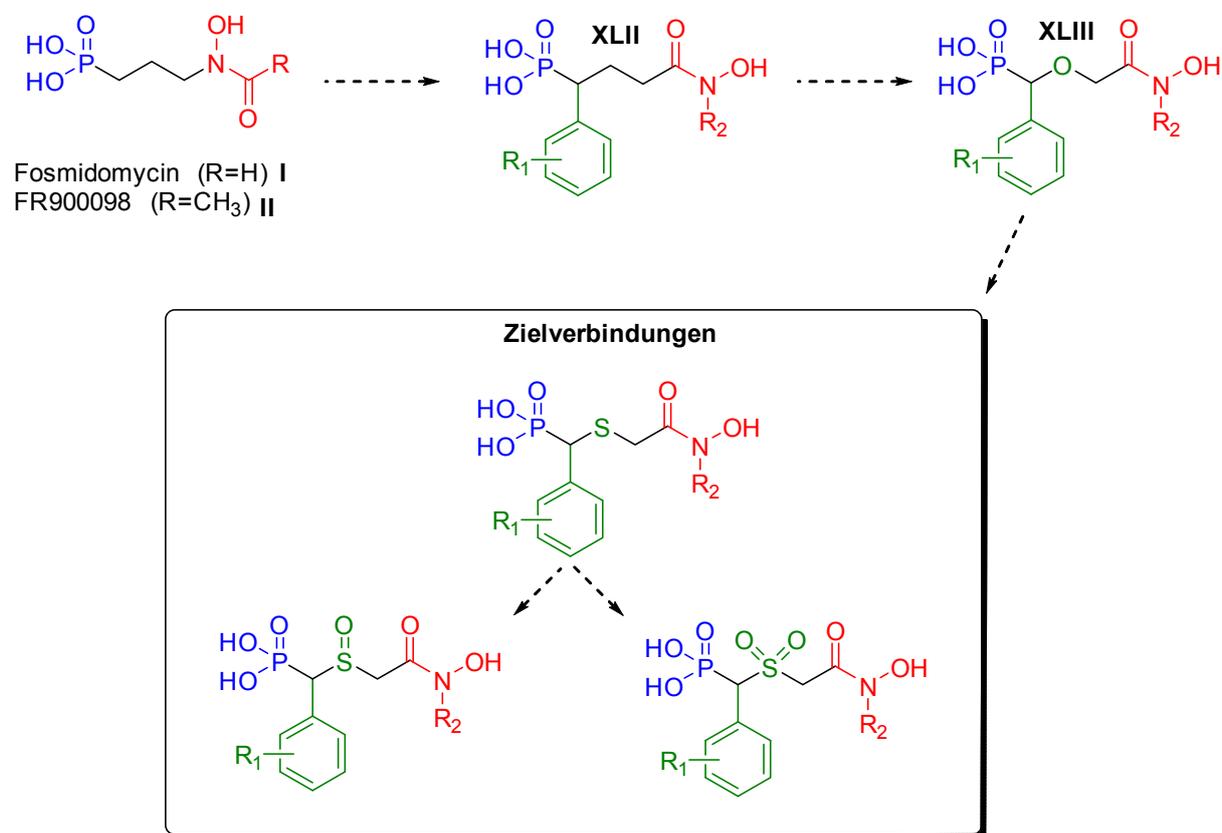
**Abbildung 11** Kaplan-Meier-Darstellung der Ergebnisse des *in vivo*-Experiments an mit *P. berghei* infizierten Mäusen. Alle Substanzen wurden an 5 aufeinanderfolgenden Tagen intraperitoneal appliziert; rot = Kontrolle; schwarz = Behandlung mit Chloroquin (10 mg\*kg<sup>-1</sup>); grün = Behandlung mit Fosmidomycin (80 mg\*kg<sup>-1</sup>); hellblau = Behandlung mit XLII-54C (80 mg\*kg<sup>-1</sup>); dunkelblau = Behandlung mit XLII-46C (80 mg\*kg<sup>-1</sup>) (übernommen aus Behrendt 2011<sup>[114]</sup> (modifiziert)).

Ausgehend von diesen Erkenntnissen wurde von Brücher dieser potente Analogtyp mit einem  $\beta$ -oxa-Substituenten kombiniert. Es war bekannt, dass  $\beta$ -oxa-Analoga Fosmidomycins eine größere antiplasmodiale Wirksamkeit *in vitro* aufweisen als Fosmidomycin. Die Einführung der  $\beta$ -oxa-Funktion sollte die für die Enzymbindung essenzielle Deprotonierung der Phosphonsäuregruppe erleichtern. Durch die Kombination beider Struktur motive entstanden die  $\alpha$ -Aryl-substituierten,  $\beta$ -oxa-isosteren Fosmidomycin-Analoga mit inverser Hydroxamsäurefunktionalität XLIII.<sup>[107, 112]</sup> Dies sollte zu einer neuen, potenteren Klasse von IspC-Inhibitoren führen. Mit Ausnahme der nicht am Stickstoff substituierten

Hydroxamsäuren zeigt auch die Mehrzahl der Verbindungen dieses Typs eine höhere antiplasmodiale Aktivität als Fosmidomycin selbst. So übersteigt die antiplasmodiale Aktivität am Pf3D7-Stamm der potentesten Verbindung die Fosmidomycins um das 5-fache. Eine nähere Betrachtung der antiplasmodialen und Enzym-inhibitorischen Potenz unterschiedlicher Analogtypen findet in Kapitel 5.8 statt. Die Verbindungen des von *Behrendt* entwickelten Analogtyps **XLII** werden nachfolgend als „Carba-Isostere“ bezeichnet und die von *Brücher* synthetisierten Analoga **XLIII** „Oxa-Isostere“.

## 1.5 Aufgabenstellung

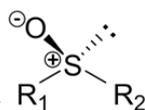
Basierend auf diesen Ergebnissen sollte ein neuer potenter IspC-Inhibitortyp entwickelt werden (s. Abbildung 12).



**Abbildung 12** Entwicklung  $\alpha$ -Aryl-substituierter  $\beta$ -thia-isosterer Fosmidomycin-Analoga mit inverser Hydroxamsäurestruktur\*.

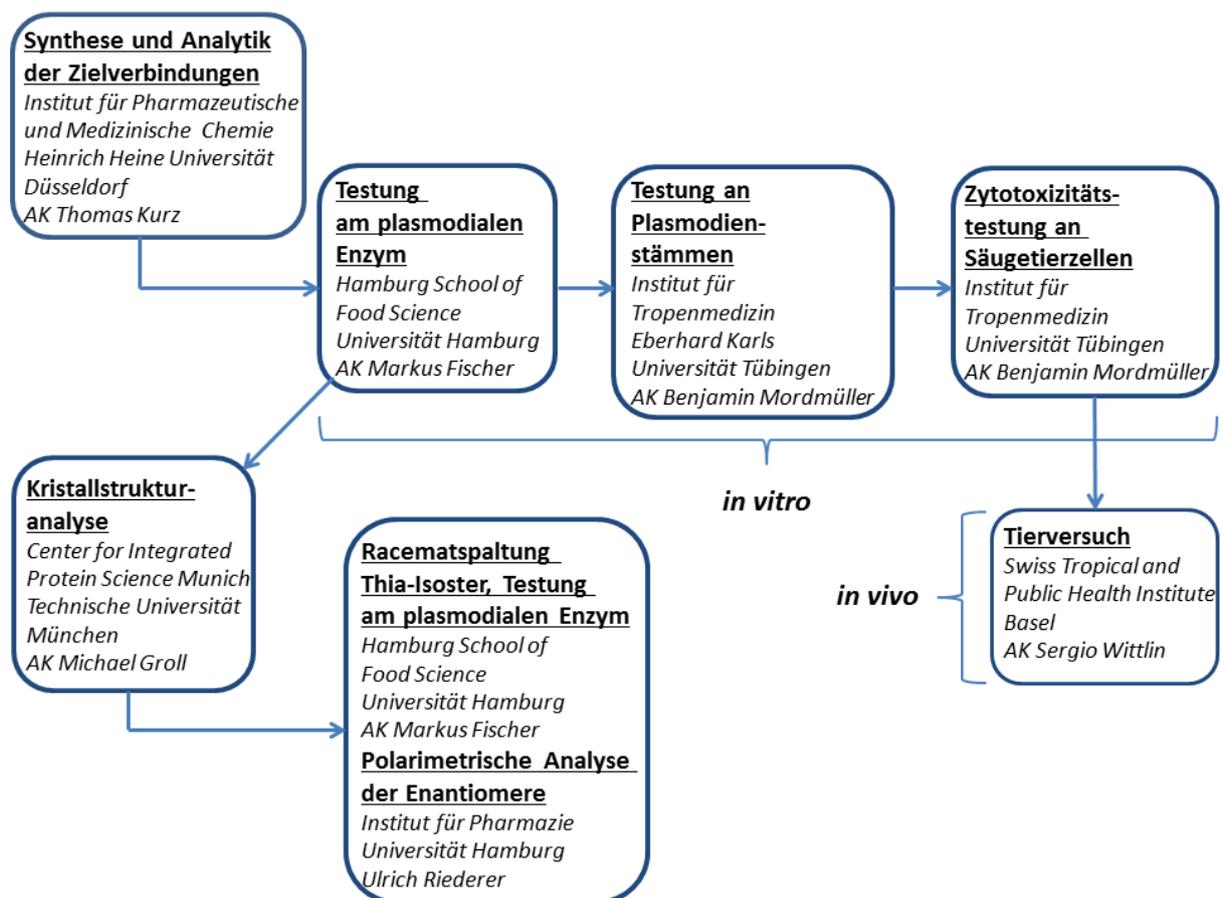
Die Struktur sollte sich hierbei von dem Grundtyp der von *Behrendt* entwickelten Carba-Isostere ableiten, da dieses Strukturmotiv zu hochpotenten Inhibitoren des IspC-Enzyms und

\* Alternative Schreibweise der Sulfoxidfunktion:



des Parasitenwachstums geführt hat. *Brücher* hat durch das Einführen eines Sauerstoffatoms in  $\beta$ -Position einen Verbindungstyp erhalten, der zwar ebenfalls potent ist, aber schwächer wirksam als die Carba-Isostere. Ein anderes Heteroatom in dieser Position sollte zu einem neuen Isostertyp mit anderen Eigenschaften führen. Besonders interessant ist die Substitution mit einem Schwefelatom, da über die Generierung der Sulfide hinaus noch die Entwicklung anderer Substanzklassen möglich ist. So können durch Oxidation der Sulfidstruktur Sulfone und Sulfoxide gewonnen werden. Ziel dieser Arbeit ist somit die Synthese und analytische Charakterisierung  $\alpha$ -Aryl-substituierter,  $\beta$ -thia-isosterer Fosmidomycin-Analoga mit inverser Hydroxamsäurefunktion.

Im Anschluss an die Synthese und Analytik der Zielverbindungen sollte der neue Verbindungstyp einer umfangreichen biologischen Evaluation unterzogen werden (s. Abbildung 13).



**Abbildung 13** Kooperationspartner und Projektstruktur.

Zunächst sollten die Verbindungen im Arbeitskreis von *Markus Fischer* (Universität Hamburg) auf ihre Enzym-inhibitorische Aktivität gegenüber *Plasmodium falciparum* IspC getestet werden. Mit potenten IspC-Inhibitoren sollte im Arbeitskreis von *Michael Groll*

(Technische Universität München) der Versuch unternommen werden, diese zusammen mit dem *PfIspC*-Enzym zu kristallisieren. Eine so gewonnene Kristallstruktur sollte unter anderem Aufschluss über Bindungsmodi zwischen Enzym und Inhibitor geben. Für die chiralen,  $\alpha$ -Aryl-substituierten Thia-Analoga war zudem die Frage zu klären, ob ein Enantiomer bevorzugt am *PfIspC*-Enzym gebunden wird. Hierüber sollte die Kristallstruktur Aufschluss geben. Darüber hinaus war geplant, durch Racematspaltung die beiden Enantiomere eines Thia-Isosters zu trennen. Anschließende Testung am *PfIspC*-Enzym sollte zeigen, ob ein Enantiomer aktiver ist und somit das Eutomer darstellt. Versuche zur Racematspaltung von Thia-Isosteren sollten sowohl von der Autorin als auch im Arbeitskreis von *Markus Fischer* (Universität Hamburg) durchgeführt werden. Zur Charakterisierung der Enantiomere sollte von *Ulrich Riederer* (Universität Hamburg) der Drehwert bestimmt werden.

Um die antiplasmodialen Eigenschaften des neuen Analogotyps *in vitro* zu untersuchen war geplant, dass die Testverbindungen im Arbeitskreis von *Benjamin Mordmüller* (Eberhard Karls Universität Tübingen) an zwei unterschiedlichen *Plasmodium falciparum*-Stämmen evaluiert werden. Wirkstoffkandidaten mit hoher antiplasmodialer Potenz sollten auf ihre Zytotoxizität gegenüber Säugetierzellen getestet und anschließend im Arbeitskreis von *Sergio Wittlin* (Swiss Tropical and Public Health Institute Basel) im Tierversuch auf ihre antiplasmodiale *in vivo*-Aktivität untersucht werden.

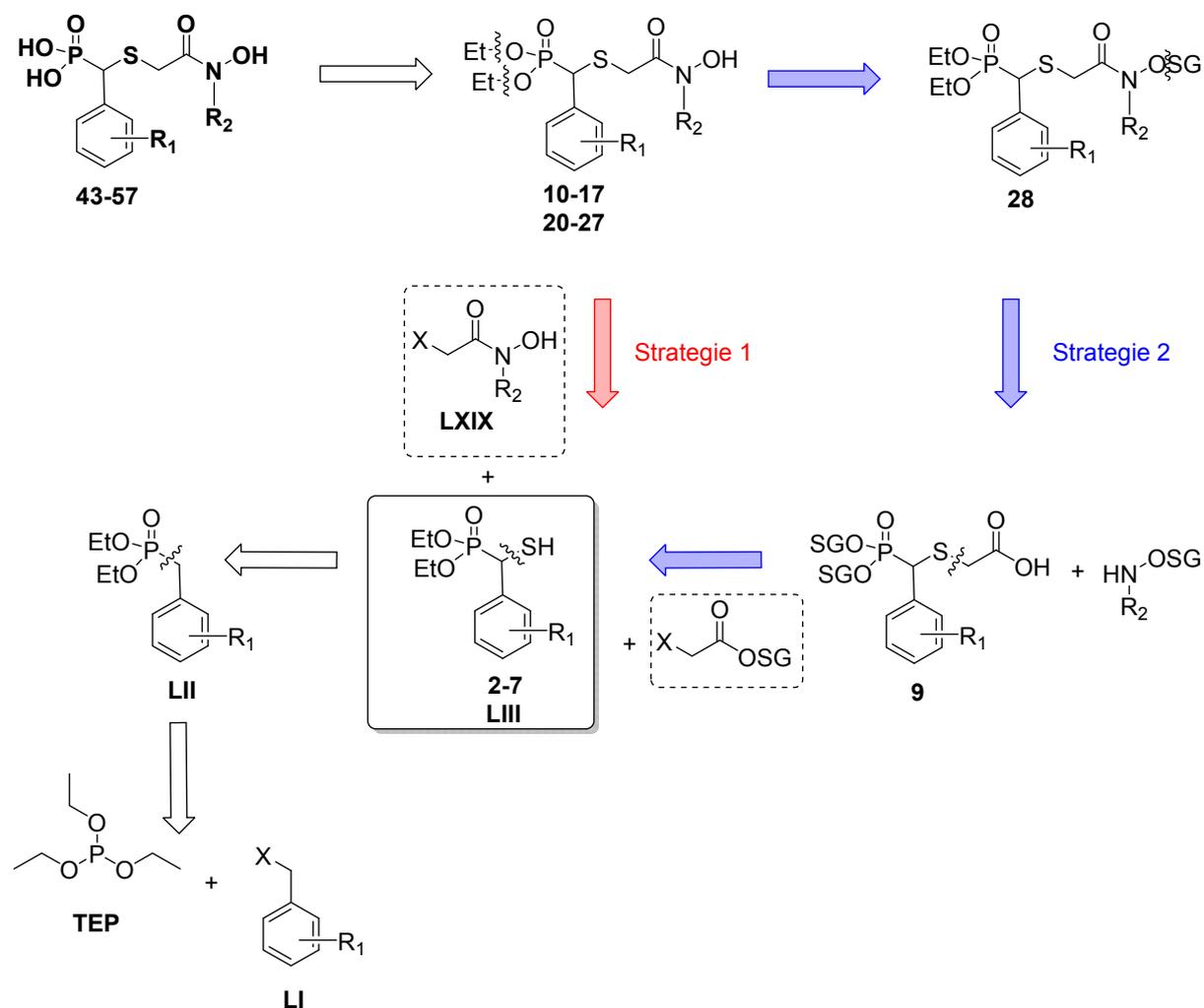
## 2 Synthese der $\beta$ -thia-isosteren Fosmidomycin-Analoga

### 2.1 Synthese der $\beta$ -thia-isosteren Fosmidomycin-Analoga mit Sulfidpartialstruktur

#### 2.1.1 Synthese als Diethylphosphonate

##### Syntheseplanung

Abbildung 14 zeigt die retrosynthetische Analyse zur Herstellung der Zielverbindungen **43-57**. Zentrale Zwischenprodukte, die aus der retrosynthetischen Zerlegung hervorgehen, sind die entsprechenden Thiole **2-7/LIII** und eine *N*-Hydroxyacetamid-Komponente zur Einführung der Hydroxamsäurepartialstruktur.



**Abbildung 14** Retrosynthetische Analyse der Zielverbindungen. X = Abgangsgruppe, TEP = Triethylphosphit, SG = Schutzgruppe.

Hydroxamsäuren können als *N*-Hydroxycarbonsäureamide aufgefasst werden, die aus einer Hydroxylamin- und einer Carbonsäurekomponente bestehen. Für die Synthese der Hydroxamsäurefunktionen von **10-17** und **20-27** wurden, basierend auf den Erfahrungen von

*Behrendt* und *Brücher* aus der Entwicklung der Carba- und Oxa-Analoga, folgende Möglichkeiten gewählt. Zum einen sollten die Hydroxamsäurefunktionen analog zu den Synthesen dieser Verbindungstypen zugänglich sein (Strategie 2).<sup>[102, 107, 112-113]</sup> Die Hydroxamsäure wird hierbei durch Umsetzung eines reaktiven Carbonsäurederivats mit einem *O*-geschützten Hydroxylamin und anschließender orthogonaler Entfernung der Schutzgruppe aufgebaut. Zum anderen bietet ein geeignetes Alkylans (**LXIX**) die Möglichkeit, direkt eine ungeschützte Hydroxamsäurefunktionalität via *S*-Alkylierung des entsprechenden Thiols **2-7/LIII** einzuführen (Strategie 1). Das Alkylans **LXIX** mit Hydroxamsäurepartialstruktur kann zuvor ebenfalls aus einem reaktiven Carbonsäurederivat und einer Hydroxylaminkomponente gewonnen werden. Beide Wege weisen somit ein ähnliches Syntheseprinzip für die Hydroxamsäurefunktionalität auf.

Hydroxamsäuren entstehen formal betrachtet durch Kondensation von Hydroxylaminen mit Carbonsäuren. Die Steigerung der Carbonylaktivität der Carbonsäure ist für die Umsetzung mit der Hydroxylaminkomponente essenziell. Dies kann durch Überführen der Säure in aktivere Derivate wie Carbonsäurechloride<sup>[126]</sup> oder -anhydride<sup>[127]</sup> erreicht werden. Alternativ kann die Carbonsäure mit Kupplungsreagenzien aktiviert werden. Hierfür wurden zwei im Arbeitskreis etablierte Reagenzien in Betracht gezogen, das Phosgenanalogon 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI) und das Carbodiimid *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid (EDC).<sup>[102, 112, 128]</sup> Anschließend erfolgt die Umsetzung des Carbonsäurederivats mit der Hydroxylaminkomponente. Um die *O*-Acylierung des Hydroxylamins als Konkurrenzreaktion auszuschließen, kann hierbei die vorherige Einführung einer Schutzgruppe an der Hydroxylfunktion des Hydroxylamins notwendig sein. Diese Schutzgruppe muss orthogonal zum Phosphonsäurediethylester entfernbar sein. Silylester, bestimmte Alkylester (z.B. *tert*-Butyl) oder die Tritylgruppe sind unabhängig vom Phosphonsäurediethylester spaltbar. Silylester können beispielsweise mit Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF)<sup>[129]</sup>, Tritylgruppen und *tert*-Butylgruppen in Gegenwart von Säure<sup>[130-131]</sup> entfernt werden.

Für die Darstellung von Sulfiden kommen Thiole als geeignete Synthese in Betracht. Verbindung **10-17**, **20-27** und **9** sollten durch *S*-Alkylierung des entsprechenden Mercaptans **2-7/LIII** mit einem Halogenalkan gut herstellbar sein. Eine vorhergehende Deprotonierung des Thiols **2-7/LIII** durch eine Base ist hierzu notwendig. Zu beachten ist, dass das Alkylans in Gegenwart der Base ebenfalls deprotoniert werden kann. Je nachdem, ob Sulfid **9** oder die Sulfide **10-17**, **20-27** synthetisiert werden, besitzt das eingesetzte Alkylans eine Carbon- oder Hydroxamsäurepartialstruktur. Um die *O*-Alkylierung als Konkurrenzreaktion zur *S*-

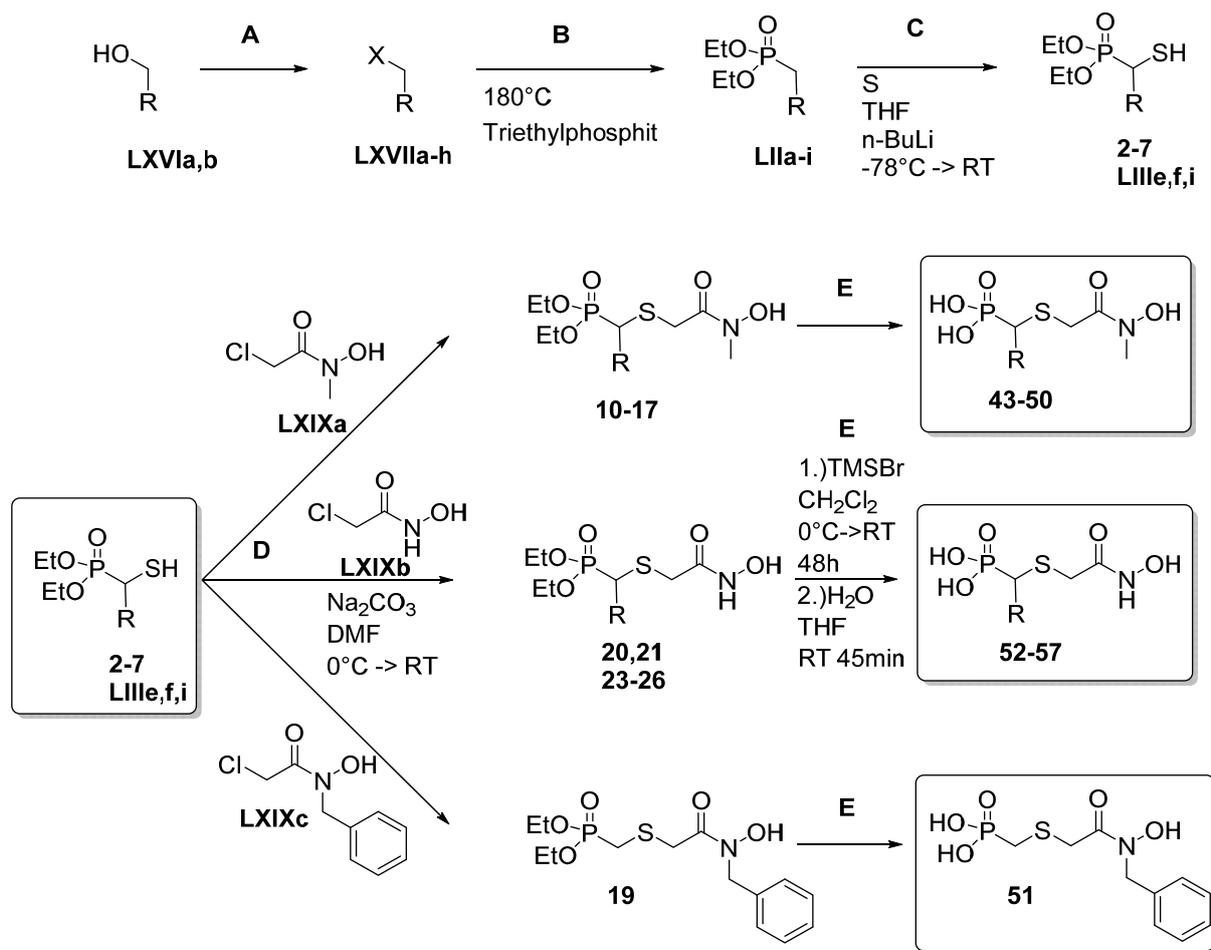
Alkylierung zu unterdrücken, kann die Einführung einer Schutzgruppe an dieser Position erforderlich sein. Es kommen dieselben Gruppen in Betracht wie zum Schutz des Hydroxylamins, die eine orthogonale Entfernung dieser zum Phosphonsäurealkylester erlauben (s. oben).

Die retrosynthetische Spaltung der C-S-Bindung führt zum entsprechenden Benzylphosphonat **LII** als Synthesebaustein für die Thiolkomponente. Benzylphosphonate verfügen über eine CH-acide Methyleneinheit in  $\alpha$ -Position zwischen Phosphonatfunktion und Aromat. Mittels einer starken Base kann diese deprotoniert werden. *Behrendt* ist dies mit *n*-Butyllithium (*n*-BuLi) gelungen.<sup>[102, 113]</sup> Aus dem so entstandenen Carbanion und einem geeigneten Halogenalkan baute er den Kohlenstofflinker der Carba-Analoga auf. Die Umsetzung von Benzylphosphonaten mit elementarem Schwefel ebenfalls in Gegenwart von *n*-BuLi wurde von *Mikolajczyk* zur Gewinnung von Thiolen eingesetzt.<sup>[132]</sup> Diese Methode kann hier auch für die Synthese der gewünschten  $\alpha$ -Aryl-substituierten Mercaptane herangezogen werden.

Die Synthese des Benzylphosphonats **LII** erfordert die Überlegung, welche Schutzgruppe die Phosphonsäure tragen soll. Eine Schützung als Alkylester ist vorteilhaft, da dieser schonend unter Erhalt der anderen funktionellen Gruppen des Moleküls zur freien Phosphonsäure konvertiert werden kann. Diese Konversion kann Trimethylsilylbromid (TMSBr)-vermittelt erfolgen<sup>[102, 113]</sup> oder, im Fall der Verwendung von *tert*-Butylestern, Säure-vermittelt<sup>[130]</sup>. Die Diethylphosphonate **LII** sind durch Umsetzung von Triethylphosphit (TEP) mit den Benzylhalogeniden **LI** zudem leicht zugänglich. Für die Synthesen der Thia-Analoga wurde der Phosphonsäurediethylester gewählt, da dieser Ester sich schon bei der Darstellung der Carba- und Oxa-Isostere bewährt hat.

### Synthesestrategie 1

Abbildung 15 illustriert den Syntheseverlauf des 1. Weges. Wie in der Syntheseplanung erläutert, unterscheiden sich Synthesestrategie 1 und 2 nur im Aufbau des Hydroxamsäurestrukturmotivs. Neben Verbindung **52**, die auch über Strategie 2 gewonnen werden konnte, wurden alle übrigen in dieser Arbeit besprochenen Phosphonsäurediethylester und deren korrespondierenden Phosphonsäuren **43-57** über Strategie 1 erhalten.



a: R=3,5-F-Ph; b: R=3,5-OCH<sub>3</sub>-Ph; c: R=3,4-F-Ph; d: R=3,4-Cl-Ph; e: R=Ph; f: R=4-CH<sub>3</sub>-Ph; g: R=Naphthyl;  
 h: R=4-SCH<sub>3</sub>-Ph; i: R=H; X=Br, Cl

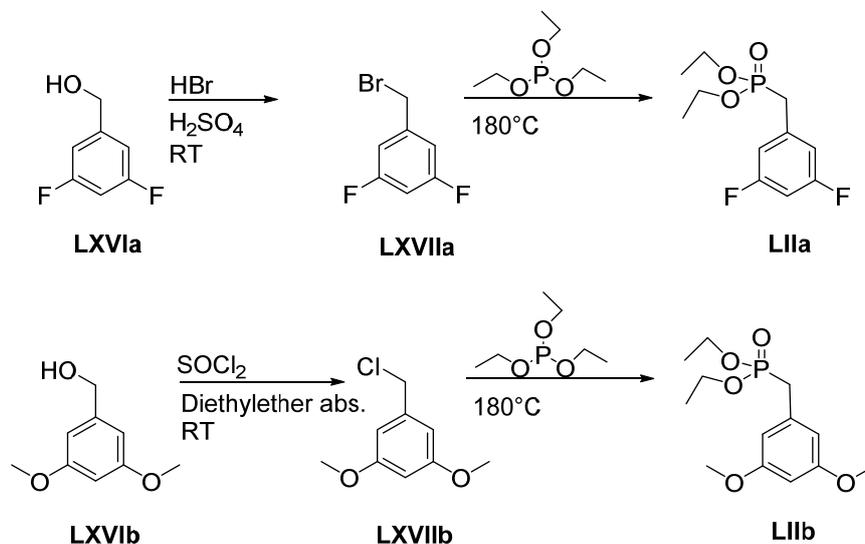
**Abbildung 15** Darstellung der Phosphonohydroxamsäuren 43-57. Tabelle 6 (S. 53) zeigt eine Strukturübersicht über alle gewonnenen Zielverbindungen.

### Synthese der $\alpha$ -Mercaptophosphonate 2-7, LIIIe, f, i (Schritt A-C)

Die in der retrosynthetischen Analyse als Edukte für die Thiolthese definierten Benzylphosphonate **LII** konnten durch *Michaelis-Arbusow*-Reaktion gewonnen werden. Dies erforderte neben Triethylphosphit den Einsatz des entsprechenden Benzylhalogenids (s. unten). Bevor eine *Michaelis-Arbusow*-Reaktion zur Generierung der Phosphonate **LIIa** und **LIIb** durchgeführt werden konnte, mussten bei diesen beiden Verbindungen zunächst die entsprechenden Benzylhalogenide dargestellt werden (A).

3,5-Difluorbenzylbromid **LXVIIa** wurde wie von *Takeuchi al.* beschrieben durch Umsetzen des korrespondierenden Benzylalkohols **LXVIa** mit 48 %iger Bromwasserstoffsäure und konzentrierter Schwefelsäure bei Raumtemperatur erhalten.<sup>[133]</sup> Die Synthese von 3,5-Dimethoxybenzylchlorid **LXVIIb** erfolgte nach *Chen et al.* durch die Zugabe von

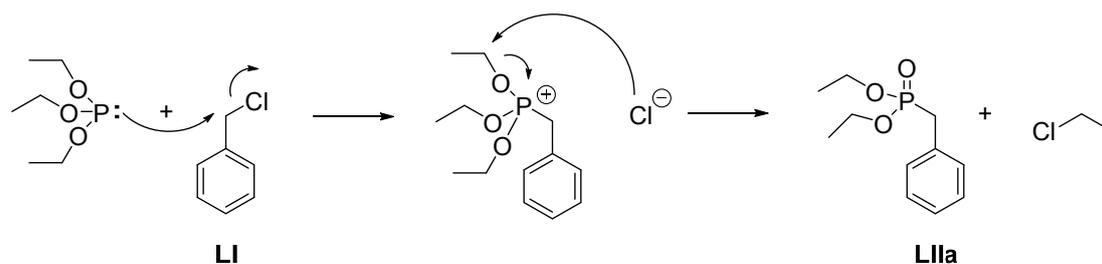
Thionylchlorid zum Benzylalkohol **LXVIb** in absolutem Diethylether bei Raumtemperatur<sup>[134]</sup> (s. Abbildung 16).



**Abbildung 16** Synthese von **LIIa** und **LIIb** aus den entsprechenden Alkoholen.

Alle in dieser Arbeit erwähnten Diethylbenzylphosphonate **LII** sind literaturbekannt und wurden in einer *Michaelis-Arbusow*-Reaktion in Anlehnung an *Saunders et al.* dargestellt<sup>[135]</sup> (B). Hierbei wurden beide Edukte, Triethylphosphit und das entsprechende Benzylhalogenid **LI**, nach mehrstündigem Erhitzen unter Rückfluss zu dem korrespondierenden Phosphonsäurediethylester **LII** umgesetzt. Die Phosphonsäurediethylester **LII** konnten nach Destillation im Vakuum in Ausbeuten um 90 % direkt mit einer für den weiteren Syntheseverlauf geeigneten Schutzgruppe erhalten werden.

Die *Michaelis-Arbusow*-Reaktion läuft über einen zweistufigen Mechanismus ab<sup>[136]</sup> (s. Abbildung 17). Nukleophiler Angriff des Trialkylphosphits auf das Alkylhalogenid (hier: Benzylchlorid) resultiert in einem intermediär gebildeten Phosphoniumion. Das im ersten Schritt als Abgangsgruppe fungierende Halogenidion greift dieses nun seinerseits nukleophil in einem  $\text{S}_{\text{N}}2$ -Mechanismus an. Es entstehen das entsprechende Dialkylphosphonat und ein Alkylhalogenid (hier: Ethylchlorid). Als Konkurrenzreaktion kann der nukleophile Angriff des Trialkylphosphits auf das entstehende Ethylchlorid auftreten. Um dies zu verhindern, wird das flüchtige Ethylchlorid durch Destillation aus der Reaktion entfernt.



**Abbildung 17** Postulierter Mechanismus der *Michaelis-Arbusow*-Reaktion am Beispiel Benzylchlorid.<sup>[136]</sup>

Anschließend wurden die Verbindungen **LII** nach *Mikolajczyk* mit äquimolaren Mengen elementarem Schwefel in Gegenwart von 1.1 Äquivalenten *n*-Butyllithium bei  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  und nachfolgender sukzessiver Erwärmung auf  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  bzw. Raumtemperatur umgesetzt (Schritt C). Wässrige Aufarbeitung mit 1 M Salzsäure lieferte die entsprechenden  $\alpha$ -Mercaptophosphonate **LIII/2-7** als Rohprodukte in einer Ausbeute von 57-84 %<sup>[132]</sup>, wobei **LIIIe**, **f**, **i** schon von anderen Autoren beschrieben wurden<sup>[132, 137]</sup>. Die oxidationsempfindlichen Thiole wurden nach der Aufarbeitung unter Schutzgas und Lichtschutz bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert und als Rohprodukte zeitnah in dem folgenden Reaktionsschritt weiter umgesetzt.

#### **Synthese der Phosphonohydroxamsäuren 10-17, 19-21, 23-26 (Schritt D)**

Um durch die *S*-Alkylierung der  $\alpha$ -Mercaptophosphonate **LIII/2-7** (D) eine Hydroxamsäurepartialstruktur einführen zu können, mussten zunächst geeignete Alkylanzien hergestellt werden. Als Alkylanzien wurden hier 2-Chlor-*N*-hydroxy-*N*-methylacetamid **LXIXa**, 2-Chlor-*N*-hydroxyacetamid **LXIXb** und *N*-Benzyl-2-chlor-*N*-hydroxyacetamid **LXIXc** verwendet. Entsprechend der retrosynthetischen Analyse wurden so direkt durch die Thiolalkylierung die ungeschützten Hydroxamsäuren **10-17** (*N*-Methyl-substituiert), **20-27** (nicht am Stickstoff substituiert) und **19** (*N*-Benzyl-substituiert) erhalten.

Abbildung 18 zeigt die Gewinnung von **LXIXa-LXIXc**. **LXIXa** wurde nach der von *Hoffman et al.* beschriebenen Methode aus Chloracetylchlorid und dem Hydroxylammoniumsalz **LXVIIIa** in Gegenwart von methanolischer Kaliumhydroxid-Lösung gewonnen.<sup>[138]</sup> Für die Synthese von **LXIXb** wurde das *O*-Benzyl-geschütztes Hydroxylamin **LXVIIIb** nach *Casadei* mit Chloracetylchlorid in Dichlormethan unter Triethylamin-Zusatz umgesetzt.<sup>[139]</sup> Aus dem so erhaltenen *O*-Benzyl-geschützten Intermediat wurde anschließend hydrogenolytisch die Hydroxamsäure **LXIXb** freigesetzt.

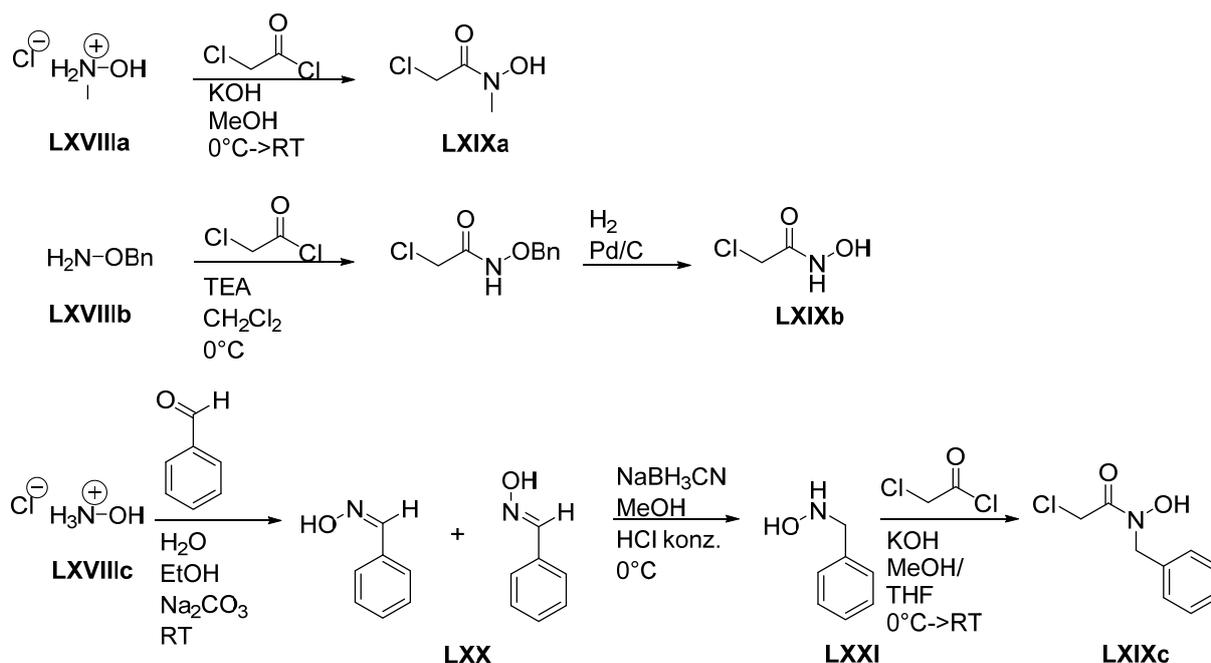


Abbildung 18 Gewinnung der Alkylanzien **LXIXa-c**.

**LXIXc** konnte in einer dreistufigen Synthese dargestellt werden. Zunächst erfolgte eine Kondensation von Hydroxylammoniumchlorid und Benzaldehyd analog *Puerto Galvis et al.* zum entsprechenden Oxim **LXX**.<sup>[140]</sup> 1.2 Äquivalente Hydroxylammoniumchlorid wurden bei Raumtemperatur in einer Mischung aus Ethanol und Wasser sowie in Gegenwart einer äquimolaren Menge Natriumcarbonat mit einem Äquivalent Benzaldehyd kondensiert. Das Oxim wurde als Gemisch aus *E*- und *Z*-Isomer erhalten. Anschließend wurde **LXX** zum Hydroxylamin **LXXI** reduziert. Die Reduktion erfolgte wie von *Aschwanden et al.* beschrieben bei 0 °C mit überschüssigem Natriumcyanoborhydrid in Methanol in Gegenwart von konzentrierter Salzsäure.<sup>[141]</sup> Für die Extraktion wurde 10 %ige Kaliumhydroxid-Lösung verwendet, sodass am Ende der Synthese das Hydroxylamin direkt als freie Base und nicht als Hydrochlorid vorlag. Der letzte Schritt der dreistufigen Synthese bestand in der Umsetzung von **LXXI** mit 2-Chloracetylchlorid wie bereits für **LXIXa** beschrieben.<sup>[138]</sup>

Zur *S*-Alkylierung von **LIII/2-7** wurden diese unter Schutzgasatmosphäre in *N,N*-Dimethylformamid (DMF) gelöst und bei 0 °C zunächst mit 1.25 Äquivalenten Natriumcarbonat in die korrespondierenden Thiolatanionen überführt. Nach erfolgter Deprotonierung wurde das gewünschte Alkylans **LXIXa-c** in äquimolaren Mengen zugegeben. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur weitergeführt und der Verlauf dünnschichtchromatographisch kontrolliert. Die *N*-Methyl-substituierten Hydroxamsäuren **10-17** konnten nach Aufarbeitung und chromatographischer Reinigung in Ausbeuten von 27-

70 % als elementaranalysenreine Feststoffe gewonnen werden. Bei den unsubstituierten Hydroxamsäuren **20-27** wurden Ausbeuten von 15-52 % erzielt. Die *N*-Benzyl-substituierte Phosphonohydroxamsäure **19** wurde in einer Ausbeute von 8 % elementaranalysenrein als Öl gewonnen. Die Hälfte der am Stickstoff unsubstituierten (freien) Hydroxamsäuren (**21, 22, 25, 26**) fiel nach der chromatographischen Reinigung als Feststoff an. Von den als Ölen erhaltenen Hydroxamsäuren **20, 23, 24** und **27** wurde **23** nach monatelanger Lagerung in der Kälte fest.

Im Vorfeld wurde die *S*-Alkylierung der Thiole **LIII/2-7** zu den entsprechenden Hydroxamsäuren **10-17, 19-21** und **23-26** anhand der Umsetzung von Thiol **LIIIe** mit Alkylans **LXIXa** zu Hydroxamsäure **10** optimiert. Die Umsetzung erfolgte ursprünglich in Anlehnung an Literaturvorschriften<sup>[142-144]</sup> in Gegenwart von Kaliumcarbonat und lieferte eine Ausbeute von 20 % (an Hydroxamsäure **10**). Der Grund für die Optimierung war die gewünschte Erhöhung der Ausbeute. Hierbei wurde DMF als Reaktionsmedium beibehalten, weil sowohl das polare Alkylans als auch die entstehenden Thiolatanionen eine sehr gute Löslichkeit darin aufwiesen. Nach erfolgter Reaktion war zudem eine nahezu quantitative Entfernung des Lösungsmittels durch die Extraktion mit 1 M Salzsäure möglich. Für das Reaktionsmedium DMF wurde die Verwendung von Cäsiumcarbonat als Base in Betracht gezogen, da diese Verbindung durch ihren hohen Dissoziierungsgrad in polaren aprotischen Lösungsmitteln<sup>[145]</sup> zu einer höheren Deprotonierungsrate des Thiols führen sollte. Neben Cäsiumcarbonat sollte außerdem der Einsatz der kostengünstigeren Basen Natrium- und Calciumcarbonat evaluiert werden.

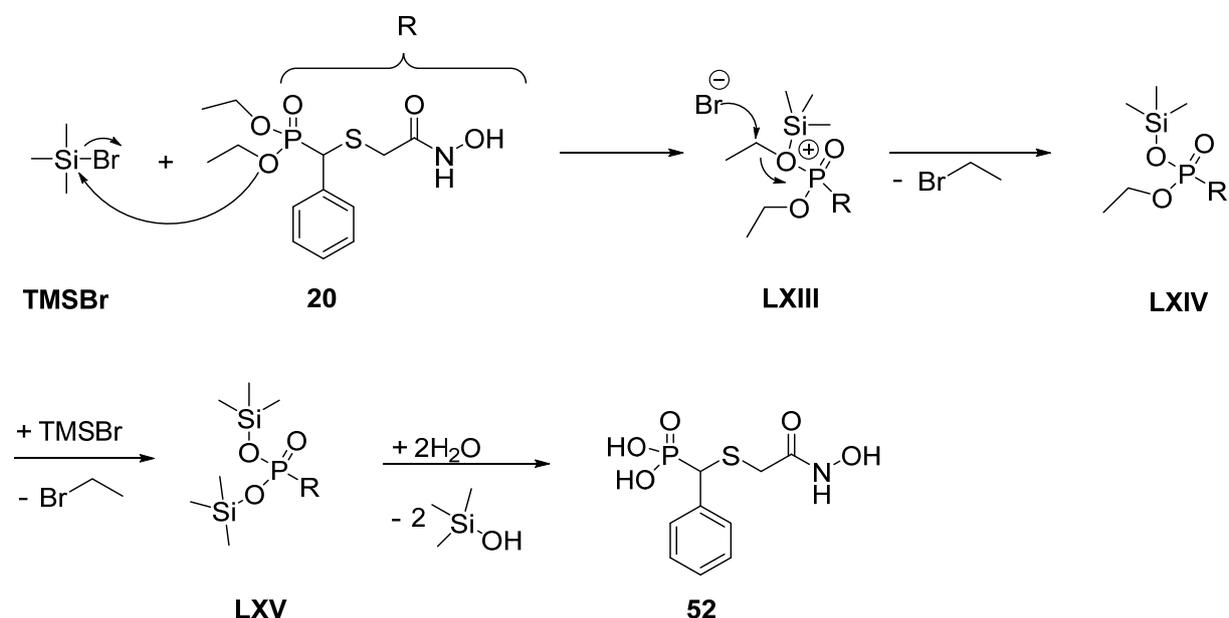
<p style="text-align: center;"> <chem>CCOP(=O)(O)C1=CC=CC=C1</chem> + <chem>ClCC(=O)N(O)C</chem> <math>\xrightarrow[\text{Base}]{\text{DMF, } 0^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}}</math> <chem>CCOP(=O)(O)C1=CC=CC=C1SCC(=O)N(O)C</chem> </p> <p style="text-align: center;"><b>LIIIe</b> + <b>LXIXa</b> → <b>10</b></p>	
Base	Ausbeute
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	20 %
Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	15 %
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	41 %
CaCO <sub>3</sub>	Keine Umsetzung

**Tabelle 5** Ausbeuten an Hydroxamsäure **10** in Abhängigkeit von der eingesetzten Base.

Aus diesen Untersuchungen ging hervor, dass durch den Einsatz von Natriumcarbonat mit einer Ausbeute von 41 % an Hydroxamsäure **10** das beste Ergebnis erzielt werden konnte (s. Tabelle 5). Deshalb wurde für die weiteren Umsetzungen diese Base genutzt.

### Entfernung der Schutzgruppen (E)

Die TMSBr-vermittelte Desalkylierung des Phosphonsäurediethylesters (E) stellt den finalen Schritt des Synthesewegs dar. *McKenna* postulierte für die Desalkylierung einen mehrstufigen Mechanismus, der durch kinetische Untersuchungen von *Conibear* gestützt wird<sup>[146-147]</sup> (s. Abbildung 19).



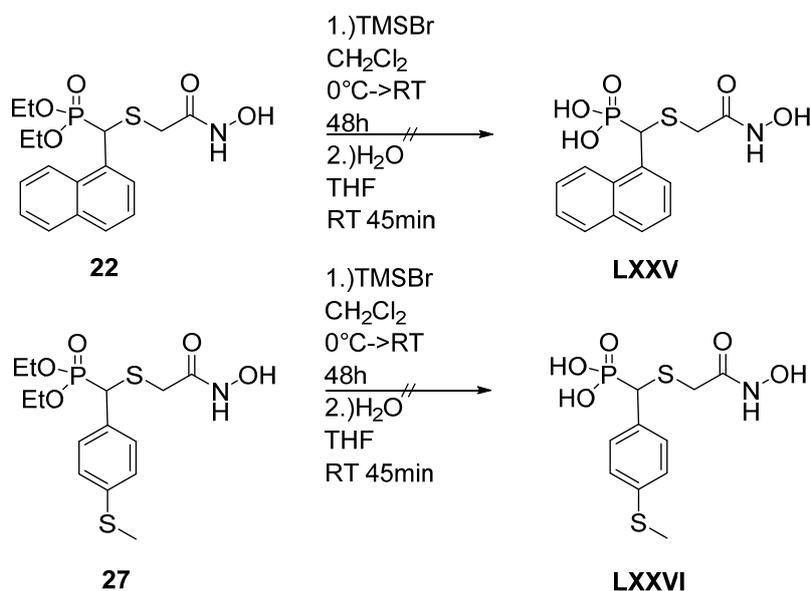
**Abbildung 19** TMSBr-vermittelte Konversion von Phosphonsäurealkylestern zu den freien Phosphonsäuren am Beispiel von Verbindung **20** nach *McKenna* und *Conibear*<sup>[146-147]</sup>.

Initial erfolgt eine Umesterung des Ethylestergruppe zu dem entsprechenden Silylester. Das Sauerstoffatom des Ethylesters greift nukleophil das Siliziumatom des Trimethylsilylbromids an, wobei das Bromidion als Abgangsgruppe fungiert. Nukleophiler Angriff dieses Bromidions auf eine der Alkoxygruppen des Esters von Intermediat **LXIII** resultiert in dem gemischten Alkyltrimethylsilylester **LXIV**. Diese Abfolge liefert nach erneutem Durchlauf den Bis(trimethylsilyl)ester **LXV**. Durch schonende Hydrolyse der Silylester kann die freie Phosphonsäure gewonnen werden.

Die Desalkylierung der Phosphonsäurediethylester **10-17**, **19-21**, **23-26** wurde in Anlehnung an *Brücher*<sup>[107,112]</sup> mit 5 Äquivalenten TMSBr in Dichlormethan durchgeführt. Aufgrund der Hydrolyseempfindlichkeit von TMSBr musste in absolutiertem Lösungsmittel und unter Schutzgas gearbeitet werden. Die korrespondierenden Silylester wurden nach 48-

stündigem Rühren mit 3 Äquivalenten Wasser hydrolysiert und im Vakuum von Lösungsmittel und volatilen Rückständen befreit. Kristallisierte das Produkt nicht durch Zugabe von Ethylacetat und *n*-Hexan aus, wurde es chromatographisch an einer kleinen Menge Kieselgel mit einem Gradienten bestehend aus *n*-Hexan und Ethylacetat als Elutionsmittel (100:0 → 0:100) gereinigt. Alle freien Phosphonsäuren mit *N*-Substitution (**43-51**) sind Feststoffe, während es sich bei allen nicht am Stickstoff substituierten Verbindungen (**52-57**) um Öle handelt. Die freien Phosphonsäuren **43-57** konnten elementaranalysenrein oder mit einer Reinheit von mehr als 95 % (HPLC-Analyse) in Ausbeuten von 16-90 % erhalten werden.

Die TMSBr-vermittelte Konversion der Phosphonsäureester **22** und **27** zu den Phosphonsäuren **LXXV** und **LXXVI** hingegen erwies sich als problematisch (s. Abbildung 20). Das  $\alpha$ -Naphthylphosphonat **22** ist in Dichlormethan unzureichend löslich, sodass für die TMSBr-vermittelte Desalkylierung des Esters ein anderes Reaktionsmedium benötigt wurde. DMF ist das einzige für TMSBr-Spaltungen geeignete Medium, in dem die Verbindung eine ausreichende Löslichkeit aufweist. Dieses Lösungsmittel konnte nach beendeter Reaktion allerdings nicht in ausreichender Menge von der freien Phosphonsäure **LXXV** abgetrennt werden. Als Methoden hierfür wurden Extraktion mit Salzsäure (1 M), Chromatographie und Lagerung im Hochvakuum angewandt.



**Abbildung 20** Phosphonsäuren, die nicht in ausreichender Reinheit nach TMSBr-vermittelter Konversion der Diethylphosphonate **22** und **27** gewonnen werden konnten.

Nach TMSBr-vermittelter Konversion des Diethylphosphonats **27** zur entsprechenden freien Phosphonsäure **LXXVI** konnte diese nicht in ausreichender Reinheit aus den

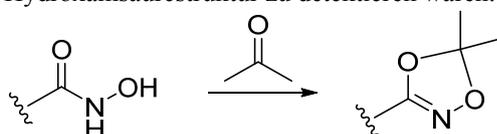
Reaktionsrückständen isoliert werden. Wie bei allen nicht am Stickstoff substituierten Hydroxamsäuren dieses Verbindungstyps mit freier Phosphonsäuregruppe handelt es sich auch bei dieser Substanz um ein Öl. Kristallisation aus den Reaktionsrückständen nach vorheriger Entfernung volatiler Verunreinigungen im Hochvakuum war nicht möglich. Die öligen Rückstände wurden chromatographisch an kleinen Mengen Kieselgel gereinigt. Dies führte im Falle von **27** aber nicht zu der gewünschten Reinheit von mind. 95 %\* (HPLC-Analyse). Aufgrund der hohen Polarität der Zielverbindungen ist deren Affinität zu der stationären Phase Kieselgel sehr groß und die Löslichkeit in den Elutionsmitteln wie beispielsweise *n*-Hexan, Dichlormethan oder Essigsäureethylester gering. Die Chromatographie zur Reinigung der Zielverbindungen ist somit weniger effektiv als bei den Diethylphosphonaten. Zudem ist sie mit großen Substanzverlusten verbunden. Aufgrund seiner hohen Polarität wäre Methanol ein geeignetes Lösungs- und Elutionsmittel<sup>†</sup>. Jedoch weisen nicht am Stickstoff substituierte Hydroxamsäuren, anders als ihre *N*-Methylsubstituierten Analoga, neben der hohen Polarität eine verminderte Stabilität auf. Gegenüber Methanol, Wasser und Aceton haben sich einige unsubstituierte Hydroxamsäuren als instabil erwiesen. Methanol und Wasser können zum Verlust der Hydroxamsäurefunktionalität führen. Während durch Wasser die Hydrolyse zur Carbonsäure erfolgt, entsteht durch Methanol der Carbonsäuremethylester. Aceton kann die freie Hydroxamsäurefunktionalität als Acetonid maskieren<sup>‡</sup>.

Die Reinigung ungeschützter Phosphonohydroxamsäuren wird auch von *Brücher* und *Van Calenbergh* als problematisch beschrieben.<sup>[107, 112, 118, 122]</sup> Die Arbeitsgruppe von *Van Calenbergh* nutzt hierfür unter anderem eine präparative HPLC.<sup>[116-118, 122]</sup> Bei dieser Methode wird eine C18-Umkehrphase in Verbindung mit einem Elutionsmittel aus Acetonitril und

\*Als Bezug für die gewünschte Reinheit wurden die Anforderung des *Journal of Medicinal Chemistry (ACS Publications)* gewählt, die eine Reinheit von mind. 95 % für die Zielverbindungen vorschreiben.

<sup>†</sup>Da Methanol Kieselgel lösen kann, wurde zur Chromatographie mit Methanol nur Kieselgel verwendet, welches zuvor wie folgt behandelt worden war: nach mindestens 3-stündigem Rühren in Dichlormethan/Methanol (90:10) wurde das Kieselgel über eine Fritte filtriert, gewaschen und im Vakuum getrocknet. Dieses Kieselgel wurde mit einem Anteil von maximal 10 % Methanol im Elutionsmittel zur Chromatographie verwendet.

<sup>‡</sup>Die Entstehung von Carbonsäuremethylestern und „Acetoniden“ (s. unten) konnte in den entsprechenden <sup>1</sup>H-NMR-Spektren beobachtet werden. Bei einer Tüpfelprobe mit FeCl<sub>3</sub> zum Nachweis der Hydroxamsäurepartialstruktur gaben die Verbindungen zudem keine oder -bei nicht quantitativer Konversion der Hydroxamsäuregruppe- nur eine schwache Färbung. Die Carbonsäuremethylester einiger Verbindungen wurden auch massenspektrometrisch nachgewiesen. Eine Hydrolyse zur Carbonsäure durch Wasser wurde daraus gefolgert, dass keine Färbung mit FeCl<sub>3</sub> eintrat und NMR-spektroskopisch keine Signale für die Hydroxamsäurestruktur zu detektieren waren.

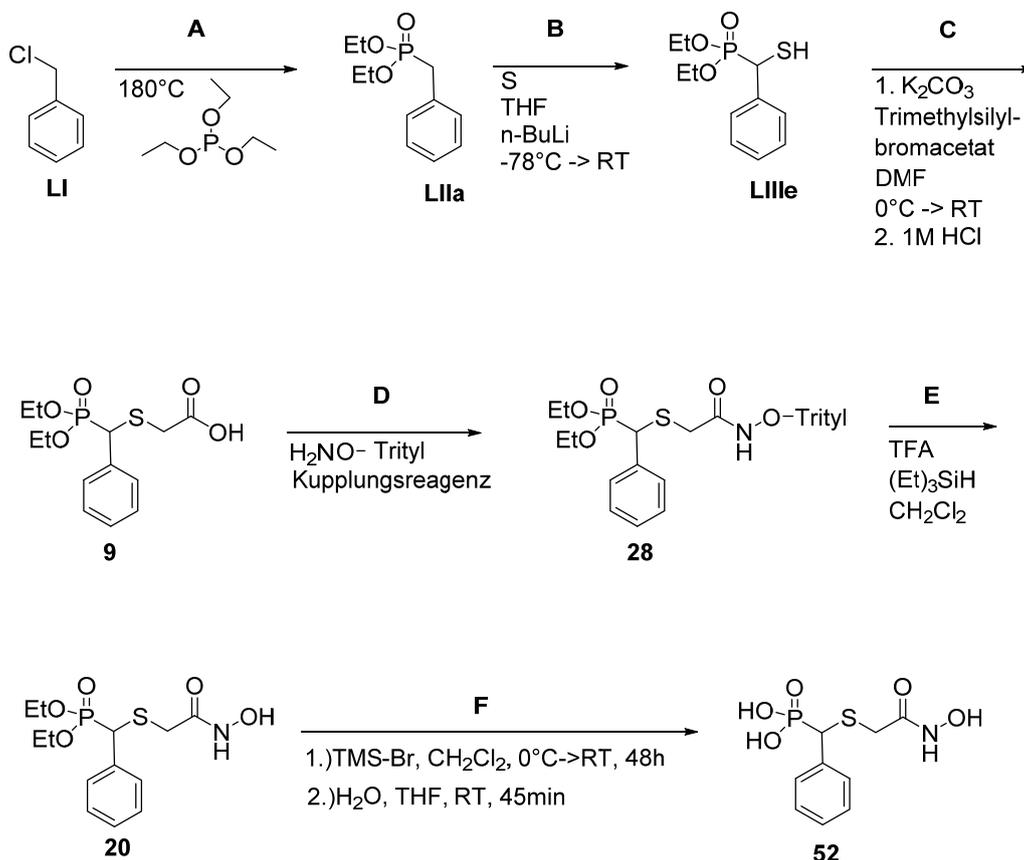


Konversion von unsubstituierten Hydroxamsäuregruppen in 5,5-Dimethyl-1,4,2-dioxazole durch Aceton.

wässrigem Ammoniumacetat-Puffer verwendet. Auch *Brücher* hat zur Reinigung eines Oxa-Isosters eine semipräparative HPLC-Methode in Anlehnung an *Van Calenbergh* verwendet, konnte dadurch allerdings keine ausreichende Reinheit erzielen.<sup>[107]</sup> Alternativ werden die Phosphonohydroxamsäuren bei *Van Calenbergh* als Bisammoniumsalze gefällt und in einigen Fällen anschließend durch Chromatographie an Cellulose gereinigt.<sup>[118, 120-121]</sup>

Die nicht am Stickstoff substituierten Phosphonsäuren **52-57** konnten -wie zuvor beschrieben- in ausreichender Reinheit gewonnen werden. Somit lagen genügend Testsubstanzen vor, um eine biologische Evaluation dieses Verbindungstyps zu ermöglichen. Auf weitere Reinigungsversuche zur Gewinnung der korrespondierenden freien Phosphonsäuren von **22** und **27** wurde daher verzichtet.

### Synthesestrategie 2



**Abbildung 21** Synthesestrategie 2 (Übersicht).

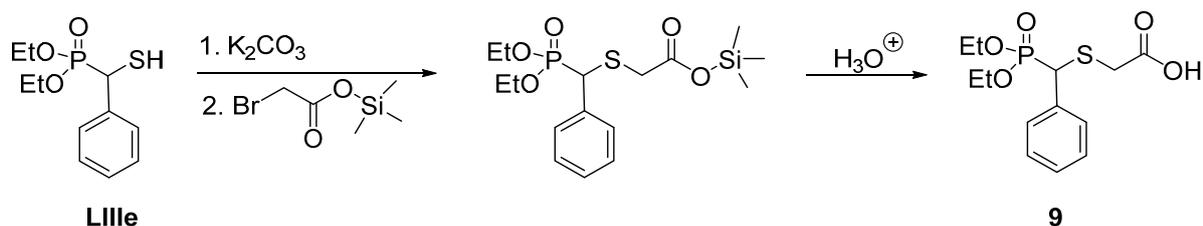
Synthesestrategie 2 ist eine sechsstufige Synthesesequenz, die zeitlich parallel zu Strategie 1 anhand von Phosphonsäure **52** als Zielverbindung entwickelt wurde. Strategie 2 stellt im Vergleich zu Strategie 1 den mit zwei zusätzlichen Schritten und damit verbundenen Reinigungsprozessen aufwendigeren Weg dar (s. Abbildung 21). Nachdem erwiesen war, dass

Phosphonsäure **52** über beide Strategien in zufriedenstellenden Ausbeuten erhalten werden konnte, wurden aufgrund dieser Überlegungen alle weiteren Zielverbindungen über Strategie 1 gewonnen. Deshalb wird in diesem Abschnitt Weg 2 ausschließlich zur Gewinnung von Phosphonsäure **52** ausgehend von Benzylchlorid **LI** vorgestellt.

### Synthese von 2-(((Diethoxyphosphoryl)(phenyl)methyl)thio)essigsäure **9** (A-C)

Das Benzylphosphonat **LIIa** konnte durch *Michaelis-Arbusow*-Reaktion wie unter Strategie 1 beschrieben nach *Saunders et al.* dargestellt werden<sup>[135]</sup> (A).

Anschließend konnte das entsprechende  $\alpha$ -Mercaptophosphonat **LIIIe** nach *Mikolajczyk* (s. Strategie 1) aus **LIIa** in einer Ausbeute von 80 % gewonnen werden<sup>[132]</sup> (B). Zur *S*-Alkylierung von **LIIIe** (C) wurde dieses zunächst mit Kaliumcarbonat\* in das korrespondierende Thiolatanion überführt. Als Alkylans fungierte das nach erfolgter Deprotonierung von **LIIIe** zugegebene Trimethylsilylbromacetat (1 Äquivalent). Wie in den retrosynthetischen Überlegungen gefordert, wurde somit ein an der Carbonsäurefunktionalität geschütztes Alkylans eingesetzt. Die Verwendung des Trimethylsilylesters ermöglichte eine orthogonale Entfernung der Schutzgruppe. Der intermediär erhaltene Silylester konnte durch wässrige Aufarbeitung mit 1 M Salzsäure zur freien Carbonsäure hydrolysiert werden, während die Phosphonsäureesterstruktur erhalten blieb (s. Abbildung 22). Die Hydrolyseempfindlichkeit von Trimethylsilylbromacetat sowie die Oxidationsempfindlichkeit des Thiols erforderten eine Synthese unter Sauerstoff- und Feuchtigkeitsausschluss. Nach chromatographischer Reinigung konnte das Produkt so in einer Ausbeute von 82 % elementaranalysenrein gewonnen werden.

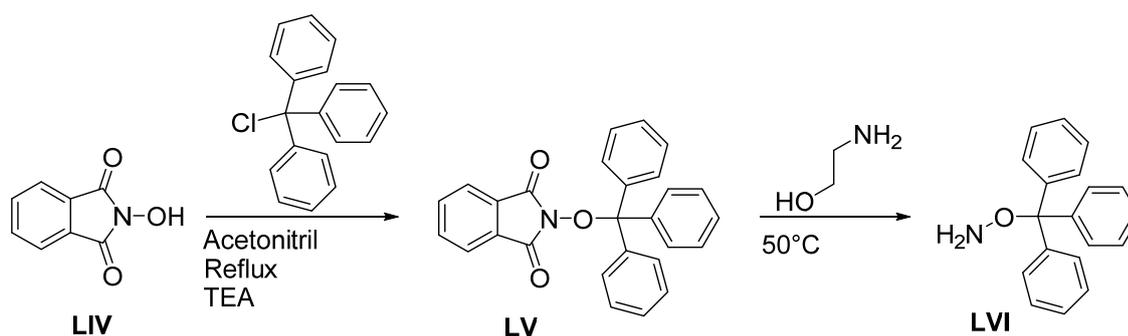


**Abbildung 22** *S*-Alkylierung des  $\alpha$ -Mercaptophosphonats **LIIIe**.

Der sich anschließende Aufbau der Hydroxamsäure benötigte neben der Carbonsäure- eine Hydroxylamin-Komponente. Das durch eine zweistufige Synthese erhältliche *O*-Trityloxyamin (s. Abbildung 23) diente als Hydroxylamin-Baustein mit geeigneter

\*Die Optimierung der *S*-Alkylierungsreaktion von Synthesestrategie 1 ergab, dass mit Natriumcarbonat als Base die höchste Ausbeute erzielt werden konnte. Synthesestrategie 2 wurde vor der Optimierung dieser Reaktion durchgeführt und da hier eine Ausbeute von 82 % an Carbonsäure **9** erzielt werden konnte, wurde hier ohne weitere Optimierungsversuche Kaliumcarbonat verwendet.

Schutzgruppe. Schritt 1 wurde analog der von *Welch et al.* für *N*-(Benzyloxy)phthalimid beschriebenen Synthese durchgeführt.<sup>[148]</sup> *N*-Hydroxyphthalimid **LIV** wurde hierzu in Acetonitril mit äquimolaren Mengen von Triethylamin und Tritylchlorid unter Rückfluss erhitzt. Ethanolaminolyse des so entstandenen *N*-(Trityloxy-)phthalsäureimids **LV** resultierte in dem gewünschten *O*-Trityloxyamin **LVI**.<sup>[149]</sup> Bei dieser Gabriel-analogen Synthese wurde der Hydrazinolyse eine Ethanolaminolyse vorgezogen, da das Toxizitätsprofil des Ethanolamins günstiger ist als das des carcinogenen Hydrazins<sup>[150-151]</sup> und eine einfachere Entfernung des wasserlöslichen Nebenprodukts ermöglicht wird.



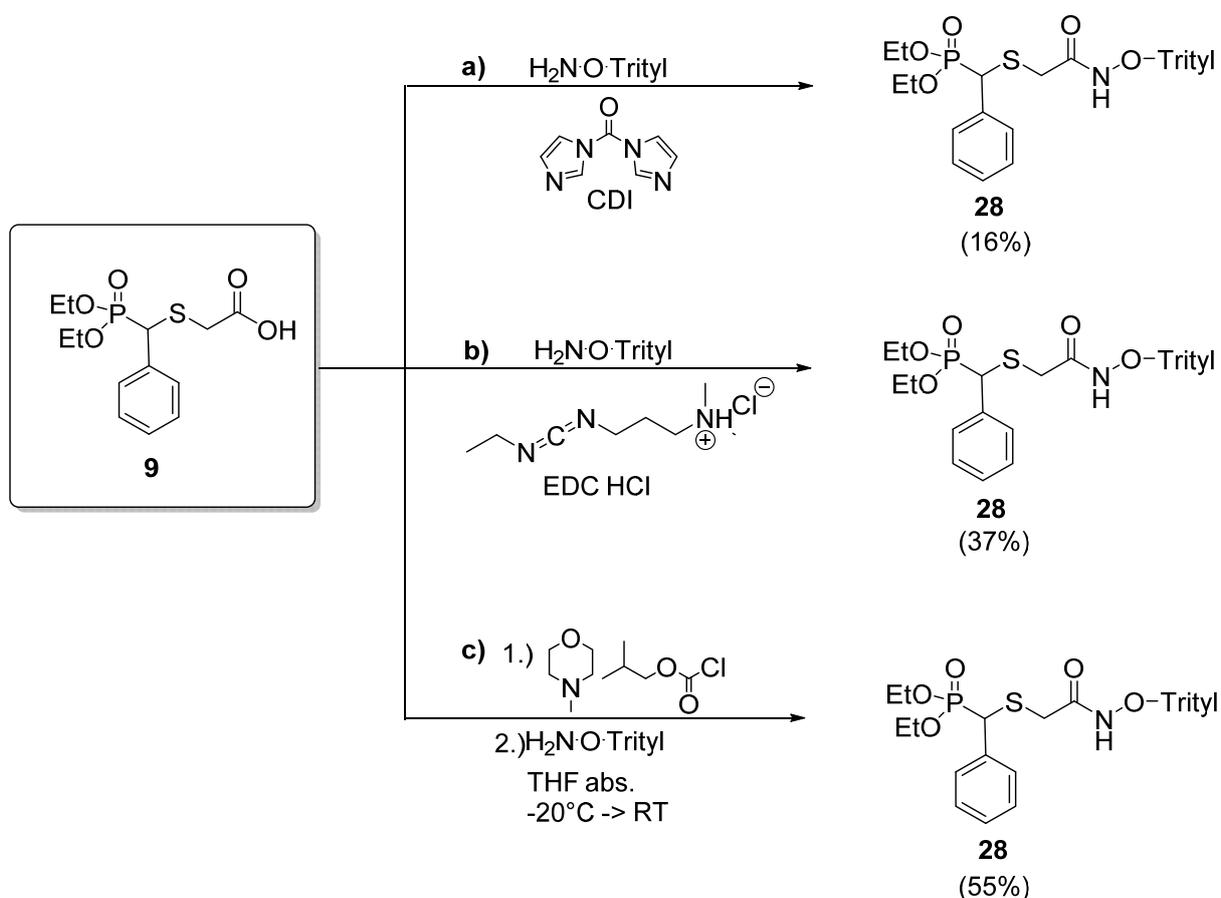
**Abbildung 23** Darstellung von *O*-Trityloxyamin **LVI**.

### **Synthese der *O*-Trityl-geschützten Hydroxamsäure **28** (D)**

Für die Synthese der *O*-Trityl-geschützten Hydroxamsäure **28** wurde das Hydroxylamin **LVI** via CDI mit der Carbonsäure **9** gekuppelt. Es konnte hierbei nur eine Ausbeute von 16 % erzielt werden. Zur Optimierung der Ausbeute wurde als alternatives Kupplungsreagenz EDC HCl eingesetzt. Dies steigerte die Ausbeute um mehr als das zweifache auf 37 %. Als dritte Methode wurde die Synthese eines intermediären gemischten Carbonsäureanhydrids gewählt. Diese Methode war am effektivsten und es konnte ca. das 3.5-fache an Produkt (55 %) gewonnen werden. Abbildung 24 zeigt eine Übersicht über die angewandten Methoden.

a) CDI ist ein Azolid, welches u.a. zur Amidbildung aus Carbonsäuren und Aminen herangezogen werden kann.<sup>[152-154]</sup> Es bildet mit Carbonsäuren Imidazole.<sup>[155]</sup> Die Carbonylaktivität des Imidazolid bezüglich eines nukleophilen Angriffs entspricht der des korrespondierenden Anhydrids oder Säurechlorids.<sup>[152, 156]</sup> Die Verwendung eines Amins bzw. Hydroxylamins als Nukleophil liefert das entsprechende Amid bzw. die Hydroxamsäure. Die Synthese der *O*-Trityl-geschützten Hydroxamsäure **28** mit Hilfe von CDI erfolgte in Anlehnung an *Brücher*.<sup>[107, 112]</sup> Hierzu wurde die Carbonsäure **9** mit einem leichten

Überschuss CDI in Dichlormethan bei Raumtemperatur umgesetzt. Aufgrund der Hydrolyseempfindlichkeit von CDI und des gebildeten Imidazolid<sup>[156]</sup> wurde die Reaktion in absolutem Lösungsmittel und in Schutzgasatmosphäre durchgeführt. Nach einstündigem Rühren wurde *O*-Tritylhydroxylamin (**LVI**) zugegeben und der Ansatz mehrere Stunden gerührt. Nach beendeter Reaktion wurden Nebenprodukte bei der Extraktion mit 10 %iger Citronensäurelösung in die wässrige Phase entfernt. Durch chromatographische Reinigung an Kieselgel konnten 16 % des gewünschten Produkts **28** elementaranalysenrein erhalten werden.



**Abbildung 24** Verwendete Methoden zur Synthese von **28**.

b) EDC HCl ist ein Carbodiimid, welches u.a. bei der Amidbildung aus Carbonsäuren und Aminen Anwendung findet.<sup>[157]</sup> Carbonsäuren reagieren mit EDC HCl zu *O*-Acylisoharnstoffen.<sup>[157-158]</sup> Im Falle der Verwendung eines Hydroxylamins als Nukleophil entsteht hieraus eine Hydroxamsäure. In der Literatur wird die Verwendung von EDC HCl in Verbindung mit *N,N*-Dimethylpyridin-4-amin (DMAP) als Katalysator bei Kupplungsreaktionen beschrieben.<sup>[159]</sup>

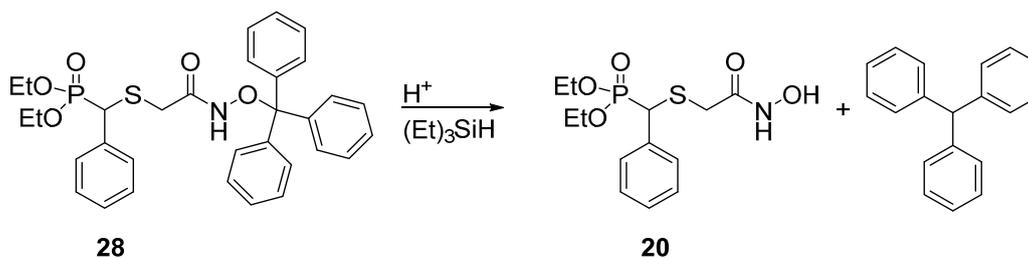
Für die Synthese der Hydroxamsäure **28** analog *Marek*<sup>[128]</sup> wurden alle drei Komponenten (Säure **9**, Hydroxylamin **LVI** und EDC HCl) in äquimolaren Mengen unter Schutzgasatmosphäre in Dichlormethan zusammengegeben, mit 0.2 Äquivalenten DMAP versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss an basische und saure Extraktionsschritte wurde das Rohprodukt chromatographisch an Kieselgel gereinigt und das Produkt konnte elementaranalysenrein in einer Ausbeute von 37 % erhalten werden.

c) In Gegenwart des Amins 4-Methylmorpholin (NMM) können aus Carbonsäuren und Isobutylchlorformiat gemischte Anhydride gebildet werden. Anschließender nukleophiler Angriff des Hydroxylamins liefert die Hydroxamsäure und einen Kohlensäurehalbester, der unter Freisetzung von CO<sub>2</sub> und Isobutanol zerfällt.

Für die Synthese von Hydroxamsäure **28** in Anlehnung an *Clavier et al.*<sup>[217]</sup> wurde die Carbonsäure **9** in Tetrahydrofuran (THF) mit 1.1 Äquivalenten NMM versetzt. Bei -20 °C wurde das entstandene Carboxylat mit ebenfalls 1.1 Äquivalenten Chlorameisensäureisobutylester umgesetzt. Die Hydrolyseempfindlichkeit des Säurechlorids und des gemischten Anhydrids erforderte das Arbeiten in absolutiertem Lösungsmittel und unter Schutzgasatmosphäre. Nachfolgend wurde Hydroxylamin **LVI** zugegeben und nach Beendigung der Reaktion, wässriger Aufarbeitung sowie chromatographischer Reinigung an Kieselgel wurde das Produkt elementaranalysenrein in einer Ausbeute von 55 % erhalten. Durch diese Methode konnte somit die höchste Ausbeute für die Hydroxamsäure **28** erzielt werden.

### Entfernung der Schutzgruppen (E, F)

Die Synthese der Hydroxamsäurefunktionalität wurde mit einem *O*-Trityl-geschützten Hydroxylamin realisiert. Da sich diese Schutzgruppe durch Säurelabilität auszeichnet, führte die Behandlung von Phosphonat **28** mit einem 8-fachen Überschuss Trifluoressigsäure zur Freisetzung der Hydroxamsäure **20** (E) (s. Abbildung 25). Es wurden 2 Äquivalente Triethylsilan zugesetzt, da das *O*-Trityl-geschützte Hydroxamat nach Protonierung durch Trifluoressigsäure neben der freien Hydroxamsäure auch in das Tritylkation zerfällt. Triethylsilan diente als Scavenger für dieses Elektrophil und wurde deswegen hierbei in Anlehnung an eine im Arbeitskreis bewährte Methode eingesetzt.<sup>[218]</sup> Nach chromatographische Reinigung des Rohprodukts an Kieselgel wurden 75 % der freien Hydroxamsäure elementaranalysenrein erhalten.



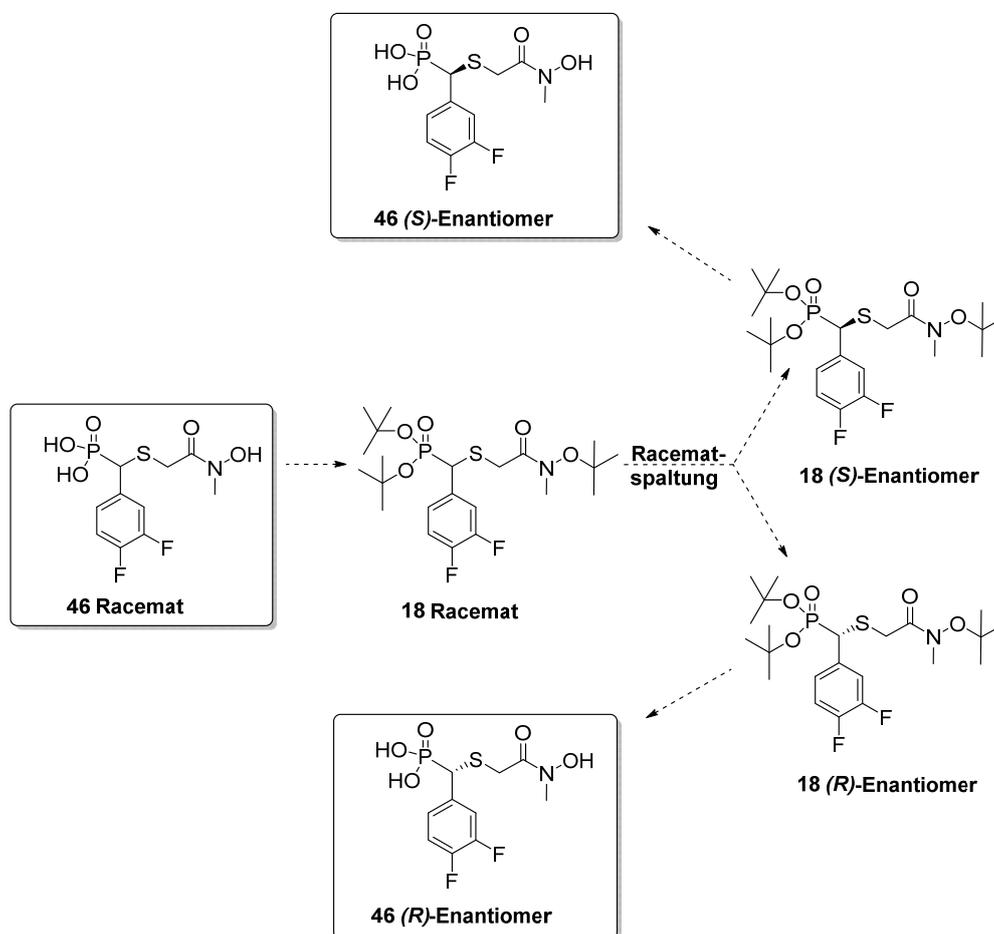
**Abbildung 25** Säurevermittelte Entschützung von **28** in Gegenwart von Triethylsilan.<sup>[218]</sup>

Als letzter Schritt schließt sich die TMSBr-vermittelte Konversion des Phosphonsäurediethylesters von **20** in die freie Phosphonsäure **52** an (F). Dies wurde, wie unter Synthesestrategie 1 beschrieben, durchgeführt. Chromatographie an einer sehr geringen Menge Kieselgel mit einem Elutionsmittelgradienten aus *n*-Hexan und Ethylacetat (100:0 → 0:100) lieferte das Produkt in einer Ausbeute von 61 % und einer Reinheit von über 95 % (HPLC-Analyse).

### 2.1.2 Synthese als Di-*tert*-butylphosphonate

Bei den  $\alpha$ -Aryl-substituierten Fosmidomycin-Thia-Analoga handelt es sich um racemische Verbindungen, die ein Asymmetriezentrum in  $\alpha$ -Position zur Phosphonsäuregruppe besitzen. Um zu evaluieren, ob das *Pf*IspC-Enzym eine Enantioselektivität gegenüber den Thia-Analoga aufweist und somit ein Enantiomer bevorzugt im aktiven Zentrum gebunden wird, sollte eine Methode zur Racematspaltung der Thia-Isostere gefunden werden. Die Selektion des Eutomers könnte so zu einer Steigerung der inhibitorischen Aktivität (idealerweise um das doppelte) gegenüber dem Racemat führen. Als Modellsubstanz für die Entwicklung einer Methode zur Racematspaltung mittels chiraler HPLC wurde die 3,4-Difluorphenyl- und *N*-Methyl-substituierte Phosphonohydroxamsäure **46** gewählt (s. Abbildung 26). **46** stellt mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von  $0.014 \pm 0.001 \mu\text{M}$  einen der potentesten *Pf*IspC-Inhibitoren (bezogen auf die Fosmidomycin-Thia-Analoga) dar. Zudem handelt es sich bei **46** um eine Substanz, die aus den Reaktionsrückständen des letzten Syntheseschritts, der TMSBr-vermittelten Entschützung des Phosphonsäureesters, sehr gut auskristallisiert und somit in hohen Ausbeuten und in hoher Reinheit gewonnen werden kann. Jedoch zeigten die Enantiomere ungeschützter Phosphonohydroxamsäuren an den chiralen stationären Phasen der zur Verfügung stehenden HPLC-Säulen (Chiralcel<sup>®</sup> OD) nur eine ungenügende Trennung und sehr lange Retentionszeiten. Daraufhin wurde Verbindung **18**, die sowohl an der Phosphon- als auch an der Hydroxamsäuregruppe *tert*-butyl-geschützt ist, entwickelt (s. Abbildung 26). Der sterisch anspruchsvolle *tert*-Butylester wurde für die Synthese von **18** ausgewählt, um zum einen die Trennbarkeit der Enantiomere zu erhöhen. Zum anderen sollte durch die

Verwendung einer einheitlichen Schutzgruppe für Phosphon- und Hydroxamsäurefunktion nach erfolgter Enantiomertrennung die parallele Entschützung beider Säurefunktionen ermöglicht werden.

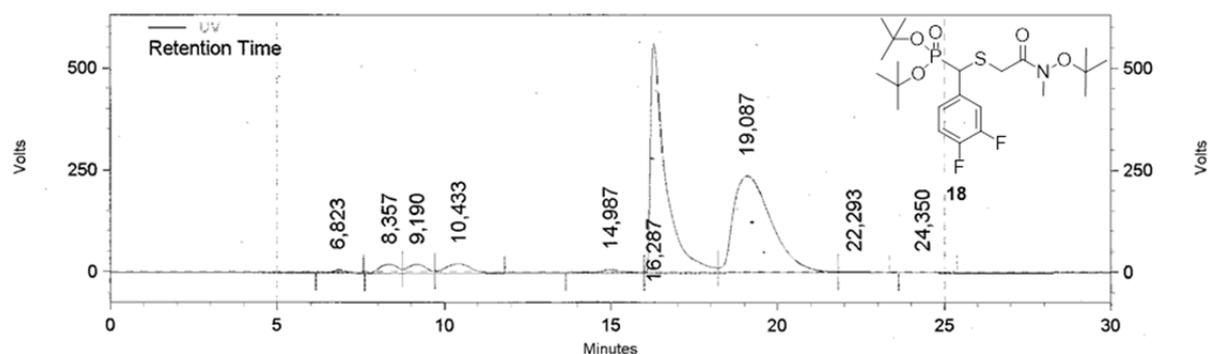


**Abbildung 26** Konzept zur Racematspaltung von **46** und Entwicklung von **18**.

Tatsächlich konnte nach Entwicklung einer geeigneten HPLC-Methode für Verbindung **18** nahezu eine Basislinientrennung der Enantiomerenpeaks (erreichte Auflösung = 1.9, s. Abbildung 27) erzielt werden, während zuvor bei der ungeschützten Phosphonohydroxamsäure **46** keine Trennung möglich war.

Wie in der Projektplanung erläutert (s. Abschnitt 1.5), sollte im Arbeitskreis von *Michael Groll* (Technische Universität München) die Kristallstruktur des *Pf*IsPC-Enzyms mit einem Thia-Analogen aufgenommen werden. Dies war in der Zwischenzeit für den Komplex aus *Pf*IsPC mit Thia-Analogen **43** und den Kofaktoren NADPH und  $Mn^{2+}$  (s. Kapitel 4.2) gelungen. Aus der Kristallstruktur geht hervor, dass selektiv das (*S*)-Enantiomer von **43** im Enzym gebunden wird. Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse wurde von Kooperationspartnern (Arbeitskreis *Markus Fischer*, Universität Hamburg) anhand von

Verbindung **43** eine Säule mit chiraler stationärer Phase und eine HPLC-Methode gefunden, die geeignet sind, die Enantiomere der ungeschützten Phosphonohydroxamsäuren zu trennen (Näheres hierzu s. Abschnitt 5.7 und 8.4.5). Eine direkte Racematspaltung der ungeschützten Zielverbindungen ist vorteilhafter als eine Racematspaltung des Triesters **18**, da dieser nach erfolgter Enantiomerentrennung noch entschützt und gereinigt werden muss. Deshalb wurde die Racematspaltung von **18** nicht weiter verfolgt.



#### UV Results

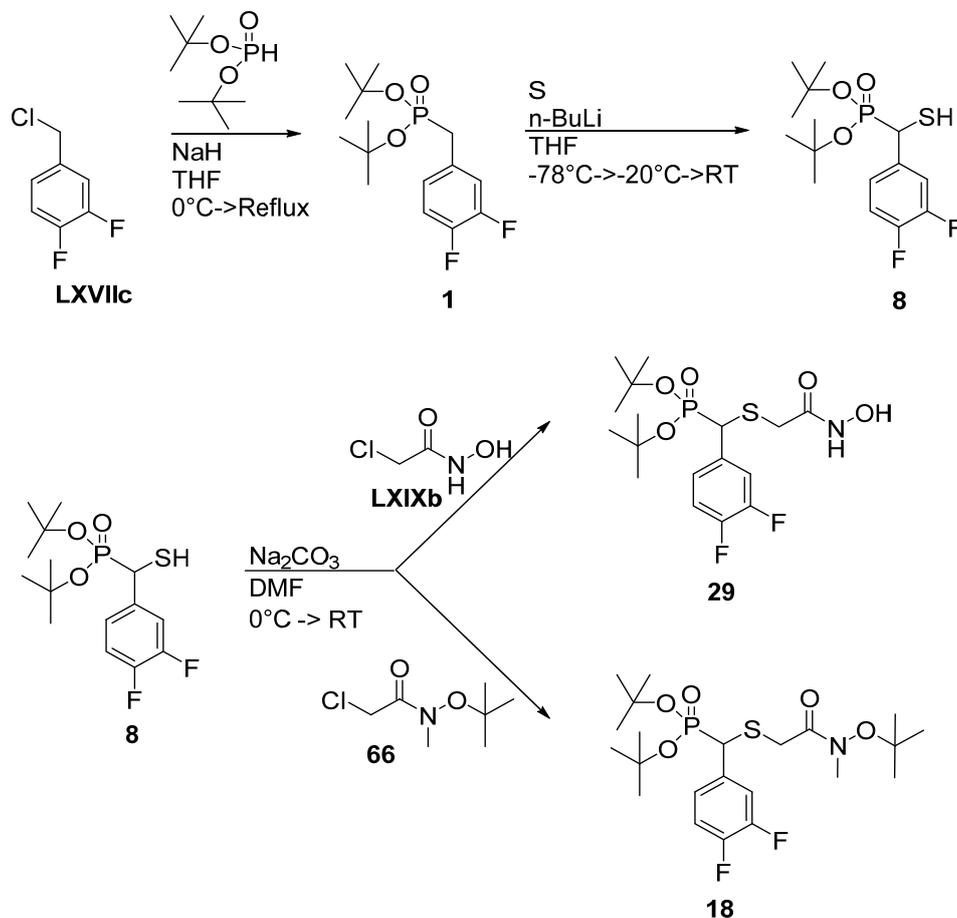
Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
6,823	694611	0,43	29195	0,83
8,357	3289242	2,05	86422	2,45
9,190	3357401	2,10	87115	2,47
10,433	4860446	3,03	92499	2,62
14,987	1195927	0,75	30437	0,86
16,287	70843414	44,22	2247661	63,61
19,087	75311737	47,01	948637	26,85
22,293	442203	0,28	7561	0,21
24,350	210243	0,13	3869	0,11

Totals	160205224	100,00	3533396	100,00
--------	-----------	--------	---------	--------

**Abbildung 27** Chromatogramm von Verbindung **18** (Racemat). Verwendete Methode: Säule: Chiralcel® OD (2 cm x 25 cm, Partikelgröße 10 µm); HPLC-Anlage: LaChrom Elite® System (VWR-Hitachi) mit Hitachi L-2130 als Pumpe und Hitachi L-2400 als UV-Detektor; Elution: *n*-Hexan/Propan-2-ol (95:5); Injektion von 20 µL der folgenden Lösung: 5 mg von **18** in 100 µL Propan-2-ol; Detektion bei 254 nm.

Verbindung **29** ist nur an der Phosphonsäuregruppe *tert*-butyl-geschützt (s. Abbildung 28). Geplant war, **29** zum Sulfoxid zu oxidieren. Die zum Phosphonsäurediethylester alternative Schutzgruppe sollte eine Isolierung der Zielverbindung in ausreichender Reinheit aus den Rückständen der Entschützungsreaktion ermöglichen (s. Abschnitt 2.2). Dies war nämlich für Sulfoxide aus den Rückständen der TMSBr-vermittelten Entschützungsreaktion nicht gelungen (s. unten). Darüber hinaus sollten die entstehenden Diastereomere und ggf. auch die Enantiomere des Sulfoxids durch den Einsatz von *tert*-Butylgruppen ebenfalls einer chromatographischen

Trennung zugänglich gemacht werden. Abschließend kann die Konversion der Estergruppe zur freien Phosphonsäure durch Säurezusatz erfolgen.<sup>[130, 160]</sup>



**Abbildung 28** Synthese der Verbindungen **18** und **29**.

Der Syntheseverlauf der als *tert*-Butylester vorliegenden Phosphonohydroxamsäuren **18** und **29** ist in Abbildung 28 dargestellt. Die Synthese der *tert*-Butylphosphonate **18** und **29** unterscheidet sich an einigen Stellen von der Synthese der Diethylphosphonate **10-17**, **19-21** und **23-26**, was in den divergenten Eigenschaften beider Estertypen und in deren Zugänglichkeit in der Synthese begründet ist. Im Gegensatz zu den schon vorgestellten Synthesewegen wurde hier der Phosphonsäureester **1** nicht in einer *Michaelis-Arbusow*-Reaktion aufgebaut. In Anlehnung an *Li et al.* konnte ausgehend von äquimolaren Mengen Di-*tert*-butylphosphit und 3,4-Difluorbenzylchlorid mit Hilfe einer starken Base ( $\text{NaH}$ , 1.04 Äquivalente) und 20-stündigem Erhitzen unter Rückfluss in  $\text{THF}$  das gewünschte Benzylphosphonat **1** gewonnen werden.<sup>[161]</sup> Nach wässriger Aufarbeitung mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung und Ethylacetat sowie chromatographischer Reinigung an Kieselgel konnte Verbindung **1** in einer Ausbeute von 85 % erhalten werden. Die nachfolgende Synthese des  $\alpha$ -Mercaptophosphonats **8** erfolgte wie in Abschnitt 2.1.1 beschrieben.

Allerdings musste die Säurelabilität der *tert*-Butylgruppen bei der wässrigen Aufarbeitung berücksichtigt werden. Ein Ansäuern des bei der Synthese entstehenden Thiolats mit 1 M HCl bis zu einem pH-Wert von 1 war nicht möglich. Toleriert wurde eine pH-Wert-Einstellung bis zu einem pH-Wert von 7-8. Diese musste unter Eiskühlung und starkem Rühren tropfenweise durchgeführt werden.

Nachfolgend schloss sich die *S*-Alkylierung analog Syntheseweg 1 an. Für die Synthese von **18** wurde das *O-tert*-butyl-geschützte Alkylans **66** benötigt, das zuvor in einer mehrstufigen Synthese gewonnen werden konnte. Der Syntheseverlauf für **66** ist in Abbildung 29 dargestellt. Nach der Freisetzung des Hydroxylamins **LXIXa** mittels Kaliumhydroxid aus seinem Hydrochlorid wurde an dessen Aminfunktion eine Schutzgruppe eingeführt. Dies geschah in Anlehnung an *Pohjakallio et al.*<sup>[162]</sup> durch Umsetzung mit einem Äquivalent Benzylchlorformiat (Cbz) in Gegenwart von Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Es resultierte das *N*-Cbz-geschützte Hydroxylamin **LXXII**. Anschließend wurde die Hydroxylfunktion, vermittelt durch Perchlorsäure-Katalyse, alkyliert.<sup>[163]</sup> Dies wurde durch Umalkylierung des *tert*-Butyl-Restes von *tert*-Butylacetat auf die betreffende Hydroxylfunktion von **LXXII** realisiert. Hydrogenolyse in Methanol mit 15-20 % (w/w) Palladium auf Aktivkohle (10 %) lieferte intermediär ein Carbaminsäure-Derivat, das durch spontanen Zerfall *O*-(*tert*-Butyl)-*N*-methylhydroxylamin **LXXIV** freisetzte.

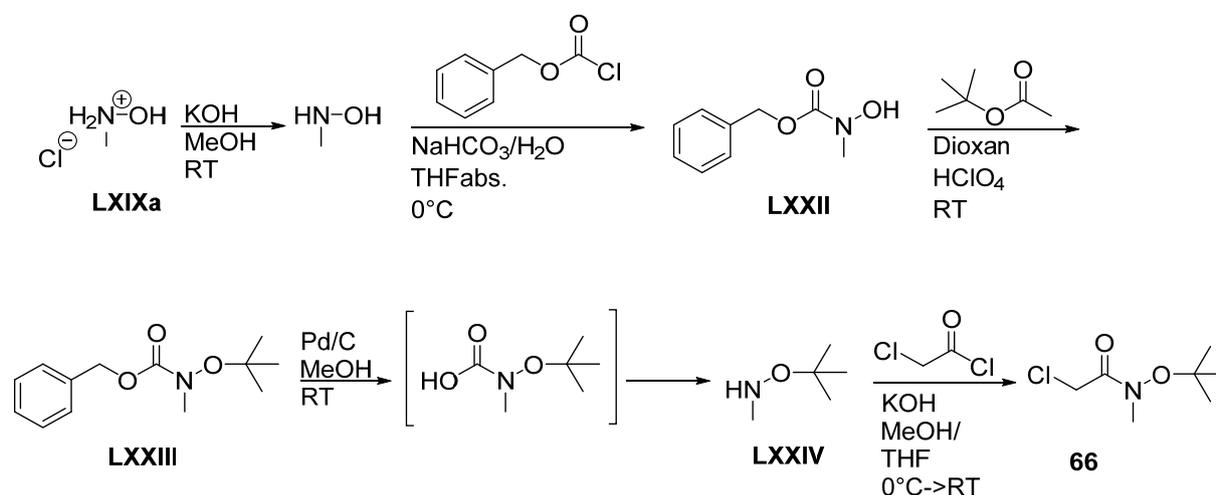


Abbildung 29 Synthese von Alkylans **66**.

Anschließend erfolgte die Umsetzung mit 2-Chloracetylchlorid wie in Synthesestrategie 1 beschrieben. Die wässrige Aufarbeitung und die Chromatographie an Kieselgel lieferten das *O-tert*-butyl-geschützte Alkylans **66** in einer Ausbeute von 77 %.

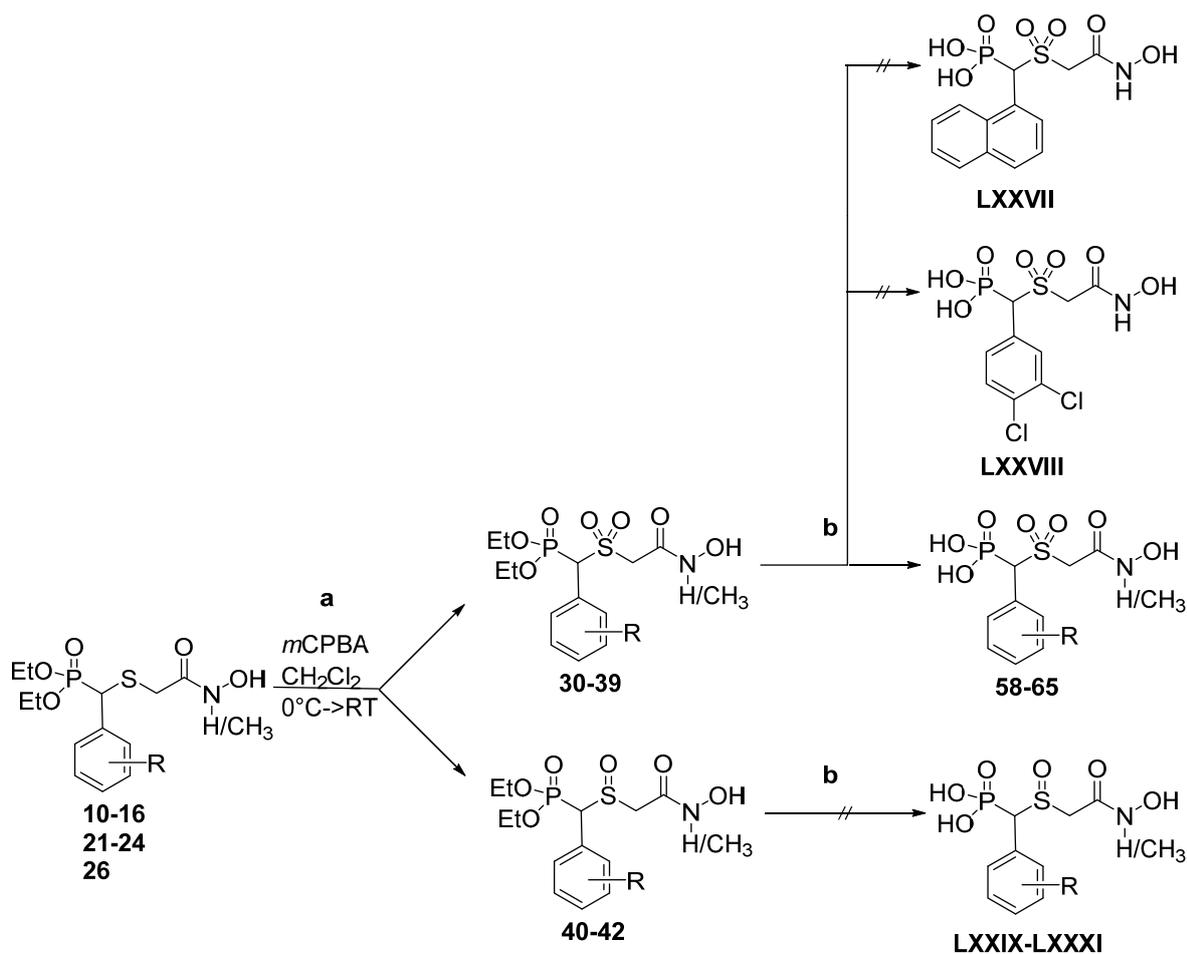
Bei der *S*-Alkylierung des Thiols **8** musste ebenfalls während der wässrigen Aufarbeitung die Säurelabilität der Schutzgruppe beachtet werden. Anstelle einer Extraktion mit 1 M Salzsäure wurde gesättigte Natriumchlorid-Lösung verwendet. Um dieselbe Effektivität zu erzielen wie die salzsaure Extraktion, musste die Extraktion mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung häufiger durchgeführt werden. Die nahezu quantitative Entfernung des Reaktionsmediums DMF gelang erst nach fünfmaliger Extraktion. Der wässrigen Aufarbeitung schloss sich die chromatographische Reinigung an Kieselgel an. **18** konnte so in einer Ausbeute von 35 % und **29** in einer Ausbeute von 45 % gewonnen werden.

## **2.2 Synthese der $\beta$ -thia-isosteren Fosmidomycin-Analoga mit Sulfoxid- und Sulfonpartialstruktur**

Von den thia-isosteren Analoga mit Sulfidpartialstruktur lassen sich durch Oxidation zwei weitere Substanzklassen ableiten, die Analoga mit Sulfon- und die Analoga mit Sulfoxidpartialstruktur (s. Abbildung 30). Die Kristallstruktur des Komplexes aus *PfIspC* und **43** (s. Abschnitt 4.2) ließ hierzu Folgendes vermuten: eine Sulfon- oder eine Sulfoxidfunktion könnte nicht nur von der Bindetasche des Enzyms toleriert, sondern auch durch Interaktionen mit Aminosäureresten stabilisiert werden. Im späteren Verlauf hat eine Dockingstudie des Sulfons **58** an *PfIspC*<sup>\*</sup> diese Vermutung bestätigt. Die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Hydroxylgruppe eines Serinrests des aktiven Zentrums und den Sauerstoffatomen der Sulfonfunktion des Liganden wäre möglich (Näheres hierzu s. Abschnitt 5.2). Eine solche Interaktion würde das Sulfonmolekül als Liganden am Enzym stabilisieren und müsste in der Folge zu einer guten inhibitorischen Aktivität führen. Die Substanzklasse der Sulfoxide zeigt darüber hinaus eine weitere Besonderheit. Durch die Synthese von Sulfoxiden wird ein zweites Chiralitätszentrum generiert, das zur Ausbildung von Diastereomeren führt. Wenn die Trennung der Diastereomere und idealerweise auch der einzelnen Enantiomere gelänge, könnte durch die Selektion des biologisch aktivsten Diastereomers bzw. Enantiomers die Enzym-inhibitorische und antiplasmodiale Potenz des Isomerengemischs um ein Vielfaches übertroffen werden.

---

<sup>\*</sup>Durchgeführt von *Leandro Avelar* (Universität Düsseldorf) mit Hilfe des Programms Autodock 4.2 und der *PfIspC*-Kristallstruktur 4KP7 (PDB-Code).



**Abbildung 30** Darstellung der Sulfone **30-39** und **58-65** sowie der Sulfoxide **40-42**. Tabelle 6 (S. 53) zeigt eine Strukturübersicht über alle gewonnenen Zielverbindungen.

Durch Oxidation der Sulfide **10-16**, **21-24** und **26** sollten die entsprechenden Sulfone **30-39** sowie Sulfoxide **40-42** mit geschützter Phosphonsäuregruppe erhalten werden. Eine Recherche ergab, dass sich in der Literatur als Oxidationsmittel für Sulfide 3-Chlorperoxybenzoesäure (*m*CPBA) bewährt hat. Dieses Oxidationsmittel hat für die Synthese von Sulfonen und Sulfoxiden insbesondere Eingang in zahlreiche Patente der pharmazeutischen Industrie gefunden.<sup>[164-168]</sup> Aufgrund dessen weiter Verbreitung wurde für die Oxidation *m*CPBA gewählt. Da mit diesem Reagenz zufriedenstellende Ausbeuten erzielt werden konnten (mit Ausnahme von zwei Substanzen\* wurden alle Verbindungen **30-42** in Ausbeuten von ca. 50-80 % gewonnen) und das Nebenprodukt 3-Chlorbenzoesäure chromatographisch gut abtrennbar war (s. unten), wurden alle Sulfone **30-39** sowie Sulfoxide

\*Die Synthese von Verbindung **23** ergab eine Ausbeute von 27 % und die Synthese von Verbindung **36** eine Ausbeute von 39 %.

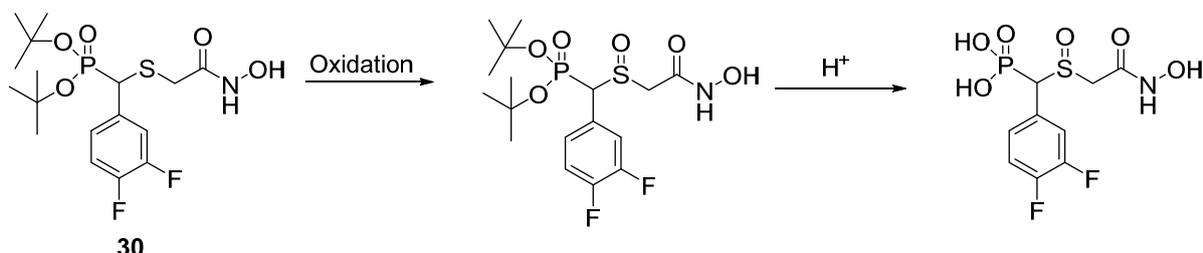
**40-42** mit Hilfe von *m*CPBA generiert. Nach der Oxidation schloss sich die TMSBr-vermittelte Desalkylierung der Phosphonsäureester an (s. Abbildung 30).

Die Oxidation erfolgte mittels 3-Chlorperoxybenzoesäure (*m*CPBA) in Anlehnung an *Gassman et al.* in trockenem Dichlormethan bzw. DMF bei 0 °C.<sup>[169]</sup> Zur Synthese der Sulfone wurde hierfür ein Überschuss des Oxidationsmittels von 2.6 Äquivalenten verwendet. Die Sulfoxidsynthese wurde mit genau einem Äquivalent 3-Chlorperoxybenzoesäure durchgeführt, um unerwünschte Oxidationen über die Sulfoxidstufe hinaus zu vermeiden. Das Oxidationsmittel wurde in trockenem Dichlormethan suspendiert und bei 0°C mit dem in wenigen Millilitern Dichlormethan gelösten Sulfid versetzt. Bei der Synthese der Sulfoxide ist darauf zu achten, dass die Sulfidzugabe schnell verläuft, um die Verweilzeit des Sulfids in der Oxidationsmittel-haltigen Suspension möglichst gering zu halten. Auch hier soll eine weitere Oxidation des Sulfoxids verhindert werden. Nach beendeter Reaktion und nach chromatographischer Reinigung an Kieselgel konnten die Sulfone **30-39** elementaranalysenrein in Ausbeuten von 39-84 % gewonnen werden. Die Sulfoxide **40-42** wurden nach erfolgter Chromatographie in Ausbeuten von 27-76 % ebenfalls elementaranalysenrein erhalten. Die TMSBr-vermittelte Entschützung der Phosphonsäuren resultierte in den Sulfonen **58-65**.

Die Isolierung der zu den Sulfonen **37, 38** korrespondierenden freien Phosphonsäuren **LXXVII** und **LXXVIII** sowie der zu den Sulfoxiden **40-42** korrespondierenden freien Phosphonsäuren **LXXIX-LXXXI** aus den Reaktionsrückständen der TMSBr-Spaltung gelang jedoch nicht in ausreichender Reinheit. Dies kann auf die Substanzeigenschaften der Sulfone und Sulfoxide zurückgeführt werden. Mit Ausnahme von Verbindung **65** handelt es sich bei allen Sulfonen bzw. Sulfoxiden mit freier Phosphonsäurefunktion um Öle. Im Vergleich hierzu sind bei den Sulfiden alle freien Phosphonsäuren mit *N*-Methyl-substituierter Hydroxamsäurefunktion **43-50** Feststoffe. Lediglich die nicht am Stickstoff substituierten Verbindungen **52-57** sind Öle. Liegt ein Produkt als Feststoff vor, ist es leichter, d. h. mit weniger Substanzverlust und in größerer Reinheit, aus den Reaktionsrückständen zu isolieren. Die öligen Reaktionsrückstände wurden chromatographisch an kleinen Mengen Kieselgel gereinigt. Wie für die Entschützung des Sulfids **27** beschrieben (s. Abschnitt 2.1.1), führte dies auch bei den korrespondierenden freien Phosphonsäuren der Sulfone **37, 38** und der Sulfoxide **40-42** nicht zu einer ausreichenden Reinheit von mind. 95 % (HPLC-Analyse).

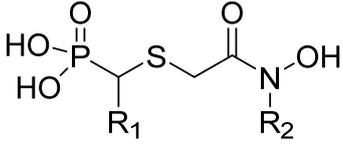
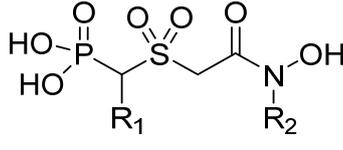
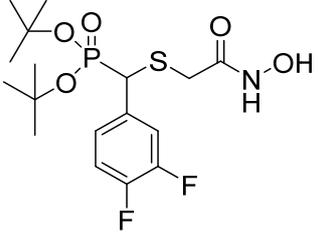
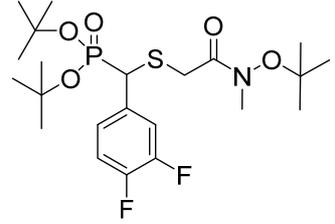
Um dennoch Sulfoxide mit freier Phosphonsäurefunktion zu gewinnen, wurde anstelle des Diethylesters eine andere Schutzgruppe eingesetzt. Dies hatte zwei Gründe. Zum einen sollte

durch eine andere Methode zur Freisetzung der Phosphonsäure die Gewinnung dieser in ausreichender Reinheit ermöglicht werden, denn der Einsatz von TMSBr als Reagenz führt zu gefärbten, stark verunreinigten Reaktionsrückständen. Zum anderen sollte eine sterisch anspruchsvolle Gruppe die chromatographische Trennung der Diastereomere und ggf. auch der Enantiomere erlauben (s. Abschnitt 2.1.2).



**Abbildung 31** Synthesekonzept für die Gewinnung von Sulfoxiden mit freier Phosphonsäurefunktion.

*tert*-Butylester sind eine geeignete Schutzgruppe, die die erforderlichen Eigenschaften aufweisen. Die Konversion des entsprechenden *tert*-Butylesters zu der freien Phosphonsäure kann durch Säurezusatz erfolgen<sup>[130, 160]</sup> (Synthesekonzept s. Abbildung 31). Die Synthese des als Phosphonsäuredi*tert*butylester vorliegenden Sulfids **29** (s. Abschnitt 2.1.2) war erfolgreich, jedoch konnte bisher noch keine geeignete Methode gefunden werden, um dieses unter Erhalt der Schutzgruppen zu oxidieren. Die Oxidation von **29** wurde mit mehreren Methoden und Reagenzien versucht. Alle Reaktionen hatten entweder den Verlust der Schutzgruppe zur Folge oder das Edukt wurde nicht umgesetzt. Die Verwendung von *m*CPBA analog der für Phosphonsäurediethylester bewährten Methode führte zum Verlust der säurelabilen Schutzgruppe. Basenzusatz wie Triethylamin oder Kaliumcarbonat bei dieser Reaktion resultierte darin, dass das Edukt nicht umgesetzt wurde. Umsetzung mit 30 %iger Wasserstoffperoxid-Lösung analog *Liu et al.*<sup>[170]</sup> in Acetonitril führte nicht zur Oxidation, sondern ebenfalls zum Abbau der Schutzgruppe. Oxidation in basischem Milieu wie von *Ràbai et al.*<sup>[171]</sup> beschrieben durch Phenyltrimethylammoniumtribromid in Pyridin führte nicht zur Umsetzung des Edukts.

	
<b>R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub></b>	<b>R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub></b>
<b>43:</b> R <sub>1</sub> = Ph	<b>58:</b> R <sub>1</sub> = Ph
<b>44:</b> R <sub>1</sub> = 4-CH <sub>3</sub> -Ph	<b>59:</b> R <sub>1</sub> = 4-CH <sub>3</sub> -Ph
<b>45:</b> R <sub>1</sub> = 1-Naphthyl	<b>60:</b> R <sub>1</sub> = 1-Naphthyl
<b>46:</b> R <sub>1</sub> = 3,4-F-Ph	<b>61:</b> R <sub>1</sub> = 3,4-Cl-Ph
<b>47:</b> R <sub>1</sub> = 3,4-Cl-Ph	<b>62:</b> R <sub>1</sub> = 3,5-F-Ph
<b>48:</b> R <sub>1</sub> = 3,5-F-Ph	<b>63:</b> R <sub>1</sub> = 3,5-OCH <sub>3</sub> -Ph
<b>49:</b> R <sub>1</sub> = 3,5-OCH <sub>3</sub> -Ph	<b>R<sub>2</sub> = H</b>
<b>50:</b> R <sub>1</sub> = 4-SCH <sub>3</sub> -Ph	<b>64:</b> R <sub>1</sub> = 4-CH <sub>3</sub> -Ph
<b>R<sub>2</sub> = CH<sub>2</sub>Ph</b>	<b>65:</b> R <sub>1</sub> = 3,5-OCH <sub>3</sub> -Ph
<b>51:</b> R <sub>1</sub> = H	
<b>R<sub>2</sub> = H</b>	
<b>52:</b> R <sub>1</sub> = Ph	
<b>53:</b> R <sub>1</sub> = 4-CH <sub>3</sub> -Ph	
<b>54:</b> R <sub>1</sub> = 3,4-F-Ph	
<b>55:</b> R <sub>1</sub> = 3,4-Cl-Ph	
<b>56:</b> R <sub>1</sub> = 3,5-F-Ph	
<b>57:</b> R <sub>1</sub> = 3,5-OCH <sub>3</sub> -Ph	
<b>29:</b> 	
<b>18:</b> 	

**Tabelle 6** Strukturen der gewonnenen Zielverbindungen.

### 3 Spektroskopische Eigenschaften

Im folgenden Kapitel werden die Eigenschaften der  $\beta$ -thia-isosteren Fosmidomycin-Analoga in der  $^1\text{H-NMR}$ -, NOE-,  $^{13}\text{C-NMR}$ - und IR-Spektroskopie beschrieben. Die Benzylphosphonate **LII** stellen die Grundbausteine der Analoga dar. Sie sind literaturbekannt, trotzdem soll zum besseren Verständnis der spektroskopischen Eigenschaften der sich von ihnen ableitenden Verbindungen das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum eines Benzylphosphonats besprochen werden. Ausgehend hiervon werden anschließend an ausgewählten Vertretern unterschiedlicher Substanztypen (wie Hydroxamsäuren mit Sulfid- und Sulfonpartialstruktur) deren spektroskopische Eigenschaften besprochen und miteinander verglichen. Für die Darstellungen werden in  $\alpha$ -Position unterschiedlich substituierte Vertreter ausgewählt, um auch spektroskopische Phänomene divergenter Struktur motive zu erfassen.

#### 3.1 $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie

##### *Benzylphosphonate LII*

Exemplarisch für die Benzylphosphonate **LII** soll das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von dem schon in der Literatur beschriebenen Diethyl(3,4-difluor)benzylphosphonat **LIIf**<sup>[172-173]</sup> vorgestellt werden (s. Abbildung 32).

Die Phosphonsäurediethylesterfunktion besitzt zwei chemisch nicht äquivalente Protonengruppen, die spektroskopisch unterschiedlich in Erscheinung treten. Die  $\text{CH}_3$ -Protonen a zeigen eine homonukleäre vicinale  $^3J(\text{H,H})$ -Kopplung mit den  $\text{CH}_2$ -Protonen b. Es tritt ein Triplett ( $^3J(\text{H,H})=7.0$  Hz) mit einer chemischen Verschiebung von  $\delta=1.17$  ppm auf. Die Protonen der  $\text{CH}_2$ -Gruppe gehen neben der  $^3J(\text{H,H})$ -Kopplung mit den  $\text{CH}_3$ -Protonen zusätzlich noch eine heteronukleäre vicinale  $^3J(\text{H,P})$ -Kopplung ein. Im Spektrum wird dies als Multiplett sichtbar. Zudem erfährt das Signal der  $\text{CH}_2$ -Gruppe einen Tieffeld-Shift durch das benachbarte Sauerstoffatom. Das Multiplett besitzt eine chemische Verschiebung von 4.00-3.92 ppm. Die Protonen der  $\text{PCH}_2$ -Gruppe c zeigen eine heteronukleäre geminale Kopplung von  $^2J(\text{H,P})=21.5$  Hz zu  $^{31}\text{P}$  und sind im Spektrum als Dublett bei 3.26 ppm sichtbar. Die drei Protonen des Aromaten koppeln sowohl homonukleär als auch mit dem Phosphor- und den Fluoratomen. Sie erscheinen als Multipletts ( $\delta=7.43-7.36$  ppm,  $\delta=7.36-7.29$  ppm,  $\delta=7.16-7.10$  ppm).

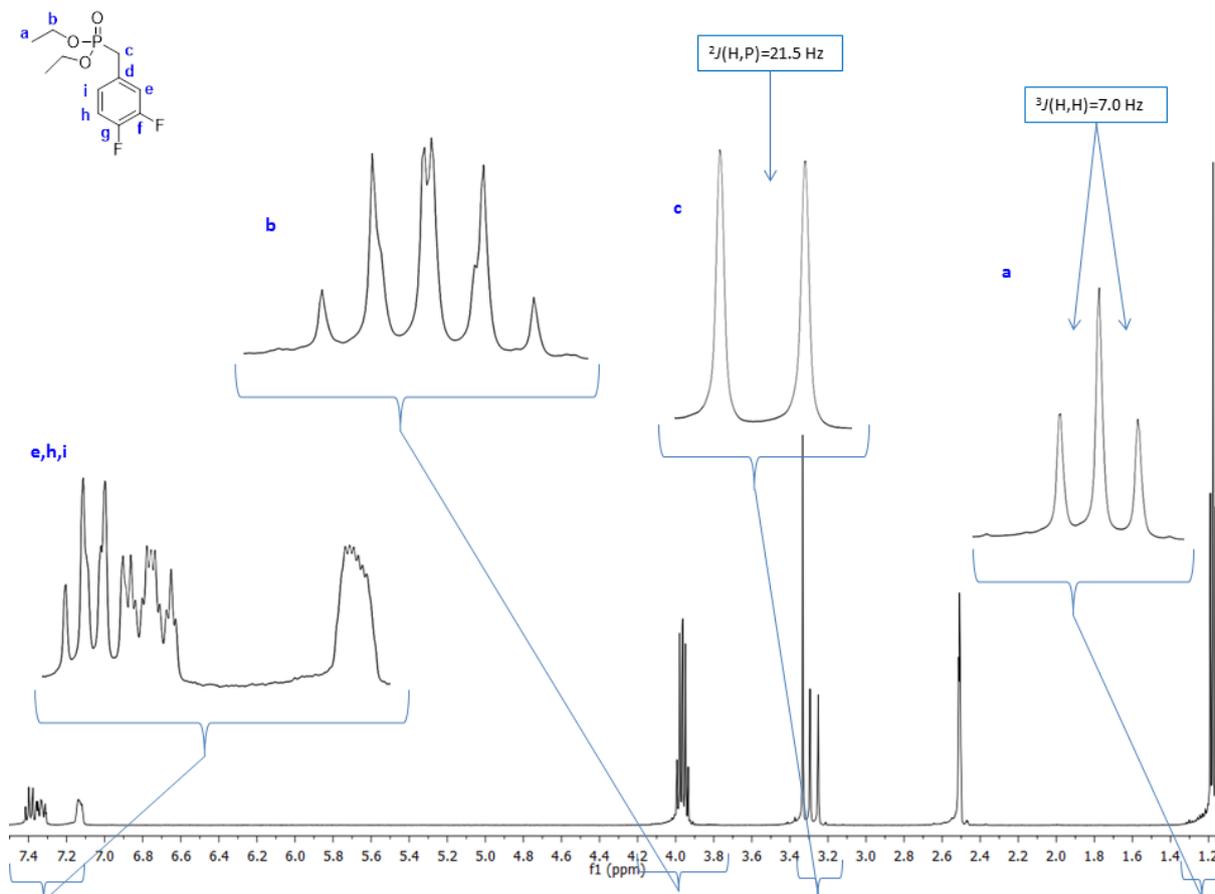


Abbildung 32  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **LIIIc** in  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ .

### *$\alpha$ -Mercaptophosphonate LIII, 2-7*

Die  $\alpha$ -Mercaptophosphonate **LIII** und **2-7** zeigen ähnliche spektroskopische Eigenschaften wie die Benzylphosphonate **LII**. Durch Einführung der Sulfhydryl-Gruppe wird allerdings in  $\alpha$ -Position zum Phosphoratom ein Chiralitätszentrum generiert, welches Auswirkungen auf das spektroskopische Verhalten der Protonen des Diethylesters hat. Das Chiralitätszentrum führt zu chemischer bzw. magnetischer Nicht-Äquivalenz der Methylgruppen des Esters. Diese koppeln, wie zuvor beschrieben, mit den benachbarten Methylengruppen, spalten aber in zwei Triplets auf. Beispielsweise treten diese Triplets für Thiol **6** mit  $^3J(\text{H},\text{H})=7.0$  Hz bei  $\delta=1.24$  ppm und  $\delta=1.07$  ppm auf (s. Abbildung 33). Die Protonen der  $\text{CH}_2$ -Gruppen des Phosphonsäureesters werden durch das Asymmetriezentrum diastereotop. Anstelle eines Multipletts, das wie zuvor beschrieben durch Protonen- und Phosphorkopplungen entsteht, treten mehrere auf. Im Falle des Thiols **6** handelt es sich um drei Multipletts bei 4.16-3.99 ppm, 3.96-3.86 ppm und 3.85-3.76 ppm.

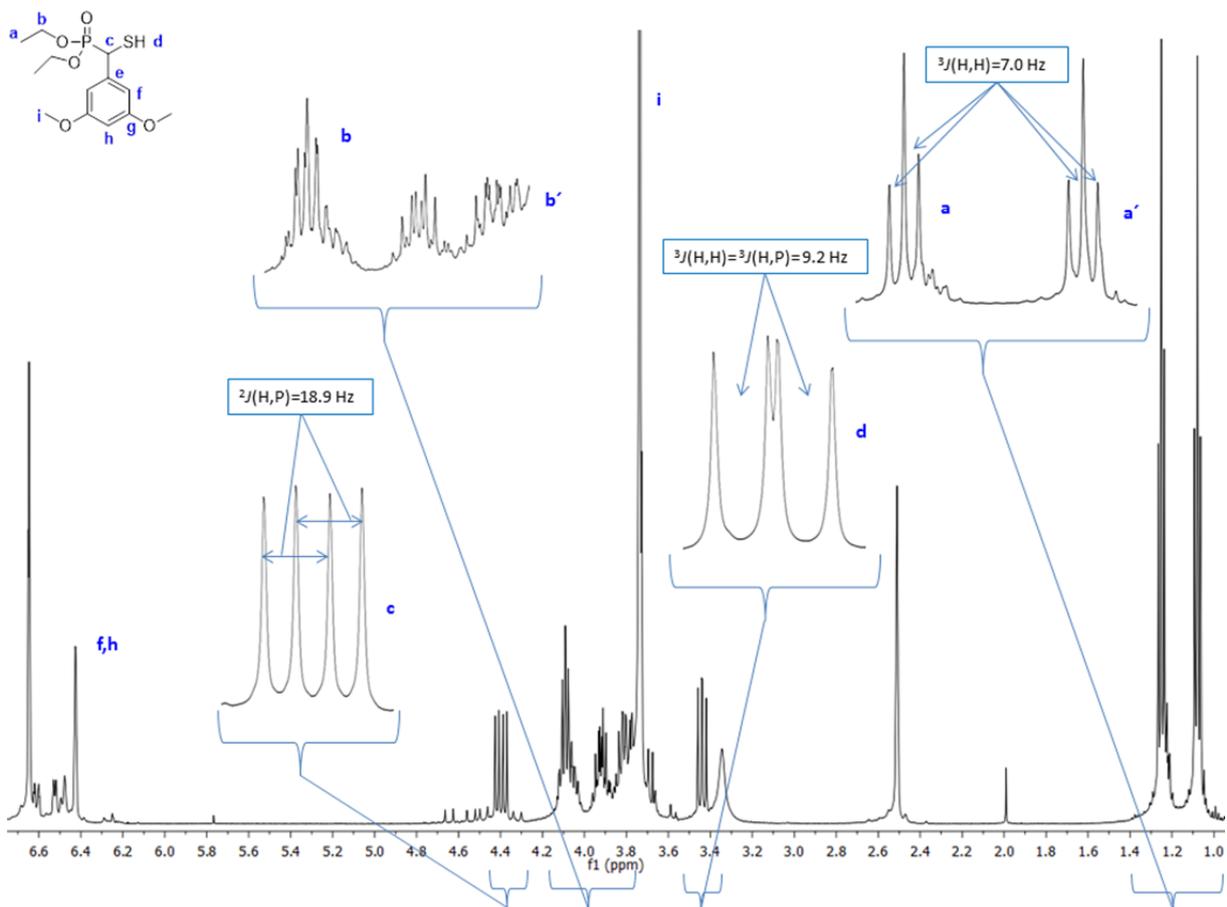


Abbildung 33  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **6** in  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ .

### Hydroxamsäuren mit Sulfidpartialstruktur 10-17, 19-21, 23-26, 43-57

Am Beispiel von Verbindung **21** sollen die spektroskopischen Eigenschaften der Hydroxamsäuren **10-17**, **19-21**, **23-26** und **43-57** dargestellt werden (s. Abbildung 34). Die Multiplizitäten der Signale des Phosphonsäurediethylesters bleiben im Vergleich zu den  $\alpha$ -Mercaptophosphonaten unverändert. Die  $\text{CH}_3$ -Gruppen des Esters a/a' treten als zwei Triplets mit  $^3J(\text{H,H})=7.0$  Hz bei 1.05 und 1.22 ppm auf. Die Signale der  $\text{CH}_2$ -Gruppen b/b' spalten als drei Multipletts bei 4.12–3.97 ppm (2H), 3.95–3.85 ppm (1H) und 3.82–3.71 ppm (1H) auf. Anstelle der Signale des Phosphonsäurediethylesters zeigen die freien Phosphonsäuren **43-65** für die Protonen der Phosphonsäurefunktion ein sehr breites Signal. Dieses liegt beispielsweise für Verbindung **52** bei einer chemischen Verschiebung von 6.41 ppm.

Durch die heteronukleäre geminale  $^{31}\text{P}$ -Kopplung erscheint das Signal des PCH-Protons im Chiralitätszentrum als Dublett mit  $^2J(\text{H,P})=19.6$  Hz bei 4.57 ppm, was in der

Multiplizität und der Lage dem Signal der PCH<sub>2</sub>-Protonen c der Benzylphosphonate entspricht.

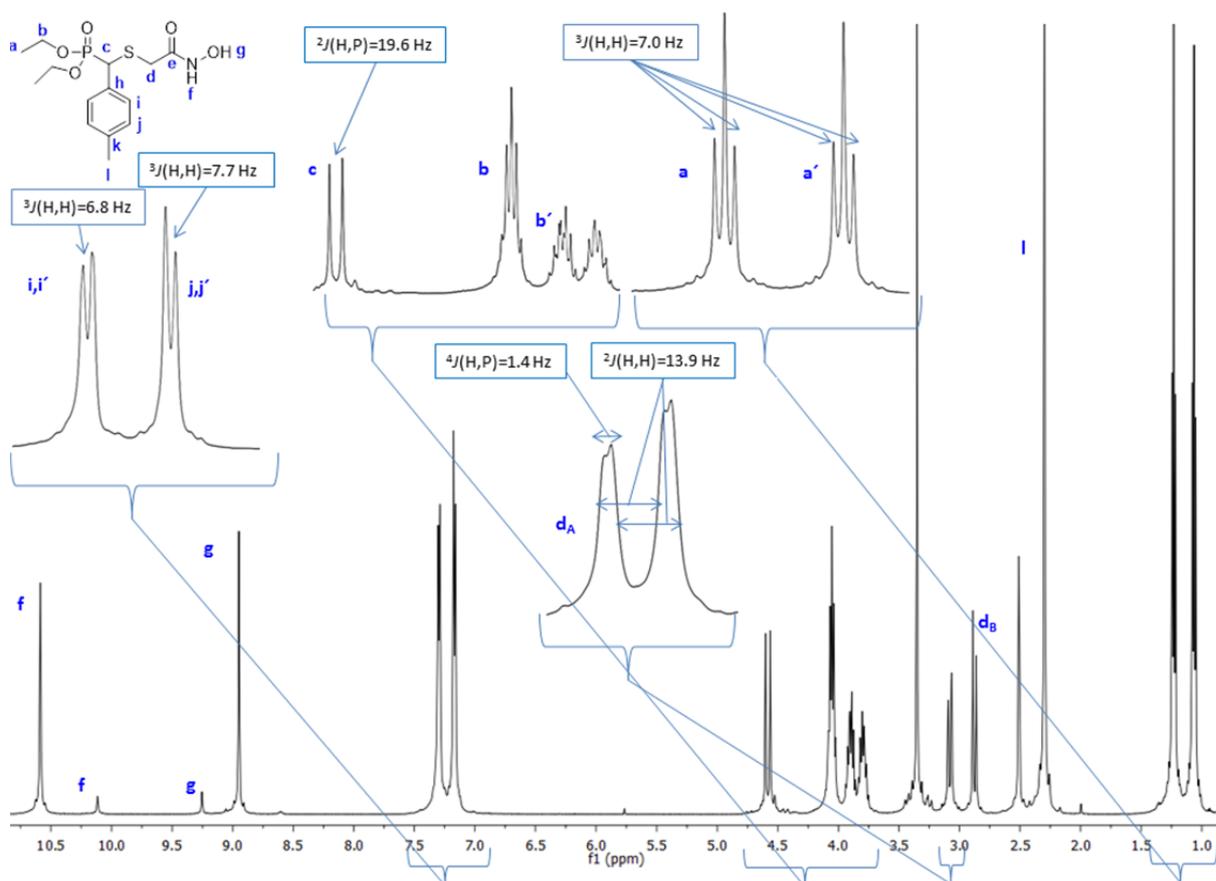


Abbildung 34 <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von Verbindung **21** in [D<sub>6</sub>]DMSO.

**21** ist in  $\alpha$ -Position mit einem Tolyrest substituiert. Die aromatischen Protonen spalten jeweils -durch die vicinale Kopplung mit den anderen aromatischen Protonen bedingt- als zwei Dubletts auf, die einen Dacheffekt zeigen (d,  $^3J(\text{H,H})=6.8$  Hz,  $\delta=7.29$  ppm; d,  $^3J(\text{H,H})=7.7$  Hz,  $\delta=7.16$  ppm).

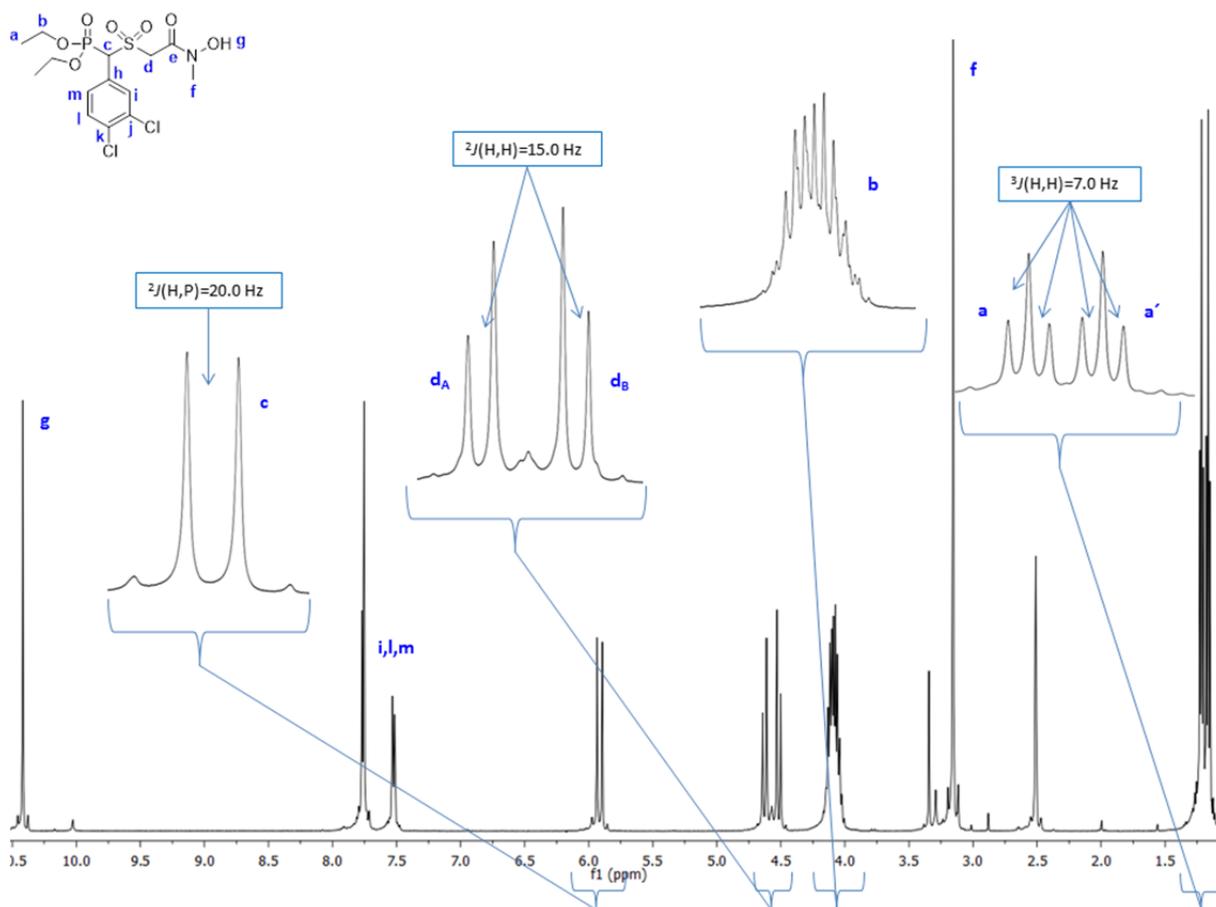
Da die Protonen d<sub>A</sub> und d<sub>B</sub> der SCH<sub>2</sub>-Funktion diastereotop sind, gibt jedes ein eigenes Signal. Die Protonen koppeln geminal, wobei auch die long-range-Kopplung mit <sup>31</sup>P bei einem der Protonen zu sehen ist. Es entstehen demnach ein einfaches Dublettsignal mit  $^2J(\text{H,H})=13.9$  Hz bei 2.87 ppm und ein Dublett vom Dublett mit  $^2J(\text{H,H})=13.9$  Hz und  $^4J(\text{H,P})=1.4$  Hz bei 3.07 ppm. Auch die Protonensignale der Hydroxamsäurefunktionalität treten mehrfach auf und sind zudem verbreitert. Der Elektronenzug der Carbonylfunktion führt zu einem Tieffeld-Shift des NH-Protons. So treten insgesamt die folgenden vier Signale für die Hydroxamsäuregruppe auf: br. s\*, NH,  $\delta=10.58$  ppm; br. s, NH,  $\delta=10.10$  ppm; br. s,

\*br. s = broad signal

OH,  $\delta=9.24$  ppm und br. s, OH,  $\delta=8.94$  ppm. Ursache hierfür kann das Vorliegen unterschiedlicher Isomere und Konformere der Hydroxamsäurefunktion sein, was in Abschnitt 3.2 mittels NOESY-Experimenten genauer analysiert wird.

### Hydroxamsäuren mit Sulfonpartialstruktur 30-39, 58-65

Hydroxamsäuren mit Sulfon- und Sulfidpartialstruktur verfügen über ähnliche spektroskopische Eigenschaften. Ein auffälliger Unterschied ist jedoch die veränderte chemische Verschiebung einiger Signale, was am Beispiel des Sulfons **33** erläutert werden soll.



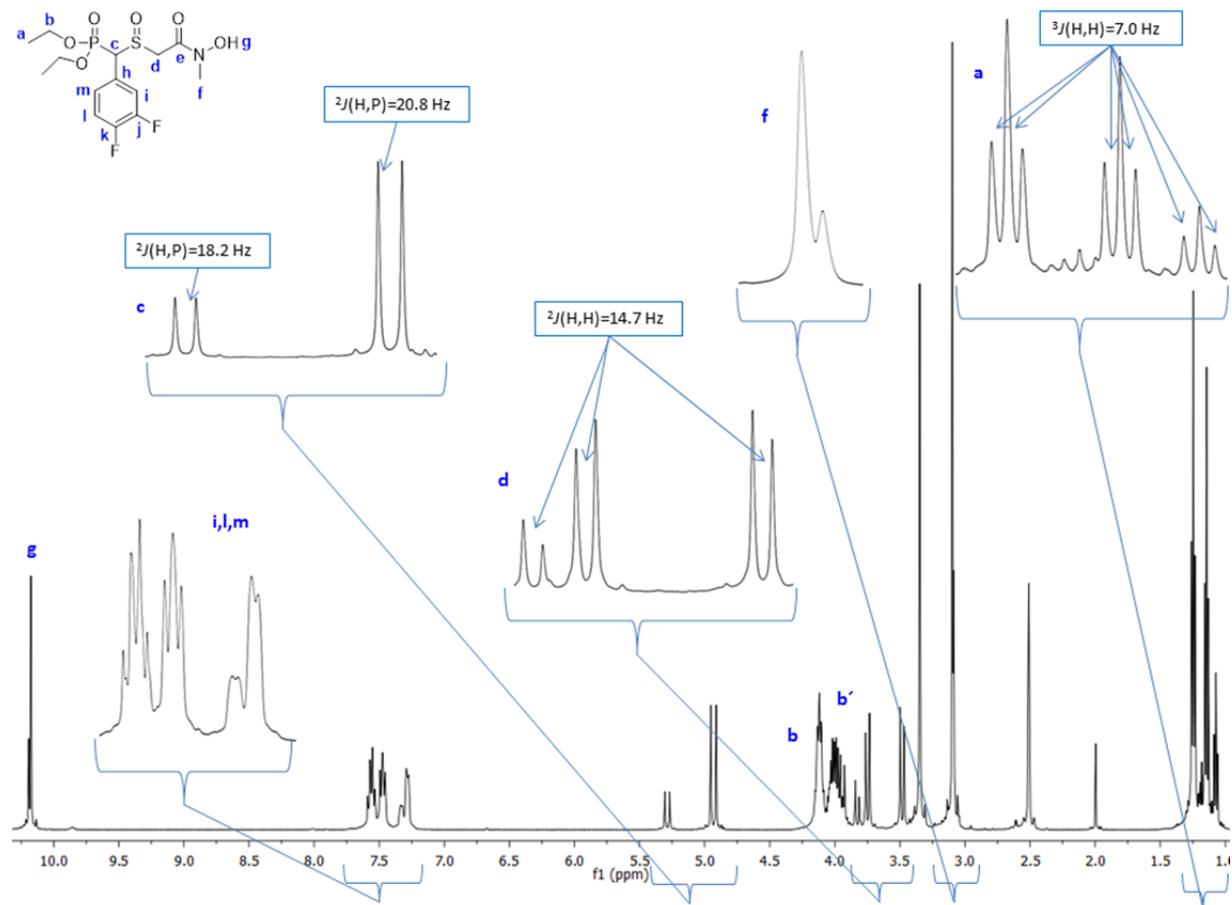
**Abbildung 35**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **33** in  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ .

Abbildung 35 zeigt das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **33** in  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ . Sowohl das Signal des PCH-Protons c als auch die Signale der S-Methyleninheit d erfahren durch den stark entschirmenden Charakter der Sulfonylgruppe einen Tieffeld-Shift und erscheinen, verglichen mit dem korrespondierenden Sulfid **14**, bei höheren ppm-Werten. Die Multiplizitäten der einzelnen Signale entsprechen den Signalen der Sulfide. So erscheint das Signal des PCH-Protons um 1.23 ppm verschoben bei 5.90 ppm als Dublett mit  $^2J(\text{H,P})=20.0$  Hz. Die Signale der  $\text{SCH}_2$ -Protonen sind um je 1.11 ppm verschoben und liegen bei 4.62 ppm und 4.51 ppm.

Durch die geminale Kopplung treten auch sie als Dubletts auf mit je  $^2J(\text{H,H})=15.0$  Hz. Die für Thiole und Sulfide beobachtete häufige Aufspaltung der diastereotopen  $\text{POCH}_2$ -Protonen in drei Multipletts ist hier verändert. Durch einen Tieffeld-Shift der beiden Multipletts, die jeweils ein Proton repräsentieren, laufen alle Signale zu einem 4 Protonen umfassenden Multiplett bei 4.18-3.97 ppm zusammen.

### Hydroxamsäuren mit Sulfoxidpartialstruktur 40-42

Die Oxidation der Sulfidfunktion zur Sulfinylgruppe hat zwei Auswirkungen auf die NMR-spektroskopischen Eigenschaften der so entstehenden Sulfoxide **40-42**.

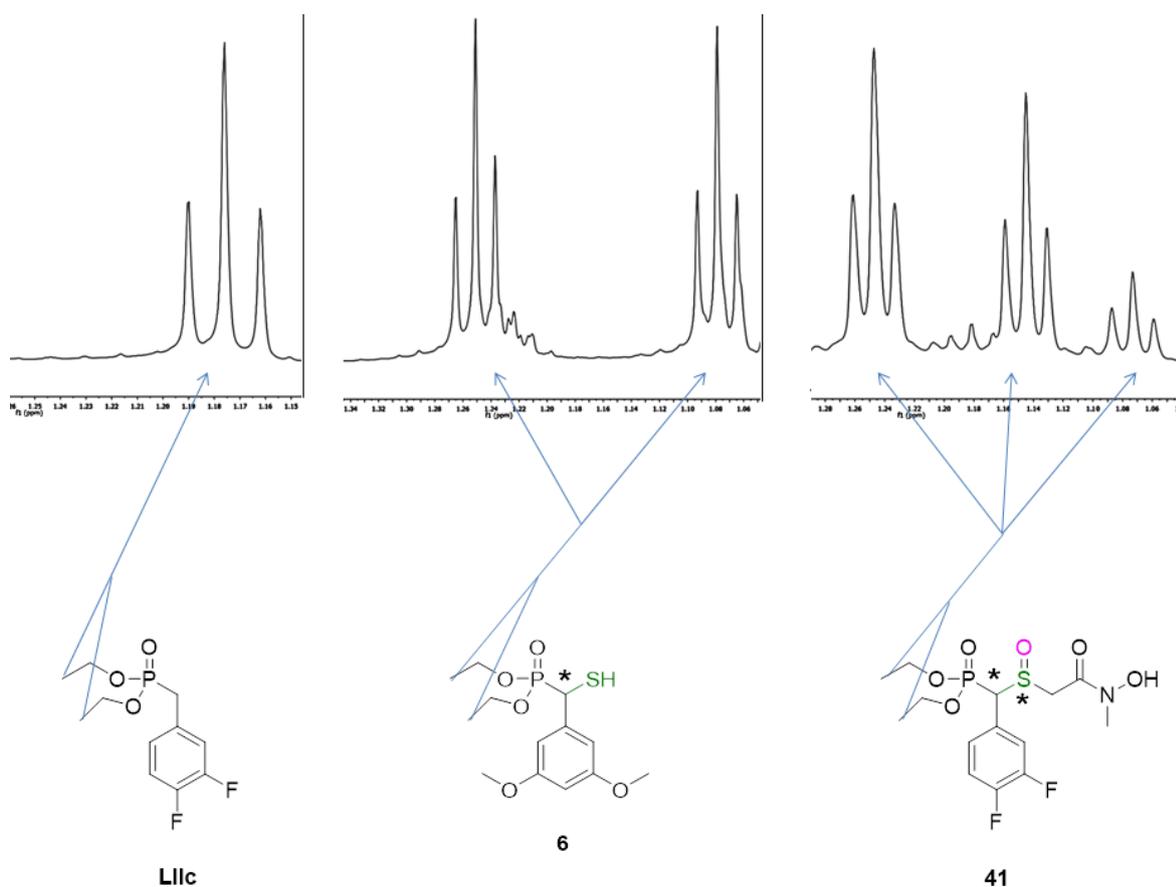


**Abbildung 36**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Verbindung **41** in  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ .

In Analogie zu den Sulfonen erfahren einige Signale einen Tieffeld-Shift, da die Sulfoxidfunktionalität ebenfalls entschirmenden Charakter hat. Zudem wird durch die Oxidation ein zweites Chiralitätszentrum generiert. Es entstehen somit Diastereomere, welche sich spektroskopisch durch eine Verdopplung von Signalsätzen auszeichnen. Im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Sulfoxids **41** (s. Abbildung 36) ist zu erkennen, dass die Protonen der Methylgruppe des Phosphonsäurediethylesters in drei anstelle von zwei Tripletts aufspalten.

Das erste Triplett liegt bei 1.24 ppm, besitzt eine Kopplungskonstante von  $^3J(\text{H,H})=7.0$  Hz und sein Integral entspricht 3 Protonen. Das zweite und dritte Triplett weisen dieselben Kopplungskonstanten auf. Sie liegen bei 1.13 ppm sowie 1.06 ppm und zeigen ein Integralverhältnis von 2.2 zu 0.8.

Abbildung 37 illustriert den Einfluss von Chiralitätszentren auf die Signalaufspaltungen der  $\beta$ -thia-isosteren Fosmidomycin-Analoga in  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren.



**Abbildung 37** Auszüge aus den  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der in diesem Abschnitt besprochenen Verbindungen **LIIc**, **6** und **41** in  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ . Die Signale der Methylgruppen des Phosphonsäurediethylesters werden verglichen. Das achirale Benzylphosphonat **LIIc** zeigt einen einfachen Signalsatz. Die Einführung eines Chiralitätszentrums wie beim  $\alpha$ -Mercaptophosphonat **6** führt zur Verdopplung des Signals. Das zusätzliche Chiralitätszentrum von **41** hat eine weitere Signalaufspaltung zur Folge. Nähere Erläuterungen siehe Text.

Auch das Signal der *N*-Methylgruppe ist nicht mehr ein einfaches Singulett, sondern erscheint als Multipllett bei 3.11-3.06 ppm. Eine Signalverdopplung verbunden mit Tieffeld-Shift tritt sowohl bei dem Methin-Proton der PCH-Gruppe als auch bei den Protonen der *S*-Methyleneinheit auf. Das Methin-Proton spaltet in zwei Dubletts mit Kopplungskonstanten von  $^2J(\text{H,P})=18.2$  Hz und  $^2J(\text{H,P})=20.8$  Hz auf. Die Dubletts liegen im Vergleich zu dem

Signal des korrespondierenden Sulfids **15** ( $\delta=4.64$  ppm) in tieferem Feld bei 5.28 ppm und 4.92 ppm. Das Integralverhältnis beträgt 0.3 zu 0.7. Die  $\text{SCH}_2$ -Protonen spalten in drei Dubletts auf, die alle eine Kopplungskonstante von  $^2J(\text{H,H})=14.7$  Hz aufweisen. Die Signale sind zu tieferem Feld verschoben und liegen bei 3.82 ppm, 3.72 ppm und 3.47 ppm. Sie treten im Verhältnis von 0.3 zu 0.7 und 1 auf.

### 3.2 NOE-Spektroskopie

Hydroxamsäuren zeichnen das Vorkommen unterschiedlicher Isomere aus, was beispielsweise durch Keto-Iminol-Tautomerie und *E/Z*-Isomerie begründet ist.<sup>[174]</sup>

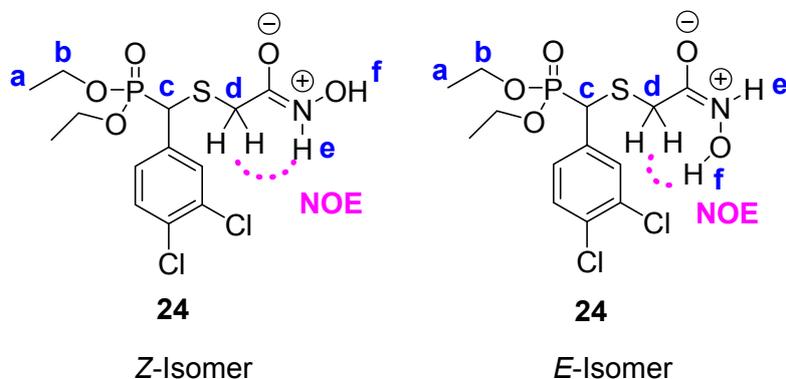
R = CH <sub>3</sub>	90.1 %	9.9 %
R =	89 %	11 %
R =	90 %	10 %

**Tabelle 7** *E/Z*-Konformation der Hydroxamsäurefunktionalität. Isomerenverhältnisse bei Acetohydroxamsäure, einem Carba- und einem Oxa-Isoster in  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$  bei 20 °C.<sup>[107, 113, 175]</sup>

Bedingt durch den partiellen Doppelbindungscharakter der C-N-Bindung ist deren Drehbarkeit eingeschränkt. So kann die Funktionalität als *E*- bzw. als *Z*-Isomer vorliegen. Welche Konformation hierbei überwiegt, hängt von Faktoren wie der Art der *N*- oder *O*-Substitution, Temperatur, Solvens und Konzentration ab.<sup>[174-176]</sup> Die Mehrzahl der Hydroxamsäuren liegt in wässrigem Milieu (z.B. auch Restwassergehalt von DMSO) in der

Z-Konformation der Keto-Form vor.<sup>[175-176]</sup> Während diese in Gegenwart von Wasser durch Hydratisierung des Moleküls energetisch begünstigt wird, bildet sich in wasserfreier Umgebung bevorzugt das *E*-Isomer.<sup>[174, 177]</sup> Für Acetohydroxamsäure wurde NMR-spektroskopisch ein Isomerenverhältnis von ca. 9:1 (Überschuss des *Z*-Isomers) in [D<sub>6</sub>]DMSO bei 20 °C ermittelt.<sup>[175]</sup> *Brücher* und *Behrendt* konnten durch Auswertung von Nuclear Overhauser Effekten (NOE) und Integralverhältnissen in Übereinstimmung hiermit eine Isomerenverteilung für Carba- und Oxa-Analoga bestimmen, die ebenfalls bei ca. 90 % *Z*-Isomer und 10 % *E*-Isomer liegt<sup>[107, 113]</sup> (s. Tabelle 7).

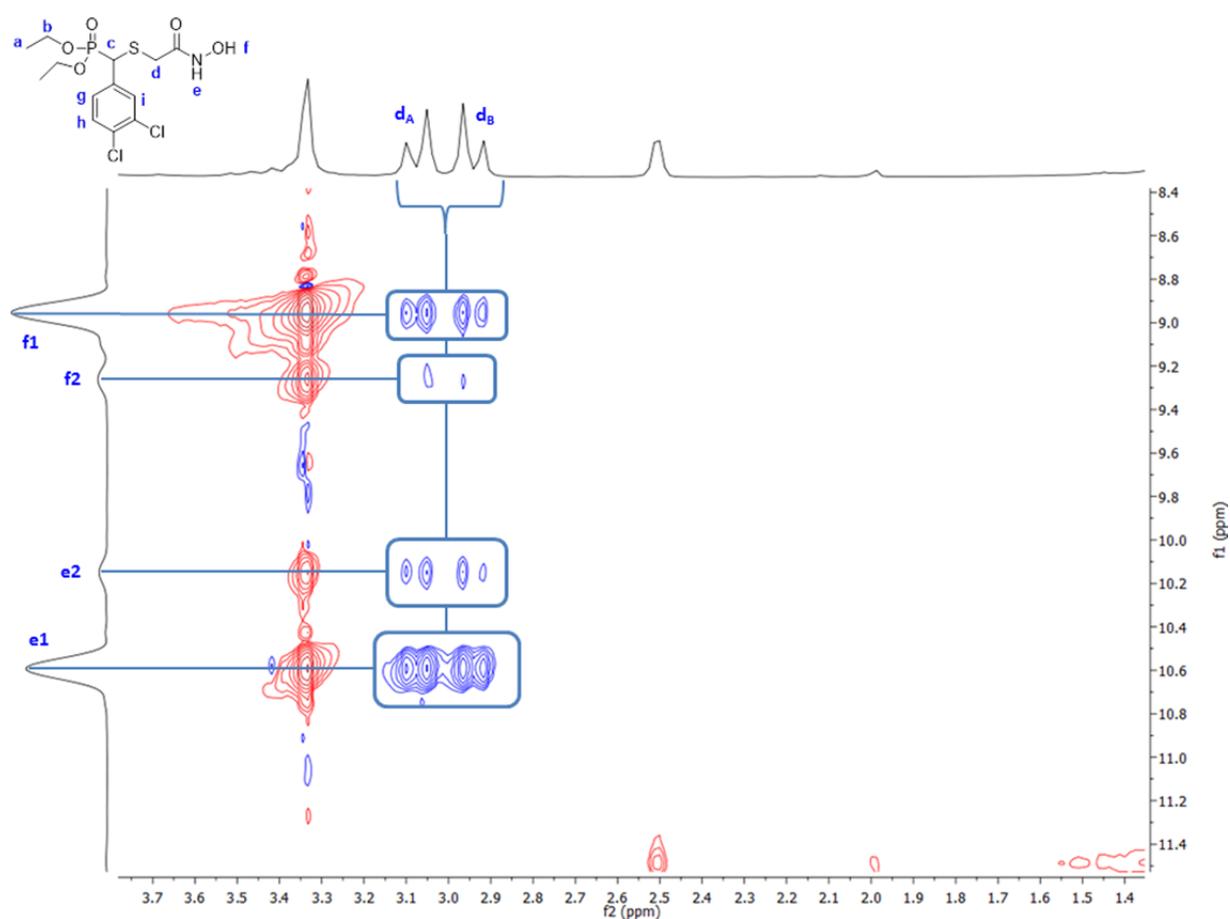
Zur Aufklärung der bevorzugten Konformation unsubstituierter Hydroxamsäurefunktionen bei Thia-Isosteren wurde für die freie Hydroxamsäure **24** ein NOESY-Experiment durchgeführt. Abbildung 38 zeigt die zu erwartenden NOEs bei Vorliegen von *Z*- bzw. *E*-Konformation. Die räumliche Nähe der Wasserstoffatome d/e und d/f führt zu NOEs, die Aufschluss darüber geben, ob das *E*- oder *Z*-Isomer vorliegt. Eine Kopplung der SCH<sub>2</sub>-Protonen mit dem NH-Proton ist nur möglich bei Vorliegen der *Z*-Konformation der Hydroxamsäuregruppe. In Analogie hierzu können die SCH<sub>2</sub>-Protonen nur mit dem OH-Proton koppeln, wenn die *E*-Konformation vorliegt.



**Abbildung 38** NOEs der SCH<sub>2</sub>-Protonen und den Protonen der Hydroxamsäuregruppe (*Z*- und *E*-Konformation) bei Verbindung **24**.

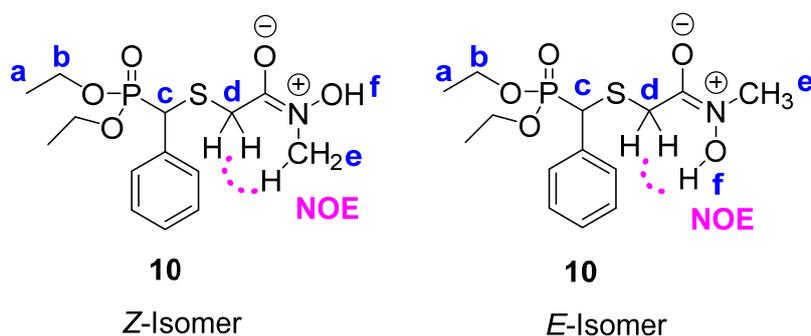
In Abbildung 39 ist ein Teil des NOESY-Spektrums von **24** in [D<sub>6</sub>]DMSO bei 20 °C zu sehen. Die Kreuzsignale der Protonen der SCH<sub>2</sub>-Gruppe (d) und den NH- bzw. OH-Protonen (e, f) unterscheiden sich deutlich in ihrer Intensität. Das Signal von d/e ist viel intensiver als das d/f-Signal. Die höhere Intensität der SCH<sub>2</sub>/NH-Kopplung deutet auf ein Überwiegen der *Z*-Konformation hin. Eine genaue Aussage über die Isomerenverteilung ist hier jedoch nicht möglich. *Brücher* und *Behrendt* konnten anhand der Signalaufspaltung für die Hydroxamsäureprotonen in große Haupt- und kleinere Nebensignale durch Integralverhältnisse Isomerenverhältnisse bestimmen, die bei ca. 90 % *Z*-Isomer und 10 % *E*-

Isomer liegen (s. oben). Die Nebensignale e2 und f2 der Hydroxamsäuregruppe von **24** jedoch können im Gegensatz dazu nicht den entsprechenden Isomeren zugeordnet werden. Die Signalaufspaltungen in Haupt- und kleinere Nebensignale der Hydroxamsäureprotonen lässt keine Differenzierung in *E*- und *Z*-Isomere zu. Es treten Kreuzsignale zwischen d und e2 auf, genau wie zwischen d und e1. Wenn das Nebensignal e2 dem *E*-Isomer zugeordnet werden könnte, würde diese Kopplung nicht auftreten. Bei dem Nebensignal f2 spricht das hier erscheinende Kreuzsignal mit d wiederum gegen die Zugehörigkeit zum *Z*-Isomer. Somit kann hier nur die Aussage gemacht werden, dass aufgrund der höheren Signalintensität für die d/e-Kopplung die *Z*-Konformation überwiegt.



**Abbildung 39** Ausschnitt aus dem NOESY-Spektrum von Verbindung **24** (aufgenommen in  $[D_6]DMSO$  bei  $20\text{ }^\circ\text{C}$  und  $300.13\text{ MHz}$ ).

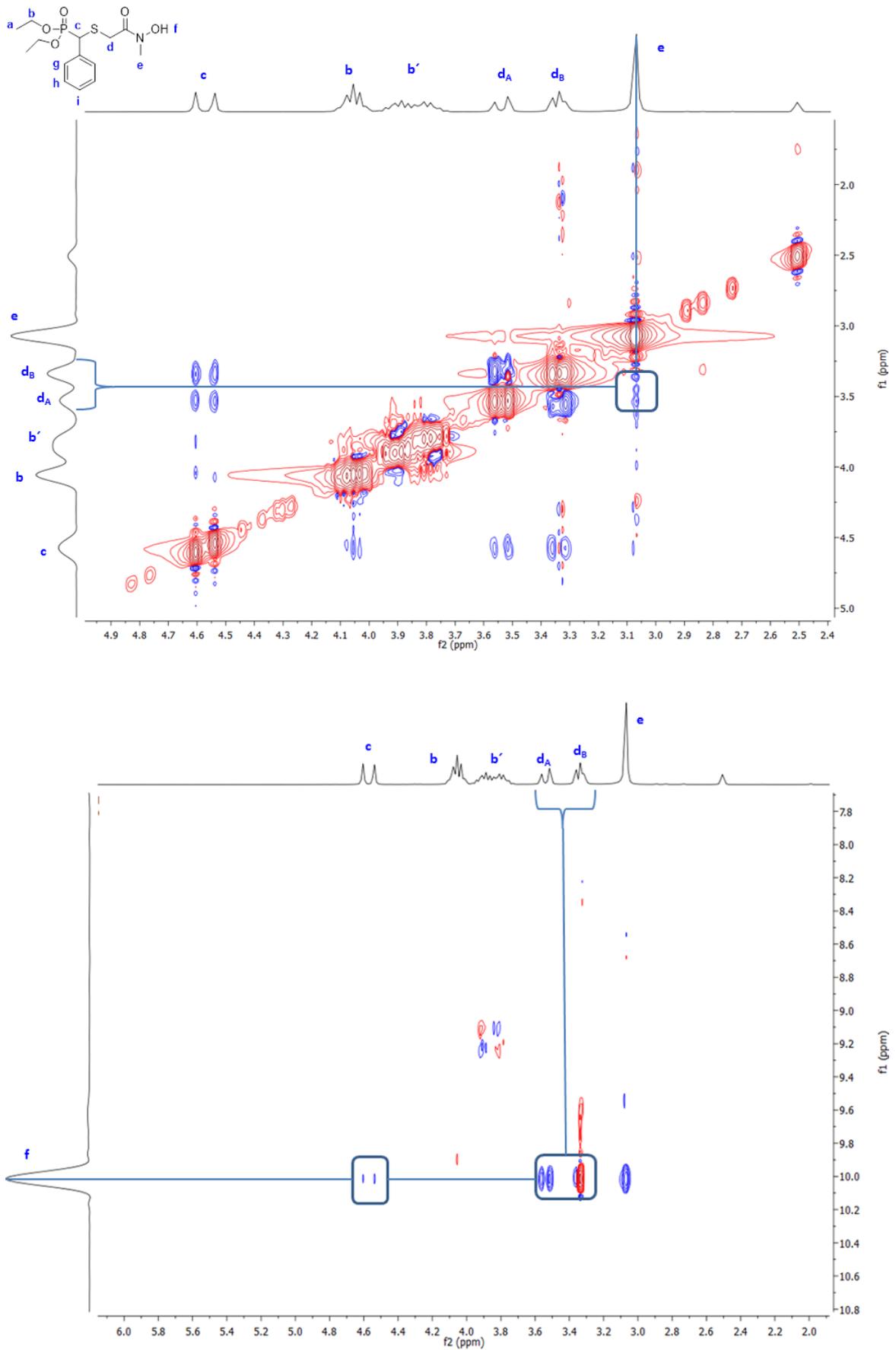
Darüber hinaus wurde der Einfluss der *N*-Methyl-Funktion auf die bevorzugte Ausbildung einer Konformation analysiert. Hierzu wurde die *N*-Methyl-substituierte Verbindung **10** in einem NOESY-Experiment untersucht. Abbildung 40 zeigt die möglichen NOEs bei Vorliegen einer *Z*- bzw. *E*-Konformation. Im *Z*-Isomer tritt ein NOE zwischen den *N*-Methyl-Protonen (e) und den  $SCH_2$ -Protonen (d) auf. Dagegen ist dieser Effekt im *E*-Isomer zwischen den  $SCH_2$ -Protonen (d) und dem OH-Proton (f) zu beobachten.



**Abbildung 40** NOEs der SCH<sub>2</sub>-Protonen und den Protonen der Hydroxamsäuregruppe (*Z*- und *E*-Konformation) bei Verbindung **10**.

Bei den in Abbildung 41 gezeigten Ausschnitten aus dem NOESY-Spektrum des *N*-Methyl-substituierten Thia-Isosters **10** ist ein Kreuzsignal der SCH<sub>2</sub>-Protonen (d) und der *N*-Methyl-Protonen (e) zu sehen. Das Methin-Proton c des Kohlenstoffgrundgerüsts und die *N*-Methyl-Protonen weisen auch eine räumliche Nähe auf. Bei ihnen kann ebenfalls ein NOE beobachtet werden. Die Kopplung dieser Protonengruppen deutet auf das Vorliegen des *Z*-Isomers hin. Gleichzeitig treten NOEs zwischen f und d sowie zwischen f und c auf. Das Vorkommen dieser Kopplungen ist nur beim *E*-Isomer möglich, sodass davon ausgegangen werden muss, dass wie bei der unsubstituierten Hydroxamsäure **25** beide Konformationen vorliegen. Für *N*-Methyl-substituierte Carba- und Oxa-Isostere haben *Behrendt* und *Brücher* durch NOESY-Untersuchungen das exklusive Vorliegen der *Z*-Konformation in [D<sub>6</sub>]DMSO bei 20 °C ermittelt.<sup>[107, 113]</sup>

Im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von **10** sind die Signale der Protonen e und f als Singulett ohne weitere Aufspaltungen zu sehen. Dies bedeutet, dass sich die Signale der *E*- und *Z*-Isomere der einzelnen Protonen überlagern. Für die freie Hydroxamsäure **24** ist dies auch der Fall. Die Aufspaltung der Hydroxamsäureprotonen in Haupt- und Nebensignale im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum lässt sich nicht in *E/Z*-Isomere differenzieren. Das NOESY-Experiment von **24** belegt aber dennoch das Vorliegen beider Konformationen. Auch *Brücher* hat für das OH-Proton eines Oxa-Isosters eine Überlagerung der Signale der beiden Isomere festgestellt.<sup>[107]</sup>



**Abbildung 41** Ausschnitte aus dem NOESY-Spektrum von Verbindung **10** (aufgenommen in [D<sub>6</sub>]DMSO bei 20 °C und 300.13 MHz).

Zusammenfassend haben die NOESY-Untersuchungen somit ergeben, dass die am Stickstoff unsubstituierten Hydroxamsäuren der Thia-Isostere analog der Carba- und Oxa-Analoga unter den experimentellen Bedingungen *E/Z*-Isomere bilden, wobei das *Z*-Isomer überwiegt. Allerdings sind für die Thia-Analoga anders als bei den anderen Isostertypen Isomerenverhältnisse aus den NMR-Spektren nicht eindeutig ableitbar. Bei Carba- und Oxa-Isosteren stabilisiert die *N*-Methylgruppe die *Z*-Konformation. Dieser Effekt kann für die Thia-Isostere nicht beobachtet werden, *N*-Methyl-substituierte Hydroxamsäuren liegen ebenfalls als *E*- und als *Z*-Isomer vor.

### 3.3 $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie

#### Benzylphosphonate LII, 1

Abbildung 42 zeigt das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von *tert*-Butylbenzylphosphonat **1**, welches besonders durch heteronukleäre  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$ - und  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$ -Kopplungen gekennzeichnet ist.

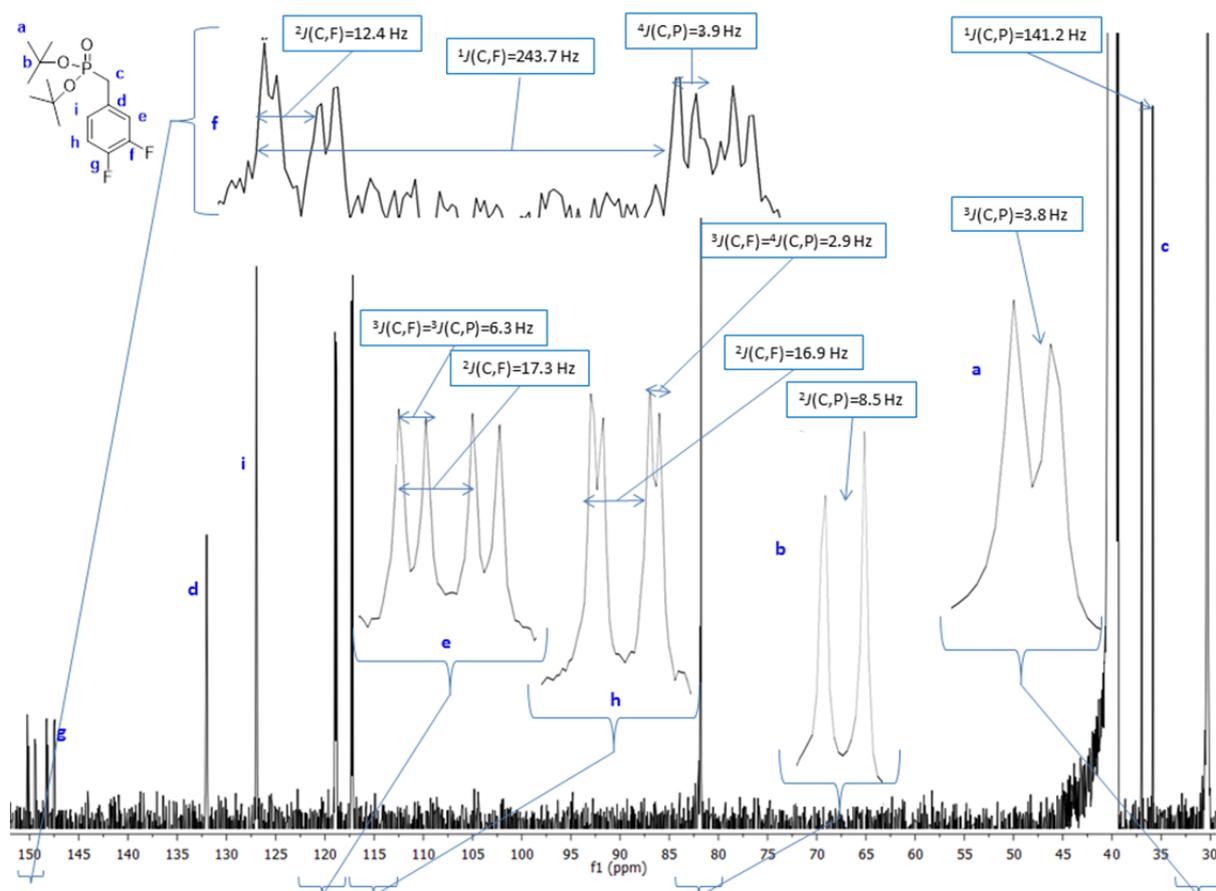
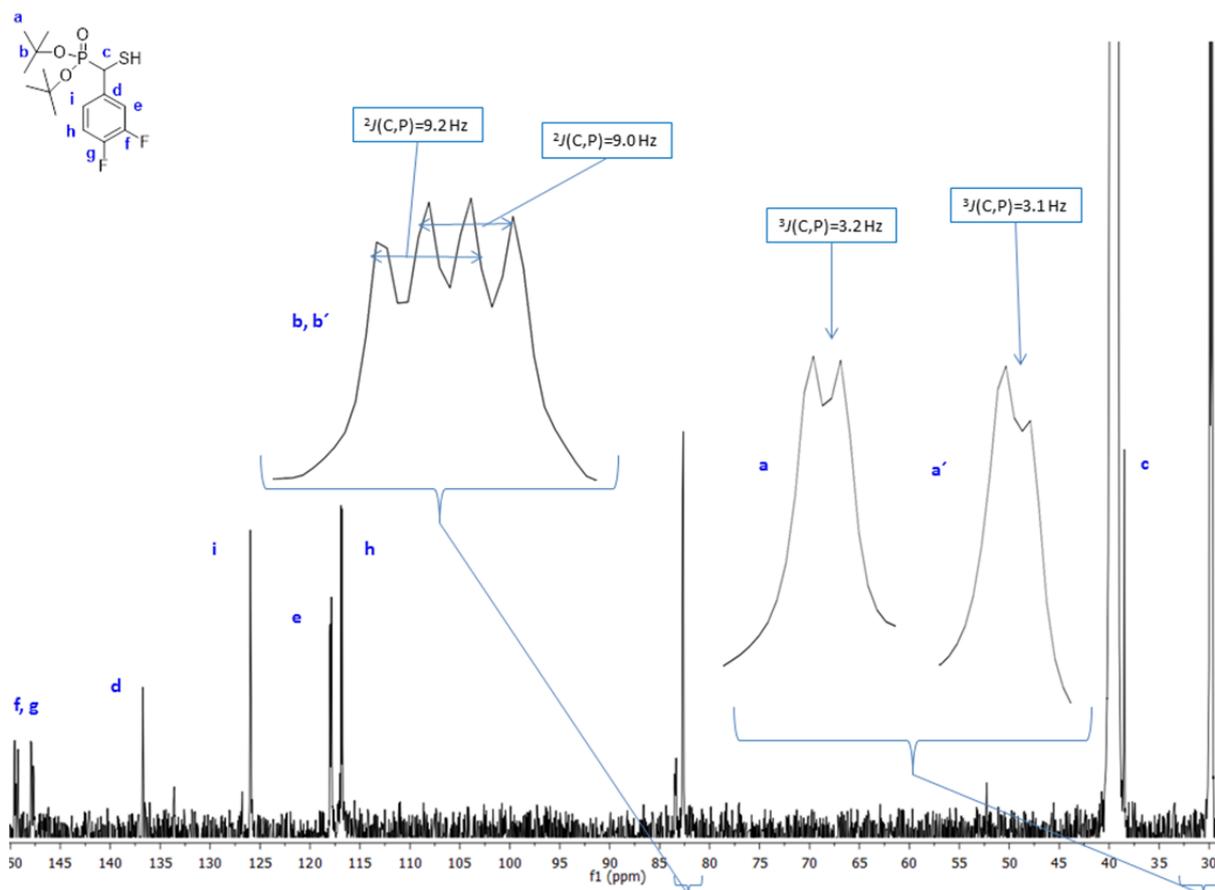


Abbildung 42  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **1** in  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ .

Bei den Signalen des Phosphonsäureesters handelt es sich, bedingt durch  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$ -Kopplungen, um Dubletts. Für die POC-Funktionen b/b' tritt ein gemeinsames Dublettsignal mit einer Kopplungskonstante von  $^2J(\text{C,P})=8.5$  Hz bei 81.32 ppm auf. Auch die C-Atome a der 6  $\text{CH}_3$ -Gruppen des Esters geben ein Dublettsignal. Es weist eine Kopplungskonstante von  $^3J(\text{C,P})=3.8$  Hz auf und liegt bei 29.80 ppm. Für das dem Phosphoratom benachbarte C-Atom c tritt das Dublettsignal mit der größten  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$ -Kopplungskonstante auf. Diese beträgt  $^1J(\text{C,P})=141.2$  Hz und das Signal weist eine chemische Verschiebung von  $\delta=35.96$  ppm auf. Die aromatischen Signale von **1** sind gekennzeichnet durch zahlreiche heteronukleäre Kopplungen mit dem Phosphor- und den Fluoratomen. Bedingt durch diese spalten die den Fluoratomen benachbarten C-Atome f und g stark tieffeldverschoben in dreifache Dubletts auf. Das Signal von f liegt bei 149.34 ppm und zeigt folgende Kopplungskonstanten:  $^1J(\text{C,F})=243.7$  Hz,  $^2J(\text{C,F})=12.4$  Hz und  $^4J(\text{C,P})=3.9$  Hz. g befindet sich mit 147.4 ppm in einem sehr ähnlichen Bereich und weist die vergleichbaren Kopplungskonstanten  $^1J(\text{C,F})=244.2$  Hz,  $^2J(\text{C,F})=12.8$  Hz und  $^5J(\text{C,P})=3.3$  Hz auf. C-Atom e und h erscheinen als doppelte Dubletts, wobei e eine chemische Verschiebung von 118.43 ppm besitzt und die Kopplungskonstanten  $^2J(\text{C,F})=17.3$  Hz sowie  $^3J(\text{C,F})=^3J(\text{C,P})=6.3$  Hz. Das Signal von h liegt bei 116.82 ppm und zeigt die Konstanten  $^2J(\text{C,F})=16.9$  Hz sowie  $^3J(\text{C,F})=^4J(\text{C,P})=2.9$  Hz.

### ***$\alpha$ -Mercaptophosphonate LIII, 2-7***

Wie schon in Abschnitt 3.1 besprochen, führt die Synthese von Thiolen ausgehend von den Benzylphosphonaten zur Entstehung eines Chiralitätszentrums, welches entscheidenden Einfluss auf die spektroskopischen Eigenschaften hat. So führt das Asymmetriezentrum bei dem von Benzylphosphonat **1** abgeleiteten Thiol **8** zu chemischer Nicht-Äquivalenz der C-Atome des *tert*-Butylesters (s. Abbildung 43).

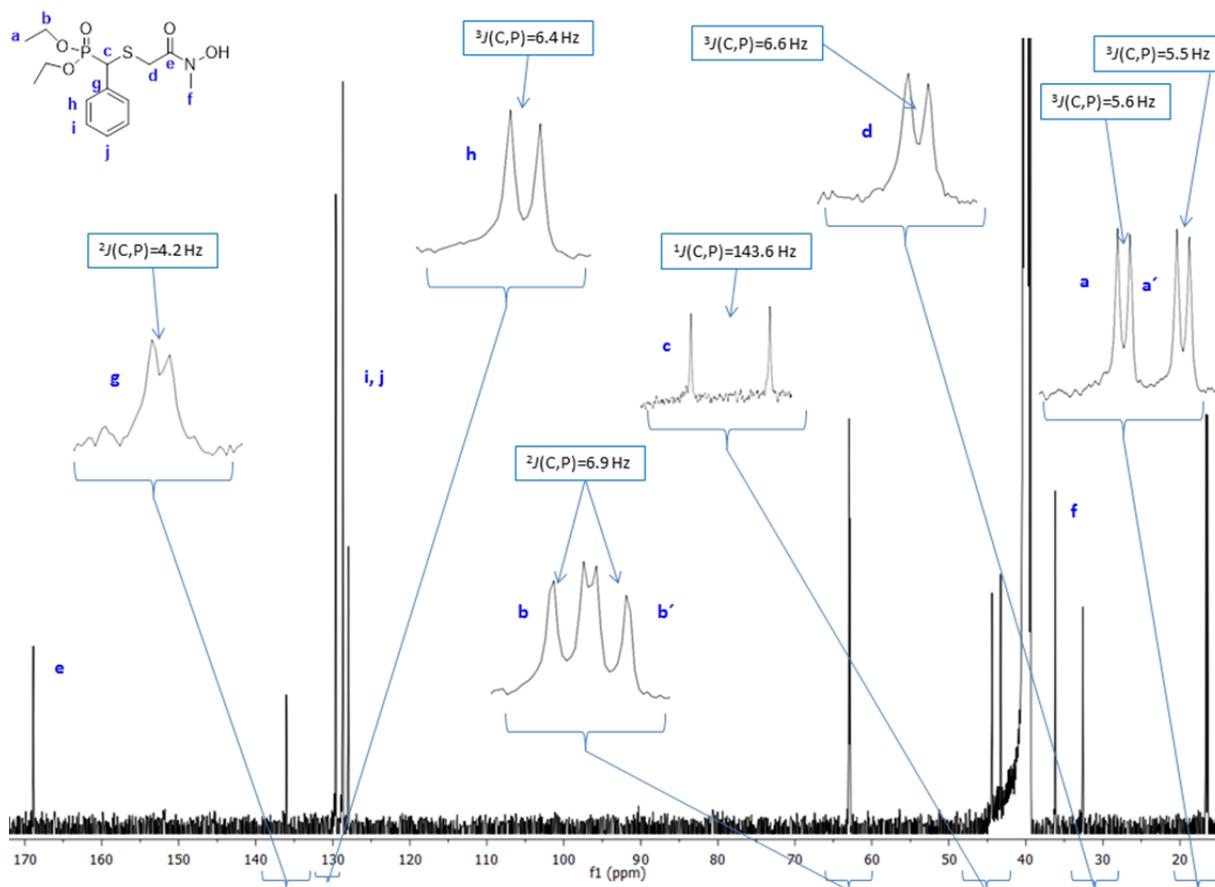


**Abbildung 43**  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **8** in  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ .

Die Signale dieser treten mehrfach auf. Das Signal der POC-Gruppe ist wie bei **1** ein Dublett, welches einmal bei 82.60 ppm mit einer Kopplungskonstante von  $^2J(\text{C},\text{P})=9.2$  Hz erscheint und bei 82.57 ppm mit  $^2J(\text{C},\text{P})=9.0$  Hz. Auch die Signale der 6  $\text{CH}_3$ -Funktionen sind nun mehrfach zu erkennen. Sie spalten in zwei Dubletts bei 29.84 ppm ( $^3J(\text{C},\text{P})=3.2$  Hz) und 29.62 ppm ( $^3J(\text{C},\text{P})=3.1$  Hz) auf sowie in ein Multipllett bei 29.80-29.70 ppm. Alle übrigen Signale verhalten sich wie bei Verbindung **1**.

### **Hydroxamsäuren mit Sulfidpartialstruktur 10-17, 19-21, 23-26, 43-57**

Wie aus dem  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **10** (s. Abbildung 44) ersichtlich wird, weisen die Phosphonohydroxamsäuren **10-17**, **19-21** und **23-26** dieselben charakteristischen Signalmerkmale für den Phosphonsäureester auf wie die Thiole.



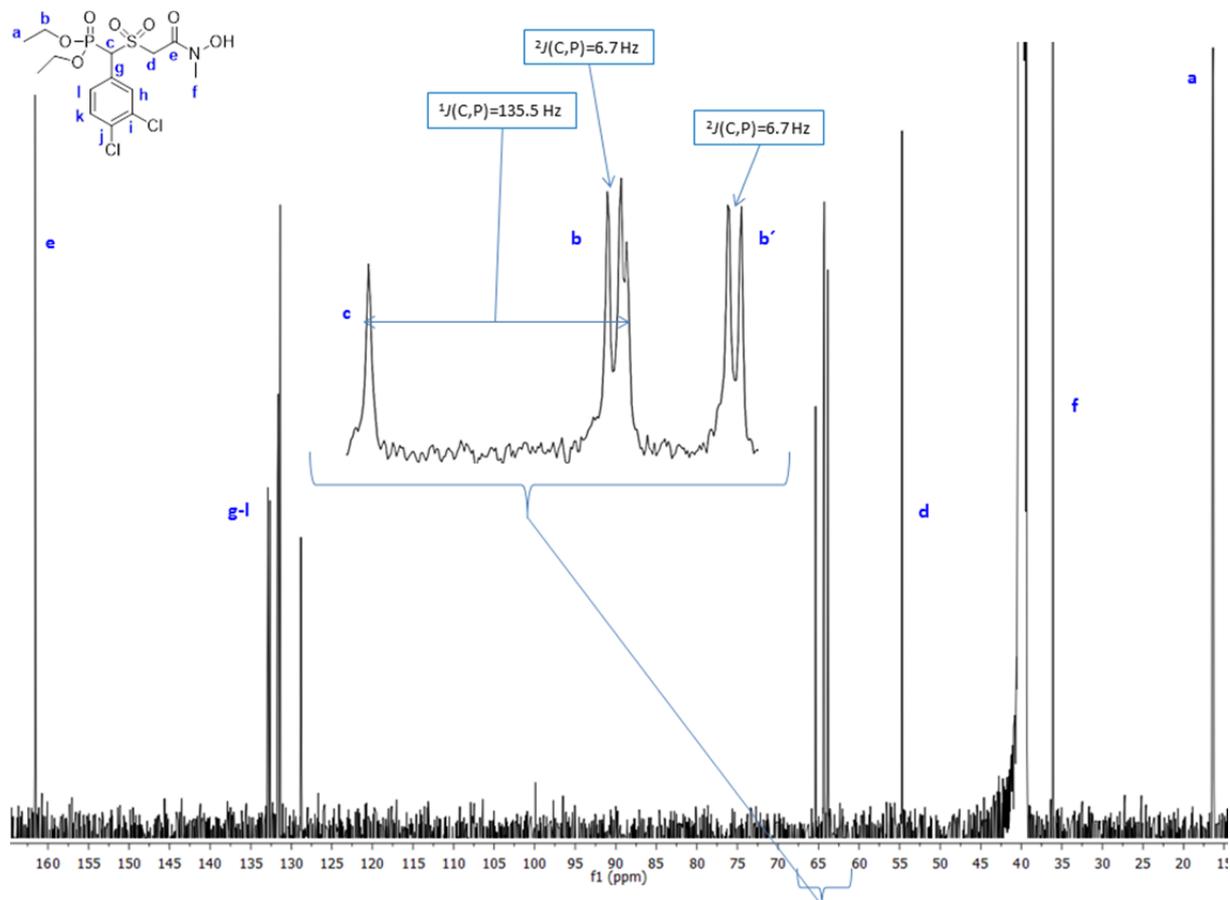
**Abbildung 44**  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **10** in  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ .

Die Signale des Diethylesters treten wie die des *tert*-Butylesters mehrfach auf und zeigen dieselben typischen Phosphorkopplungen. So ist das  $\text{POCH}_2$ -Signal ein Dublett, welches bei 62.50 ppm und bei 62.42 ppm mit je  $^2J(\text{C},\text{P})=6.9$  Hz auftritt. Auch die Signale der  $\text{CH}_3$ -Gruppen a/a' sind Dubletts mit Kopplungskonstanten von  $^3J(\text{C},\text{P})=5.6$  Hz und  $^3J(\text{C},\text{P})=5.5$  Hz, die bei 16.13 ppm und 15.92 ppm liegen. Hinzu kommen die Signale der Hydroxamatpartialstruktur. Die Carbonylfunktion besitzt ein stark tieffeldverschobenes Signal bei 168.41 ppm. Das Signal der *N*-Methylgruppe liegt mit 35.72 ppm in einem ähnlichen Bereich wie das der *S*-Methyleneinheit (32.12 ppm). Zusätzlich weist das Signal der  $\text{SCH}_2$ -Funktion aber eine  $^3J(\text{C},\text{P})$ -Kopplung von 6.6 Hz auf.

### **Hydroxamsäuren mit Sulfonpartialstruktur 30-39, 58-65**

Sulfone zeichnen sich durch das Vorkommen derselben charakteristischen Signalsätze aus wie die Sulfide. Auffälligster Unterschied ist der auch im  $^1\text{H}$ -NMR beobachtbare Tieffeld-Shift von Signalen der Gruppen, die der Sulfonfunktion benachbart sind. Abbildung 45 zeigt das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **33**. Das Signal der PC-Gruppe erscheint hier als Dublett bei 64.35 ppm mit  $^1J(\text{C},\text{P})=135.5$  Hz. Bei dem korrespondierenden Sulfid **14** tritt dies bei

42.41 ppm auf. Auch das Signal der SCH<sub>2</sub>-Gruppe liegt mit 54.25 ppm in tieferem Feld als das des Sulfids **14** ( $\delta=32.53$  ppm). Zudem tritt das Signal dieser Funktion als Singulett auf, während bei den Sulfiden für dieses Signal die  $^3J(\text{C},\text{P})$ -Kopplung sichtbar ist. Alle übrigen Signale wie beispielsweise das der POCH<sub>2</sub>-Gruppe entsprechen in der Lage und der Multiplizität den Sulfiden.



**Abbildung 45**  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **33** in  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ .

### Hydroxamsäuren mit Sulfoxidpartialstruktur 40-42

Durch den entschirmenden Charakter der Sulfinylgruppe und das Entstehen von Diastereomeren treten Signalvervielfältigungen und Tieffeld-Shifts auf, wie sie für diese Substanzklasse auch im  $^1\text{H}$ -NMR typisch sind. Sulfoxid **40** (s. Abbildung 46) zeigt für das C-Atom der POCH<sub>2</sub>-Einheit 4 Dubletts mit Kopplungskonstanten von  $^2J(\text{C},\text{P})=6.5\text{-}6.7$  Hz im Bereich 62.68 ppm-62.28 ppm. Das Dublettsignal der Methylgruppe des Phosphonsäurediethylesters tritt drei Mal auf: mit  $^3J(\text{C},\text{P})=5.8$  Hz bei 16.08 ppm, mit  $^3J(\text{C},\text{P})=5.7$  Hz bei 15.91 ppm und mit  $^3J(\text{C},\text{P})=6.0$  Hz bei 15.79 ppm. Verdoppelt und zusätzlich tieffeldverschoben liegen die Signale der PC- und der SCH<sub>2</sub>-Gruppe vor. Das

Dublett der PC-Funktion tritt mit Kopplungskonstanten von  $^1J(\text{C,P})=139.0$  Hz und  $^1J(\text{C,P})=144.3$  Hz bei 62.57 ppm und 60.69 ppm auf. Dies entspricht einer Verschiebung von fast 20 ppm im Vergleich zum Signal des korrespondierenden Sulfids **10** (43.37 ppm). Die Dublettsignale der SCH<sub>2</sub>-Funktion liegen bei 54.34 ppm ( $^3J(\text{C,P})=9.5$  Hz) und 53.96 ppm ( $^3J(\text{C,P})=5.3$  Hz), was ebenfalls einer Verschiebung um 20 ppm entspricht (**10**: SCH<sub>2</sub>  $\delta=32.12$  ppm).

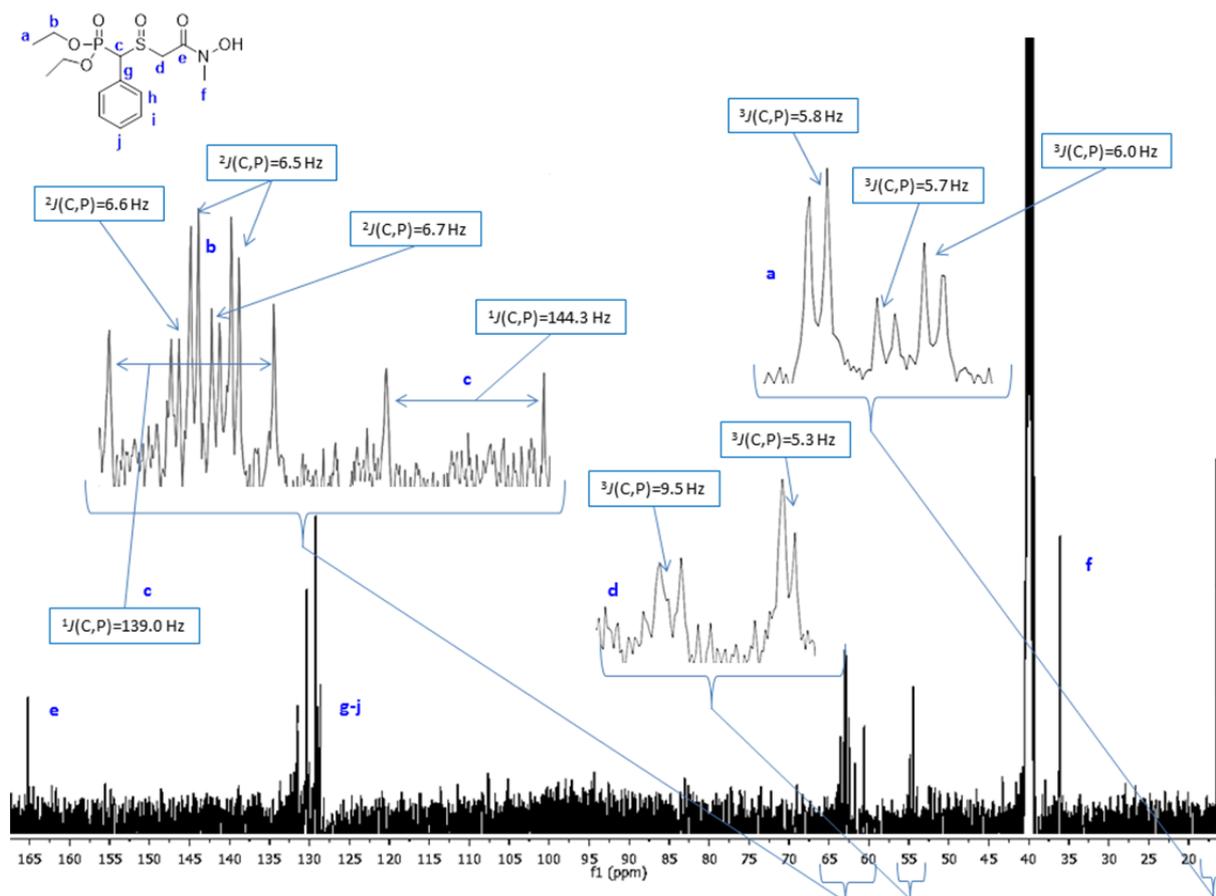
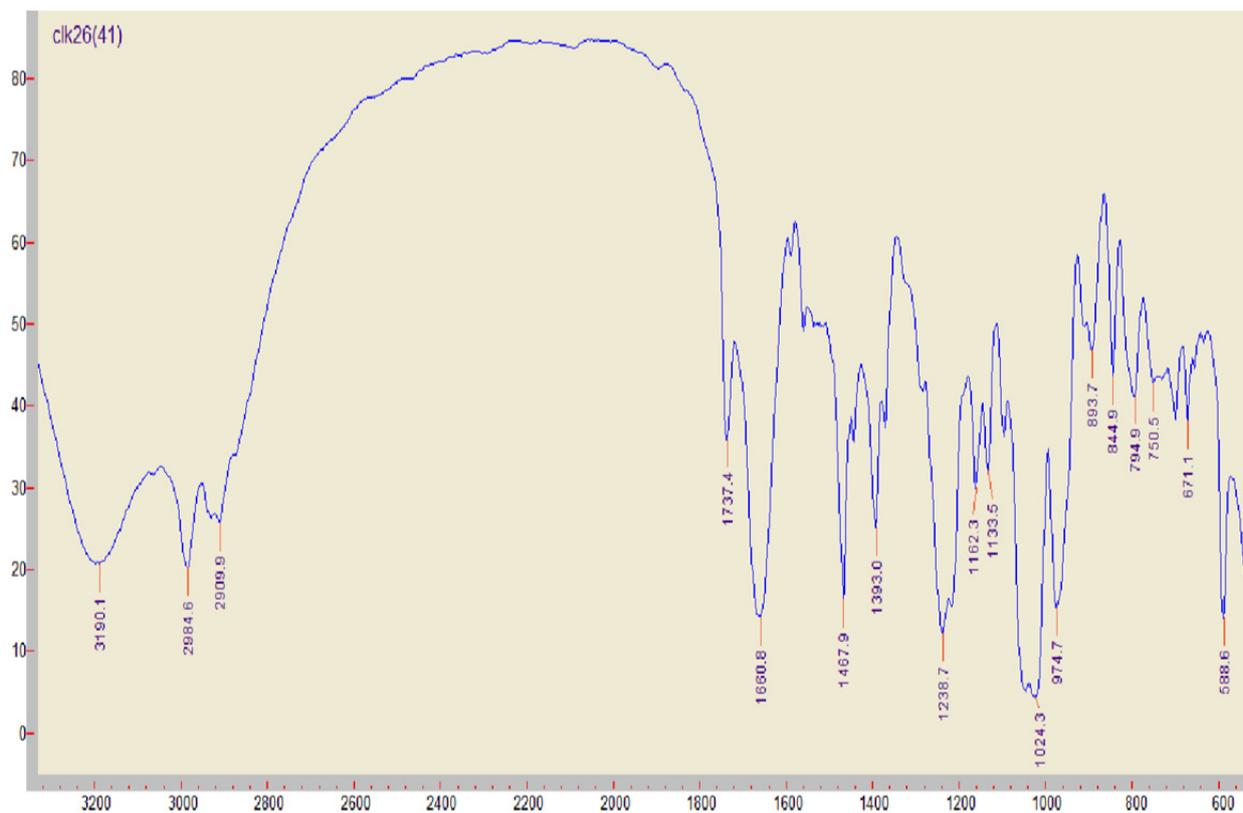


Abbildung 46  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **40** in  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ .

### 3.4 IR-Spektroskopie

Abbildung 47 zeigt exemplarisch für die  $\beta$ -thia-isosteren Fosmidomycin-Analoga das IR-Spektrum von **24**. In diesem Abschnitt soll auf die charakteristischen Absorptionsbanden dieses Verbindungstyps eingegangen werden. Die N-H- und O-H-Valenzschwingungen zeigen Absorptionen mit starker Intensität bei einer Wellenzahl von  $3190\text{ cm}^{-1}$ . Im Bereich knapp über  $2900\text{ cm}^{-1}$  sind die Absorptionsbanden der aliphatischen C-H-Valenzschwingungen zu sehen. Die aromatischen C-H-Valenzschwingungen, die mit schwacher Intensität bei einer Wellenzahl von  $3000\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$  absorbieren, werden von den

Absorptionsbanden der N-H- und O-H-Schwingungen überdeckt. Charakteristisch für diesen Verbindungstyp ist die Absorptionsbande der C=O-Valenzschwingung der Hydroxamatfunktion, welche mit einer starken Intensität bei  $1661\text{ cm}^{-1}$  auftritt. Ebenso bezeichnend sind die intensiven Absorptionen der Valenzschwingungen der Phosphonsäureesterstruktur. Hierbei liegt die Bande der P=O-Valenzschwingung bei  $1239\text{ cm}^{-1}$ , während die P-O-Valenzschwingung bei  $1024\text{ cm}^{-1}$  absorbiert.



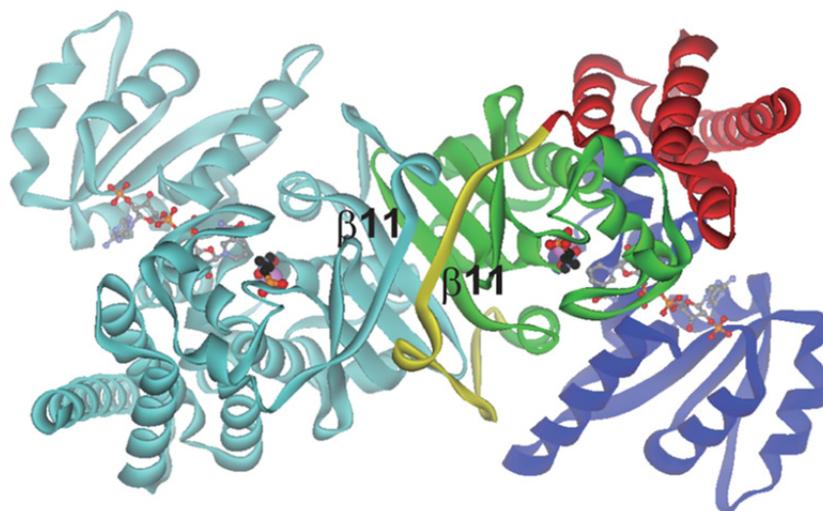
**Abbildung 47** IR-Spektrum von **24** als Film auf NaCl. y-Achse: Transmission (%); x-Achse: Wellenzahl ( $\text{cm}^{-1}$ ).

## 4 Kristallstrukturanalysen

### 4.1 Kristallstrukturen der Komplexe aus carba- sowie oxa-isosteren Fosmidomycin-Analoga und IspC-Enzymen

#### 4.1.1 Aufbau des *PfIspC*-Enzyms

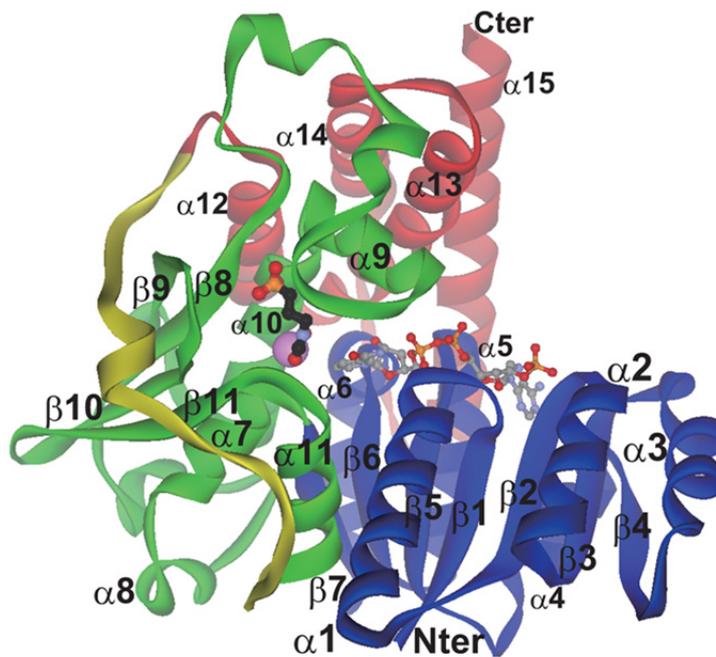
2011 wurden von *Umeda et al.* umfassende Kristallstrukturanalysen des *PfIspC*-Enzyms sowohl mit den Inhibitoren Fosmidomycin und FR900098 als auch ohne Liganden veröffentlicht.<sup>[92]</sup> Aus diesen Analysen geht hervor, dass das *PfIspC*-Enzym wie folgt aufgebaut ist. Die aktive Form des Enzyms (Lys75 bis Ser488) ist ein Homodimer mit einem Molekulargewicht von ca. 47 kDa. Jede Untereinheit verfügt über eine eigene *N*-terminale NADPH-Binderegion und eine katalytische Domäne, wobei letztere für die Substratbindung sowie für die Koordination des divalenten Metallkations und somit für die Katalyse der Umsetzungsreaktion zuständig ist. Die katalytische Domäne wird über eine Linkerregion mit einer kleinen *C*-terminale Domäne verbunden. Die NADPH-Bindedomäne und die katalytische Domäne verfügen über eine fast identische Größe und sind durch eine Spalte getrennt (s. Abbildung 48).<sup>[92]</sup>



**Abbildung 48** Dreidimensionale Struktur des *PfIspC*-Enzyms. Eine Untereinheit des Homodimers ist hellblau, die andere Untereinheit wie folgt eingefärbt: NADPH-Binderegion: blau; katalytische Domäne: grün; Linkerregion: gelb; *C*-terminale Domäne: rot; hier: mit gebundenem NADPH (Kohlenstoffatome in grau) und Fosmidomycin (Kohlenstoffatome in schwarz) als Kugel-Stab-Modell (übernommen aus *Umeda 2011*<sup>[92]</sup>).

Abbildung 49 zeigt den Aufbau einer Untereinheit des *PfIspC*-Homodimers. Die NADPH-Bindedomäne (Aminosäuren 77 bis 230) weist eine Struktur auf, die für die Dinukleotidbindung zuständig ist. Hier wird ein NADPH-Molekül gebunden, welches als

Kofaktor für die Umsetzung von DOXP zu MEP fungiert. Es handelt sich hierbei um eine Rossmann-Faltung, die von der klassischen Rossmann-Struktur leicht abgewandelt ist. Die katalytische Domäne (Aminosäuren 231 bis 369) besteht aus fünf  $\alpha$ -Helices ( $\alpha 7$  bis  $\alpha 11$ ) und vier  $\beta$ -Faltblättern ( $\beta 8$  bis  $\beta 11$ ) und weist als strukturelles Kernelement ein teilweise offen liegendes, viersträngiges  $\beta$ -Faltblatt auf. Dieses ist von einer Seite mit den helikalen Strukturen und mit Schleifenstrukturen bedeckt. Die Domäne bildet eine tiefe Spalte aus, in der sowohl das divalente Metallion als auch das Substrat binden. Zudem zeichnet sie sich durch das Vorhandensein einer flexiblen Schleifenstruktur (Aminosäuren 291 bis 299) aus, die beim Apoenzym ungeordnet vorliegt. Die C-terminale Domäne (Aminosäuren 396 bis 486) besteht aus einem Bündel von vier  $\alpha$ -Helices ( $\alpha 12$  bis  $\alpha 15$ ). Diese Domäne wird mit der katalytischen Domäne über eine Linkerregion (Aminosäuren 370 bis 395) verbunden, die den offenen Teil der katalytischen Region überspannt.<sup>[92]</sup>

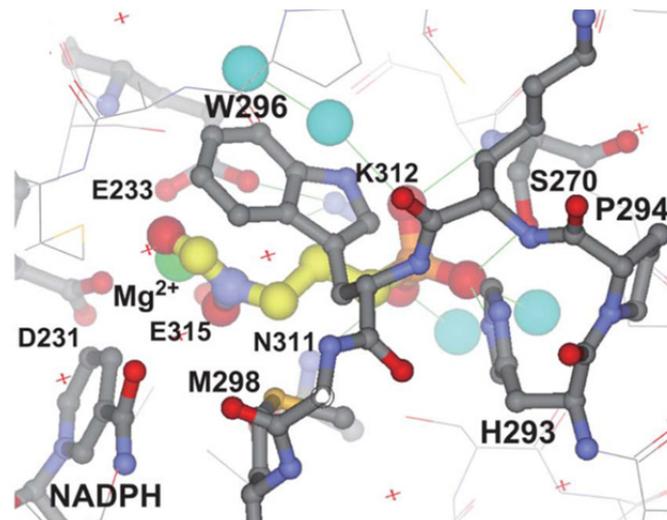


**Abbildung 49** Struktur einer Untereinheit des *PflspC*-Homodimers. NADPH-Binderegion: blau; katalytische Domäne: grün; Linkerregion: gelb; C-terminale Domäne: rot; hier: mit gebundenem NADPH (Kohlenstoffatome in grau) und Fosmidomycin (Kohlenstoffatome in schwarz) als Kugel-Stab-Modell (übernommen aus *Umeda 2011*<sup>[92]</sup>).

#### **4.1.2 Quarternärer Komplex aus *PflspC*, NADPH, $Mg^{2+}$ und Fosmidomycin bzw. FR900098**

Die Inhibitoren Fosmidomycin und FR900098 wurden von *Umeda et al.* als Liganden im Komplex aus *PflspC*, NADPH und  $Mg^{2+}$  kristallographisch untersucht.<sup>[92]</sup> Hier sollen zunächst die Wechselwirkungen zwischen Fosmidomycin und *PflspC* wiedergegeben werden

(s. Abbildung 50, 51b). Durch Bindung dieses Inhibitors nimmt das Enzym eine komplett geschlossene Form ein. Die Spalte zwischen katalytischer und NADPH-Binderegion schließt sich und zudem kann beobachtet werden, dass die ungeordnete Schleifenregion eine geordnete Struktur annimmt und ebenfalls in geschlossener Konformation vorliegt. Die flexible Schleifenregion formt somit eine Art Deckel über dem katalytischen Zentrum. Fosmidomycin wird in der katalytischen Domäne gebunden, wobei dessen Bindestelle drei Untereinheiten aufweist.<sup>[92]</sup>



**Abbildung 50** Inhibitor-Bindestelle des quarternärer Komplexes aus Fosmidomycin, *PflspC*,  $Mg^{2+}$  und NADPH. Kohlenstoff-Atome Fosmidomycin = gelb; Wassermoleküle = blau;  $Mg^{2+}$ -Ion = grün (übernommen aus *Umeda 2011*<sup>[92]</sup>).

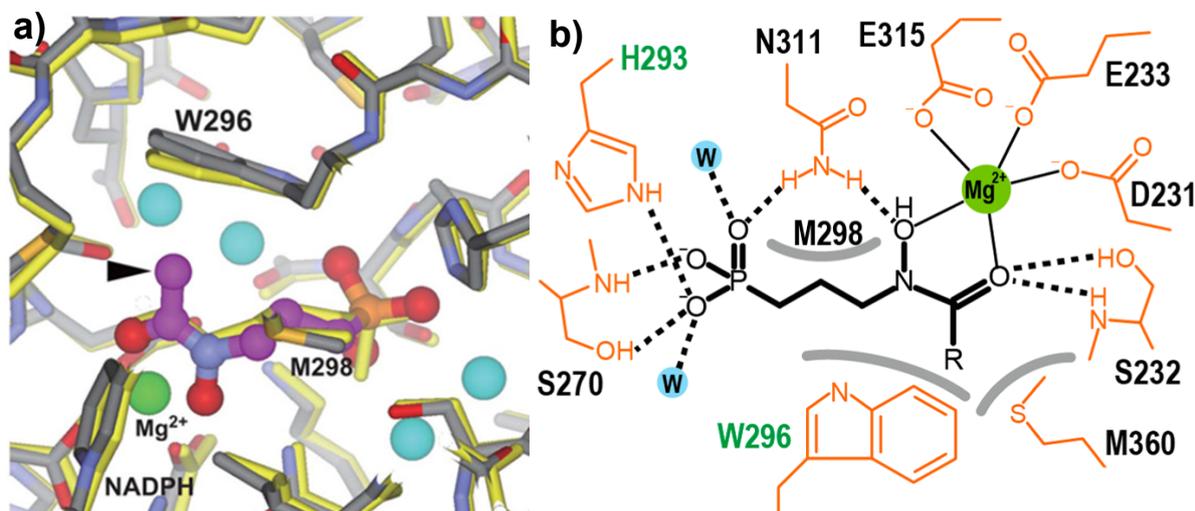
Es gibt eine Binderegion für die Phosphonsäurefunktion. Hierbei bilden die Aminosäuren Ser270, Asn311, His293 und zwei Wassermoleküle mit der Phosphonsäuregruppe ein dichtes Netzwerk aus Wasserstoffbrücken aus.

Der Kohlenstoff-Linker zwischen Phospon- und Hydroxamsäuregruppe befindet sich in einem Bereich, in dem er Interaktionen mit hydrophoben Aminosäureresten eingehen kann. Diese Interaktionen erfolgen zum einen unter der Beteiligung des Indolrings von Trp296, zu dem das Kohlenstoffgerüst des Inhibitors eine parallele Ausrichtung einnimmt. Zum anderen geht die Linkerregion Wechselwirkungen mit Met298 ein. Sowohl das Wasserstoffbrückennetzwerk der Phosphonsäurebindestelle als auch die hydrophoben Reste der Binderegion des Linkers liegen bei Abwesenheit des Inhibitors in ungeordneter Form vor.

Das aktive Zentrum weist außerdem eine Binderegion für die Hydroxamsäuregruppe auf, welche zusammen mit den drei Aminosäureresten Asp231, Glu233 und Glu315 das divalente Metallkation (hier:  $Mg^{2+}$ ) insgesamt fünffach koordiniert. Die Geometrie ist verzerrt trigonal bipyramidal mit dem *N*-Hydroxyl-Sauerstoffatom der Hydroxamsäurefunktion und

den Aminosäuren Asp231 und Glu233 als äquatorialen Liganden. Das *N*-Formyl-Sauerstoffatom der Hydroxamsäurefunktion und Glu315 bilden die axialen Liganden. Die Hydroxamsäurefunktionalität nimmt somit eine *Z*-Konformation an.

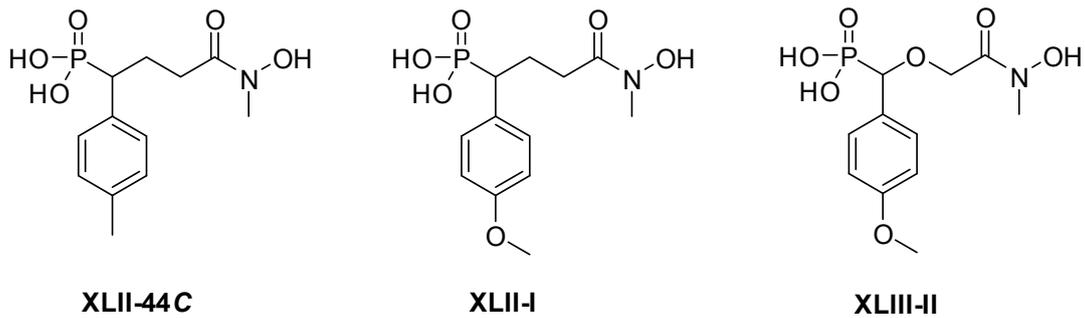
FR900098 weist anstelle des Formyl-Wasserstoffatoms von Fosmidomycin eine Methylgruppe auf. Die Interaktionen und Bindungsmodi für FR900098 sind denen Fosmidomycins sehr ähnlich, durch die Methylgruppe ergeben sich allerdings zusätzliche Wechselwirkungsmöglichkeiten (s. Abbildung 51). Die Methylfunktion ist substratäquivalent zur Methylgruppe des DOXP. Es können sich *Van-der-Waals*-Interaktionen zwischen diesem und Trp296 ausbilden, welche möglicherweise die größere inhibitorische Aktivität von FR900098 im Vergleich zu Fosmidomycin erklären. Außerdem könnte eine solche Interaktion die für die Metallkoordination essenzielle *Z*-Konformation der Hydroxamsäurefunktionalität stabilisieren.<sup>[92]</sup>



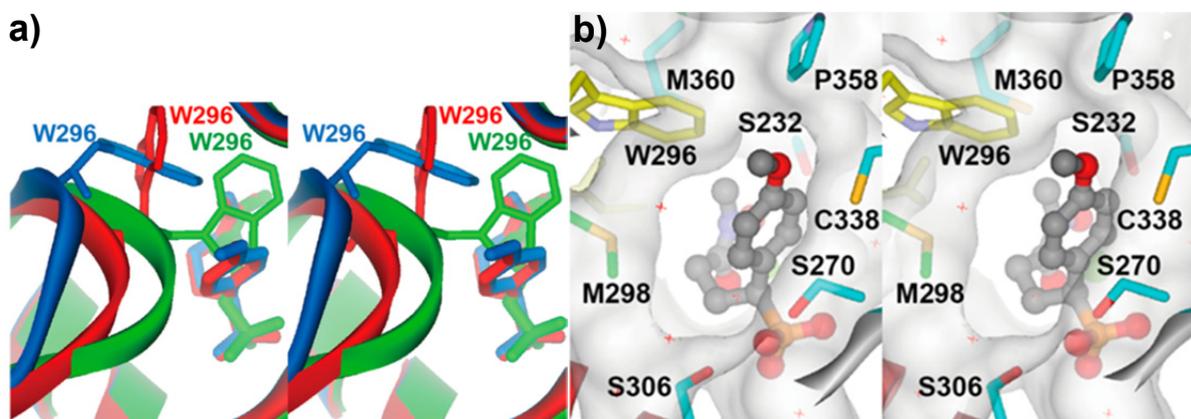
**Abbildung 51** a) Inhibitor-Bindestelle des quaternären Komplexes aus FR900098, *PflspC*,  $Mg^{2+}$  und NADPH. Kohlenstoff-Atome von FR900098 = magenta; Wassermoleküle = blau;  $Mg^{2+}$ -Ion = grün; der schwarze Pfeil deutet auf die *N*-Methylgruppe; der Komplex mit Fosmidomycin ist als gelbes Stab-Modell gezeigt (übernommen aus *Umeda 2011*<sup>[92]</sup>). b) Schema über Interaktionen von Fosmidomycin/FR900098 im aktiven Zentrum von *PflspC*. R = H = Fosmidomycin; R = Methyl = FR900098; die Metallkoordination wird in durchgehenden Linien angegeben; mögliche Wasserstoffbrückenbindungen sind in gestrichelten Linien dargestellt; intermolekulare *Van-der-Waals*-Wechselwirkungen sind in dicken grauen Bögen dargestellt (übernommen aus *Konzuch 2014*<sup>[101]</sup>).

#### 4.1.3 Kristallstruktur des Komplexes aus *PflspC*, $Mn^{2+}$ , NADPH und carba- bzw. oxaisosteren Fosmidomycin-Analoga

2014 wurden von *Konzuch et al.* die Kristallstrukturen von zwei carba- und einem oxaisosteren Fosmidomycin-Analogen (XLII-44C, XLII-I und XLIII-II, s. Abbildung 52) im *PflspC*-Enzym publiziert.<sup>[101]</sup>



**Abbildung 52** Strukturen der von *Konzuch et al.* im Komplex mit *PflspC* untersuchten Fosmidomycin-Analoga. Die flexible Schleife zeigt bei Bindung von **XLII-I** eine ungeordnete, offenere Konformation. Dies wird durch die hohen B-Faktoren\* der Aminosäuren der Schleifenregion im Komplex mit **XLII-I** deutlich. Diese hohen B-Faktoren deuten auf eine flexible ungeordnete Struktur hin. Bei Vorliegen einer geschlossenen Konformation würde zudem der  $\alpha$ -Arylring von **XLII-I** mit Trp296, welches in der Schleife lokalisiert ist, zusammenstoßen. Durch Analyse der *induced-fit*-Bewegungen des Enzyms bei der Inhibitorbindung wird zudem ersichtlich, dass das Ausmaß der Geschlossenheit der flexiblen Schleife eng mit der Größe des Inhibitors verknüpft ist. So nimmt diese Region abhängig davon, ob die voluminösen Inhibitoren **XLII-44C** und **XLII-I** oder der im Vergleich hierzu kleine Inhibitor Fosmidomycin bindet, unterschiedliche Konformationen ein (s. *Abbildung 53*).<sup>[101]</sup>



**Abbildung 53 a.** Vergleich der *induced-fit*-Bewegungen der flexiblen Schleife in Abhängigkeit der unterschiedlichen Liganden **XLII-44C** (blau), **XLII-I** (rot) und Fosmidomycin (grün). **b.** Die Seitenketten, die den  $\alpha$ -Arylring umgeben, sind analog ihrer B-Faktoren eingefärbt: hellblau: 15 - 25 Å<sup>2</sup>; grün: 25 - 35 Å<sup>2</sup>; gelb: 35-45 Å<sup>2</sup>; Trp296 und Met298, die in der flexiblen Schleife lokalisiert sind, zeigen hohe B-Faktoren (**a** und **b** übernommen aus *Konzuch 2014*<sup>[101]</sup>).

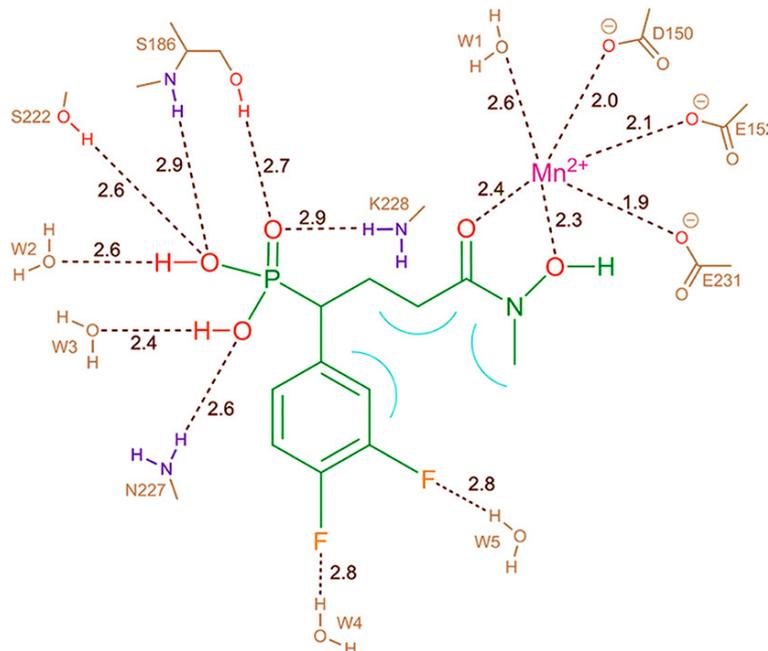
Die offene und ungeordnete Struktur der flexiblen Schleife spricht eher dafür, dass die starke Bindung der Inhibitoren **XLII-44C** und **XLII-I** durch *Van-der-Waals*-Wechselwirkungen

\*B-Faktoren = Temperatur-Faktoren = *Debye-Waller*-Faktoren sind ein Maß für die relativen Schwingungsbewegungen von unterschiedlichen Teilen einer Struktur; hohe B-Faktoren werden bei sehr flexiblen Strukturteilen festgestellt.



#### 4.1.4 Kristallstruktur des Komplexes aus XLII-46C, Mn<sup>2+</sup> und EcIspC

Behrendt *et al.* analysierten die Kristallstruktur des ternären Komplexes aus XLII-46C, Mn<sup>2+</sup> und EcIspC<sup>[114]</sup> (s. Abbildung 55).



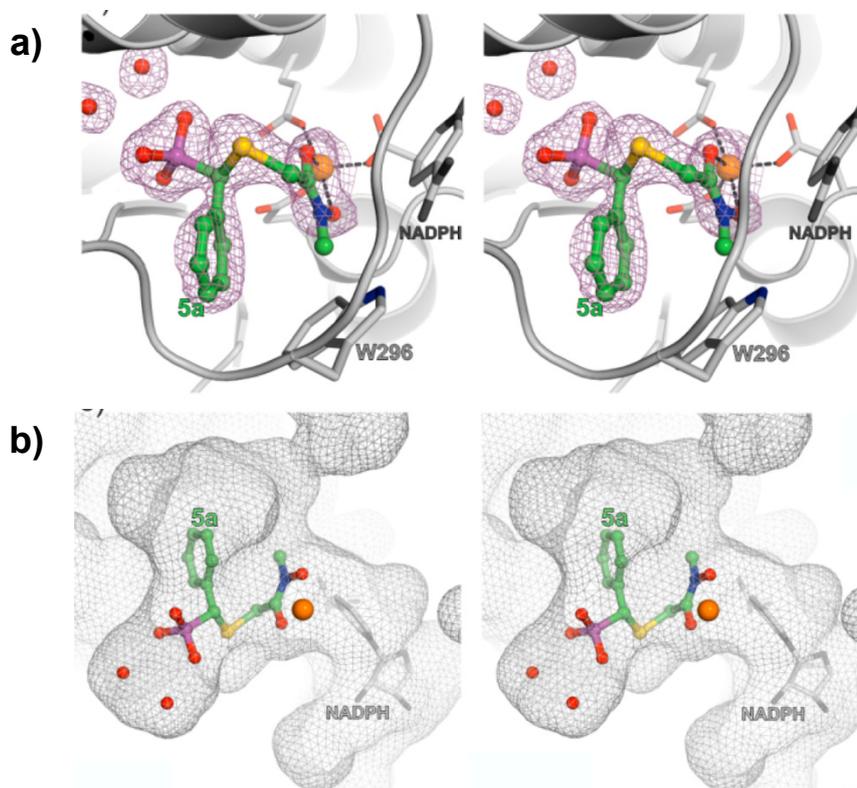
**Abbildung 55** Schematischer Überblick über die Interaktionen von XLII-46C im aktiven Zentrum von EcIspC und die intramolekularen *Van-der-Waals*-Wechselwirkungen (hellblau) (übernommen aus Behrendt 2011<sup>[114]</sup>).

Eine Bindung des Inhibitors ist nur bei offener Konformation der flexiblen Schleifenregion möglich, da Aminosäurereste der Schleife ansonsten mit dem  $\alpha$ -Difluorphenylring kollidieren würden. Im Gegensatz hierzu nimmt diese bei Bindung von Fosmidomycin in dem von MacSweeney *et al.* veröffentlichten Komplex aus NADPH und EcIspC eine geschlossene Konformation ein.<sup>[178]</sup> Die Koordination des Metallions entspricht sowohl bei XLII-46C als auch in dem von Steinbacher *et al.* veröffentlichten Komplex aus Fosmidomycin, Mn<sup>2+</sup>, NADPH und EcIspC einer oktaedrischen Geometrie.<sup>[179]</sup> Wie in den PflspC-Kristallstrukturen erfolgt die Koordination durch die Reste von einem Molekül Asparagin- und zwei Molekülen Glutaminsäure sowie der Hydroxamsäurefunktionalität. Ein zusätzliches Wassermolekül führt zu sechsfacher Koordination und damit zu der im Vergleich zu den PflspC-Komplexen veränderten Geometrie. Die *N*-Methyl-Funktion geht intramolekulare *Van-der-Waals*-Wechselwirkungen mit dem Kohlenstofflinker und dem  $\alpha$ -Difluorphenylring ein, steht selbst aber nicht in Kontakt mit dem Protein. Die Phosphonsäurefunktionalität ist ebenfalls wie in den PflspC-Komplexen Teil eines Wasserstoffbrückennetzwerks. Auch die 3,4-Difluorsubstituenten am Phenylring gehen polare Wechselwirkungen mit zwei Wassermolekülen ein. Die im Vergleich zu Fosmidomycin größere inhibitorische Aktivität

von **XLII-46C** erklären *Behrendt et al.* mit der entropischen und enthalpischen Stabilisierung, die durch die hier wiedergegebenen Interaktionen entsteht. Diese führt möglicherweise trotz der geringeren Stabilisierung durch die Schleifenregion zu einer verbesserten Bindung des Inhibitors.<sup>[114]</sup>

## 4.2 Kristallstrukturanalyse des Komplexes aus Thia-Isoster 43, $Mn^{2+}$ , NADPH und *PflspC*

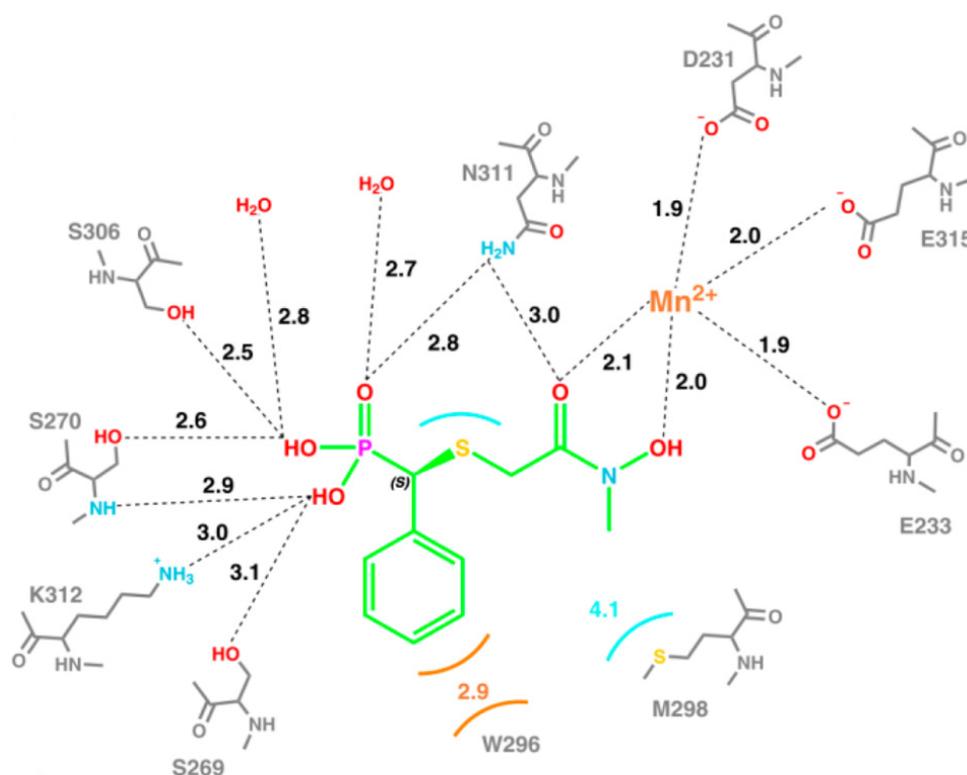
Zum Zeitpunkt des Projektes „ $\beta$ -thia-isostere Fosmidomycin-Analoga“ lagen die Kristallstrukturanalysen des Komplexes aus *PflspC* mit Fosmidomycin bzw. FR900098<sup>[92]</sup> und des Komplexes aus *EclspC* mit Carba-Isoster **XLII-46C**<sup>[114]</sup> vor. Vor diesem Hintergrund sollte untersucht werden, inwiefern sich die Kristallstruktur von *PflspC* mit einem Thia-Isoster hiervon unterscheidet. Als Teil der umfassenden biologischen Evaluation der Thia-Analoga (s. Projektübersicht Abschnitt 1.5) wurde hierzu im Arbeitskreis von *Michael Groll* (Technische Universität München) erstmals ein Fosmidomycin-Thia-Isoster mit *PflspC* kokristallisiert. Der Komplex besteht aus dem *PflspC*-Enzym mit Verbindung **43** und den Kofaktoren  $Mn^{2+}$  sowie NADPH (Auflösung: 2 Å).<sup>[180]</sup>



**Abbildung 56 a.** Blick auf **43** gebunden an das aktive Zentrum von *PflspC* (grau) mit einer Auflösung von 2 Å. NADPH = grau;  $Mn^{2+}$  = orange; Elektronendichte = violettes Gitternetz; **b.** Blick auf die Connolly-Oberflächendarstellung des aktiven Zentrums (übernommen aus *Kunfermann, Lienau 2013*<sup>[180]</sup>).

Diese Untersuchungen liefern einerseits tiefgehende Erkenntnisse zu Struktur-Aktivitäts-Beziehungen unterschiedlicher Fosmidomycin-Analogatypen, andererseits aber auch Informationen zur Enantioselektivität des Enzyms gegenüber chiralen Liganden.

Bei der Analyse der verschiedenen Isooster-Enzym-Komplexe im Vergleich ergeben sich sowohl Gemeinsamkeiten in den Bindungsmodi als auch entscheidende Unterschiede, die nachfolgend diskutiert werden. Der quaternäre Komplex aus *PfIspC*, **43**,  $Mn^{2+}$  und NADPH wurde -wie zuvor erwähnt- durch die Arbeitsgruppe von *Michael Groll*, Technische Universität München, kristallographisch analysiert (Details zur experimentellen Durchführung s. Kapitel 8.4.2).<sup>[180]</sup> Die Struktur ähnelt den oben besprochenen Kristallstrukturen des *PfIspC*-Enzyms (s. Abbildung 56, 57).



**Abbildung 57** Interaktionen der Aminosäurereste mit **43**; Distanzen sind in Å angegeben; *Van-der-Waals*-Wechselwirkungen sind durch farbige Kurven angedeutet (übernommen aus *Kunfermann, Lienau* 2013<sup>[180]</sup>).

So erfolgt am divalenten Metallkation eine fünffache Koordination durch die Aminosäuren Asp231, Glu233 und Glu315 sowie durch die Hydroxamsäurefunktion des Inhibitors.<sup>[180]</sup> Die Koordination des Metallions ist somit in allen drei *PfIspC*-Kristallstrukturen (mit Fosmidomycin, **XLII-I** und **43** als Liganden) gleich unter Beteiligung der identischen Aminosäuren und der Hydroxamsäurefunktionalität als zweizähnigem Chelator. Dementsprechend liegt hier für alle Komplexe mit *PfIspC* dieselbe Geometrie (verzerrt trigonal bipyramidal) vor. Lediglich der Komplex von Carba-Isooster **XLII-46C** im Komplex mit *EcIspC*, welcher ohne den Kofaktor NADPH kristallisiert wurde, weist eine andere

Geometrie auf. Wie in den *PfIspC*-Komplexen erfolgt bei *EcIspC* und **XLII-46C** die Koordination zwar durch die Reste von einem Molekül Asparagin- und zwei Molekülen Glutaminsäure sowie der Hydroxamsäurefunktionalität. Ein zusätzliches Wassermolekül führt jedoch zu sechsfacher Koordination und damit zu der im Vergleich zu den *PfIspC*-Komplexen veränderten oktaedrischen Geometrie. *Konzuch et al.* analysierten, dass das Vorkommen eines Wassermoleküls in dieser Position im **XLII-I/PfIspC**-Komplex sehr unwahrscheinlich ist, da es mit der Nicotinamidpartialstruktur des NADPH-Moleküls kollidieren würde.<sup>[101]</sup> Da **43** ebenfalls mit NADPH kokristallisiert wurde, kann dies auch für den hier vorliegenden Komplex angenommen werden. Die Methylfunktion des Hydroxamsäurestickstoffs ist bei **43** weder in Kontakt mit dem Protein noch an intramolekularen Interaktionen beteiligt.<sup>[180]</sup> Dies steht im Gegensatz zu den Beobachtungen an den Komplexen **XLII-46C/EcIspC**, **XLII-I/PfIspC** und **FR900098/PfIspC**. Bei **XLII-46C/EcIspC** und **XLII-I/PfIspC** bilden sich durch die *N*-Methylfunktion intramolekulare Wechselwirkungen sowohl mit dem Kohlenstofflinker als auch mit dem Arylring aus (s. oben). **XLII-I** weist zusätzlich noch wie **FR900098** Interaktionen zwischen der *N*-Methylfunktion und Aminosäureresten des Enzyms auf.

Die Phosphonsäurefunktion bildet Wasserstoffbrückenbindungen mit Ser269, Ser270, Ser306, Asn311, Lys312 und zwei Wassermolekülen aus.<sup>[180]</sup> Dieses Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen, das die Phosphonsäuregruppe mit dem aktiven Zentrum ausbildet, ist vergleichbar zu dem von **XLII-I** und Fosmidomycin. Bei allen drei Strukturen sind zusätzlich zwei Wassermoleküle beteiligt. Es treten lediglich Abweichungen in einzelnen involvierten Aminosäuren auf. Alle in direktem Kontakt zum Liganden stehenden Aminosäuren sind konserviert (außer Ser269), was möglicherweise für eine inhibitorische Aktivität der Liganden an anderen *IspC*-Enzymen spricht. Im Gegensatz zu den übrigen veröffentlichten *IspC*-Strukturen mit anderen Fosmidomycin-Analoga, die in  $\alpha$ -Position einen Arylrest tragen, liegt hier die den Liganden bedeckende Schleifenregion wie im Fosmidomycin/*PfIspC*-Komplex geordnet vor.<sup>[180]</sup> Während also das Vorliegen einer ungeordneten Schleifenstruktur bei den anderen Enzym-Inhibitor-Komplexen darauf hindeutet, dass kaum bis keine Wechselwirkungen zwischen dieser und dem Liganden auftreten, sind bei der geordneten Struktur des Thia-Isosterkomplexes Wechselwirkungen zu beobachten. Die in der Schleifenregion vorkommenden Aminosäuren Trp296 und Met298 stabilisieren mittels hydrophober Wechselwirkungen den gebundenen Inhibitor. Hierbei geht das  $\beta$ -Schwefelatom von **43** mit dem Schwefelatom der streng konserviert vorliegenden Aminosäure Met298 Interaktionen ein.<sup>[180]</sup> Das  $\beta$ -Kohlenstoffatom der Carba-Isostere würde an dieser Stelle nicht in Kontakt mit dem Protein treten. Zwischen dem  $\beta$ -Sauerstoffatom der

Oxa-Isostere und Met298 entstünden abstoßende Effekte. Eine ungünstige Beeinflussung der Enzym-Inhibitor-Bindung durch das  $\beta$ -Sauerstoffatom in der hydrophoben Umgebung des aktiven Zentrums wurde auch von *Konzuch et al.* postuliert (s. oben). Allerdings konnten hier für die  $\beta$ -Methyleneinheit des Carba-Isosters **XLII-I** hydrophobe Interaktionen mit dem Enzym beobachtet werden. Von *Brücher et al.* wurde die mögliche Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem  $\beta$ -Sauerstoffatom eines oxa-isosteren Liganden und Ser306 vorgeschlagen und im Modell simuliert.<sup>[112]</sup> Das Auftreten dieser Wasserstoffbrücke kann somit weder durch die Untersuchungen von *Konzuch et al.* noch durch die Strukturanalyse des *PfIspC*/Thia-Isoster-Komplexes bestätigt werden.

Neben der Ausbildung hydrophober Wechselwirkungen mit der Schleifenregion hat das  $\beta$ -Schwefelatom der Thia-Isostere einen weiteren Vorteil. Durch dieses entsteht eine erhöhte Flexibilität des Inhibitormoleküls, was möglicherweise zu einer erleichterten Bindung des Liganden an das aktive Zentrum führt. Trp296, lokalisiert in der Schleifenregion, geht hydrophobe Wechselwirkungen mit dem  $\alpha$ -Phenylring ein; durch ihre hohe Mobilität ist die Schleifenregion dazu in der Lage, Substituenten wie beispielsweise den Phenylring oder noch voluminösere Reste (z.B. 1-Naphthyl, **45**) zu tolerieren.<sup>[180]</sup>

Über die hier vorgestellten Bindungsmodi zwischen Ligand und Enzym hinaus ermöglicht es die Kristallstruktur zudem, eine Aussage über die Enantioselektivität des Enzyms gegenüber dem chiralen Inhibitor zu machen. Es wird selektiv das (*S*)-Enantiomer gebunden.<sup>[180]</sup> Diese Feststellung entspricht den Analysen anderer Autoren, die ebenfalls vorschlagen, dass das (*S*)-Enantiomer  $\alpha$ -Aryl-substituierter Fosmidomycin-Analoga an *IspC*-Enzyme bindet.<sup>[101, 181]</sup> Um diese Enantioselektivität jedoch nicht nur in der Kristallstrukturanalyse, sondern auch durch biologische Testung am Enzym selbst zu zeigen, wurden Versuche zur Racematspaltung unternommen. Wie in Abschnitt 5.7 näher erläutert wird, konnten via chirale HPLC das (+)- und das (-)-Enantiomer von **43** getrennt werden. Erstmals konnten so das (*S*)- und das (*R*)-Enantiomer eines chiralen Fosmidomycin-Analogons isoliert an *IspC*-Enzymen getestet und so ein Enantiomer als das Eutomer definiert werden (s. Abschnitt 5.7).<sup>[180]</sup> Das (+)-Enantiomer weist gegenüber *IspC*-Enzymen eine um ein Vielfaches größere inhibitorische Potenz auf als das (-)-Enantiomer. Aufgrund der Tatsache, dass das (+)-Enantiomer eine sehr viel höhere biologische Aktivität besitzt und weil aus der Kristallstrukturanalyse hervorgeht, dass selektiv das (*S*)-Enantiomer vom *PfIspC*-Enzym gebunden wird, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem (+)-Enantiomer um das (*S*)-Enantiomer handelt. Während von anderen Autoren anhand von Kristallstrukturanalysen lediglich vermutet wurde, dass im *IspC*-Enzym von chiralen

Fosmidomycin-Analoga selektiv ein Enantiomer gebunden wird, konnte hier durch die biologische Testung beider Enantiomere erstmals der finale Beweis erbracht werden, dass tatsächlich nur ein Enantiomer für die IspC-Inhibition verantwortlich ist.

## 5 Biologische Evaluation

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Fosmidomycin-Analoga mit Substitution in  $\alpha$ -Position,  $\beta$ -Thia-Einheit und reverser Hydroxamsäurefunktionalität entwickelt. Die Variation der Molekülregionen A-C resultierte in einer kleinen Substanzbibliothek (s. Abbildung 58). So wurde in Molekülregion A mit aromatischen Systemen gearbeitet, die beispielsweise Substituenten mit +I/+M- oder -I-Effekt besitzen. Neben voluminösen Resten wie einer Naphthylgruppe gibt es auch Verbindungen, die in  $\alpha$ -Position nur einen Phenylring tragen oder an dieser Position gar keinen Substituenten aufweisen. Ergänzend zu Analoga mit unsubstituierter („freier“) Hydroxamsäuregruppe führte die Modifikation der Molekülregion C zur Entwicklung von Isosteren, die am Stickstoff einen kleinen (Methyl-) oder voluminösen (Benzyl-) Rest besitzen. Durch Oxidation der Sulfid-Struktur in Molekülregion B wurden die korrespondierenden Sulfone generiert. Die Diversität der Strukturvariationen und die Erkenntnisse aus der Kristallstrukturanalyse (s. Kapitel 4) erlauben eine tiefere Evaluation von Struktur-Wirkungsbeziehungen.

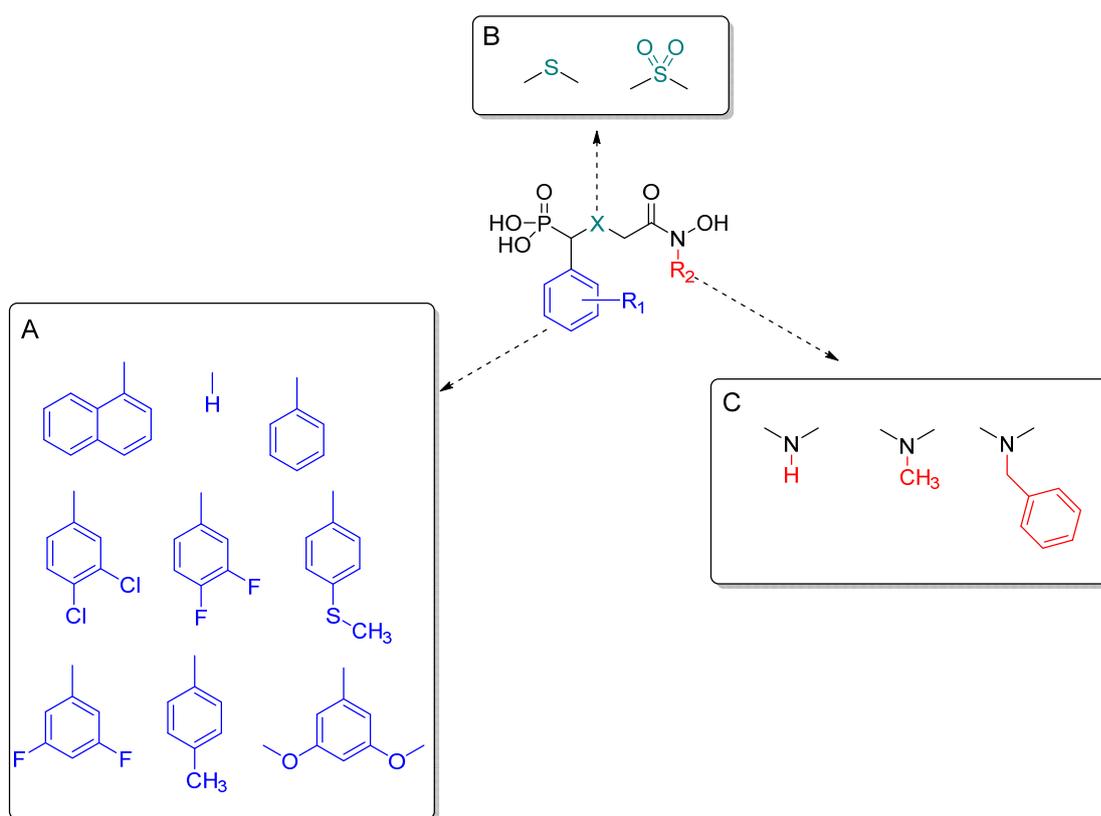
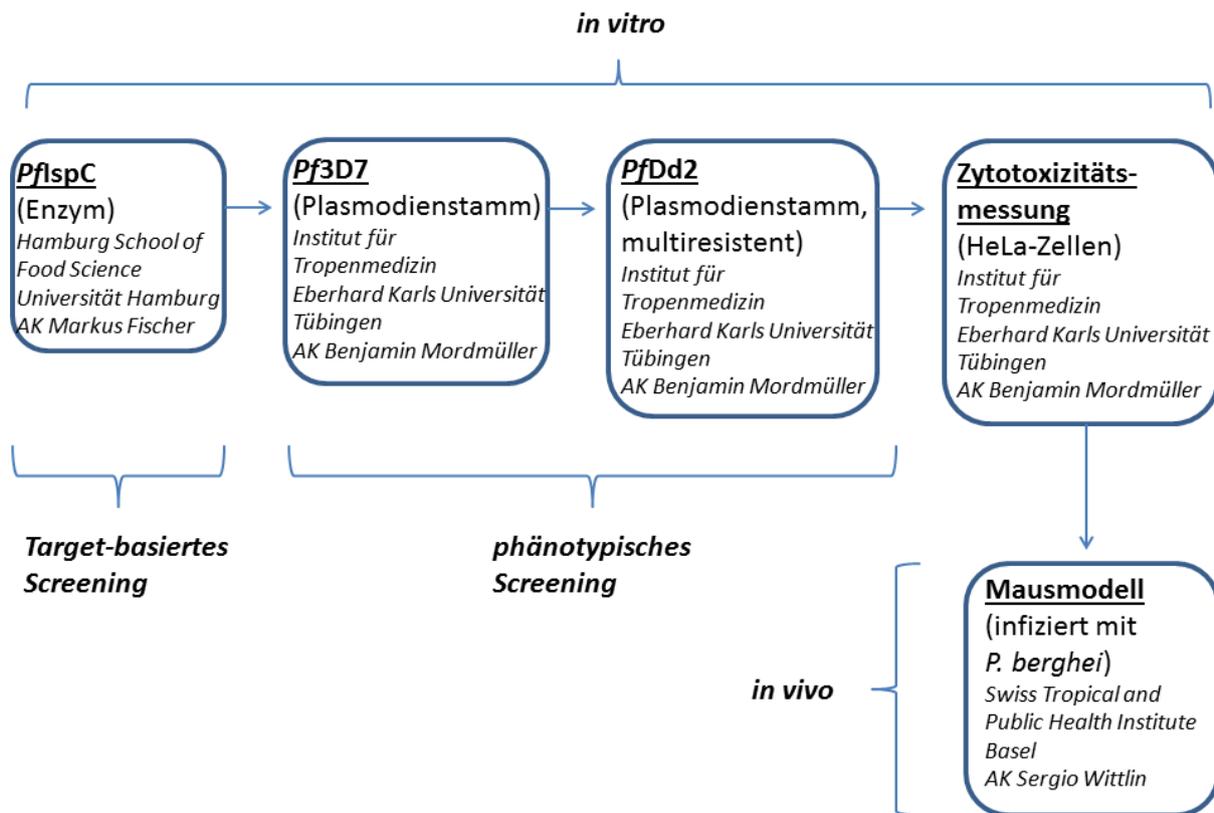


Abbildung 58 Variation der Molekülregionen A-C.

Abbildung 59 zeigt eine Übersicht über alle in dieser Arbeit zur biologischen Evaluation der Testsubstanzen verwendeten Methoden.



**Abbildung 59** Angewendete Testmethoden zur biologischen Evaluation  $\beta$ -thia-isosterer Fosmidomycin-Analoga.

Die Evaluation der potentiellen Aktivität der Fosmidomycin-Analoga gegenüber Plasmodien erfolgte durch zwei Screeningmethoden, dem Target-basierten sowie dem phänotypischen Screening (Näheres hierzu s. unten). Durch Target-basiertes Screening wurde die inhibitorischen Potenz der Verbindungen direkt am Enzym ermittelt. Hierbei wurde die inhibitorische Aktivität von **18** und **43-65** gegenüber dem rekombinanten IspC-Enzym aus *Plasmodium falciparum* (*PflspC*) bestimmt. Alle Screenings an IspC-Enzymen wurden in der Arbeitsgruppe von *Markus Fischer* (Universität Hamburg) durchgeführt. Darüber hinaus wurde im Zellkultur-Assay die wachstumshemmende Aktivität der Testsubstanzen gegenüber zwei Plasmodienstämmen evaluiert. Bei diesem phänotypischen Screening wurde die antiplasmodiale *in vitro*-Aktivität an den Laborstämmen *Plasmodium falciparum* 3D7 (*Pf3D7*) und *Plasmodium falciparum* Dd2 (*PfDd2*) untersucht. Bei *Pf3D7* handelt es sich um einen Chloroquin-sensitiven Plasmodien-Stamm, während sich *PfDd2* durch Resistenz gegen Chloroquin, Chinin, Pyrimethamin und Sulfadoxin auszeichnet. Anschließend wurde durch eine Untersuchung an HeLa-Zellen\* für ausgewählte Testverbindungen ermittelt, ob diese

\*HeLa-Zellen = menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms

gegenüber Säugetierzellen zytotoxisch wirken. Die Untersuchungen an den Plasmodienstämmen und an den HeLa-Zellen erfolgten in der Arbeitsgruppe von *Benjamin Mordmüller* (Universität Tübingen). Nach der Selektion durch beide Screeningmethoden und nachdem erwiesen war, dass die Substanz nicht zytotoxisch gegenüber HeLa-Zellen ist, wurde ein interessanter Wirkstoffkandidat auf seine *in vivo*-Aktivität an mit *P. berghei* infizierten Mäusen untersucht. Die Durchführung des Tierversuchs erfolgte im Arbeitskreis von *Sergio Wittlin* (Swiss Tropical and Public Health Institute, Basel). Für Details zu der experimentellen Durchführung der biologischen Testungen s. Kapitel 8.4.

### **Bestimmung der PfIspC-inhibitorischen und antiplasmodialen Aktivität - Target-basiertes und phänotypisches Screening**

Bei der Entwicklung neuer Arzneistoffe stehen sich zur Selektion biologisch aktiver Substanzen („Hits“) unter anderem\* zwei Methoden gegenüber, die oben schon erwähnt wurden: das Target-basierte und das Zell-basierte Screening, die auch kombiniert werden können. Beim Target-basierten Screening wird eine Substanzbibliothek auf Aktivität an einem isolierten Protein getestet. Das phänotypische Screening hingegen erfolgt an der ganzen lebenden Zelle.<sup>[182]</sup> Beide Methoden haben einige generelle Vor- und Nachteile, die im folgenden Abschnitt kurz beschrieben werden sollen.

#### **Target-basiertes Screening**

Durch seine Spezifität gegenüber dem Target wird der Wirkungsmechanismus des potentiellen Arzneistoffs verstanden. Es können strukturbiologische oder computergestützte Methoden zur Aufklärung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen und somit zur Optimierung der Leitstruktur herangezogen werden. Zudem sind Target-basierte Screeningmethoden für High-Throughput-Screenings leicht zugänglich.<sup>[183]</sup>

Demgegenüber stehen die Nachteile dieser Methode. So gibt es insbesondere bei parasitären Erkrankungen wie Malaria nur wenige validierte Targets.<sup>[182, 184]</sup> Bei vielen Arzneistoffen ist das Target nach wie vor nicht bekannt. Einige Wirkstoffe interagieren mit mehreren Targets oder zeigen zudem noch off-Target-Interaktionen, die bei dieser Screening-Methode nicht erfasst werden.<sup>[185]</sup> Außerdem ist die reine Fokussierung auf das Target problematisch. So werden bei dieser Methode beispielsweise die Relevanz und die Zugänglichkeit des Targets in der lebenden Zelle nicht berücksichtigt. Auch Kompensations-

---

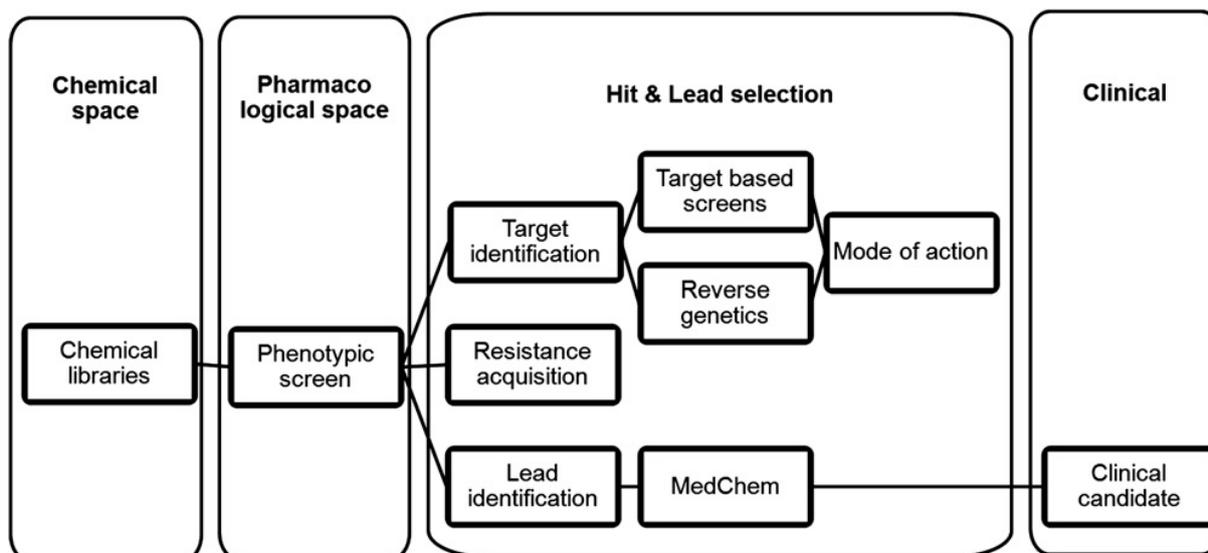
\*Neben dem Target-basierten und dem phänotypischen Screening sind beispielsweise auch computergestützte Screeningmethoden im Einsatz, die zur Vorhersage von Hits genutzt werden.

oder Resistenzmechanismen der Zelle fließen nicht ein.<sup>[183]</sup> Darüber hinaus besteht die Gefahr, dass mögliche Stabilitätsprobleme der Testsubstanz im Target-basierten Screening unentdeckt bleiben. Prozesse wie Hydrolyse oder enzymatischer Abbau können ggf. erst unter den Bedingungen des Zellkulturassays in Erscheinung treten.

### **Zell-basiertes phänotypisches Screening**

Diese Methode stellt an die zu testende Verbindung neben der bloßen Aktivität am Target noch andere entscheidende Anforderungen. Hits im Ganzzellassay weisen neben einer guten Aktivität am Target automatisch noch andere Eigenschaften auf. Zwei der wichtigsten zusätzlichen Eigenschaften für eine Aktivität im Ganzzellassay sind eine ausreichende Zellpermeabilität und eine ausreichende Stabilität der Testsubstanz. Zudem dürfen keine Mechanismen zur Inaktivierung der Testsubstanz vorhanden sein wie beispielsweise ein Efflux.<sup>[182-183]</sup> Der ganze Zellorganismus mit all seinen potentiellen Targets und Biosynthesewegen kann von der Testsubstanz adressiert werden. Dies ist vor allem bei Substanzen mit mehreren Targets oder unbekanntem Target relevant.<sup>[185]</sup> Im Zellkulturassay können zudem schon mögliche Toxizitätsprobleme in Erscheinung treten.<sup>[182-183]</sup>

Jedoch weist auch diese Methode Nachteile auf. Um die Leitstruktur zu optimieren, können Untersuchungen zur Findung des eigentlichen Targets notwendig sein. Um das Aktivitätsspektrum einer Testsubstanz zu verstehen und somit einer Strukturoptimierung zugänglich zu machen, können unterschiedliche Targets und somit unterschiedliche Assays notwendig sein. Die meisten Ganzzellassays können zudem nur mit niedrigerer Effizienz im High-Throughput-Screening eingesetzt werden. Außerdem führt eine erhöhte Variabilität in den Assays zu unterschiedlichen statistischen Ergebnissen und geringerer Robustheit.<sup>[183, 185]</sup> Substanzen, die aufgrund von mangelnder Zellpermeabilität im phänotypischen Screening inaktiv sind, können als potente Target-Inhibitoren unentdeckt bleiben.<sup>[185]</sup> Durch eine geeignete Formulierung oder chemische Modifizierung können diese trotzdem phänotypisch aktiv sein.



**Abbildung 60** Strategie zur Arzneistoffentwicklung gegen Malaria ausgehend von phänotypischen Screenings (übernommen aus *Guiguemde 2012*<sup>[184]</sup>).

In der modernen Arzneistoffentwicklung gibt es den Trend, Hits verstärkt durch phänotypisches Screening zu selektieren. So wurden 37 % der von der FDA zwischen 1999-2008 zugelassenen *first in class drugs*\* durch phänotypische Screenings entdeckt. Lediglich 23 % hiervon gingen aus Target-basierten Screenings hervor.<sup>[182, 186]</sup> Auch MMV und die Partner dieser Organisation haben einige Wirk- bzw. Arzneistoffkandidaten in präklinischer und klinischer Entwicklung, die über phänotypische Screenings entdeckt wurden.<sup>[182]</sup> Die Identifizierung des molekularen Targets wird mehr zur retrospektiven Betrachtung nach der Hit-Selektion mittels phänotypischen Screenings. Abbildung 60 zeigt die Vorgehensweise der Arzneistoffentwicklung gegen Malaria ausgehend von phänotypischen Screenings. Das am Beginn stehende phänotypische Screening führt zur Auswahl von Testsubstanzen, die gegen zelluläre und pharmakologische Einschränkungen bestehen. Es werden so schnell Verbindungen selektiert, bei denen eine hohe Wahrscheinlichkeit vorliegt, dass sie *in vivo* wirksam sind. Target-Identifizierung und -Validierung erscheinen später im Prozess. Sie werden so aus der ersten kritischen Entwicklungsphase, der Hit-Identifizierung, ausgeschlossen. Trotzdem ist das Finden eines Targets von Vorteil, beispielsweise für die Optimierung der Leitstruktur und das Verständnis von Resistenzmechanismen.<sup>[184]</sup> In der pharmazeutischen Industrie werden Target-basierte und zelluläre Screenings hierzu häufig kombiniert.<sup>[182]</sup> Die Target-Identifizierung einer Hit-Substanz nach dem phänotypischen Screening kann beispielsweise wie nachfolgend beschrieben durchgeführt werden. In den Parasiten wird im ersten Schritt Resistenzbildung gegenüber der Testsubstanz induziert.

\* *first in class drugs* = Arzneimittel bzw. -stoffe, die einen neuartigen Wirkmechanismus haben

Anschließend wird das Genom der resistenten Parasiten mit dem Genom der empfindlichen Parasiten verglichen und so das Target identifiziert.<sup>[187]</sup>

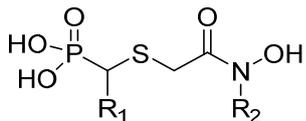
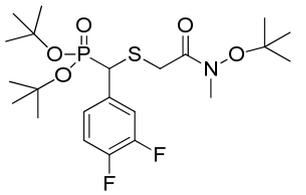
In dem kommenden Abschnitt wird zunächst die Aktivität der Thia-Isostere **18** und **43-65** gegenüber Plasmodien evaluiert. Hierzu wird die *PfIspC*-inhibitorische Aktivität diskutiert, die antiplasmodiale Aktivität gegenüber den zwei Plasmodienstämmen *Pf3D7* und *PfDd2* *in vitro* betrachtet und abschließend die antiplasmodiale *in vivo*-Aktivität im Mausmodell untersucht. Darüber hinaus wird die inhibitorische Aktivität gegenüber nicht-plasmodialen *IspC*-Enzymen analysiert. Abschließend soll bewertet werden, ob die Thia-Isostere eine verbesserte Aktivität gegenüber Plasmodien zeigen als die zuvor entwickelten Carba-Analoga **XLII-43C** – **XLII-47C**, **XLII-52C** und **XLII-54C** sowie die Oxa-Analoga **XLIII-43O** – **XLIII-47O**, **XLIII-52O** und **XLIII-55O**.

## **5.1. *PfIspC*-inhibitorische und antiplasmodiale Aktivität der $\beta$ -thia-isosteren Fosmidomycin-Analoga mit Sulfidpartialstruktur**

Die  $IC_{50}$ -Werte der *PfIspC*-Inhibition für alle Thia-Analoga mit Sulfidpartialstruktur (**18**, **43-57**) und deren antiplasmodiale Aktivität gegenüber *Pf3D7* und *PfDd2* sind in Tabelle 8 dargestellt.

### **5.1.1 Target-basiertes Screening – *in vitro*-Aktivität gegenüber dem Enzym *PfIspC***

Verbindung **47** weist im Enzymassay mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $0.0045 \pm 0.0004 \mu\text{M}$  die höchste inhibitorische Aktivität auf. Die Verbindung verfügt über elektronenziehende Substituenten in 3,4-Position des Aromaten sowie eine *N*-Methyl-substituierte Hydroxamsäuregruppe. Dass sich ein solches Substitutionsmuster als vorteilhaft für die inhibitorische Aktivität erweist, zeigen auch die  $IC_{50}$ -Werte der übrigen Analoga.

<b>Verbindung</b> 	<b><i>Pf</i>IspC IC<sub>50</sub> (μM)<sup>[a]</sup></b>	<b><i>Pf</i>3D7 IC<sub>50</sub> (μM)<sup>[b]</sup></b>	<b><i>Pf</i>Dd2 IC<sub>50</sub> (μM)<sup>[b]</sup></b>
<b>R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub></b>			
<b>43:</b> R <sub>1</sub> = Ph	0.024 ± 0.002 <sup>[d]</sup>	0.03 <sup>[d]</sup>	0.075 <sup>[d]</sup>
<b>44:</b> R <sub>1</sub> = 4-CH <sub>3</sub> -Ph	0.018 ± 0.004 <sup>[d]</sup>	0.11 <sup>[d]</sup>	0.095 <sup>[d]</sup>
<b>45:</b> R <sub>1</sub> = 1-Naphthyl	0.0098 ± 0.0009 <sup>[d]</sup>	0.38 <sup>[d]</sup>	0.51 <sup>[d]</sup>
<b>46:</b> R <sub>1</sub> = 3,4-F-Ph	0.014 ± 0.001 <sup>[d]</sup>	0.11 <sup>[d]</sup>	0.088 <sup>[d]</sup>
<b>47:</b> R <sub>1</sub> = 3,4-Cl-Ph	0.0045 ± 0.0004 <sup>[d]</sup>	0.091 <sup>[d]</sup>	0.085 <sup>[d]</sup>
<b>48:</b> R <sub>1</sub> = 3,5-F-Ph	0.013 ± 0.004	0.15	0.13
<b>49:</b> R <sub>1</sub> = 3,5-OCH <sub>3</sub> -Ph	0.02 ± 0.004	0.16	0.18
<b>50:</b> R <sub>1</sub> = 4-SCH <sub>3</sub> -Ph	0.029 ± 0.008	0.099	0.18
<b>18:</b> 	>1000	>111	111
<b>R<sub>2</sub> = CH<sub>2</sub>Ph</b>			
<b>51:</b> R <sub>1</sub> = H	0.74 ± 0.04	5.53	n.b.
<b>R<sub>2</sub> = H</b>			
<b>52:</b> R <sub>1</sub> = Ph	0.11 ± 0.02 <sup>[d]</sup>	2.9 <sup>[d]</sup>	3.77 <sup>[d]</sup>
<b>53:</b> R <sub>1</sub> = 4-CH <sub>3</sub> -Ph	0.032 ± 0.006	6.48	8.03
<b>54:</b> R <sub>1</sub> = 3,4-F-Ph	0.015 ± 0.002 <sup>[d]</sup>	0.16 <sup>[d]</sup>	0.33 <sup>[d]</sup>
<b>55:</b> R <sub>1</sub> = 3,4-Cl-Ph	0.2 ± 0.01 <sup>[d]</sup>	0.54 <sup>[d]</sup>	0.87 <sup>[d]</sup>
<b>56:</b> R <sub>1</sub> = 3,5-F-Ph	0.011 ± 0.002	1.23	0.87
<b>57:</b> R <sub>1</sub> = 3,5-OCH <sub>3</sub> -Ph	0.024 ± 0.004	0.33	0.27
<b>Fosmidomycin</b>			
	0.16 ± 0.02 <sup>[c]</sup>	0.88 <sup>[c]</sup>	0.81 <sup>[c]</sup>

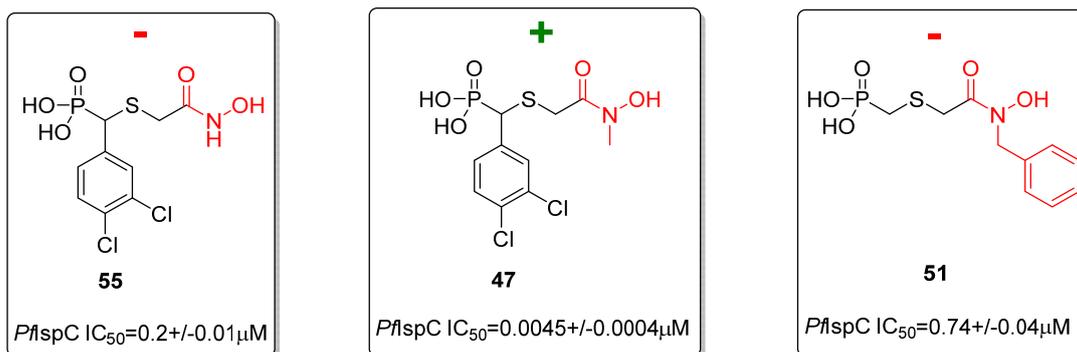
**Tabelle 8** [a] Enzymassay. Mittelwerte ± Standardabweichung aus 7-10 Messpunkten; [b] Zellkulturassay. Mittelwert aus zwei unabhängigen Doppelbestimmungen; [c] Wert entsprechend Referenz<sup>[112]</sup>; [d] Wert veröffentlicht in *Kunfermann, Lienau* 2013<sup>[180]</sup>; n.b. = nicht bestimmt.

### **Einfluss des Substituenten am Hydroxamsäurestickstoff**

Alle *N*-Methyl-substituierten Verbindungen sind entweder aktiver oder weisen eine vergleichbare Aktivität auf wie ihre korrespondierenden, nicht am Stickstoff substituierten

Hydroxamsäuren. Bei der Hälfte der Verbindungen mit nicht am Stickstoff substituierter Hydroxamsäurefunktion liegt eine Reduktion der Aktivität gegenüber den entsprechenden *N*-Methyl-substituierten Substanzen vor (**52**, **53**, **55**). So besitzt Verbindung **44** einen IC<sub>50</sub>-Wert von  $0.018 \pm 0.004 \mu\text{M}$  während der des korrespondierenden unsubstituierten Analogons **53** mit  $0.032 \pm 0.006 \mu\text{M}$  annähernd doppelt so groß ist. Bei **47** und der zugehörigen freien Hydroxamsäure **55** ist der Aktivitätsunterschied am größten. Mit  $0.2 \pm 0.01 \mu\text{M}$  ist der IC<sub>50</sub>-Wert von **55** um den Faktor 44 höher als der von **47**. Dagegen ist die andere Hälfte der nicht am Stickstoff substituierten Verbindungen (**54**, **56**, **57**) vergleichbar aktiv wie die korrespondierenden *N*-Methyl-substituierten Hydroxamsäuren.

Die Hydroxamsäuregruppe muss für die Chelatisierung des divalenten Kations im aktiven Zentrum des Enzyms in der *Z*-Konformation vorliegen (s. Kapitel 4). *Brücher* und *Behrendt* vermuteten, dass für die größere Aktivität der am Stickstoff Methyl-substituierten Carba- und Oxa-Isostere u. a. die Stabilisierung dieser Konformation durch den Substituenten entscheidend sei, die bei diesen beiden Isostertypen auch so auftritt.<sup>[107, 113]</sup> Wie aus den NMR-spektroskopischen Untersuchungen hervorgeht (s. Kapitel 3.2), führt eine *N*-Substitution bei den Thia-Isosteren nicht zu einer Stabilisierung der *Z*-Konformation der Hydroxamsäuregruppe. Durch die Kristallstrukturanalyse von Thia-Isoster **43** im Komplex mit *PflspC* ist zudem belegt, dass die *N*-Methylfunktion weder Wechselwirkungen mit dem Enzym noch intramolekulare Interaktionen eingeht. Somit kann die erhöhte biologische Aktivität der am Stickstoff Methyl-substituierten Thia-Analoga auch nicht mit einer stabileren Enzymbindung erklärt werden. Stattdessen kann die erhöhte Substanzstabilität gegenüber den unsubstituierten Hydroxamsäuren als Grund für die höhere Aktivität angenommen werden. Wie in Abschnitt 2.1.1 erläutert, können beispielsweise einige unsubstituierte Hydroxamsäuren durch Hydrolyse in die entsprechende Carbonsäure konvertiert werden. Der Austausch der Hydroxamsäurefunktionalität gegen eine Carbonsäuregruppe führt zur Inaktivität gegenüber dem Enzym (s. Abschnitt 1.4.2).<sup>[102]</sup> Die erhöhte biologische Aktivität des am Stickstoff Methyl-substituierten Verbindungstyps wird in Abschnitt 5.1.2 weiter diskutiert.



**Abbildung 61** Einfluss des Substituenten am Hydroxamsäurestickstoff auf die inhibitorische Aktivität gegenüber *PflspC*.

Eine zu starke Vergrößerung des Restes am Hydroxamsäure-Stickstoff ist sowohl für die IspC-Hemmung als auch für die antiplasmodiale Aktivität unvorteilhaft. Diese Beobachtung wurde auch für andere Fosmidomycin-Analogatypen gemacht<sup>[112, 114]</sup> und lässt sich anhand der geringen Aktivität der *N*-Benzyl-substituierten Verbindung **51** bestärken (s. Abbildung 61). Für die Aktivitätsminderung der Fosmidomycin-Analoga **XXIII** und **XXIV**, welche einen Ethyl- bzw. Isopropylrest am Hydroxamsäure-Stickstoff besitzen (s. Kapitel 1.4.2), kann eine ungünstige Beeinflussung der Metallkoordination angenommen werden.<sup>[107]</sup> Bei **51** ist möglicherweise der sterische Anspruch des *N*-Substituenten der Hauptgrund für die geringe Aktivität. Der im Vergleich zu den Analoga **XXIII** und **XXIV** viel voluminösere *N*-Benzylrest verhindert so ggf. eine optimale Bindung an das Enzym. **51** wurde aufgrund der Erkenntnis, dass Fosmidomycin-Analoga mit großem Rest am Hydroxamsäurestickstoff eine schwache IspC-Inhibition zeigen, nicht für dieses Enzym entwickelt, sondern als möglicher Inhibitor des Dxr-like (DRL) Enzyms. DRL katalysiert dieselbe Reaktion wie Dxr (IspC), weist aber eine geringe strukturelle Verwandtschaft mit diesem auf.<sup>[188]</sup> Die von Pérez-Gil *et al.* veröffentlichte Kristallstrukturanalyse des DRL Proteins von *Brucella abortus* im Komplex mit Fosmidomycin zeigt, dass  $\alpha$ -Aryl-Substituenten bei Fosmidomycin-Analoga eine Bindung an das aktive Zentrum erschweren und Reste in *N*-Position der Hydroxamsäurefunktion eine Bindung begünstigen. Somit überrascht es nicht, dass potente IspC-Inhibitoren mit  $\alpha$ -Phenyl-Substitution (die von Behrendt entwickelte Carba-Analoga **XLII-43C**, **XLII-52C**, s. Abschnitt 5.8) am DRL-Enzym eine geringe Aktivität aufweisen.<sup>[189]</sup> Dagegen ist Verbindung **51** in  $\alpha$ -Position unsubstituiert und in *N*-Position befindet sich ein größerer Rest. Der Strukturvorschlag für **51** stammt von Pérez-Gil und basiert auf den Erkenntnissen dieser Kristallstrukturanalyse. Zurzeit ist **51** in biologischer Testung am DRL-Enzym von *Brucella abortus* (durchgeführt von Jordi Pérez-Gil, University of Queensland, Australian Institute for Bioengineering and Nanotechnology, Brisbane).

### **Einfluss des Substituenten in $\alpha$ -Position**

Der potenteste Inhibitor ist, wie zuvor erwähnt, die 3,4-Dichlorphenyl-substituierte und *N*-Methyl-substituierten Verbindung **47** mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $0.0045 \pm 0.0004 \mu\text{M}$ . Neben der *N*-Methyl-Substitution hat sich die Einführung von Halogenen am  $\alpha$ -Phenylring als aktivitätssteigernd für die Enzyminhibition erwiesen. Der Elektronenzug kann beispielsweise dazu führen, dass die Acidität der Phosphonsäure gesteigert wird und somit die Deprotonierung leichter erfolgt. Eine vollständige Deprotonierung der Phosphonsäure ist essenziell für die Bindung des potentiellen Inhibitors an das aktive Zentrum des Enzyms (s. Kapitel 1, 4).<sup>[92, 101]</sup> Im Gegensatz zur *N*-Methyl-Substitution hat das Substitutionsmuster des Aromaten in  $\alpha$ -Position allerdings keinen so großen Einfluss auf das inhibitorische Potenzial. Gleichgültig, ob voluminöse Substituenten (**45**, **49**), Substituenten mit positivem (**44**) oder negativem (**46**, **48**) induktiven Effekt oder keine Substitution (**43**) am Aromaten vorliegen, die  $IC_{50}$ -Werte dieser Verbindungen liegen in einem Bereich von  $0.0098 \mu\text{M}$  -  $0.024 \mu\text{M}$  nah beieinander.

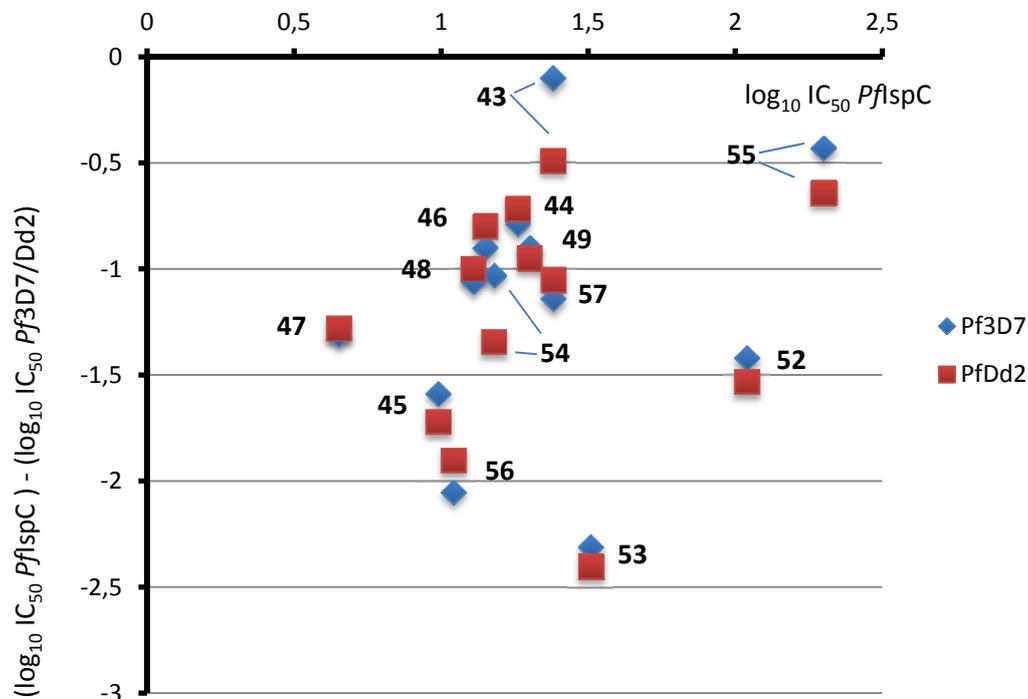
Bis auf die Verbindungen **52** ( $IC_{50}$ -Wert:  $0.11 \pm 0.02 \mu\text{M}$ ) und **55** ( $IC_{50}$ -Wert:  $0.2 \pm 0.01 \mu\text{M}$ ), die eine vergleichbare Aktivität wie Fosmidomycin ( $0.16 \pm 0.02 \mu\text{M}$ ) aufweisen, sind alle Thia-Analoga deutlich potentere Inhibitoren von *PfIspC* als Fosmidomycin selbst. Die  $IC_{50}$ -Werte dieser Analoga liegen in einem Bereich von  $0.0045 \mu\text{M}$  -  $0.032 \mu\text{M}$  und sind um den Faktor 5-36 niedriger.

### **5.1.2 Phänotypisches Screening – *in vitro*-Aktivität gegenüber den Plasmodienstämmen**

#### ***Pf3D7* und *PfDd2***

Auch hier weist die Mehrzahl der Thia-Analoga eine deutlich höhere Aktivität auf als Fosmidomycin. Am *Pf3D7*-Stamm liegt der  $IC_{50}$ -Wert des aktivsten Inhibitors **43** ( $0.03 \mu\text{M}$ ) um den Faktor 30 niedriger als bei Fosmidomycin ( $0.88 \mu\text{M}$ ). Bei der Analyse der  $IC_{50}$ -Werte fällt jedoch auf, dass diese für die Inhibition des Parasitenwachstums durchgängig größer sind als gegenüber dem isolierten Enzym. Sowohl die Thia-Analoga als auch Fosmidomycin zeigen diesen Trend. So hat Fosmidomycin im *PfIspC*-Assay einen  $IC_{50}$ -Wert von  $0.16 \mu\text{M}$  während dieser gegenüber *Pf3D7* mit  $0.88 \mu\text{M}$  und gegenüber *PfDd2* mit  $0.81 \mu\text{M}$  um den Faktor 5 größer ist. Abbildung 62 verdeutlicht die Diskrepanz der Werte beider Assaysysteme. Die Lage der Punkte in X-Richtung repräsentiert die Aktivität des Thia-Isosters im *PfIspC*-Enzymassay. Je weiter ein Punkt rechts liegt, desto weniger aktiv ist die Verbindung. Eine Verschiebung um eine Einheit in X-Richtung bedeutet, dass der  $IC_{50}$ -Wert um eine Zehnerpotenz größer wird. Die Y-Koordinate gibt das Verhältnis der  $IC_{50}$ -Werte des

Enzymassays und des Zellkulturassays einer Verbindung an. Je weiter unten der Punkt liegt, desto schwächer aktiv ist die Verbindung im Zellkulturassay. Liegt der Punkt im negativen Bereich, ist der  $IC_{50}$ -Wert des Zellkulturassays größer als der des Enzymassays.



**Abbildung 62** Enzym-inhibitorische (*PfIspC*) und antiplasmodiale Aktivitäten (*Pf3D7*, *PfDd2*). Abszisse: dekadischer Logarithmus der  $IC_{50}$ -Werte der Sulfide **43-49**, **52-57** von *PfIspC*. Ordinate: dekadischer Logarithmus des Verhältnisses zwischen den  $IC_{50}$ -Werten der Sulfide **43-49**, **52-57** von *PfIspC* und den  $IC_{50}$ -Werten der Sulfide **43-49**, **52-57** von *Pf3D7* bzw. *PfDd2*. Blaue Rauten: bezogen auf *Pf3D7*; rote Kästen: bezogen auf *PfDd2*. Die Grafik wurde in Anlehnung an die grafische Darstellung der Beziehung der biologischen Aktivitäten von den Oxa-Isosteren gegenüber *PfIspC*, *Pf3D7* und *PfDd2* aus Brücher 2012<sup>[112]</sup> erstellt.

Die  $IC_{50}$ -Wertediskrepanz beider Assaysysteme kann durch den Umstand erklärt werden, dass zum Erreichen des aktiven Zentrums von IspC im Zellkulturassay die Penetration von bis zu sieben Membranen notwendig ist. Hierbei handelt es sich um die Membran des Erythrozyten, die parasitäre Vakuole, die äußere Membran der parasitären Zelle und vier Membranen des Apikoplasten.<sup>[82, 180]</sup> Insbesondere die Tatsache, dass Phosphonohydroxamsäuren eine hohe Polarität aufweisen, kann die Membranpenetration beeinträchtigen. Eine 50 %ige Proliferationshemmung von Plasmodienstämmen kann so gegebenenfalls erst durch wesentlich höhere Inhibitorkonzentrationen erreicht werden als für eine 50 %ige Enzyminhibition benötigt werden.<sup>[107]</sup>

Darüber hinaus ist festzustellen, dass die  $IC_{50}$ -Werte der einzelnen Verbindungen am Chloroquin-sensitiven *Pf3D7*- und am multiresistenten *PfDd2*-Stamm sehr ähnlich sind. Die

Resistenzen des *PfDd2*-Stamms wurden gegenüber Substanzen ausgebildet, die sowohl andere Wirkmechanismen, andere Targets als auch andere Transportwege aufweisen als Fosmidomycin. Somit überrascht es nicht, dass dieser Stamm gegenüber Fosmidomycin-Analoga eine ähnlich hohe Sensibilität zeigt wie der nicht-resistente Stamm. Es ergeben sich für die antiplasmodiale Aktivität der einzelnen Substitutionsmuster der Inhibitoren an beiden Stämmen die gleichen Trends, diese unterscheiden sich aber teilweise von denen für die *PfIspC*-Enzym-Hemmung. So ist im Zellkulturassay die am Aromaten unsubstituierte Verbindung **43** am aktivsten, während dies in den Enzymassays die 3,4-Dichlorphenyl-substituierte Verbindung **47** ist. Diese Diskrepanzen in den Aktivitätsabstufungen können möglicherweise damit erklärt werden, dass die einzelnen Verbindungen divergierende Membranpermeabilitäten aufweisen, die nur im Zellkulturassay eine Rolle spielen. Darüber hinaus können die Substanzen unter den Bedingungen des Zellkultur- und des Enzymassays unterschiedliche Stabilitäten aufweisen (s. Einfluss der *N*- bzw.  $\alpha$ -Substitution in den folgenden Abschnitten).

#### **Einfluss des Substituenten am Hydroxamsäurestickstoff**

In Analogie zur *PfIspC*-Inhibition wird auch hier die Beobachtung gemacht, dass Inhibitoren mit *N*-Methyl-substituierter Hydroxamsäurefunktionalität über niedrigere  $IC_{50}$ -Werte und somit über eine höhere Aktivität gegenüber den Plasmodienstämmen verfügen. Dieser Effekt ist hier stärker ausgeprägt als im Enzymassay. Alle Verbindungen mit unsubstituierter Hydroxamsäurefunktion sind schwächer antiplasmodial aktiv als ihre korrespondierenden *N*-Methyl-substituierten Analoga. **57** hat gegenüber *Pf3D7* einen  $IC_{50}$ -Wert von 0.33  $\mu\text{M}$ . Die zugehörige *N*-Methyl-substituierte Hydroxamsäure **49** weist mit 0.16  $\mu\text{M}$  einen halb so großen  $IC_{50}$ -Wert auf. **43** hingegen besitzt einen  $IC_{50}$ -Wert von 0.03  $\mu\text{M}$  gegenüber *Pf3D7*. Dieser ist sogar um zwei Zehnerpotenzen niedriger als der der korrespondierenden freien Hydroxamsäure **52** (2.9  $\mu\text{M}$ ). Das Spektrum der Aktivitätssteigerung durch *N*-Methyl-Substitution reicht somit von einer kleinen Verringerung des  $IC_{50}$ -Werts um den Faktor  $\sim 2$  bis hin zu einer Erniedrigung um das 100-fache.

Neben der Tatsache, dass im Zellkulturassay auch Aspekte wie unterschiedliche Membranpermeabilitäten der einzelnen Verbindungen zum Tragen kommen (s. oben), kann hier auch eine erhöhte Hydrolyserate der nicht am Stickstoff substituierten Verbindungen unter den Bedingungen des Zellkulturassays angenommen werden. Die eigenen Erfahrungen in Synthese und Analytik unsubstituierter Hydroxamsäuren haben gezeigt, dass dieser

Verbindungstyp eine verminderte Stabilität aufweist\* (s. auch Kapitel 2.1.1). Dies kann somit zu einem Verlust des Pharmakophors durch Hydrolyse führen. *Brücher* vermutet für die Inaktivität von  $\beta$ -oxa-isosteren Fosmidomycin-Analoga mit freier Hydroxamsäurefunktionalität gegenüber Plasmodien ebenfalls eine erhöhte Instabilität dieses Verbindungstyps im Zellkulturassay<sup>[107]</sup> (s. auch Abschnitt 5.8, Tabelle 13).

### **Einfluss des Substituenten in $\alpha$ -Position**

Die 3,4-Dichlorphenyl-substituierte Verbindung **47** ist die aktivste im Enzymassay. Für die Zellkulturassays hingegen stellt die am Aromaten unsubstituierte Verbindung **43** sowohl am 3D7- als auch am Dd2-Stamm den potentesten Inhibitor dar. Die  $IC_{50}$ -Werte des Inhibitors liegen mit 0.03  $\mu$ M gegenüber *Pf3D7* und 0.075  $\mu$ M gegenüber *PfDd2* im zweistelligen nanomolaren Bereich. Die zweitaktivste Verbindung ist jedoch **47**, welche hier ebenfalls eine Aktivität im zweistelligen nanomolaren Bereich aufweist (*Pf3D7*: 0.091  $\mu$ M; *PfDd2*: 0.085  $\mu$ M). Elektronenziehende Gruppen am  $\alpha$ -Phenylring wie Halogene können die Aktivität der potentiellen Inhibitoren positiv beeinflussen. Im phänotypischen Assay können hierfür -neben den unter dem Target-basierten Screening genannten Faktoren- hauptsächlich zwei Gründe angenommen werden. Dies sind eine Erhöhung der Stabilität und eine Erhöhung der Lipophilie. Elektronenziehende Substituenten können an aromatischen Systemen zu einer Erhöhung der (metabolischen) Stabilität der betreffenden Substanz führen, da Oxidationsprozesse durch den Elektronenzug erschwert werden. Die Erhöhung der Lipophilie durch Halogensubstituenten sollte primär die Aktivität im Zellkulturassay beeinflussen, da hier die Penetration von Membranen für die Wirkung essenziell ist. Jedoch scheinen elektronische und sterische Effekte keinen so großen Einfluss auf die Aktivität zu haben, was auch auf die *PfIspC*-Inhibition zutrifft. Die Tatsache, dass im *PfIspC*-Assay das Substitutionsmuster des Aromaten einen geringeren Einfluss auf die Aktivität der Verbindung hat, spiegelt sich hier wieder. Im Enzymassay liegen, mit Ausnahme der aktivsten Verbindung, alle  $IC_{50}$ -Werte im hohen einstelligen und niedrigen zweistelligen nanomolaren Bereich. Im Zellkulturassay weist die Mehrzahl der Substanzen Werte im zwei- bis dreistelligen nanomolaren Bereich auf (s. Tabelle 7). Somit liegen auch hier die  $IC_{50}$ -Werte der einzelnen Verbindungen nah beieinander. Bezogen auf die *N*-Methyl-substituierten Hydroxamsäuren stellt die im Enzymassay zweitaktivste Verbindung **45** hier

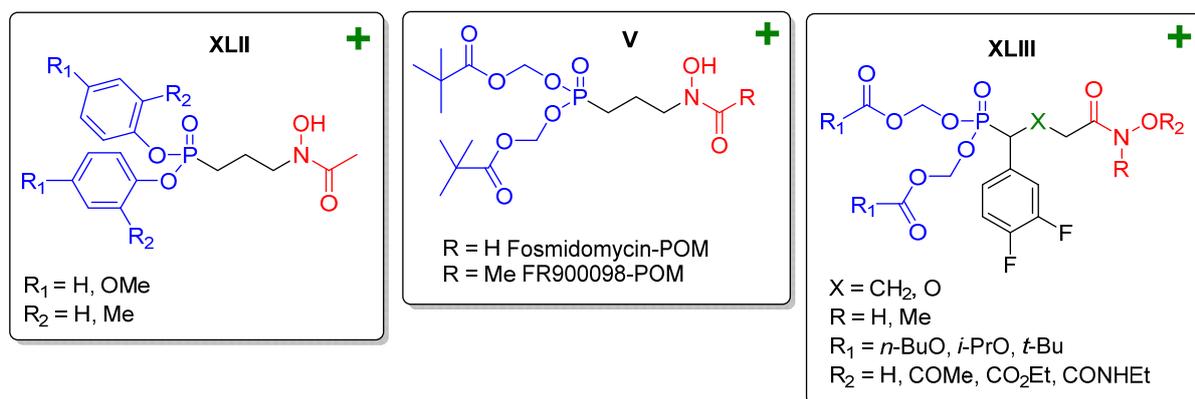
---

\*Gegenüber Methanol, Wasser und Aceton haben sich einige unsubstituierte Hydroxamsäuren als instabil erwiesen. Methanol und Wasser führen zum Verlust der Hydroxamsäurefunktionalität. Während durch Wasser die Hydrolyse zur Carbonsäure erfolgt, entsteht durch Methanol der Carbonsäuremethylester. Aceton maskiert die freie Hydroxamsäurefunktionalität als Acetonid.

interessanterweise mit 0.38  $\mu\text{M}$  (*Pf3D7*) bzw. 0.51  $\mu\text{M}$  (*PfDd2*) den schwächsten Inhibitor dar.

### Evaluation von 18 als Prodrug

Es wurden zahlreiche unterschiedliche Prodrugtypen von Fosmidomycin und seinen Analoga entwickelt (s. auch Kapitel 1.4.1).<sup>[100, 112, 190-192]</sup> Neben Acyloxyalkylestern und Alkyloxycarbonyloxyalkylestern wurden auch einfache Ester wie Arylester erfolgreich zur Generierung von Prodrugs eingesetzt<sup>[192]</sup> (s. Abbildung 63).

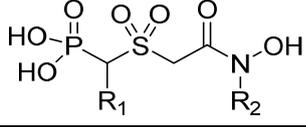


**Abbildung 63** Auswahl unterschiedlicher Prodrugtypen von Fosmidomycin und dessen Analoga.<sup>[100, 192]</sup>

Das an Phosphon- und Hydroxamsäure als *tert*-Butylester vorliegende Analogon **18** wurde ursprünglich zur Racematspaltung entwickelt (s. Kapitel 2.1.2). Im Rahmen der biologischen Evaluation sollte **18** auf seine Eignung als Prodrug für Verbindung **46** getestet werden. Im Target-basierten Assay zeigt die Substanz erwartungsgemäß keinerlei Inhibition von *Pf*IsPC. Da es sich bei diesem Assay um eine direkte Umsetzung mit dem Enzym handelt, kann Substanz **46** beispielsweise durch das Fehlen von Esterasen nicht aus Verbindung **18** freigesetzt werden. Eine Derivatisierung der Phosphon- und Hydroxamsäuregruppe führt zu Inaktivität, da für die Enzymbindung eine freie Phosphonsäuregruppe essenziell ist und für die inhibitorische Wirkung eine Metallion-chelatisierende Einheit (s. Kapitel 1). Allerdings ist **18** nicht nur im Enzym-, sondern auch im Zellkulturassay inaktiv. Während die Inaktivität am isolierten Enzym erklärbar ist, deutet die fehlende antiplasmodiale Aktivität darauf hin, dass die Estergruppen weder von erythrozytären noch von parasitären Enzymen hydrolysiert werden können. Andere Prodrugtypen von Fosmidomycin und Analoga weisen im Zellkulturassay eine höhere Aktivität im Vergleich zur Muttersubstanz auf.<sup>[112, 190-191]</sup> **18** ist somit als Prodrug ungeeignet.

## 5.2 PfIspC-inhibitorische und antiplasmodiale Aktivität der $\beta$ -thia-isosteren Fosmidomycin-Analoga mit Sulfonpartialstruktur

In Tabelle 9 sind die  $IC_{50}$ -Werte für die Inhibition von PfIspC und für die Wachstumshemmung der Plasmodienstämme Pf3D7 und PfDd2 durch die Verbindungen mit Sulfonpartialstruktur (**58-65**) dargestellt.

<b>Verbindung</b> 	<u>PfIspC <math>IC_{50}</math> (<math>\mu</math>M)</u> <sup>[a]</sup>	<u>Pf3D7 <math>IC_{50}</math> (<math>\mu</math>M)</u> <sup>[b]</sup>	<u>PfDd2 <math>IC_{50}</math> (<math>\mu</math>M)</u> <sup>[b]</sup>
<b>R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub></b>			
<b>58:</b> R <sub>1</sub> = Ph	7.6 ± 0.7	>111	>111
<b>59:</b> R <sub>1</sub> = 4-CH <sub>3</sub> -Ph	8.5 ± 0.9	>100	n.b.
<b>60:</b> R <sub>1</sub> = 1-Naphthyl	823 ± 164	>100	n.b.
<b>61:</b> R <sub>1</sub> = 3,4-Cl-Ph	1 ± 0.2	>100	n.b.
<b>62:</b> R <sub>1</sub> = 3,5-F-Ph	5.5 ± 0.3	18.79	n.b.
<b>63:</b> R <sub>1</sub> = 3,5-OCH <sub>3</sub> -Ph	3.7 ± 0.6	>100	n.b.
<b>R<sub>2</sub> = H</b>			
<b>64:</b> R <sub>1</sub> = 4-CH <sub>3</sub> -Ph	65 ± 9	>100	n.b.
<b>65:</b> R <sub>1</sub> = 3,5-OCH <sub>3</sub> -Ph	0.22 ± 0.03	2.71	n.b.
<b>Fosmidomycin</b>			
	0.16 ± 0.02 <sup>[c]</sup>	0.88 <sup>[c]</sup>	0.81 <sup>[c]</sup>

**Tabelle 9** [a] Enzymassay. Mittelwerte ± Standardabweichung aus 8-10 Messpunkten; [b] Zellkulturassay. Mittelwert aus zwei unabhängigen Doppelbestimmungen; [c] Wert entsprechend Referenz<sup>[112]</sup>; n.b. = nicht bestimmt.

### Target-basiertes und phänotypisches Screening - in vitro-Aktivität gegenüber dem Enzym PfIspC und den Plasmodienstämmen Pf3D7 und PfDd2

Anhand der  $IC_{50}$ -Werte wird ersichtlich, dass die Oxidation der Sulfide zu den entsprechenden Sulfonen einen ausgesprochenen Verlust an inhibitorischer Aktivität gegenüber dem Enzym zur Folge hat. Während die  $IC_{50}$ -Werte der Sulfide fast ausschließlich im nanomolaren Bereich liegen, befinden sich die Werte der analogen Sulfone hingegen im ein- bis dreistelligen mikromolaren Bereich. Dies entspricht in den meisten Fällen einer mehreren hundert- bis mehreren tausendfachen Reduktion der Aktivität. So zeigt **45** durch die Oxidation zum korrespondierenden Sulfon **60** mit einer Steigerung des  $IC_{50}$ -Werts von 0.0098 ± 0.0009  $\mu$ M auf 823 ± 164  $\mu$ M den höchsten Aktivitätsverlust. Nur Verbindung **65** (0.22 ±

0.03  $\mu\text{M}$ ) zeigt noch eine moderate Aktivität gegenüber *PfIspC*, die mit der von Fosmidomycin ( $0.16 \pm 0.02 \mu\text{M}$ ) vergleichbar ist. Diese Verbindung besitzt allerdings trotzdem einen um eine Zehnerpotenz höheren  $\text{IC}_{50}$ -Wert als ihr korrespondierendes Sulfid **57**, welches einen  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $0.024 \pm 0.004 \mu\text{M}$  aufweist. Der sich schon im Enzymassay abzeichnende Aktivitätsverlust durch die Oxidation der Sulfide zu den korrespondierenden Sulfonen ist im Zellkulturassay noch viel deutlicher ausgeprägt. Mit Ausnahme der zwei Verbindungen **62** und **65** sind alle Sulfone gegenüber *Pf3D7* inaktiv. Im Einklang mit den Ergebnissen des Enzymassays ist die gegenüber *PfIspC* aktivste Substanz **65** auch hier der potenteste Inhibitor. Allerdings weist **65** gegenüber *PfIspC* eine mit Fosmidomycin vergleichbare Aktivität auf (s. oben), während der  $\text{IC}_{50}$ -Wert hier mit  $2.71 \mu\text{M}$  denjenigen Fosmidomycins um das dreifache übersteigt. Die zweite antiplasmodial schwach aktive Verbindung **62** besitzt einen um den Faktor 7 höheren  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $18.79 \mu\text{M}$ . Die Sulfone **62** und **65** zeichnen sich durch eine 3,5-Substitution am Aromaten aus, wobei **65** Dimethoxy- und **62** Difluor-substituiert ist. Aufgrund der niedrigen Aktivität bzw. Inaktivität dieses Verbindungstyps wurde auf eine weitere Bestimmung der  $\text{IC}_{50}$ -Werte gegenüber dem multiresistenten *PfDd2*-Stamm verzichtet.

Eine Dockingstudie des Sulfons **58** an *PfIspC*<sup>\*</sup> hat gezeigt, dass die Entfernung zwischen der Hydroxylgruppe von Serin 306 und den Sauerstoffatomen der Sulfonfunktion des Liganden  $1.99 \text{ \AA}$  beträgt. Eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen den beiden Strukturen wäre somit möglich. Eine solche Interaktion würde das Sulfonmolekül als Liganden am Enzym stabilisieren und müsste zu einer guten inhibitorischen Aktivität führen. Dies steht im Widerspruch zu der experimentell ermittelten inhibitorischen Aktivität. Auch von *Brücher et al.* wurden in Dockingversuchen die mögliche Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zwischen Serin 306 und dem  $\beta$ -Sauerstoff-Atom der Oxa-Isostere vorausgesagt,<sup>[107, 112]</sup> welche ebenfalls zu einer erhöhten Stabilisierung des Liganden am Enzym und somit zu einer erhöhten inhibitorischen Potenz führen sollte. Kristallstrukturanalysen und die geringere biologische Aktivität der Oxa-Isostere verglichen mit den Carba-Isosteren konnten diese jedoch nicht bestätigen<sup>[101, 107, 112]</sup> (s. auch Abschnitt 5.8).

Da die Sulfone insbesondere im Zellkulturassay sehr schwach aktiv bis inaktiv sind, liegt die Vermutung nahe, dass eine erhöhte Instabilität dieses Verbindungstyps hierfür verantwortlich ist. Durch die Einführung der stark elektronenziehenden Sulfonfunktion in das

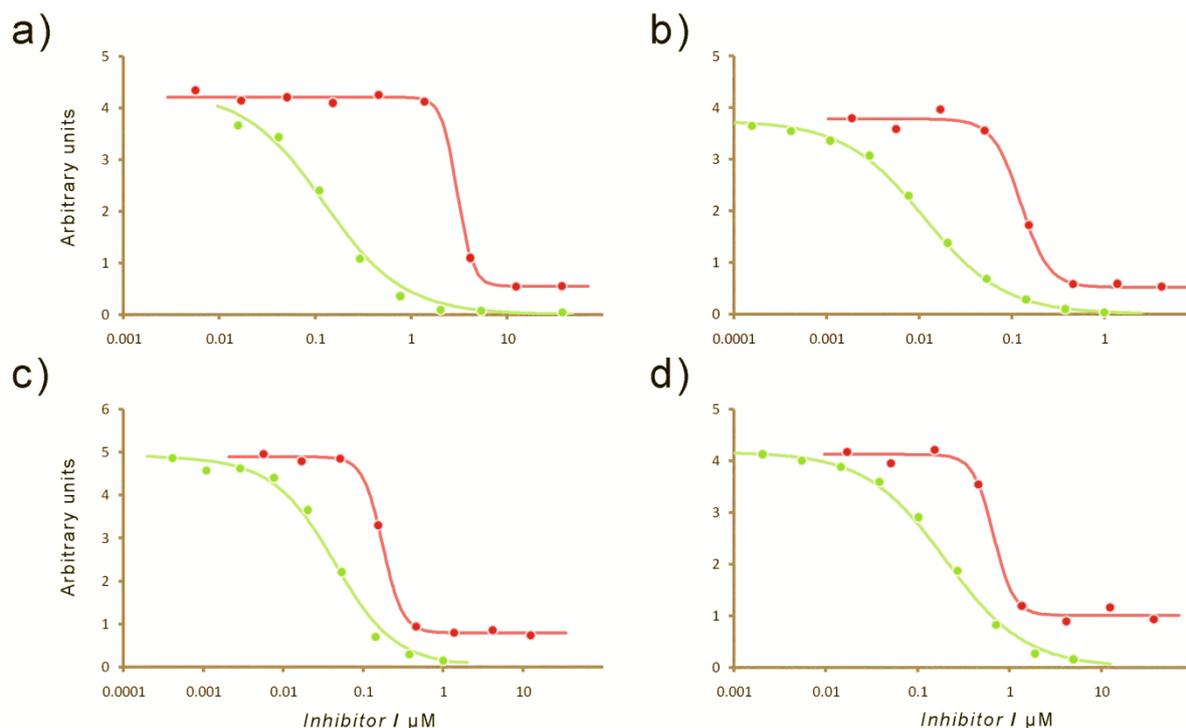
---

\*Durchgeführt von *Leandro Avelar* (Universität Düsseldorf) mit Hilfe des Programms Autodock 4.2 und der *PfIspC*-Kristallstruktur 4KP7 (PDB-Code).

Molekül könnte dieses eine erhöhte Instabilität aufweisen, die möglicherweise Hydrolysereaktionen begünstigen und somit zu einer Zersetzung des potenziellen Inhibitors führen kann. Diese Gefahr besteht besonders im Zellkulturassay.

### 5.3 Kinetik und Inhibitionsmodus

Abbildung 64 zeigt exemplarisch die Daten für die Enzyminhibition von *PfIspC* und die Proliferationsinhibition von *P. falciparum* durch die vier Verbindungen **52**, **46**, **54** und **55**.



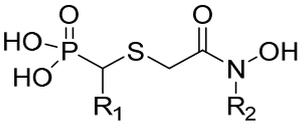
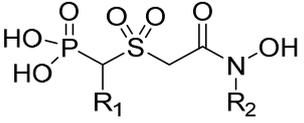
**Abbildung 64** Daten für die Inhibition von *PfIspC* und die Wachstumsinhibition des Stammes *Pf3D7* durch vier Testsubstanzen. a) **52**; b) **46**; c) **54**; d) **55**. Grün: IspC-Reaktionsgeschwindigkeit gegen Inhibitorkonzentration; Rot: Plasmodiumproliferation gegen Inhibitorkonzentration (übernommen aus *Kunfermann, Lienau 2013*<sup>[180]</sup>, Supporting Information).

Die kinetischen Daten der Enzyminhibition (grüne Kurven) entsprechen dem Modell einer kompetitiven Hemmung.<sup>[180]</sup> Die Reaktionsgeschwindigkeit sinkt sanft über einem Intervall von mehr als zwei Zehnerpotenzen der Inhibitorkonzentration ab.<sup>[180]</sup> Auch die in der Kristallstruktur offengelegten Bindungsmodi zwischen Enzym und Inhibitor sprechen für eine kompetitive Hemmung der Analoga gegenüber dem Substrat DOXP an *PfIspC*. Zudem haben kinetische Untersuchungen von *Behrendt et al.* an den Carba-Analoga **XLII-43C** und **XLII-52C** ergeben, dass für diese ein kompetitiver Inhibitionsmechanismus gegenüber *PfIspC* vorliegt.<sup>[102, 113]</sup> Da die Thia-Analoga eine hohe strukturelle Verwandtschaft zu diesem Isostertyp aufweisen, kann für diese ebenfalls eine kompetitive Hemmung angenommen werden.

Die Konzentrations-Effekt-Kurven für die Proliferationshemmung des Plasmodienstamms (rote Kurven) zeigen einen viel steileren Abfall.<sup>[180]</sup> Das Absinken erstreckt sich über ein sehr enges Konzentrationsintervall des Inhibitors, meist über weniger als eine halbe Zehnerpotenz.<sup>[180]</sup> Ein steiler Abfall der Konzentrations-Effekt-Kurve ist für einen potentiellen therapeutischen Effekt vorteilhaft, da bei einer Therapie eine vollständige Suppression des Parasitenwachstums erreicht werden soll.<sup>[193]</sup>

#### **5.4 Evaluation der Zytotoxizität – *in vitro*-Untersuchung an HeLa-Zellen**

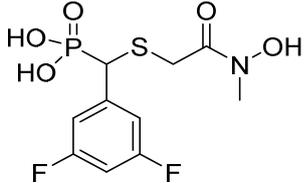
Um zu evaluieren, ob die  $\beta$ -thia-isosteren Fosmidomycin-Analoga gegenüber Säugetierzellen zytotoxisch wirken, wurden ausgewählte Substanzen unterschiedlicher Verbindungstypen auf eine Wachstumsinhibition von humanen Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (HeLa-Zellen) untersucht (für Details zur Durchführung s. Abschnitt 8.4.3). Die IC<sub>50</sub>-Werte aller Derivate zeigen, dass keine Zytotoxizität vorliegt (s. Tabelle 10). Dieser Befund stimmt mit den Ergebnissen der Zytotoxizitätsuntersuchungen der anderen Analogtypen überein. Carba- und Oxa-Isostere sowie deren Prodrugs zeigten gegenüber HeLa-Zellen ebenfalls keine Zytotoxizität.<sup>[100]</sup>

<b><u>Verbindung</u></b>	<b><u>HeLa IC<sub>50</sub> (<math>\mu</math>M)</u></b> <sup>[a]</sup>
	
<b>48:</b> R <sub>1</sub> = 3,5-F-Ph, R <sub>2</sub> = CH <sub>3</sub>	> 1000
<b>49:</b> R <sub>1</sub> = 3,5-OCH <sub>3</sub> -Ph, R <sub>2</sub> = CH <sub>3</sub>	> 1000
<b>51:</b> R <sub>1</sub> = H, R <sub>2</sub> = CH <sub>2</sub> -Ph	> 1000
<b>57:</b> R <sub>1</sub> = 3,5-OCH <sub>3</sub> -Ph, R <sub>2</sub> = H	> 1000
	
<b>59:</b> R <sub>1</sub> = 4-CH <sub>3</sub> -Ph, R <sub>2</sub> = CH <sub>3</sub>	> 50
<b>65:</b> R <sub>1</sub> = 3,5-OCH <sub>3</sub> -Ph, R <sub>2</sub> = H	> 500

**Tabelle 10** Ergebnisse der Zytotoxizitätsuntersuchungen an HeLa-Zellen. [a] Mittelwert aus zwei unabhängigen Doppelbestimmungen.

## 5.5 Untersuchung der antiplasmodialen *in vivo*-Aktivität an mit *P. berghei* infizierten Mäusen

Da für Verbindung **48** nachgewiesen worden war, dass sie gegenüber HeLa-Zellen nicht zytotoxisch ist und dass sie eine gute antiplasmodiale Aktivität aufweist (*Pf3D7*: IC<sub>50</sub> = 0.15 µM; *PfDd2*: IC<sub>50</sub> = 0.13 µM), wurde sie in einem Standard-Peters-Test auf ihre antiplasmodiale *in vivo*-Aktivität untersucht.<sup>[60]</sup> Hierzu wurde 3 mit *P. berghei* infizierten Mäusen\* über 4 Tage intravenös eine Lösung appliziert, die 50 mg/kg Körpergewicht Testsubstanz (**48**) enthielt. Die Applikation erfolgte 4 h, 24 h, 48 h und 72 h nach der Infektion. Das Blut für die Bestimmung der Parasitämie wurde 96 h (Tag 4) nach der Infektion abgenommen. Ohne Behandlung tritt der Tod gewöhnlich nach 6 Tagen ein. Um den Versuchstieren unnötiges Leiden zu ersparen, wurden die Mäuse der Kontrollgruppe nach vier Tagen getötet (Näheres zur Versuchsdurchführung s. Abschnitt 8.4.4). Die Ergebnisse des Tests werden in Tabelle 11 gezeigt. Verbindung **48** führte zu einer Reduktion der Parasitämie (= Aktivität) um 74 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Auch die mittlere Überlebenszeit der behandelten Tiere lag mit 7.7 Tagen höher als die der unbehandelten Mäuse. Trotz dieser antiplasmodialen *in vivo*-Aktivität führte die Behandlung mit **48** nicht zu einer Heilung.

<u>Verbindung</u>	<u>Mit Parasiten befallene Erythrozyten (%)</u> <sup>[a]</sup>	<u>Aktivität (%)</u> <sup>[b]</sup>	<u>Überlebenszeit (in Tagen)</u>
<b>48:</b> 	15	74	7.7
Kontrollgruppe	58	0	4.0

**Tabelle 11** Ergebnisse des Standard-Peters-Tests zur Evaluation der antiplasmodialen *in vivo*-Aktivität. Testsubstanz **48** wurde *i.v.* appliziert (Näheres siehe Text und Abschnitt 8.4.4); [a] Blut für die Bestimmung der Parasitämie wurde an Tag 4 (96 h nach der Infektion) abgenommen; [b] Aktivität = Reduktion der Parasitämie = [(Parasitämie der Kontrollgruppe) - (Parasitämie der behandelten Gruppe)] / (Parasitämie der Kontrollgruppe).

Die niedrige *in vivo*-Aktivität von Verbindung **48** steht im Gegensatz zu der hohen antiplasmodialen Potenz *in vitro*, die sowohl gegenüber dem Enzym *PfIspC* als auch den Plasmodienstämmen *Pf3D7* und *PfDd2* größer ist als bei Fosmidomycin. Fosmidomycin jedoch kann im Säugetierorganismus Malaria heilen und wurde in einigen klinischen Studien

\*Humanpathogene Plasmodienarten können bei Mäusen keine Malaria auslösen, deswegen erfolgt die Infektion durch *P. berghei* (nagerpathogen).

der Phase II erfolgreich zur Behandlung von Malaria eingesetzt (s. Abschnitt 1.3). Theoretisch könnten Unterschiede in der Struktur von *PfIspC* und *P. berghei* IspC für die geringere Aktivität von **48** *in vivo* verantwortlich sein. Dies wurde auch von *Brücher et al.*<sup>[100]</sup> für die geringe *in vivo*-Aktivität von einigen Carba-Analoga und deren Prodrugs angenommen\*. Um Speziesunterschiede auszuschließen, wurden die Testsubstanzen von den Autoren in einem anderen Mausmodell untersucht. Hierzu wurden SCID<sup>†</sup> Mäuse, in deren Organismus sich humane, mit *P. falciparum* infizierte Erythrozyten befinden, verwendet. Allerdings zeigte sich auch bei diesem Tierversuch, dass die *in vivo*-Aktivität des getesteten Carba-Analogotyps gering war.<sup>[100]</sup> Wenn man basierend auf diesen Untersuchungsergebnissen auch für die Thia-Analoga annimmt, dass strukturelle Unterschiede in den Spezies nicht der Grund für die Diskrepanz zwischen *in vitro*- und *in vivo*-Aktivität sind, ist für die geringere antiplasmodiale Aktivität möglicherweise der „chemische“ bzw. „metabolische“ Abbau der Testsubstanz *in vivo* verantwortlich. So kann ein Verlust der Hydroxamsäurefunktionalität durch Hydrolyse und damit die Konversion zur Carbonsäure eintreten. Wie in Abschnitt 1.4.2 erläutert, führt ein Austausch der Hydroxamsäurefunktionalität gegen eine Carbonsäuregruppe zum Verlust der antiplasmodialen Aktivität der Testsubstanz.<sup>[102]</sup> Die Entstehung von Carbonsäuren wurde auch von *Brücher et al.* als Grund für die niedrige *in vivo*-Aktivität der Carba-Analoga postuliert.<sup>[100]</sup>

Die geringere Aktivität der Testverbindungen im *in vitro*-Zellkulturassay und *in vivo* lässt sich möglicherweise neben der Stabilität auf die ungenügende Membranpermeabilität zurückführen, da die Inhibitoren aufgrund der Dissoziation eine hohe Polarität aufweisen. *In vivo* können darüber hinaus noch weitere pharmakokinetische Parameter von Bedeutung sein.

## **5.6 Inhibitorische Aktivität gegenüber nicht-plasmodialen IspC-Enzymen**

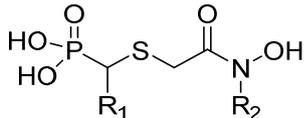
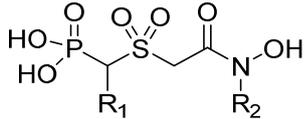
### **Target-basiertes Screening - *in vitro*-Aktivität gegenüber den Enzymen *Ec*- und *MtIspC***

Das Enzym IspC und mit ihm der Mevalonat-unabhängige Biosyntheseweg sind für andere pathogene Mikroorganismen wie *Mycobacterium tuberculosis* und *Escherichia coli* ebenfalls essenziell (s. Abschnitt 1.3). Ein Target-basiertes Screening an *Escherichia coli* IspC (*EcIspC*) und *Mycobacterium tuberculosis* IspC (*MtIspC*) sollte zeigen, ob die  $\beta$ -thia-isosteren Fosmidomycin-Analoga über die *PfIspC*-hemmende und antiplasmodiale Aktivität hinaus auch eine inhibitorische Potenz gegenüber den Enzymen dieser Spezies aufweisen (s. Tabelle 12).

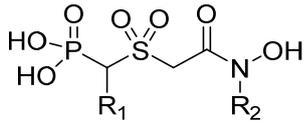
---

\**P. berghei* IspC ist für *in vitro*-Untersuchungen nicht verfügbar<sup>[101]</sup>.

†SCID = Severe Combined Immunodeficiency

<b>Verbindung</b> 	<b><u>EcIspC IC<sub>50</sub> (µM)</u></b>	<b><u>MtIspC IC<sub>50</sub> (µM)</u></b>	<b><u>PfIspC IC<sub>50</sub> (µM)</u></b>
<b>R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub></b>			
<b>43:</b> R <sub>1</sub> = Ph	0.0082 ± 0.0008 <sup>[a]</sup>	0.28 ± 0.030 <sup>[a]</sup>	0.024 ± 0.002 <sup>[a]</sup>
<b>44:</b> R <sub>1</sub> = 4-CH <sub>3</sub> -Ph	0.033 ± 0.009 <sup>[a]</sup>	0.11 ± 0.01 <sup>[a]</sup>	0.018 ± 0.004 <sup>[a]</sup>
<b>45:</b> R <sub>1</sub> = 1-Naphthyl	0.14 ± 0.01 <sup>[a]</sup>	0.55 ± 0.01 <sup>[a]</sup>	0.0098 ± 0.0009 <sup>[a]</sup>
<b>46:</b> R <sub>1</sub> = 3,4-F-Ph	0.0085 ± 0.001 <sup>[a]</sup>	0.042 ± 0.002 <sup>[a]</sup>	0.014 ± 0.001 <sup>[a]</sup>
<b>47:</b> R <sub>1</sub> = 3,4-Cl-Ph	0.0059 ± 0.0006 <sup>[a]</sup>	0.0092 ± 0.0006 <sup>[a]</sup>	0.0045 ± 0.0004 <sup>[a]</sup>
<b>48:</b> R <sub>1</sub> = 3,5-F-Ph	0.018 ± 0.003	0.11 ± 0.01	0.013 ± 0.004
<b>49:</b> R <sub>1</sub> = 3,5-OCH <sub>3</sub> -Ph	0.16 ± 0.03	4.4 ± 0.2	0.02 ± 0.004
<b>50:</b> R <sub>1</sub> = 4-SCH <sub>3</sub> -Ph	0.022 ± 0.005	0.1 ± 0.02	0.029 ± 0.008
<b>R<sub>2</sub> = CH<sub>2</sub>Ph</b>			
<b>51:</b> R <sub>1</sub> = H	0.74 ± 0.04	7 ± 1.2	0.96 ± 0.08
<b>R<sub>2</sub> = H</b>			
<b>52:</b> R <sub>1</sub> = Ph	0.6 ± 0.09 <sup>[a]</sup>	15 ± 1 <sup>[a]</sup>	0.11 ± 0.02 <sup>[a]</sup>
<b>53:</b> R <sub>1</sub> = 4-CH <sub>3</sub> -Ph	0.29 ± 0.02	8.2 ± 0.5	0.032 ± 0.006
<b>54:</b> R <sub>1</sub> = 3,4-F-Ph	0.077 ± 0.006 <sup>[a]</sup>	1.70 ± 0.1 <sup>[a]</sup>	0.015 ± 0.002 <sup>[a]</sup>
<b>55:</b> R <sub>1</sub> = 3,4-Cl-Ph	0.044 ± 0.002 <sup>[a]</sup>	0.72 ± 0.05 <sup>[a]</sup>	0.2 ± 0.01 <sup>[a]</sup>
<b>56:</b> R <sub>1</sub> = 3,5-F-Ph	0.013 ± 0.001	0.32 ± 0.03	0.011 ± 0.002
<b>57:</b> R <sub>1</sub> = 3,5-OCH <sub>3</sub> -Ph	0.68 ± 0.13	44 ± 4	0.024 ± 0.004
<b>Verbindung</b> 	<b><u>EcIspC IC<sub>50</sub> (µM)</u></b>	<b><u>MtIspC IC<sub>50</sub> (µM)</u></b>	<b><u>PfIspC IC<sub>50</sub> (µM)</u></b>
<b>R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub></b>			
<b>58:</b> R <sub>1</sub> = Ph	36 ± 2	115 ± 6	7.6 ± 0.7
<b>59:</b> R <sub>1</sub> = 4-CH <sub>3</sub> -Ph	36 ± 3	143 ± 23	8.5 ± 0.9
<b>60:</b> R <sub>1</sub> = 1-Naphthyl	15 ± 0	621 ± 83	823 ± 164
<b>61:</b> R <sub>1</sub> = 3,4-Cl-Ph	11 ± 1	21 ± 1	1 ± 0.2
<b>62:</b> R <sub>1</sub> = 3,5-F-Ph	4.3 ± 0.3	44 ± 4	5.5 ± 0.3
<b>63:</b> R <sub>1</sub> = 3,5-OCH <sub>3</sub> -Ph	80 ± 5	>1000	3.7 ± 0.6

**Tabelle 12** Enzymassay (Fortsetzung auf Seite 106). Mittelwerte ± Standardabweichung aus 8-10 Messpunkten; [a] Wert veröffentlicht in *Kunfermann, Lienau 2013*<sup>[180]</sup>.

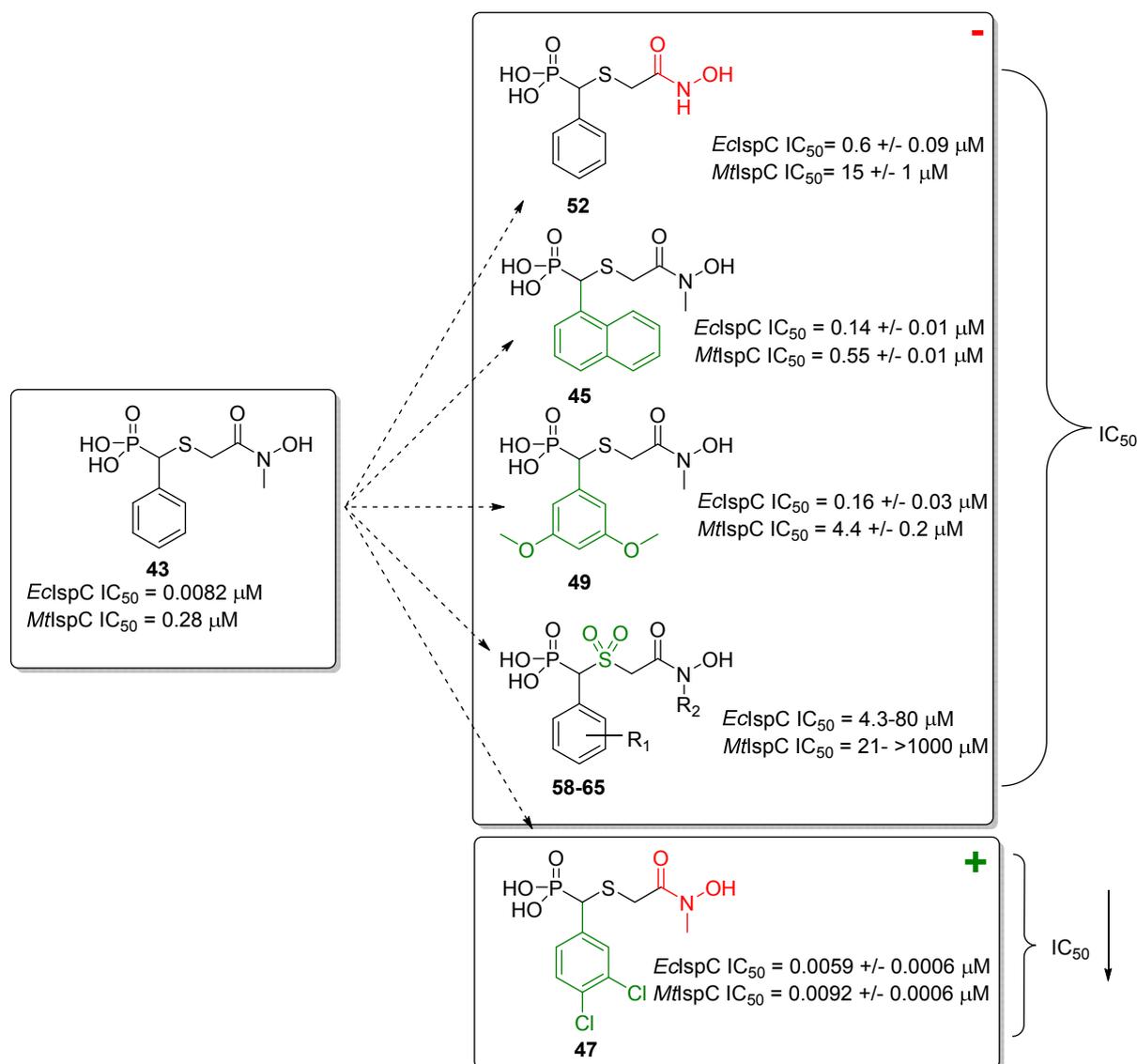
<b>Verbindung</b> 	<u><i>EcIspC</i> IC<sub>50</sub> (μM)</u>	<u><i>MtIspC</i> IC<sub>50</sub> (μM)</u>	<u><i>PfIspC</i> IC<sub>50</sub> (μM)</u>
<b>R<sub>2</sub> = H</b>			
<b>64:</b> R <sub>1</sub> = 4-CH <sub>3</sub> -Ph	64 ± 7	>1000	65 ± 9
<b>65:</b> R <sub>1</sub> = 3,5-OCH <sub>3</sub> -Ph	4.5 +/- 0.3	194 +/- 12	0.22 +/- 0.03
<b>Fosmidomycin</b>			
	0.221 ± 0.0144 <sup>[b]</sup>	0.23 ± 0.02	0.16 ± 0.02 <sup>[c]</sup>

**Tabelle 12** Enzymassay (Fortsetzung von Seite 105). Mittelwerte ± Standardabweichung aus 8-10 Messpunkten; n.b. = nicht bestimmt; [a] Wert veröffentlicht in *Kunfermann, Lienau* 2013<sup>[180]</sup>; [b] Wert entsprechend Referenz<sup>[102]</sup>; [c] Wert entsprechend Referenz<sup>[112]</sup>.

Eine hohe inhibitorische Aktivität der Testverbindungen gegenüber den bakteriellen Enzymen kann ein Hinweis auf mögliche antibakterielle Eigenschaften des neuen Analogotyps bezüglich *E. coli* und *M. tuberculosis* sein. Die Mehrzahl der Thia-Analoga mit Sulfidpartialstruktur ist gegenüber *EcIspC* deutlich inhibitorisch aktiver als Fosmidomycin. Die aktivste Verbindung (**47**) zeigt mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 0.0059 ± 0.0006 μM eine 37-mal höhere Aktivität als dieses (IC<sub>50</sub>-Wert = 0.221 ± 0.0144 μM). Gegenüber *MtIspC* ist etwa ein Drittel der Thia-Analoga (Sulfidpartialstruktur) aktiver als Fosmidomycin (IC<sub>50</sub>-Wert von 0.23 ± 0.02 μM). Auch hier stellt **47** die aktivste Verbindung dar. Es ist mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 0.0092 ± 0.0006 μM 25-mal aktiver als Fosmidomycin. Für die Struktur-Aktivitätsbeziehungen der Thia-Analoga gegenüber den bakteriellen Enzymen können drei zentrale Beobachtungen gemacht werden (s. auch Abbildung 65).

Für die Mehrzahl der Verbindungen gilt, dass eine *N*-Methyl-Substitution der Hydroxamsäurefunktionalität und elektronenziehende Substituenten am Aromaten zur Aktivitätssteigerung führen. So zeigt in Übereinstimmung mit dem *PfIspC*-Assay auch hier die 3,4-Dichlorphenyl- und *N*-Methyl-substituierte Hydroxamsäure **47** die stärkste Enzyminhibition (s. oben). Die aktivitätssteigernde Wirkung durch *N*-Methyl-Substitution der Hydroxamsäurefunktionalität wird bei *MtIspC*- und *EcIspC*-Inhibition besonders deutlich. Dieser Effekt ist bei *PfIspC*-Inhibition weniger stark ausgeprägt. Die Bestimmung der *IspC*-hemmenden Aktivität erfolgt durch Enzymassays, bei denen die Einflüsse von anderen bakteriellen bzw. plasmodialen Strukturen wie Zellwandaufbau und Eigenschaften wie Membrangängigkeit keine Rolle spielen. Es könnten noch zusätzliche Wechselwirkungen von *Ec*- und *MtIspC* mit der *N*-Methylgruppe eine Rolle spielen, die bei *PfIspC* nicht auftreten. Allerdings konnten *Behrendt et al.* anhand der Kristallstruktur des Carba-Analogons **XLII-46C** im Komplex mit *EcIspC* zeigen, dass die *N*-Methyl-Gruppe von **XLII-46C** keine

Wechselwirkungen mit dem Enzym, sondern intramolekulare *Van-der-Waals*-Interaktionen einget<sup>[114]</sup> (s. Kapitel 4).



**Abbildung 65** Variationen des Substitutionsmusters von **43** und deren Einfluss auf die inhibitorische Aktivität gegenüber *EclspC* und *MtlspC*.

Voluminöse Reste in  $\alpha$ -Position und die Oxidation zu Sulfoxonen hingegen führen zur Aktivitätsminderung bis hin zur Inaktivität. Dies kann sowohl für 1-Naphthyl- als auch für 3,5-Dimethoxyphenyl- substituierte Hydroxamsäuren beobachtet werden. Besonders Verbindung **57** (3,5-Dimethoxyphenyl-substituiert und mit freier Hydroxamsäuregruppe) weist mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von  $44 \pm 4 \mu\text{M}$  an *MtlspC* einen hohen Aktivitätsverlust auf. Sterisch anspruchsvolle Reste in 3,5-Position des Aromaten werden somit von den bakteriellen Enzymen deutlich schlechter toleriert als von dem plasmodialen Enzym. Ebenso sind unterschiedliche Beeinträchtigungen intramolekularer Wechselwirkungen durch die voluminösen Reste in  $\alpha$ -Position denkbar. Von diesen Interaktionen wurde gezeigt, dass sie

für Inhibitoren an *EcIspC* eine große Rolle spielen (s. oben und Kapitel 4).

Im Vergleich zur *PfIspC*-Inhibition lassen sich somit zusammenfassend zwei Feststellungen machen. *N*-Methyl-Substitution führt bei deutlich mehr Verbindungen zur Aktivitätssteigerung. Wenn eine Aktivitätssteigerung vorliegt, ist diese zudem deutlich stärker ausgeprägt ist als bei der *PfIspC*-Inhibition. Das Substitutionsmuster des Aromaten in  $\alpha$ -Position hat ebenfalls einen viel größeren Einfluss auf das inhibitorische Potenzial als dies bei *PfIspC*-Inhibition der Fall ist.

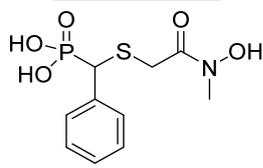
Diese Enzym-inhibitorischen Eigenschaften gegenüber *Ec*- und *MtIspC* geben einen ersten Hinweis darauf, dass die Thia-Analoga auch antibakteriell wirksam sein könnten. Nur durch ein phänotypisches Screening an den Organismen selbst kann dies verifiziert werden. Allerdings ist von Fosmidomycin bekannt, dass es zwar *MtIspC* hemmt, aber nicht zu einer Wachstumsinhibition von Mycobakterien führt.<sup>[194-195]</sup> Der sehr hydrophile Wirkstoff kann die mycobakterielle Zellwand nicht durchdringen und da es auch kein aktives Transportsystem für Fosmidomycin gibt, wird dieses nicht in die Zelle aufgenommen.<sup>[196-197]</sup> Im Gegensatz hierzu kann Fosmidomycin mittels eines Glycerol-3-phosphat-Transporters durch die Zellmembran ins Zytosol von *E. coli* gelangen<sup>[198]</sup> und die Behandlung mit Fosmidomycin führt zu einer Wachstumsinhibition von *E. coli*-Stämmen<sup>[124]</sup>. Mit *P. falciparum* infizierte Erythrozyten wiederum weisen sogenannte *new permeability pathways* auf. Diese durch die Parasiten induzierten Transportwege ermöglichen es Fosmidomycin und FR900098 in den befallenen Erythrozyten zu gelangen, wobei ungeklärt ist, wie der weitere Transport der Wirkstoffe durch die parasitären Membranen bis hinein in den Apikoplast erfolgt.<sup>[199-201]</sup>

Zur Klärung ob die Thia-Analoga auch antibakterielle Eigenschaften haben, sind phänotypische Screenings an *E. coli* und *M. tuberculosis* in Planung.

## **5.7 Enantioselektivität von IspC**

Neben dem Einfluss von Strukturvariationen auf die Aktivität wurde zudem die Enantioselektivität des Fosmidomycin-Analogons **43** gegenüber den drei IspC-Enzymen aus *P. falciparum*, *E. coli* und *M. tuberculosis* evaluiert. Diese Analyse umfasste zwei Ebenen. Zum einen lieferte die Kristallstruktur von **43** im Komplex mit *PfIspC* die Information, dass das (*S*)-Enantiomer selektiv gebunden wird (s. Kapitel 4). Zum anderen konnte ausgehend vom Racemat **43** durch Enantiomerentrennung und anschließende Testung der inhibitorischen Aktivität das (*S*)-Enantiomer eindeutig als das Eutomer definiert werden.

Die beiden Enantiomere von Verbindung **43** wurden durch HPLC an chiraler stationärer Phase mit einem Enantiomerenüberschuss (ee) von > 99.9 % gewonnen.<sup>[180]</sup> Die Racematspaltung erfolgte in der Arbeitsgruppe von *Markus Fischer* (Universität Hamburg). Charakterisiert wurden die Enantiomere nach der Trennung durch LC/MS-Untersuchungen und die Bestimmung der Drehwerte. Die polarimetrischen Untersuchungen wurden von *Ulrich Riederer* (Universität Hamburg) durchgeführt. Die Details zur Durchführung sind in Kapitel 8.4.5 beschrieben. Tabelle 13 zeigt die IC<sub>50</sub>-Werte dieser Enantiomere gegenüber *Ec*-, *Mt*- und *PfIspC*.<sup>[180]</sup>

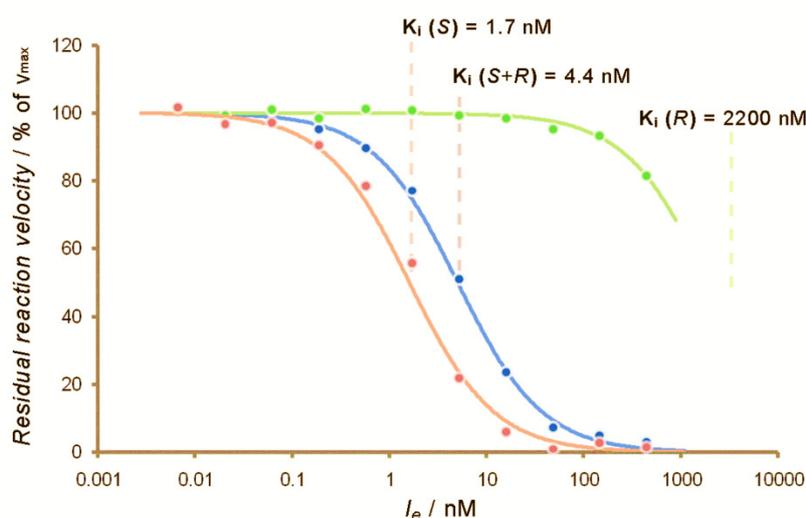
<b>Verbindung</b> 	<b><i>EcIspC</i> IC<sub>50</sub> (μM)</b>	<b><i>MtIspC</i> IC<sub>50</sub> (μM)</b>	<b><i>PfIspC</i> IC<sub>50</sub> (μM)</b>
<b>43: Racemat</b>	0.0082 ± 0.0008	0.28 ± 0.030	0.024 ± 0.002
<b>43: (<i>R</i>)-(-)-Enantiomer</b>	4 ± 0.7	83 ± 13	12 ± 1
<b>43: (<i>S</i>)-(+)-Enantiomer</b>	0.0051 ± 0.0016	0.12 ± 0.02	0.0094 ± 0.0006

**Tabelle 13** Enzymassay. IspC-Inhibition von Verbindung **43** (Racemat) und dessen Enantiomere; Mittelwert ± Standardabweichung aus 8-11 Messpunkten; alle Werte veröffentlicht in *Kunfermann, Lienau 2013*<sup>[180]</sup>.

Gegenüber allen drei IspC-Enzym-Homologen sind deutliche Aktivitätsunterschiede zu erkennen. Bei *Ec*- und *PfIspC* liegt der IC<sub>50</sub>-Wert des (-)-Enantiomers um ca. das 500-fache höher als der des (+)-Enantiomers. Für beide Enzyme befindet sich der IC<sub>50</sub>-Wert des (+)-Enantiomers mit 0.0051 ± 0.0016 μM für *EcIspC* und 0.0094 ± 0.0006 μM für *PfIspC* im einstelligen nanomolaren Bereich, während das (-)-Enantiomer Werte im ein- bis zweistelligen mikromolaren Bereich zeigt. Gegenüber *MtIspC* ist der Wert für das (-)-Enantiomer mit 83 ± 13 μM um den Faktor 300 größer als der des (+)-Enantiomers mit 0.12 ± 0.02 μM. Somit kann das (+)-Enantiomer eindeutig für alle drei Enzyme als das Eutomer und das (-)-Enantiomer als das Distomer bezeichnet werden (s. hierzu auch Abbildung 66).

Aufgrund der Tatsache, dass das (+)-Enantiomer eine größere inhibitorische Potenz aufweist und weil aus der Kristallstrukturanalyse hervorgeht, dass selektiv das (*S*)-Enantiomer vom *PfIspC*-Enzym gebunden wird, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem (+)-Enantiomer um das (*S*)-Enantiomer handelt.<sup>[180]</sup>

Sowohl das Racemat als auch die beiden Enantiomere zeigen an den unterschiedlichen Enzymen dieselbe Reihenfolge in der Aktivität: gegenüber *EcIspC* sind sie am aktivsten, dann folgt *PfIspC* und die schwächste Aktivität kann gegenüber *MtIspC* beobachtet werden. Für *EcIspC* ist der  $IC_{50}$ -Wert des Racemats 1.6-fach, für *MtIspC* 2.3-fach und für *PfIspC* sogar 2.6-fach höher als der des Eutomers. Die starke Enantioselektivität ermöglicht somit, dass die Aktivität dieses Thia-Isosters durch Racematspaltung um ca. das 2-fache gegenüber allen drei Enzymen gesteigert werden konnte.



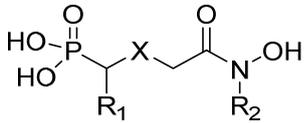
**Abbildung 66** Inhibition von *PfIspC* durch Verbindung **43**. Orangefarbene Kurve: (+)-Enantiomer, blaue Kurve: Racemat, grüne Kurve: (-)-Enantiomer;  $I_e$  ist eine effektive Inhibitorkonzentration, die wie folgt berechnet wird:  $I_e = I/(1 + [S]/K_m)$ ;  $I$  = Inhibitorkonzentration,  $[S]$  = Substratkonzentration,  $K_m$  = Michaelis-Menten-Konstante; bei einer Reaktionsgeschwindigkeit von 50 % ist  $I_e$  äquivalent zu  $K_i$  (Inhibitionskonstante) des Inhibitors (übernommen aus *Kunfermann, Lienau 2013*<sup>[180]</sup>).

Darüber hinaus ist die Testung der beiden Enantiomere von **43** auf ihre Wachstumsinhibition gegenüber den Plasmodienstämmen *Pf3D7* und *PfDd2* geplant. Hierzu wird zurzeit eine erneute Racematspaltung von **43** mittels chiraler HPLC durchgeführt (*Tobias Gräwert, Universität Hamburg*), da für die Bestimmung der antiplasmodialen Aktivität nicht genügend Substanzmengen der einzelnen Enantiomere vorhanden war.

## 5.8 Vergleich der Aktivitäten gegen Plasmodien von carba-, oxa- und thia-isosteren Fosmidomycin-Analoga

Abschließend soll in diesem Abschnitt der Einfluss eines Kohlenstoff-, Sauerstoff- oder Schwefelatoms in  $\beta$ -Position auf die Enzym-inhibitorische und antiplasmodiale Aktivität bewertet werden. Hierzu wurden die Aktivitäten von sieben unterschiedlichen Analogatypen verglichen. Diese liegen jeweils als Carba-, Oxa- und Thia-Isoster vor. Für diese Analyse

wurden die Daten der von *Behrendt* entwickelten Carba-Analoga **XLII-43C** – **XLII-47C**, **XLII-52C** und **XLII-54C**<sup>[102, 113-114]</sup> sowie die Daten der von *Brücher* synthetisierten Oxa-Analoga **XLIII-43O** – **XLIII-47O**, **XLIII-52O** und **XLIII-55O**<sup>[107, 112]</sup> herangezogen.<sup>[180]</sup> Tabelle 14 zeigt die *Pf*IsPC-inhibitorischen und antiplasmodialen Aktivitäten der Isostere.

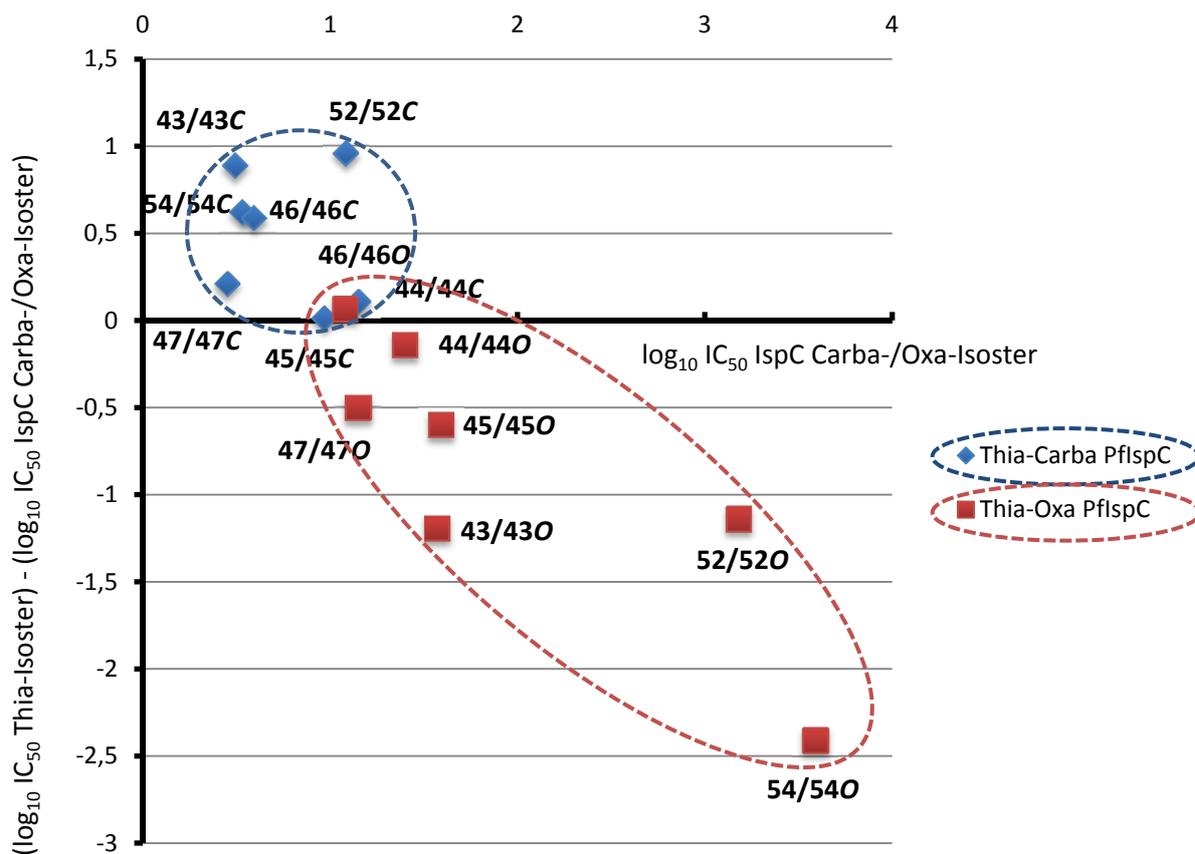
<b>Verbindung</b> 	<b><i>Pf</i>IsPC IC<sub>50</sub> (μM)<sup>[a]</sup></b>			<b><i>Pf</i>3D7 IC<sub>50</sub> (μM)<sup>[b]</sup></b>			<b><i>Pf</i>Dd2 IC<sub>50</sub> (μM)<sup>[b]</sup></b>		
<b>R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub></b>									
<b>X =</b>	<b>S<sup>[c]</sup></b>	<b>O</b>	<b>C<sup>[d]</sup></b>	<b>S</b>	<b>O<sup>[c]</sup></b>	<b>C<sup>[d]</sup></b>	<b>S</b>	<b>O<sup>[c]</sup></b>	<b>C<sup>[d]</sup></b>
R <sub>1</sub> = Ph <b>43, XLIII-43O, XLII-43C</b>	0.024 ± 0.002	0.037 ± 0.002	0.0031 ± 0.0003	0.03	1.2	0.09	0.075	0.7	0.074
R <sub>1</sub> = 3,4-F-Ph <b>46, XLIII-46O, XLII-46C</b>	0.014 ± 0.001	0.012 ± 0.001	0.0034 ± 0.0004	0.11	0.54	0.12	0.088	0.13	0.04
R <sub>1</sub> = 3,4-Cl-Ph <b>47, XLIII-47O, XLII-47C</b>	0.0045 ± 0.0004	0.014 ± 0.001	0.0028 ± 0.0004	0.091	0.24	n.b.	0.085	0.14	n.b.
R <sub>1</sub> = 1-Naphthyl <b>45, XLIII-45O, XLII-45C</b>	0.0098 ± 0.0009	0.039 ± 0.004	0.0094 ± 0.0013	0.38	0.52	n.b.	0.51	0.35	n.b.
R <sub>1</sub> = 4-CH <sub>3</sub> -Ph <b>44, XLIII-44O, XLII-44C</b>	0.018 ± 0.004	0.025 ± 0.003	0.014 ± 0.002	0.11	0.18	n.b.	0.095	0.19	n.b.
<b>R<sub>2</sub> = H</b>									
<b>X =</b>	<b>S</b>	<b>O<sup>[c]</sup></b>	<b>C<sup>[d]</sup></b>	<b>S</b>	<b>O<sup>[c]</sup></b>	<b>C<sup>[d]</sup></b>	<b>S</b>	<b>O<sup>[c]</sup></b>	<b>C<sup>[d]</sup></b>
R <sub>1</sub> = Ph <b>52, XLIII-52O, XLII-52C</b>	0.11 ± 0.02	1.5 ± 0.1	0.012 ± 0.003	2.9	> 50	0.4	3.77	n.b.	0.57
R <sub>1</sub> = 3,4-F-Ph <b>54, XLIII-54O, XLII-54C</b>	0.015 ± 0.002	3.9 ± 0.2	0.0039 ± 0.0004	0.16	> 50	0.075	0.33	n.b.	0.065

**Tabelle 14** [a] Enzymassay. Mittelwerte ± Standardabweichung aus mind. 8 Messpunkten; [b] Zellkulturassay. Mittelwert aus zwei unabhängigen Doppelbestimmungen; [c] Oxa-Analoga wurden von *Brücher* entwickelt<sup>[107, 112]</sup>; [d] Carba-Analoga wurden von *Behrendt* entwickelt<sup>[102, 113-114]</sup>. n.b. = nicht bestimmt.

Über die inhibitorische Aktivität gegenüber *Pf*IsPC lässt sich für fast alle der korrespondierenden Isostere sagen, dass die Carba-Analoga am aktivsten sind, gefolgt von den Thia-Analoga während die Oxa-Analoga die schwächste Inhibition zeigen. Betrachtet

man die Werte der *Pf*lspC-Inhibition insgesamt, so ist das Carba-Analogon **XLII-47C** mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von  $0.0028 \pm 0.0004 \mu\text{M}$  die aktivste Verbindung, gefolgt von dem Thia-Isoster **47** mit  $0.0045 \pm 0.0004 \mu\text{M}$  während das aktivste Oxa-Isoster **XLIII-46O** einen IC<sub>50</sub>-Wert von  $0.012 \pm 0.001 \mu\text{M}$  aufweist. Dieselbe Reihenfolge gilt für die antiplasmodiale Aktivität gegenüber dem *Pf*Dd2-Stamm und bei dem Verbindungstyp mit freier Hydroxamsäuregruppe sowohl gegenüber *Pf*3D7 als auch gegenüber *Pf*Dd2. Allerdings ist die Verbindung mit der höchsten inhibitorischen Aktivität am 3D7-Stamm das  $\alpha$ -Phenyl- und *N*-Methyl-substituierte Thia-Analogon **43**. Die Bewertung, ob für die antiplasmodialen Eigenschaften der Isostertypen ein  $\beta$ -Schwefel- oder  $\beta$ -Kohlenstoffatom vorteilhafter ist, muss unter dem Aspekt gesehen werden, dass für die Carba-Analoga lediglich vier Verbindungen am *Pf*3D7- bzw. *Pf*Dd2-Stamm getestet wurden. Alle Carba-Isostere wurden zwar hinsichtlich ihrer antiplasmodialen Aktivität gegenüber dem multiresistenten Stamm *Pf*K1 evaluiert, jedoch sind *in vitro*-Daten unterschiedlicher *P. falciparum*-Stämme nicht direkt vergleichbar.

Abbildung 67 illustriert diesen Einfluss der  $\beta$ -Thiaeinheit im Vergleich zur  $\beta$ -Carba- und zur  $\beta$ -Oxa-Funktion auf die Aktivität gegenüber *Pf*lspC. Die Lage der Punkte in X-Richtung repräsentiert die Aktivität des Carba- oder Oxa-Isosters. Je weiter ein Punkt rechts liegt, desto weniger aktiv ist das Isoster. Eine Verschiebung um eine Einheit in X-Richtung bedeutet, dass der IC<sub>50</sub>-Wert um eine Zehnerpotenz größer wird. Die Y-Koordinate gibt das Verhältnis der IC<sub>50</sub>-Werte eines Thia-Isosters und des korrespondierenden Carba- oder Oxa-Isosters an. Eine Verschiebung des Punkts um eine Einheit in Y-Richtung nach unten bedeutet, dass der IC<sub>50</sub>-Wert des Carba- bzw. Oxa-Analogons um eine Zehnerpotenz zunimmt. Je weiter unten der Punkt liegt, desto schwächer aktiv ist das Carba- bzw. Oxa-Analogon. Liegt der Punkt im negativen Bereich, ist der IC<sub>50</sub>-Wert des Carba- bzw. Oxa-Isosters höher und die Aktivität schlechter als die des Thia-Analogons. Die Graphik illustriert, dass die Oxa-Isostere eine geringere Aktivität haben als die Thia-Isostere, während die Carba-Isostere eine größere Aktivität zeigen.



**Abbildung 67** Einfluss des  $\beta$ -Schwefelatoms im Vergleich zur  $\beta$ -Methyleneinheit oder  $\beta$ -Oxa-Funktionalität auf die inhibitorischen Aktivitäten (*PfIspC*). Abszisse: dekadischer Logarithmus der  $IC_{50}$ -Werte der Carba (XLII)- und Oxa (XLIII)-Isostere **43C/O-47C/O**, **52C/O**, **54C/O**. Ordinate: dekadischer Logarithmus des Verhältnisses zwischen den  $IC_{50}$ -Werten der Thia-Isostere **43-47**, **52**, **54** und den korrespondierenden Carba- bzw. Oxa-Isosteren. Blaue Rauten: Vergleich der Aktivität von Thia- und Carba-Isosteren; rote Kästen: Vergleich der Aktivität von Thia- und Oxa-Isosteren. Die Grafik wurde in Anlehnung an die grafische Darstellung der Beziehung von Carba-Oxa- und Carba-Thia-Isosteren aus *Kunfermann, Lienau 2013*<sup>[180]</sup> erstellt.

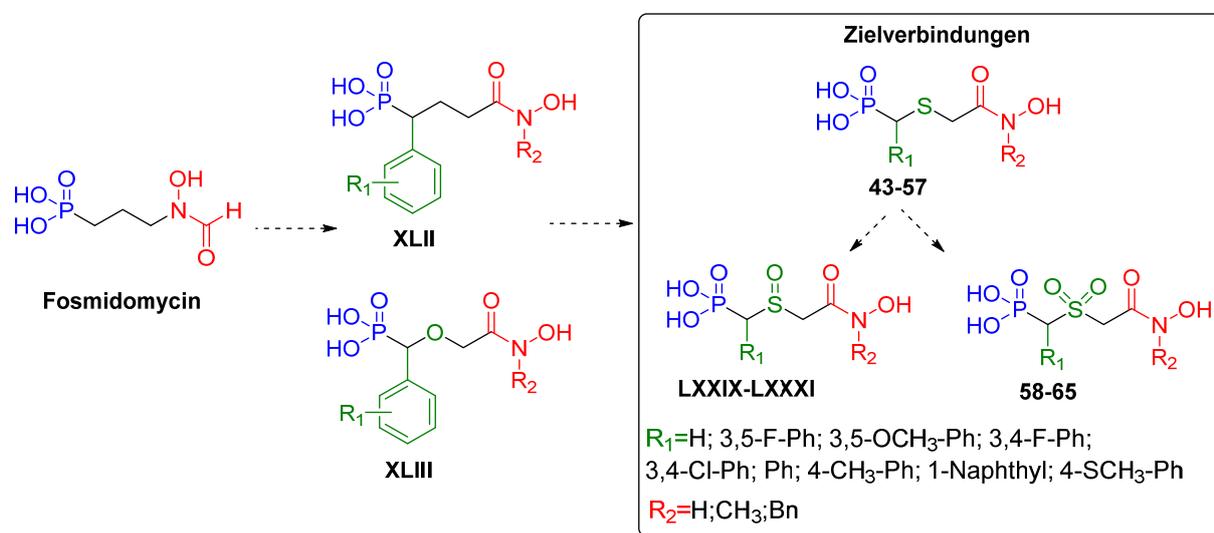
Mögliche Erklärungen für diese Aktivitätsunterschiede und den Einfluss der  $\beta$ -Thia-Einheit auf die inhibitorische Potenz liefert die (Kristall-)Strukturanalyse. Die Kristallstruktur des Komplexes aus **43** und *PfIspC* (s. Kapitel 4.2) zeigt, dass das  $\beta$ -Schwefelatom von **43** hydrophobe Interaktionen mit dem Schwefelatom in Methionin 298 eingeht und so der gebundene Ligand stabilisiert wird. Die  $\beta$ -Methyleneinheit der Carba-Isostere ist an dieser Stelle nicht in Kontakt mit dem Protein. Zwischen der  $\beta$ -Oxa-Funktion der Oxa-Isostere und dem Schwefelatom in Methionin 298 würde wiederum ein abstoßender Effekt entstehen. Wie in Abschnitt 4.2 und 5.2 erwähnt, kann die von *Brücher et al.* aufgestellte Hypothese, dass sich zwischen der Hydroxylgruppe von Serin 306 und der  $\beta$ -Oxa-Funktion eine Wasserstoffbrückenbindung ausbildet, anhand dieser Kristallstruktur nicht unterstützt werden.<sup>[112]</sup> Dies wurde auch von *Konzuch et al.* durch den Komplex aus einem Oxa-Isoster und *PfIspC* bestätigt (s. Abschnitt 4.1.3).<sup>[101]</sup> Die geringere Aktivität der Oxa-Isostere sowohl

im Vergleich mit den Carba- als auch mit den Thia-Analoga spricht ebenfalls gegen die Ausbildung dieser Wasserstoffbrücke. Neben der erhöhten Instabilität (nicht am Stickstoff substituierten) Oxa-Isostere können die durch die  $\beta$ -Oxa-Funktion veränderten Bindungseigenschaften des Inhibitors an das Enzym möglicherweise die geringere Aktivität dieses Isostertyps erklären.

## 6 Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation handelt von der Synthese und biologischen Evaluation  $\beta$ -thia-isosterer Fosmidomycin-Analoga. Das natürliche Antibiotikum Fosmidomycin weist neben antibakteriellen auch antiplasmodiale Eigenschaften auf. In klinischen Studien der Phase II wurde bereits gezeigt, dass Fosmidomycin Infektionen mit dem Erreger von *Malaria tropica*, *Plasmodium falciparum*, heilen kann. Aufgrund seines neuartigen Wirkmechanismus, der Hemmung des Enzyms 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase (kurz: Dxr, IspC), eines Schlüsselenzyms des DOXP-Biosynthesewegs, ist keine Kreuzresistenz gegenüber anderen etablierten Malaria-Therapeutika zu erwarten. Das klinische Wirkprofil Fosmidomycins ähnelt wegen des frühen Wirkeintritts und der schnellen Parasitämiereduktion dem der Artemisinine. Aufgrund der fortschreitenden Artemisinin-Resistenz werden diese voraussichtlich zukünftig in der Behandlung von Malaria-Infektionen an Bedeutung verlieren. Fosmidomycin kann als potentieller Ersatz für diese Arzneistoffklasse angesehen werden.

Basierend auf den zahlreichen Strukturmodifikationen Fosmidomycins zur Verbesserung der pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften, die dieser Arbeit vorangegangen sind, sollte ein neuer Fosmidomycin-Analogatyp mit erhöhter antiplasmodialer Aktivität entwickelt werden (s. Abbildung 68).

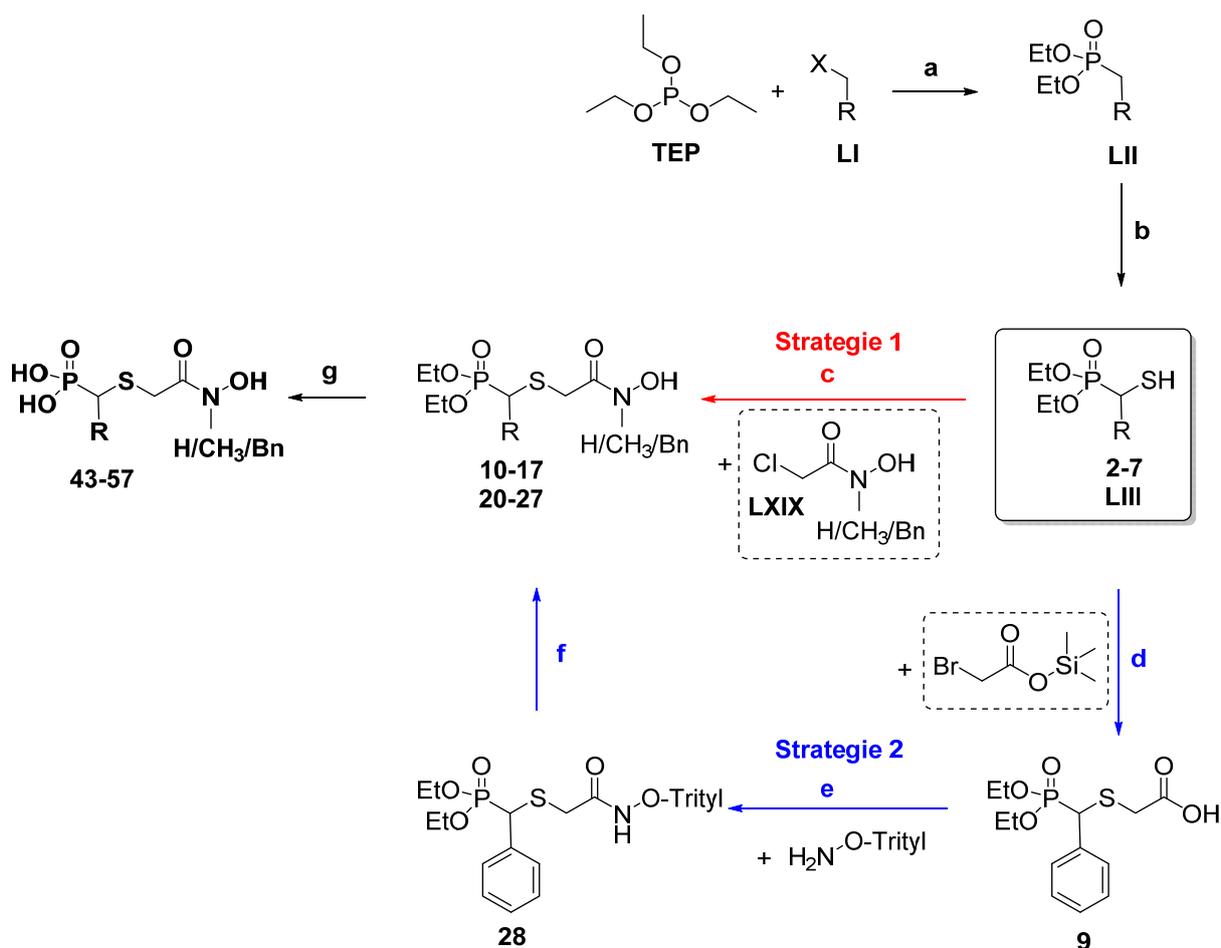


**Abbildung 68** Entwicklung der  $\beta$ -thia-isosteren Fosmidomycin-Analoga mit inverser Hydroxamsäurefunktion.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten zwei Synthesewege zur Generierung einer kleinen variationsreichen Substanzbibliothek des  $\beta$ -thia-isosteren Analogatyps gefunden werden (s. Abbildung 69).

Durch *Michaelis-Arbusow*-Reaktion wurden die Diethylbenzylphosphonate **LII** als Grundbausteine der Zielverbindungen **43-50** und **52-57** gewonnen (a). Umsetzung der Diethylphosphonate mit elementarem Schwefel in Gegenwart von *n*-BuLi lieferte die korrespondierenden  $\alpha$ -Mercaptophosphonate **LIII** und **2-7** (b). Ausgehend von diesen konnte über zwei Synthesewege die Hydroxamsäurepartialstruktur entwickelt werden:

- Synthesestrategie 1: *S*-Alkylierung des entsprechenden Thiols mit 2-Chlor-*N*-hydroxyacetamid bzw. 2-Chlor-*N*-hydroxy-*N*-methylacetamid (c)
- Synthesestrategie 2: *S*-Alkylierung des entsprechenden Thiols mit Trimethylsilylbromacetat und anschließende Hydrolyse zur Carbonsäure **9** (d); Umsetzen von *O*-Trityloxyamin und der Carbonsäure mittels eines Kupplungsreagenz zur entsprechenden Hydroxamsäure **28** (e); Entschützung der Hydroxamsäurefunktion mit Trifluoressigsäure in Gegenwart von Triethylsilan (f)

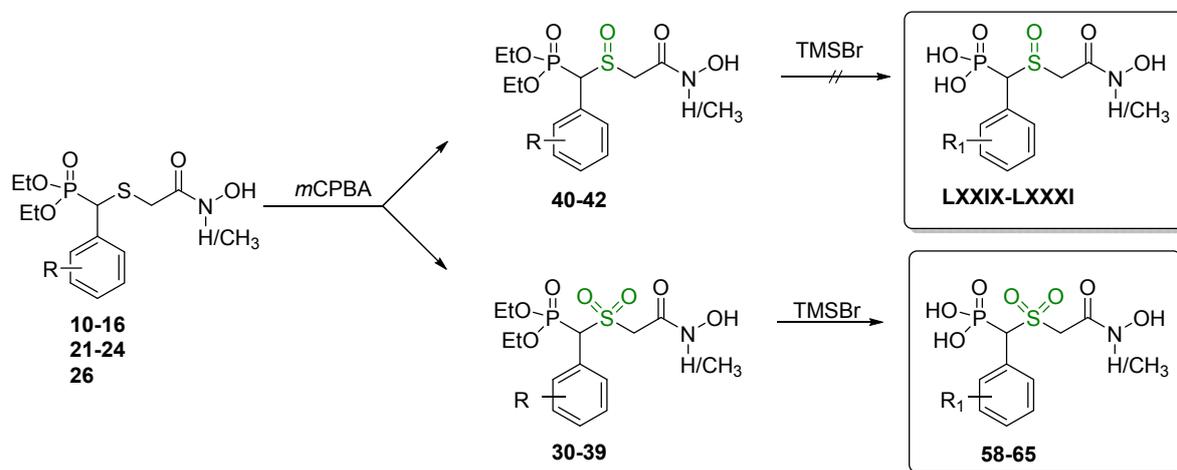


R=H; 3,5-F-Ph; 3,5-OCH<sub>3</sub>-Ph; 3,4-F-Ph; 3,4-Cl-Ph; Ph; 4-CH<sub>3</sub>-Ph; 1-Naphthyl; 4-SCH<sub>3</sub>-Ph  
X=Cl;Br

**Abbildung 69** Synthese der  $\beta$ -thia-isosteren Fosmidomycin-Analoga **43-57**.

Als letzter Schritt schließt sich bei beiden die TMSBr-vermittelte Entschützung der Phosphonsäurefunktion an (g). Aufgrund ihrer höheren Effizienz wurde Strategie 1 für die Synthese aller Zielverbindungen **43-57** genutzt, während Strategie 2 nur zur Synthese der  $\alpha$ -Phenyl-substituierten Phosphonsäure **52** mit freier Hydroxamsäurefunktion eingesetzt wurde.

Durch Oxidation mit *m*-Chlorperbenzoesäure konnten aus den Sulfiden **10-16**, **21-24** und **26** die entsprechenden Sulfone **30-39** und Sulfoxide **40-42** generiert werden (s. Abbildung 70). Nach der TMSBr-vermittelten Konversion der Phosphonsäureester zu den freien Phosphonsäuren wurden die Zielverbindungen **58-65** erhalten. Bei den ungeschützten Sulfoxiden **LXXIX-LXXXI** handelt es sich um Öle, die trotz chromatographischer Reinigung an einer kleinen Menge Kieselgel nicht in der ausreichenden Reinheit aus den Reaktionsrückständen isoliert werden konnten.



R=3,5-F-Ph; 3,5-OCH<sub>3</sub>-Ph; 3,4-F-Ph; 3,4-Cl-Ph; Ph; 4-CH<sub>3</sub>-Ph; 1-Naphthyl

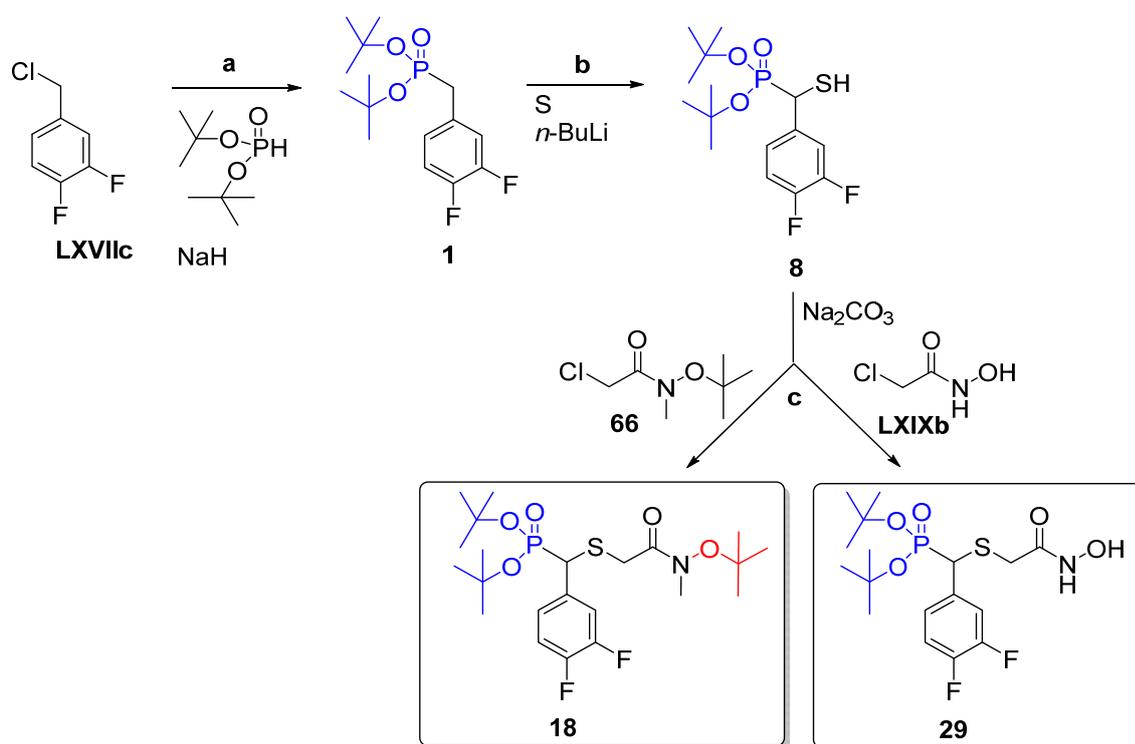
**Abbildung 70** Synthese der Sulfoxide **40-42** und **LXXXIX-LXXXI** sowie der Sulfone **30-39** und **58-65**.

Abgeleitet von den freien Phosphonsäuren **54** und **46** wurden die Phosphonsäure-*tert*-butylester **18** und **29** entwickelt, wobei **18** auch an der Hydroxamsäurefunktionalität mit einer *tert*-Butylgruppe derivatisiert ist (s. Abbildung 71). **46** sollte durch die Veresterung mit sterisch anspruchsvollen Gruppen einer Racematspaltung mittels chiraler HPLC zugänglich gemacht werden. Tatsächlich konnte durch **18** eine Basislinientrennung der Enantiomere erreicht werden, während bei **46** keine Trennung möglich war.

**29** sollte zum korrespondierenden Sulfoxid oxidiert werden. Die von der TMSBr-Spaltung divergente Entschützungreaktion kann die Gewinnung von Sulfoxiden mit freier Phosphonsäurefunktion in einer ausreichenden Reinheit ermöglichen. Zudem sollte auch hier der sterisch anspruchsvolle Ester zu einer Diastereomeren- und ggf. Racematspaltung der

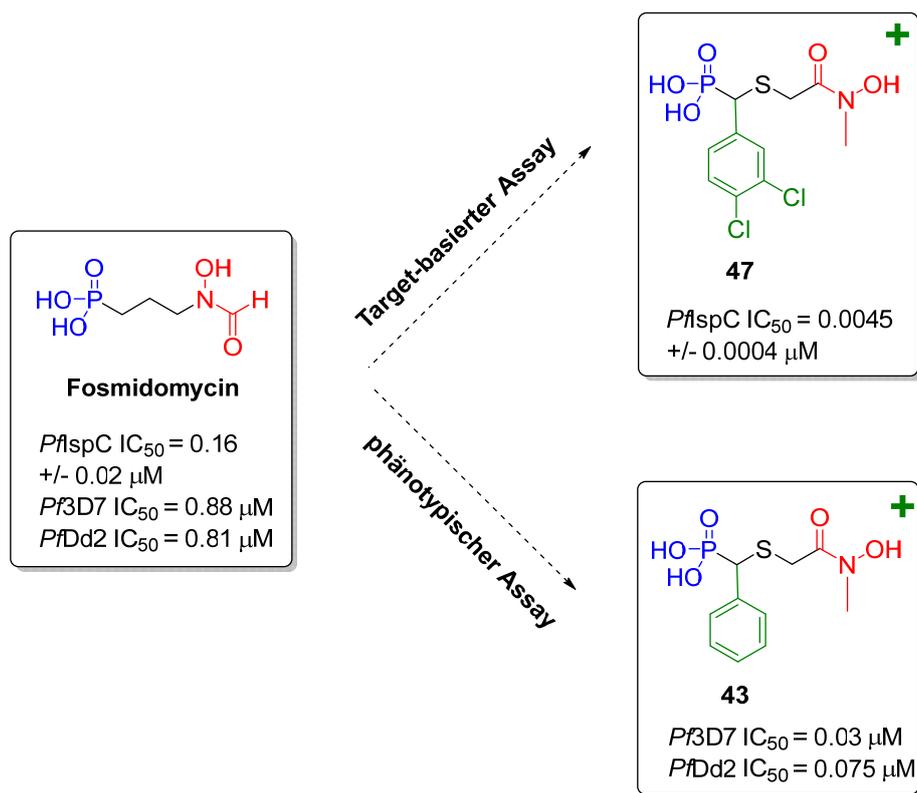
Sulfoxide führen. Bisher konnte allerdings keine Methode gefunden werden, **29** unter Erhalt der Schutzgruppen zu oxidieren.

Zur Gewinnung des Di-*tert*-butylphosphonats **1** als Grundstruktur für **18** und **29** wurde Di-*tert*-butylphosphit in Gegenwart von NaH mit dem entsprechenden Benzylchlorid umgesetzt (a). Das  $\alpha$ -Mercaptan **8** wurde analog zur Synthese der Diethylmercaptophosphonate **LIII** und **2-7** generiert (b). Ebenfalls in Analogie zu diesem Syntheseweg erfolgte anschließend die *S*-Alkylierung von **8** und es konnten so die als Phosphonsäure-*tert*-butylester vorliegenden Verbindungen **18** und **29** gewonnen werden (c).



**Abbildung 71** Synthese der Analoga **18** und **29** mit Phosphonsäure-*tert*-butylesterfunktion.

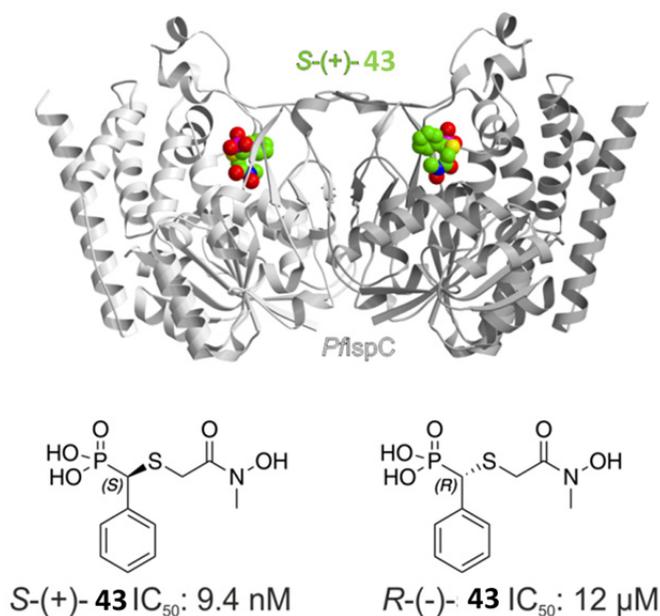
Die biologische Evaluation der Thia-Isostere erfolgte *in vitro* als Target-basiertes Screening gegenüber dem Enzym *Plasmodium falciparum* IspC (*PfIspC*) und als phänotypisches Screening gegenüber den Plasmodienstämmen *Pf3D7* und *PfDd2*. Einige Vertreter dieses neuen Fosmidomycin-Analogatyps sind mit IC<sub>50</sub>-Werten im ein- bis zweistelligen nanomolaren Bereich hochpotente Inhibitoren von *PfIspC* und des Parasitenwachstums (s. Abbildung 72). Die aktivste Verbindung gegenüber *PfIspC* stellt mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 0.0045 ± 0.0004  $\mu$ M die in  $\alpha$ -Position 3,4-Dichlorphenyl-substituierte, *N*-Methyl-substituierte Phosphonohydroxamsäure **47** dar. Gegenüber dem Parasitenwachstum hat sich die in  $\alpha$ -Position Phenyl-substituierte, *N*-Methyl-substituierte Phosphonohydroxamsäure **43** als potentester Inhibitor erwiesen (IC<sub>50</sub>-Wert (*Pf3D7*): 0.03  $\mu$ M; IC<sub>50</sub>-Wert (*PfDd2*): 0.075  $\mu$ M).



**Abbildung 72** Die potentesten Inhibitoren im Target-basierten und im phänotypischen Assay.

Die Zytotoxizitätsuntersuchung einiger ausgewählter Verbindungen (**48**, **49**, **51**, **57**, **59**, **65**) an HeLa-Zellen ergab, dass diese gegenüber Säugetierzellen nicht toxisch wirken. Basierend auf dieser Erkenntnis wurde die 3,5-Difluorphenyl- und *N*-Methyl-substituierte Phosphonohydroxamsäure **48** an mit *P. berghei* infizierten Mäusen auf ihre *in vivo*-Aktivität untersucht. Die Behandlung mit dem Wirkstoffkandidaten **48** erfolgte intravenös über vier Tage. Durch dieses Experiment konnte zwar die antiplasmodiale Aktivität *in vivo* belegt werden, allerdings wurde keine Heilung erreicht. Dies ist wahrscheinlich auf den chemischen bzw. metabolischen Abbau der Testsubstanz *in vivo* zurückzuführen.

Über die biologische Evaluation der antiplasmodialen Aktivität hinaus wurde zusätzlich die IspC-inhibitorische Aktivität der Fosmidomycin-Thia-Analoga gegenüber Enzymen anderer pathogener Mikroorganismen betrachtet. Auch *Escherichia coli* IspC (*EcIspC*) und *Mycobacterium tuberculosis* IspC (*MtIspC*) werden von diesem Analogotyp effektiv gehemmt, wobei **47** mit IC<sub>50</sub>-Werten von  $0.0059 \pm 0.0006 \mu\text{M}$  (*EcIspC*) und  $0.0092 \pm 0.0006 \mu\text{M}$  (*MtIspC*) den potentesten Inhibitor darstellt.



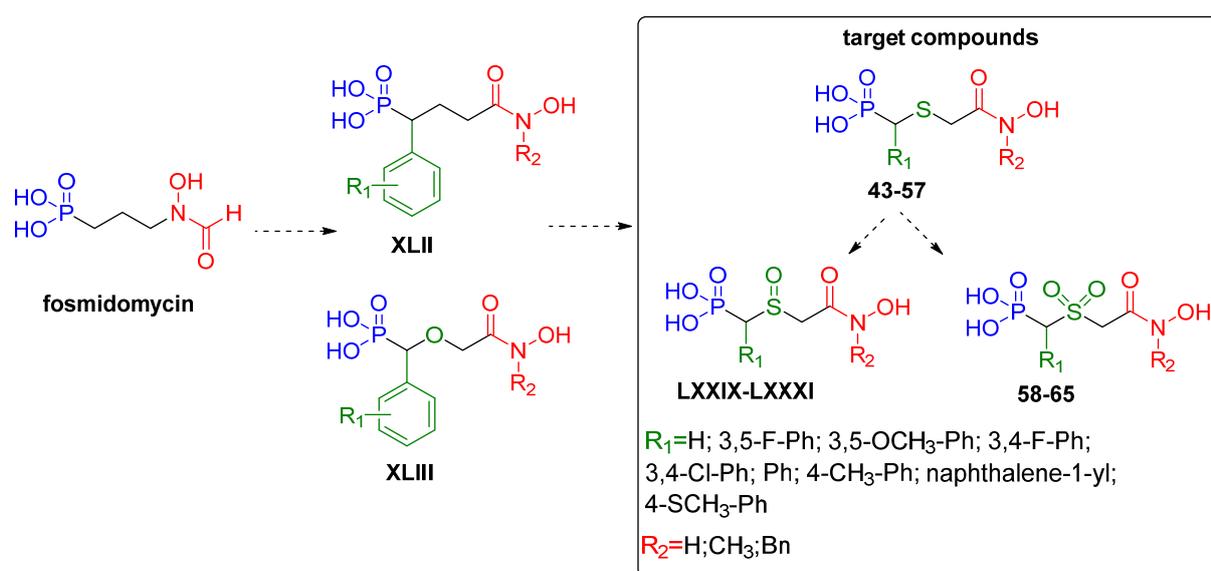
**Abbildung 73** Inhibitorische Aktivität der beiden Enantiomere von **43** gegenüber *PflspC* (übernommen aus Kunfermann, Lienau 2013<sup>[180]</sup>).

Verbindung **43** konnte im Komplex mit *PflspC* und den Kofaktoren  $Mn^{2+}$  und NADPH kristallisiert werden, wodurch eine Analyse des Bindungsmodus und von Struktur-Aktivitätsbeziehungen ermöglicht wurde. Sowohl durch die Kristallstruktur als auch durch die Racematspaltung von **43** konnte zudem die Enantioselektivität chiraler Fosmidomycin-Analoga gegenüber *PflspC* evaluiert werden. Die Analyse der Kristallstruktur liefert die Information, dass selektiv das (*S*)-Enantiomer von **43** im Enzym gebunden wird. Die biologische Testung beider Enantiomere nach der Racematspaltung via chiraler HPLC ergab Folgendes. Während das (*S*)-(+)-Enantiomer *PflspC* mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $0.0094 \pm 0.0006 \mu M$  hemmt, zeigt das (*R*)-(-)-Enantiomer gegenüber dem Enzym einen  $IC_{50}$ -Wert von  $12 \pm 1 \mu M$  (s. Abbildung 73). Erstmalig wurde so für das IspC-Enzym ein Enantiomer (hier: (*S*)-(+)-Enantiomer) als Eutomer mit deutlich gesteigerter inhibitorischer Potenz gegenüber dem Distomer bestimmt.

## 7 Summary

This dissertation is concerned with the synthesis and biological evaluation of fosmidomycin thia isosters. The natural antibiotic fosmidomycin possesses antibacterial and antiparasitic properties. In clinical trials (phase II), fosmidomycin cured infections with *Plasmodium falciparum*, the cause of *Malaria tropica*. Due to its novel mechanism of action, the inhibition of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (Dxr, IspC), a key enzyme of the DOXP pathway, no cross-resistance with established antimalarials should occur. Fosmidomycin's early onset of action and its fast reduction of parasitemia are in accordance with the clinical properties of artemisinin and its derivatives. Due to the progressing resistance towards artemisinins, they will presumably recede in importance concerning the treatment of malaria infections in the future. Fosmidomycin may possibly substitute this class of drugs one day.

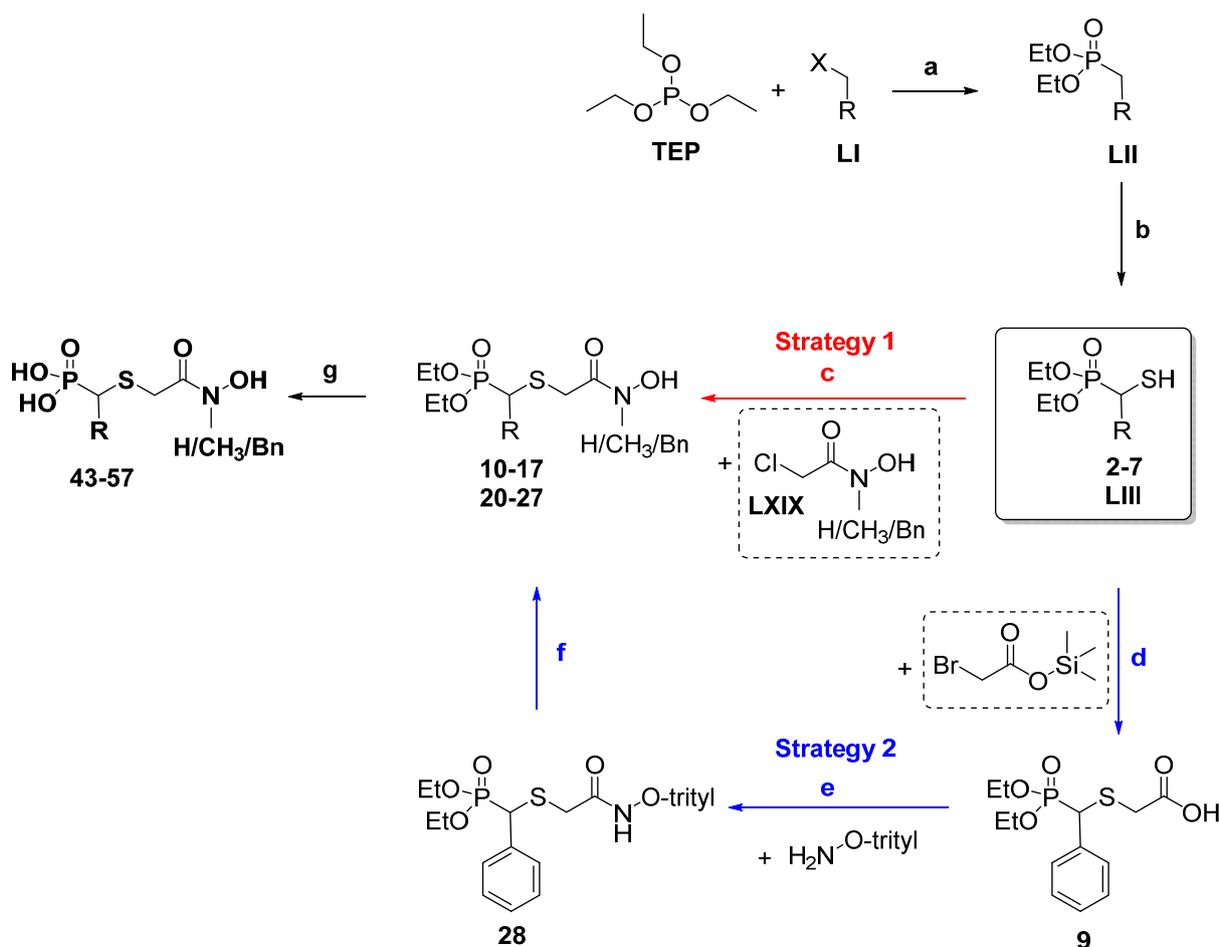
In order to improve pharmacokinetic and pharmacodynamic properties, a new type of fosmidomycin analogue with increased antiparasitic activity was developed (see Figure 1).



**Figure 1** Development of the fosmidomycin  $\beta$ -thia isosters.

Two ways to synthesize a small but diversified compound library of fosmidomycin thia analogues were designed (see Figure 2). The diethyl benzylphosphonates **LII** are the key building blocks for target compounds **43-50** and **52-57**. They were obtained by *Michaelis-Arbuzov*-reaction of triethyl phosphite with the respective benzyl chloride (a). Treatment of **LII** with elemental sulfur in the presence of *n*-butyl lithium provided the corresponding  $\alpha$ -mercaptophosphonates **LIII** and **2-7** (b). Based on these, the hydroxamate motif could be introduced via two strategies:

- Strategy 1: *S*-alkylation of the respective thiol with 2-chloro-*N*-hydroxyacetamide or 2-chloro-*N*-hydroxy-*N*-methylacetamide (c)
- Strategy 2: *S*-alkylation of the respective thiol with trimethylsilyl 2-bromoacetate and subsequent hydrolysis to the carboxylic acid **9** (d); coupling of the carboxylic acid with *O*-tritylhydroxylamine to gain hydroxamic acid **28** (e); deprotection of the hydroxamic acid moiety with trifluoro acetic acid in the presence of triethyl silane (f)



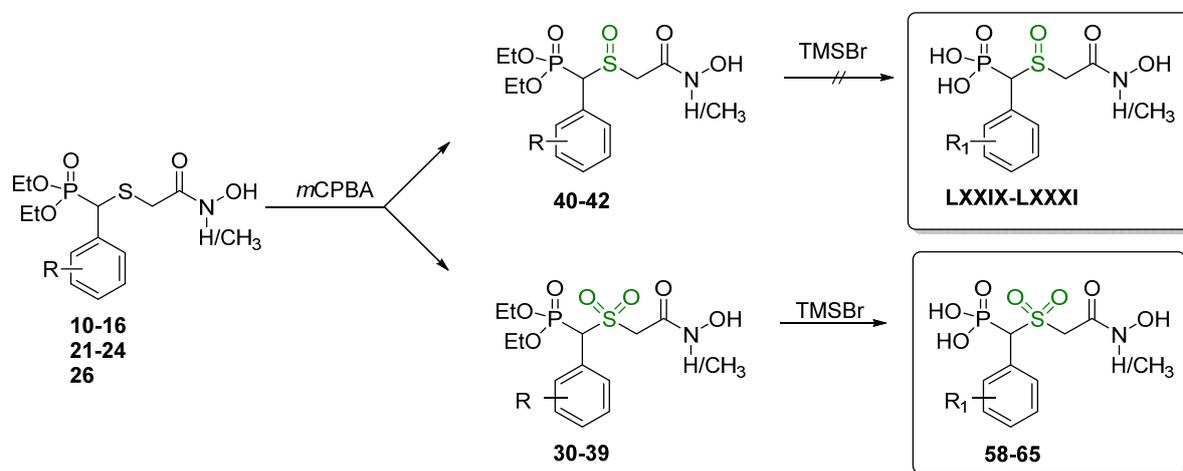
R=H; 3,5-F-Ph; 3,5-OCH<sub>3</sub>-Ph; 3,4-F-Ph; 3,4-Cl-Ph; Ph; 4-CH<sub>3</sub>-Ph; naphthalene-1-yl; 4-SCH<sub>3</sub>-Ph  
 X=Cl;Br

**Figure 2** Synthesis of fosmidomycin thia isosters via strategy 1 and 2.

The last step of both sequences is the deprotection of the phosphonic acid moiety via treatment with bromotrimethylsilane (g). Because of its higher efficiency, strategy 1 was used to synthesize all target compounds **43-57**. Only **52** was prepared according to strategy 2.

Oxidation of the sulfides **10-16**, **21-24** and **26** with 3-chlorobenzoperoxoic acid provided the corresponding sulfones **30-39** and sulfoxides **40-42** (see Figure 3). Conversion of the diethyl

phosphonates to the phosphonic acids **58-65** was mediated by bromotrimethylsilane. However, all the unprotected sulfoxides **LXXIX-LXXXI** are not solid and could neither be isolated out of the residues of the reaction in a sufficient purity nor be purified chromatographically.



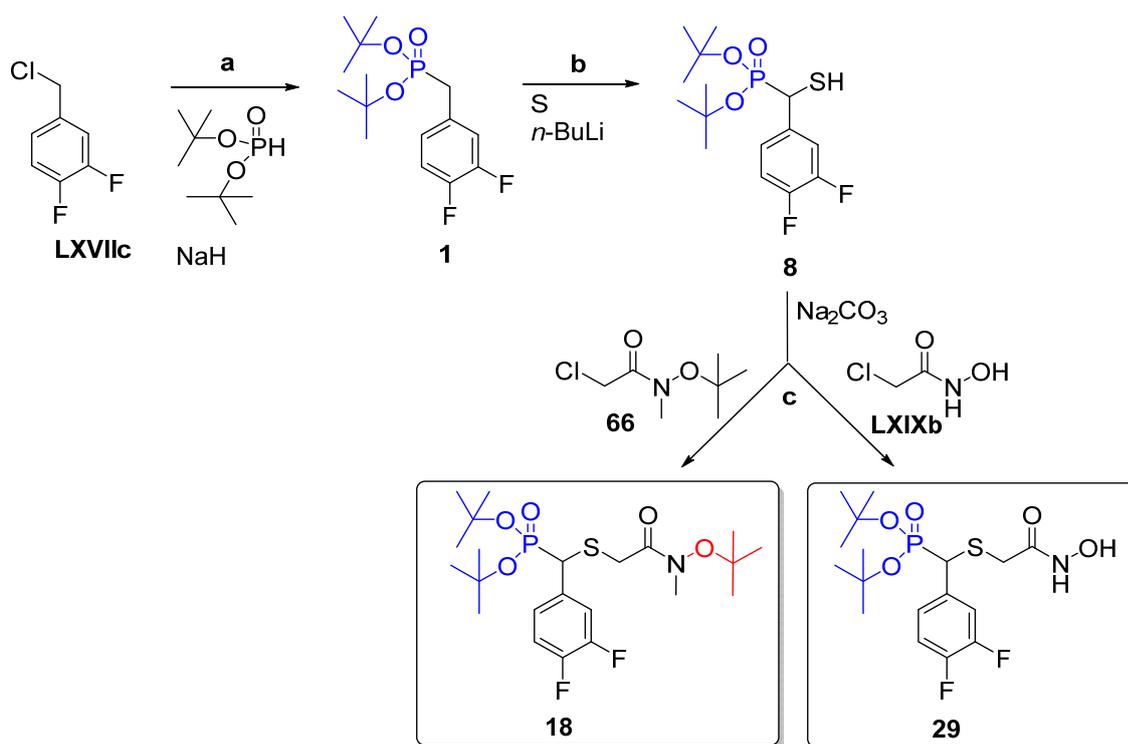
R=3,5-F-Ph; 3,5-OCH<sub>3</sub>-Ph; 3,4-F-Ph; 3,4-Cl-Ph; Ph; 4-CH<sub>3</sub>-Ph; naphthalene-1-yl

**Figure 3** Synthesis of sulfoxides **40-42**, **LXXXIX-LXXXI** and the sulfones **30-39** and **58-65**.

Derived from the free phosphonic acids **54** and **46**, the di-*tert*-butyl phosphonates **18** and **29** were designed (see Figure 4). In order to make **46** accessible for enantiomeric separation via chiral HPLC, bulky di-*tert*-butyl residues were chosen for derivatization of this compound's acid moieties. Indeed, the enantiomers of **18** showed a sufficient separation whereas the enantiomers of **46** could not be separated at all.

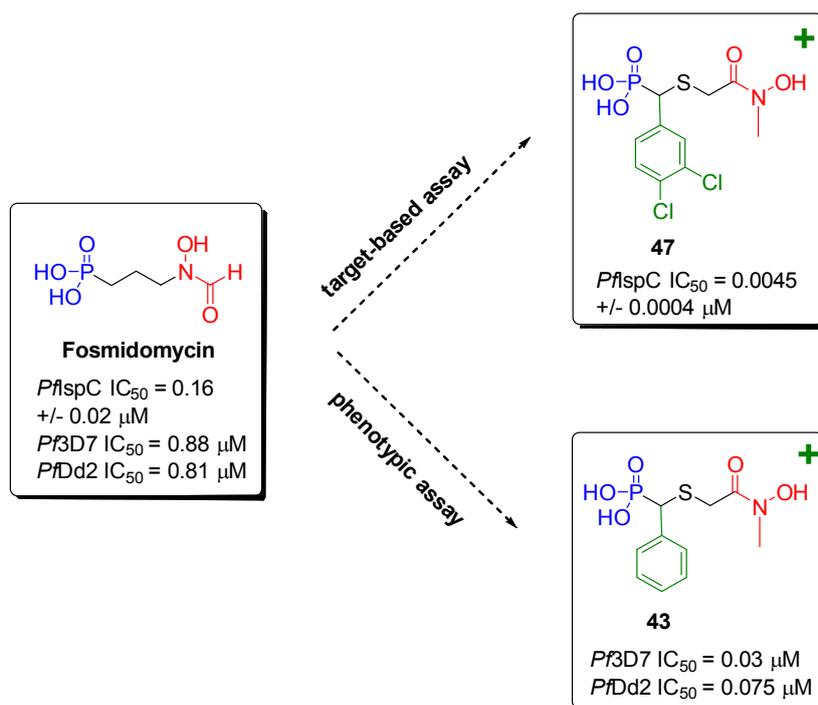
Subsequent oxidation of **29** should lead to the corresponding sulfoxide. The bulky ester functions should also enable the separation of this sulfoxide's enantiomers and diastereomers by (chiral) HPLC. Furthermore, *tert*-butyl esters should enable the synthesis of unprotected sulfoxides in a sufficient purity. However, a method to oxidise **29** and preserve the protecting group could not be found yet.

The central building block for **18** and **29** is di-*tert*-butyl phosphonate **1**. For its synthesis, di-*tert*-butyl phosphite was heated with the respective benzyl chloride in the presence of sodium hydride (a). Thiol **8** was obtained according to the synthesis of diethyl mercaptophosphonates **LIII** and **2-7** (b). *S*-alkylation of **8** was performed in analogy to the procedure of synthetic route 1 yielding the di-*tert*-butyl phosphonates **18** and **29** (c).



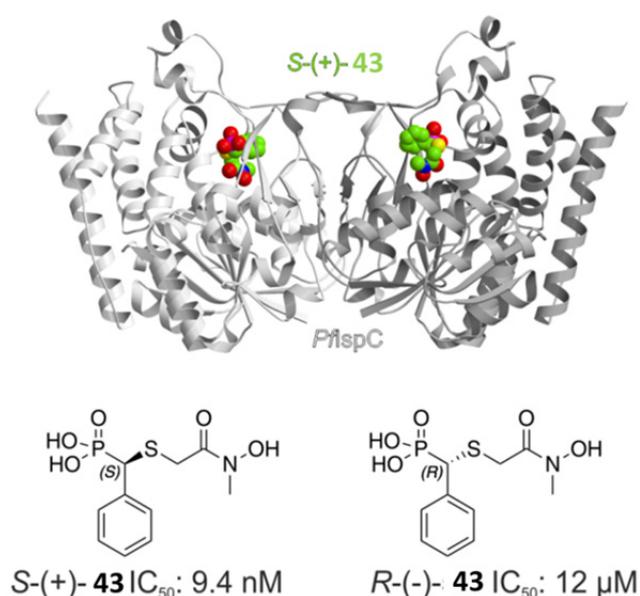
**Figure 4** Synthesis of the di-*tert*-butyl phosphonates **18** and **29**.

Biological *in vitro* evaluation of the fosmidomycin thia isosters was conducted as follows. Compounds were tested for their inhibitory activity in a target based screening towards the enzyme *Plasmodium falciparum* IspC (*Pf*IspC) and for their antiplasmodial activity in a phenotypic screening towards the plasmodium strains *Pf*3D7 and *Pf*Dd2. Some representatives of this new type of fosmidomycin analogue are highly potent inhibitors of *Pf*IspC and of parasite growth possessing IC<sub>50</sub>-values in the single- and doubledigit nanomolar range (see Figure 5). The 3,4-dichlorophenyl substituted *N*-methylated compound **47** has an IC<sub>50</sub>-value of 0.0045 ± 0.0004 μM and shows the highest inhibitory activity towards *Pf*IspC. Towards parasite growth the phenyl substituted *N*-methylated compound **43** is the most active one (IC<sub>50</sub>-value *Pf*3D7: 0.03 μM; IC<sub>50</sub>-value *Pf*Dd2: 0.075 μM). Cytotoxicity testings of selected compounds (**48**, **49**, **51**, **57**, **59**, **65**) conducted at HeLa-cells proved these thia analogs not to be toxic towards mammalian cells. Based on these results the 3,5-difluorophenyl substituted *N*-methylated phosphonohydroxamic acid **48** was investigated for its antiplasmodial *in vivo* activity. *Plasmodium berghei* infected mice were treated with **48** for four days with drug administration via the intravenous route. Even though the treatment with **48** showed that the compound actually possesses antiplasmodial *in vivo* activity, the mice could not be cured. Presumably, the lack of *in vivo* activity is caused by chemical or metabolic degradation of the tested compound.



**Figure 5** Compounds showing the highest inhibitory activity towards *PfIspC* and parasite growth.

Beyond the investigation of the antiplasmodial activity, the inhibitory activity towards IspC-enzymes of other pathogens was evaluated. The test results showed that fosmidomycin thia isosters are also potent inhibitors of *Escherichia coli* IspC (*EcIspC*) and *Mycobacterium tuberculosis* IspC (*MtIspC*). As for *PfIspC* inhibition, **47** is also the most active compound towards *EcIspC* ( $IC_{50}$ -value:  $0.0059 \pm 0.0006$   $\mu$ M) and *MtIspC* ( $IC_{50}$ -value:  $0.0092 \pm 0.0006$   $\mu$ M).



**Figure 6** Inhibitory activity of the enantiomers of **43** towards *PfIspC* (figure taken from Kunfermann, Lienau 2013<sup>[180]</sup>).

Crystallization of compound **43** in complex with *PfIspC* and the respective cofactors  $Mn^{2+}$  and NADPH enabled an analysis of the binding mode and of the structure activity relationships. Moreover, both the crystal structure and the enantiomeric separation of **43** allowed the evaluation of *PfIspC*'s enantioselectivity towards chiral fosmidomycin analogues. The crystal structure suggests that the (*S*)-enantiomer of **43** is selectively bound by the enzyme. After chiral separation of this compound's enantiomers, testing of the inhibitory activity towards *PfIspC* showed one enantiomer to be the eutomer ( $IC_{50}$ -value:  $0.0094 \pm 0.0006 \mu M$ ) and the other one to be the distomer ( $IC_{50}$ -value:  $12 \pm 1 \mu M$ ) (see Figure 6). Up to now, this is the first definitive chirality assignment concerning *PfIspC* and its enantioselectivity towards chiral fosmidomycin analogues.

## **8 Experimentalteil**

### **8.1 Verzeichnis der Geräte und Analysenmethoden**

#### **8.1.1 Chromatographische Verfahren**

##### **Dünnschichtchromatographie**

Für alle durchgeführten dünnschichtchromatographischen Untersuchungen wurden DC-Aluminiumplatten beschichtet mit Kieselgel 60 und Fluoreszenzindikator (F<sub>254</sub>) der Firma Merck verwendet. Die Chromatographie erfolgte unter Kammersättigung und unter Verwendung von Ethylacetat und *n*-Hexan in variierender Zusammensetzung als Fließmittel. Die Laufstrecken betragen 5-8 cm. Fluoreszenzlöschung bei UV-Licht der Wellenlänge 254 nm, Anfärben mit wässriger Kaliumpermanganat-Lösung oder Anfärben mit methanolischer Eisen(III)chlorid-Lösung wurden zur Detektion herangezogen.

##### **Säulenchromatographie**

Säulenchromatographische Reinigung erfolgte an Kieselgel 60 (0.04-0.063 mm/230-400 mesh, Porengröße 60 Å) der Firmen Macherey-Nagel und Fluka. Das jeweils verwendete Eluentensystem ist in der entsprechenden allgemeinen Arbeitsvorschrift beschrieben.

##### **Flashchromatographie**

Flashchromatographie wurde an dem Gerät CombiFlash<sup>®</sup> Rf 200 der Firma Teledyne Isco durchgeführt, wobei die zugehörigen Säulen (RediSep<sup>®</sup> Rf) verwendet wurden. Die Elution erfolgte mittels eines Gradienten aus Ethylacetat/*n*-Hexan (0:100 → 100:0).

##### **HPLC (zur Reinheitsbestimmung)**

Die Bestimmung der Reinheit wurde bei einigen Substanzen mittels HPLC durchgeführt. Hierfür standen zwei Anlagen zur Verfügung:

- LaChrom Elite<sup>®</sup> System (VWR-Hitachi) mit Hitachi L-2130 als Pumpe und Hitachi L-2400 als UV-Detektor
- Varian ProStar HPLC System mit Varian ProStar 210 als Pumpe, Varian ProStar 320 als UV-Detektor und Varian ProStar 410 als Autosampler

Als Säule wurde Phenomenex Luna C 18(2) (5 µm Partikelgröße, 250 mm × 4.6 mm) kombiniert mit der Vorsäule Phenomenex Security Guard<sup>®</sup> cartridge kit C18

(4.0 mm × 3.0 mm) verwendet. Die jeweils genutzte HPLC-Methode wird bei den analytischen Daten der entsprechenden Verbindung beschrieben.

### **8.1.2 Spektroskopische Verfahren**

#### **<sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie**

<sup>1</sup>H-NMR-Spektren wurden mit Hilfe von Bruker Avance DRX 500 (500.13 MHz) und Bruker Avance III-600 (600.22 MHz) aufgenommen. Die chemische Verschiebung  $\delta$  wird in ppm angegeben. DMSO-d<sub>6</sub> diente als Lösungsmittel und als Bezug für die Angabe der chemischen Verschiebung. Die Ermittlung der Protonenverhältnisse erfolgte durch Integration. Die Abkürzung der Signalmultiplizitäten erfolgt wie nachstehend beschrieben: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett und m = Multipllett. Die Kopplungskonstanten  $J$  werden in Hz angegeben, für Spin-Spinsysteme höherer Ordnung nur bei vollständig aufgelösten Signalsätzen.

#### **<sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie**

<sup>13</sup>C-NMR-Spektren wurden mit Hilfe von Bruker Avance DRX 500 (125.76 MHz) und Bruker Avance III-600 (150.93 MHz) aufgenommen. Die chemische Verschiebung  $\delta$  wird in ppm angegeben. DMSO-d<sub>6</sub> diente als Lösungsmittel und als Bezug für die Angabe der chemischen Verschiebung. Die Abkürzung der Signalmultiplizitäten erfolgt wie nachstehend beschrieben: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett und m = Multipllett. Die Kopplungskonstanten  $J$  werden in Hz angegeben, für Spin-Spinsysteme höherer Ordnung nur bei vollständig aufgelösten Signalsätzen.

#### **IR-Spektroskopie**

Varian 800 FT-IR Scimitar series

Zur Aufnahme von IR-Spektren wurde bei Feststoffen ein KBr-Pressling angefertigt und Öle wurden als Film auf einer NaCl-Platte vermessen.

### **8.1.3 Sonstige Verfahren**

#### **Elementaranalyse**

Perkin-Elmer PE 2400 CHN Elemental Analyzer

vario MICRO cube Elemental Analyzer (Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau Germany)

**Massenspektrometrie (HRMS)**

UHR-TOF maXis 4G instrument (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland)

**Schmelzpunkte**

Stuart melting point apparatus SMP11

**Trockenmittel für organische Phasen**

Wasserfreies Natriumsulfat

## **8.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften**

### **AAV 1: Synthese von Di-tert-butyl(3,4-difluorbenzyl)phosphonat 1 in Anlehnung an**

#### **Lit.<sup>[161]</sup>**

Eine 60 %ige Dispersion von Natriumhydrid in Mineralöl (1.04 Äquivalente, 2.08 g, 52 mmol) wird in 50 mL trockenem Tetrahydrofuran unter Stickstoffbegasung suspendiert. Die Suspension wird auf 0 °C gekühlt und unter Rühren tropfenweise mit Di-tert-butylphosphit (1 Äquivalent, 9.7 g, 50 mmol) versetzt. Der Ansatz wird für 30 Minuten bei 0 °C gerührt und anschließend erfolgt die langsame Zugabe von 3,4-Difluorbenzylchlorid (1 Äquivalent, 8.13 g, 50 mmol). Der Ansatz wird 20 Stunden unter Feuchtigkeitsausschluss zum Rückfluss erhitzt. Nachfolgend wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (100 mL) und Ethylacetat (70 mL) versetzt. Die wässrige Phase wird drei Mal mit Ethylacetat (je 70 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und eingeeengt. Das Rohprodukt wird chromatographisch an Kieselgel mit einem Elutionsmittelgradienten aus *n*-Hexan und Ethylacetat (100:0 → 0:100) gereinigt.

### **AAV 2: Synthese der $\alpha$ -Mercaptophosphonate 2-8 ausgehend von den Diethylbenzylphosphonaten LII in Anlehnung an Lit.<sup>[132]</sup>**

Der jeweilige Phosphorsäurediethylester LII (1 Äquivalent, 50 mmol) wird unter Stickstoffatmosphäre in 50 mL trockenem Tetrahydrofuran gelöst und auf -78 °C gekühlt. Dem Ansatz wird langsam und unter stetigem Rühren eine 1.6 M Lösung von *n*-Butyllithium in Hexan zugetropft (1.1 Äquivalente, 34.5 mL, 55 mmol). Nachdem der Ansatz 5 Minuten bei -78 °C gerührt wurde, wird getrockneter und gepulverter Schwefel (1 Äquivalent, 1.60 g, 50 mmol) zugegeben. Die resultierende Suspension wird langsam auf -20 °C erwärmt und eine Stunde bei dieser Temperatur gerührt. Anschließend wird der Ansatz auf Raumtemperatur erwärmt und weitere 30 Minuten gerührt. Es werden 150 mL Wasser zugegeben, die wässrige Phase wird abgetrennt und zwei Mal mit je 75 mL Dichlormethan extrahiert. Die wässrige Phase wird auf 0 °C gekühlt und unter kräftigem Rühren mit 1 M Salzsäure auf einen pH-Wert von 1 angesäuert. Im Falle der Synthese von Di-tert-butyl((3,4-difluorphenyl)(mercapto)methyl)phosphonat **8** wird die wässrige Phase mit 1 M Salzsäure auf einen pH-Wert von 8 eingestellt. Im Anschluss daran wird die wässrige Phase drei Mal mit Dichlormethan (je 75 mL) extrahiert, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Das Rohprodukt wird anschließend für die Synthese der Phosphonohydroxamsäurediethylester eingesetzt.

### **AAV 3: Synthese von *N*-(*tert*-Butoxy)-2-chlor-*N*-methylacetamid 66**

Benzyl*tert*-butoxy(methyl)carbamat **LXXIII** (1 Äquivalent, 2.37 g, 10 mmol) wird in Methanol (300 mL) gelöst und mit 15-20 % (w/w) Palladium auf Aktivkohle (10 %) versetzt. Nach der Evakuierung des Reaktionsgefäßes wird dieses mit Wasserstoff befüllt und bei Raumtemperatur und atmosphärischem Druck über Nacht geschüttelt. Anschließend wird der Katalysator abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das erhaltene Rohprodukt (2.2 Äquivalente, 1.03 g, 10 mmol) wird in Methanol (10 mL) gelöst und die entstehende Lösung im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Dem Ansatz wird 2-Chloracetylchlorid (1 Äquivalent, 0.37 mL, 4.5 mmol), gelöst in trockenem Tetrahydrofuran (5 mL), tropfenweise bei 0 °C zugegeben. Der Ansatz wird 30 Minuten bei 0 °C und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (50 mL) versetzt und drei Mal mit Ethylacetat extrahiert (je 50 mL). Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Das Rohprodukt wird chromatographisch an Kieselgel mit einem Elutionsmittelgradienten aus Ethylacetat/*n*-Hexan (0:100 → 100:0) gereinigt.

### **AAV 4: Synthese von 2-(((Diethoxyphosphoryl)(phenyl)methyl)thio)essigsäure 9**

Diethyl(mercapto(phenyl)methyl)phosphonat **LIIIe** (1 Äquivalent, 1.30 g, 5 mmol) wird unter Schutzgas (Stickstoffatmosphäre) in 80 mL trockenem Dimethylformamid gelöst. Nach der Zugabe von Kaliumcarbonat (1.25 Äquivalente, 0.86 g, 6.25 mmol) wird die resultierende Suspension auf eine Temperatur von 0 °C gekühlt. Bei 0 °C wird Trimethylsilylbromacetat (1 Äquivalent, 1.06 g, 5 mmol) tropfenweise zugegeben. Der Reaktionsansatz wird auf Raumtemperatur erwärmt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Dem Ansatz werden 50 mL Ethylacetat und 50 mL 1 M Salzsäure zugesetzt. Die organische Phase wird abgetrennt und mit 1 M Salzsäure (20 mL) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Das so erhaltene Rohprodukt wird chromatographisch an Kieselgel mit einem Elutionsmittelgradienten von Ethylacetat/*n*-Hexan (10:90 → 100:0) gereinigt.

**AAV 5: S-Alkylierung der  $\alpha$ -Mercaptophosphonate LIII/2-7 zu den Hydroxymethylaminophosphonaten 10-17, zu dem Diethyl(((2-(benzyl(hydroxy)amino)-2-oxoethyl)thio)methyl)phosphonat 19 und zu den Hydroxyaminophosphonaten 20-27**

Das entsprechende  $\alpha$ -Mercaptophosphonat **LIII** bzw. **2-7** (1 Äquivalent, 10 mmol) wird unter Schutzgas (Stickstoffatmosphäre) in 10 mL trockenem Dimethylformamid gelöst. Nach der Zugabe von Natriumcarbonat (1.25 Äquivalente, 1.32 g, 12.5 mmol) wird die resultierende Suspension auf eine Temperatur von 0 °C gekühlt. Im Falle der Synthese der Hydroxymethylaminophosphonsäureester **10-17** wird bei 0 °C eine Lösung von 2-Chlor-*N*-hydroxy-*N*-methylacetamid (1 Äquivalent, 1.24 g, 10 mmol) in 2 mL trockenem Dimethylformamid tropfenweise der Suspension zugesetzt. Im Falle der Synthese der Hydroxyaminophosphonsäureester **20-27** wird bei 0 °C eine Lösung von 2-Chlor-*N*-hydroxyacetamid (1 Äquivalent, 1.10 g, 10 mmol) in 2 mL trockenem Dimethylformamid tropfenweise der Suspension zugesetzt. Die Synthese von Diethyl(((2-(benzyl(hydroxy)amino)-2-oxoethyl)thio)methyl)phosphonat **19** erfordert den tropfenweisen Zusatz von *N*-Benzyl-2-chlor-*N*-hydroxyacetamid (1 Äquivalent, 2.0 g, 10 mmol) in 2 mL trockenem Dimethylformamid zu dem auf 0 °C gekühlten Reaktionsansatz. Der Reaktionsansatz wird auf Raumtemperatur erwärmt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, wobei mittels Dünnschichtchromatographie der Reaktionsfortschritt kontrolliert wird. Nach beendeter Reaktion werden Ethylacetat (40 mL) und 1 M Salzsäure (10 mL) zugegeben. Die wässrige Phase wird abgetrennt und drei Mal mit Ethylacetat (je 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden einmal mit 1 M Salzsäure (10 mL) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Das so erhaltene Rohprodukt wird chromatographisch an Kieselgel mit einem Elutionsmittelgradienten von Ethylacetat/*n*-Hexan (10:90 → 100:0) gereinigt.

**AAV 6: S-Alkylierung von Di-*tert*-butyl( $\alpha$ -mercapto)phosphonat 8 zu *tert*-Butyloxyaminophosphonat 18 bzw. Hydroxyaminophosphonat 29**

$\alpha$ -Mercaptophosphonsäuredi-*tert*-butylester **8** (1 Äquivalent, 3.52 g, 10 mmol) wird unter Schutzgas (Stickstoffatmosphäre) in 10 mL trockenem Dimethylformamid gelöst. Nach der Zugabe von Natriumcarbonat (1.25 Äquivalente, 1.32 g, 12.5 mmol) wird die resultierende Suspension auf eine Temperatur von 0 °C gekühlt. Im Falle der Synthese des *tert*-Butyloxyaminophosphonsäuredi-*tert*-butylesters **18** wird der Suspension tropfenweise bei 0 °C eine Lösung von *N*-(*tert*-Butoxy)-2-chlor-*N*-methylacetamid **66** (1 Äquivalent, 1.80 g, 10 mmol) in 2 mL trockenem Dimethylformamid zugesetzt. Im Falle der Synthese des

Hydroxyaminophosphonsäuredi-*tert*-butylesters **29** wird der Suspension tropfenweise bei 0 °C eine Lösung von 2-Chlor-*N*-hydroxyacetamid (1 Äquivalent, 1.10 g, 10 mmol) in 2 mL trockenem Dimethylformamid zugesetzt. Der Reaktionsansatz wird auf Raumtemperatur erwärmt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, wobei mittels Dünnschichtchromatographie der Reaktionsfortschritt kontrolliert wird. Nach beendeter Reaktion werden Ethylacetat (40 mL) und gesättigte Natriumchlorid-Lösung (10 mL) zugegeben. Die wässrige Phase wird abgetrennt und drei Mal mit Ethylacetat (je 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden fünf Mal mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (10 mL) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer eingengt. Das so erhaltene Rohprodukt wird chromatographisch an Kieselgel mit einem Elutionsmittelgradienten von Ethylacetat/*n*-Hexan (0:100 → 100:0) gereinigt.

**AAV 7: Synthese des Trityloxyaminophosphonats 28 ausgehend von Carbonsäure 9 durch Kupplung mittels CDI in Anlehnung an Lit.<sup>[107,112]</sup>**

2-(((Diethoxyphosphoryl)(phenyl)methyl)thio)essigsäure **9** (1 Äquivalent, 1.59 g, 5 mmol) wird unter Stickstoffatmosphäre in trockenem Tetrahydrofuran (5 mL) gelöst und mit 1,1'-Carbonyldiimidazol (1.1 Äquivalente, 0.89 g, 5.5 mmol) versetzt. Der Ansatz wird eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. *O*-Tritylhydroxylamin (1 Äquivalent, 1.38 g, 5 mmol) wird zugegeben und der Ansatz über Nacht bei Raumtemperatur weiter gerührt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in Ethylacetat (50 mL) aufgenommen. Die organische Phase wird drei Mal mit 10 %iger Citronensäure-Lösung (je 20 mL) und ein Mal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (20 mL) gewaschen. Anschließend wird die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird chromatographisch an Kieselgel mit einem Elutionsmittelgradienten von Ethylacetat/*n*-Hexan (0:100 → 100:0) gereinigt.

**AAV 8: Synthese von Trityloxyaminophosphonat 28 ausgehend von Carbonsäure 9 durch Kupplung mittels EDC in Anlehnung an Lit.<sup>[128]</sup>**

2-(((Diethoxyphosphoryl)(phenyl)methyl)thio)essigsäure **9** (1 Äquivalent, 0.32 g, 1 mmol) wird unter Stickstoffatmosphäre in trockenem Dichlormethan (5 mL) gelöst, erst mit *O*-Tritylhydroxylamin (1 Äquivalent, 0.28 g, 1 mmol), dann mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (1 Äquivalent, 0.19 g, 1 mmol) und anschließend mit *N,N*-

Dimethylpyridin-4-amin (0.2 Äquivalente, 0.02 g, 0.2 mmol) versetzt. Der Ansatz wird bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in Ethylacetat (50 mL) aufgenommen und drei Mal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (je 20 mL), ein Mal mit Wasser (20 mL), ein Mal mit 10 %iger Citronensäure (20 mL) und wieder ein Mal mit Wasser (20 mL) gewaschen. Nach Trocknen der organischen Phase über Natriumsulfat wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wird chromatographisch an Kieselgel mit einer Mischung aus Ethylacetat/*n*-Hexan (50:50) als Elutionsmittel gereinigt.

**AAV 9: Synthese von Trityloxyaminophosphonat 28 ausgehend von Carbonsäure 9 via gemischtem Anhydrid in Anlehnung an Lit.<sup>[217]</sup>**

2-(((Diethoxyphosphoryl)(phenyl)methyl)thio)essigsäure **9** (1 Äquivalent, 1.91 g, 6 mmol) wird unter Stickstoffatmosphäre in trockenem Tetrahydrofuran (60 mL) gelöst und mit 4-Methylmorpholin (1.1 Äquivalente, 0.67 g, 6.6 mmol) versetzt. Die Lösung wird auf -20 °C gekühlt und es wird Chlorameisensäureisobutylester (1.1 Äquivalente, 0.90 g, 6.6 mmol) zugetropft. Der Ansatz wird 10 Minuten bei -20 °C gerührt. *O*-Tritylhydroxylamin (1 Äquivalent, 1.65 g, 6 mmol) wird in trockenem Tetrahydrofuran (12 mL) gelöst und ebenfalls dem Ansatz zugetropft. Der Ansatz wird auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Der entstandene Niederschlag wird abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingeeengt. Dieses wird mit Wasser (30 mL) versetzt und drei Mal mit Ethylacetat extrahiert (je 30 mL). Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird chromatographisch an Kieselgel mit einem Elutionsmittelgradienten von Ethylacetat/*n*-Hexan (0:100 → 100:0) gereinigt.

**AAV 10: Entschützung des Trityloxyaminophosphonats 28 zur freien Hydroxamsäure 20**

Trityloxyaminophosphonat **28** (1 Äquivalent, 0.58 g, 1 mmol) wird in trockenem Dichlormethan (25 mL) unter Schutzgasatmosphäre gelöst und es wird langsam Trifluoressigsäure (8 Äquivalente, 0.91 g, 8 mmol) zugetropft. Anschließend wird Triethylsilan (2 Äquivalente, 0.23 g, 2 mmol) zugegeben. Nachdem die Lösung 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt wurde, wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und

das Rohprodukt chromatographisch an Kieselgel mit einem Elutionsmittelgradienten aus Ethylacetat/*n*-Hexan (0:100 → 100:0) gereinigt.

**AAV 11: Oxidation der Sulfide 10-16, 21-24, 26 und 29 zu den entsprechenden Sulfonen 30-39 bzw. Sulfoxiden 40-42 in Anlehnung an Lit.<sup>[169]</sup>**

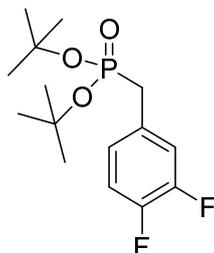
70-75 %ige 3-Chlorperoxybenzoesäure wird unter Stickstoffbegasung in 20 mL trockenem Dichlormethan suspendiert. Die Synthese von Sulfon **37** erfordert die Verwendung von trockenem *N,N*-Dimethylformamid. Im Falle der Synthese der Sulfone **30-39** werden 2.6 Äquivalente (1.14 g, 5.2 mmol) 3-Chlorperoxybenzoesäure verwendet. Für die Synthese der Sulfoxide **40-42** wird 1 Äquivalent (0.44 g, 2 mmol) 3-Chlorperoxybenzoesäure benötigt. Die Suspension wird auf 0 °C gekühlt. Das ausgewählte Sulfid (1 Äquivalent, 2 mmol) wird in 2 mL trockenem Dichlormethan gelöst und dem Ansatz zugegeben. Anschließend wird der Ansatz eine Stunde bei 0 °C gerührt, danach auf Raumtemperatur erwärmt und weitere 12 Stunden gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wird das Rohprodukt auf Kieselgel aufgezogen und chromatographisch an Kieselgel mit einem Elutionsmittelgradienten aus *n*-Hexan und Ethylacetat (100:0 → 0:100) gereinigt.

**AAV 12: TMSBr-vermittelte Konversion der Phosphonsäurediethylester 10-17, 19-27 und 30-42 zu den freien Phosphonsäuren 43-65 in Anlehnung an Lit.<sup>[107,112]</sup>**

Der ausgewählte Phosphonsäurediethylester **10-17, 19-27** oder **30-42** (1 Äquivalent, 1 mmol) wird in über Calciumhydrid getrocknetem und frisch destillierten Dichlormethan (10 mL) gelöst. Die so erhaltene Lösung wird mit Stickstoff begast und in einem Eisbad auf 0 °C gekühlt. Trimethylsilylbromid (5 Äquivalente, 0.66 mL, 5 mmol) wird tropfenweise zugesetzt und der Ansatz 1 Stunde bei 0 °C gerührt. Anschließend wird dieser auf Raumtemperatur erwärmt und für weitere 47 Stunden gerührt. Danach wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wird in trockenem Tetrahydrofuran (10 mL) gelöst und mit Wasser (3 Äquivalente, 0.05 mL, 3 mmol) versetzt. Die resultierende Lösung wird 45 Minuten bei Raumtemperatur gerührt, dann wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand über Nacht im Hochvakuum getrocknet. Kristallisiert das Produkt durch Zugabe von Ethylacetat und *n*-Hexan aus, werden die Kristalle mit Diethylether gewaschen. Ist das Produkt ein Öl, wird es säulenchromatographisch an einer kleinen Menge Kieselgel mit einem Gradienten bestehend aus *n*-Hexan und Ethylacetat als Elutionsmittel (100:0 → 0:100) gereinigt.

## 8.3 Analytische Daten

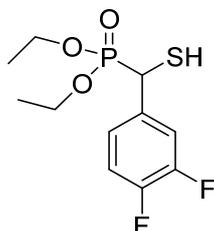
### Di-tert-butyl(3,4-difluorbenzyl)phosphonat 1



Hergestellt aus **Di-tert-butylphosphit** (9.7 g, 50 mmol) und **3,4-Difluorbenzylchlorid** (8.13 g, 50 mmol) nach **AAV 1**.

Ausbeute	85 % weißer Feststoff
Schmelzpunkt	50 °C
<sup>1</sup> H-NMR	500.13 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO=δ (ppm): 7.40-7.32 (m, 1H, H <sub>arom.</sub> ), 7.32-7.23 (m, 1H, H <sub>arom.</sub> ), 7.14-7.05 (m, 1H, H <sub>arom.</sub> ), 3.05 (d, <sup>2</sup> J(H,P)=21.3 Hz, 2H, PCH <sub>2</sub> ), 1.48 (s, 0.26H, CH <sub>3</sub> ), 1.44 (s, 0.45H, CH <sub>3</sub> ), 1.40 (s, 0.88H, CH <sub>3</sub> ), 1.36 (s, 15.3H, CH <sub>3</sub> ), 1.32 (s, 0.92H, CH <sub>3</sub> ), 1.23 (s, 0.19H, CH <sub>3</sub> )
<sup>13</sup> C-NMR	125.76 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO=δ (ppm): 149.34 (ddd, <sup>1</sup> J(C,F)=243.7 Hz, <sup>2</sup> J(C,F)=12.4 Hz, <sup>4</sup> J(C,P)=3.9 Hz, C <sub>arom.</sub> ), 147.40 (ddd, <sup>1</sup> J(C,F)=244.2 Hz, <sup>2</sup> J(C,F)=12.8 Hz, <sup>5</sup> J(C,P)=3.3 Hz, C <sub>arom.</sub> ), 131.67-131.41 (m, C <sub>arom.</sub> ), 126.65-126.39 (m, C <sub>arom.</sub> ), 118.43 (dd, <sup>2</sup> J(C,F)=17.3 Hz, <sup>3</sup> J(C,F)= <sup>3</sup> J(C,P)=6.3 Hz, C <sub>arom.</sub> ), 116.82 (dd, <sup>2</sup> J(C,F)=16.9 Hz, <sup>3</sup> J(C,F)= <sup>4</sup> J(C,P)=2.9 Hz, C <sub>arom.</sub> ), 81.32 (d, <sup>2</sup> J(C,P)=8.5 Hz, POC), 35.96 (d, <sup>1</sup> J(C,P)=141.2 Hz, PC), 29.80 (d, <sup>3</sup> J(C,P)=3.8 Hz, CH <sub>3</sub> )
C <sub>15</sub> H <sub>23</sub> F <sub>2</sub> O <sub>3</sub> P	[320.32]
CHN	Berechnet (%): C 56.25, H 7.24 Gefunden (%): C 56.20, H 7.31

## Diethyl((3,4-difluorphenyl)(mercapto)methyl)phosphonat 2



Hergestellt aus **Diethyl(3,4-difluorbenzyl)phosphonat** (8.72 g, 33 mmol) nach **AAV 2**.

Ausbeute 67 % gelbes Öl

<sup>1</sup>H-NMR 500.13 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO =δ (ppm): 7.57-7.17 (m, 3H, H<sub>arom.</sub>), 4.81 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=20.0 Hz, 0.31H, PCH), 4.76 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=19.2 Hz, 0.26H, PCH), 4.58 (dd, <sup>2</sup>J(H,P)=19.7 Hz, <sup>3</sup>J(H,H)=9.5 Hz, 0.43H, PCH), 4.15-3.99 (m, 2H, POCH<sub>2</sub>), 3.99-3.76 (m, 2H, POCH<sub>2</sub>), 3.68 (d, <sup>3</sup>J(H,H)=<sup>3</sup>J(H,P)=9.5 Hz, SH), 3.65 (d, <sup>3</sup>J(H,H)=<sup>3</sup>J(H,P)=9.5 Hz, SH), 1.31-1.14 (m, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.14-0.97 (m, 3H, CH<sub>3</sub>)

<sup>13</sup>C-NMR 125.76 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 150.16-149.51 (m, C<sub>arom.</sub>), 148.15-147.50 (m, C<sub>arom.</sub>), 135.84-135.66 (m, C<sub>arom.</sub>), 132.47-132.24 (m, C<sub>arom.</sub>), 132.11-131.94 (m, C<sub>arom.</sub>), 126.80-126.46 (m, C<sub>arom.</sub>), 125.81-125.59 (m, C<sub>arom.</sub>), 118.76-118.28 (m, C<sub>arom.</sub>), 117.88-117.04 (m, C<sub>arom.</sub>), 62.96 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.3 Hz, POCH<sub>2</sub>), 62.86 d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.3 Hz, POCH<sub>2</sub>), 62.82 d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.8 Hz, POCH<sub>2</sub>), 62.63 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.9 Hz, POCH<sub>2</sub>), 47.85 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=138.6 Hz, PC), 47.67 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=141.3 Hz, PC), 35.33 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=146.2 Hz, PC), 16.2-15.8 (m, CH<sub>3</sub>)

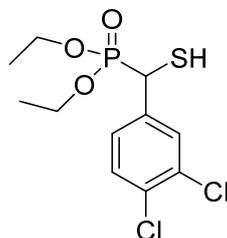
C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>F<sub>2</sub>O<sub>3</sub>PS [296.27]

HRMS (ESI) C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>F<sub>2</sub>O<sub>3</sub>PS+H<sup>+</sup> [M+H<sup>+</sup>]

Berechnet: 297.05203

Gefunden: 297.05215

### Diethyl((3,4-dichlorphenyl)(mercapto)methyl)phosphonat 3



Hergestellt aus **Diethyl(3,4-dichlorbenzyl)phosphonat** (8.62 g, 29 mmol) nach **AAV 2**.

Ausbeute 62 % gelbes Öl

$^1\text{H-NMR}$  500.13 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}=\delta$  (ppm): 8.09 (d,  $J=2.1$  Hz, 0.05H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7.93 (d,  $J=2.1$  Hz, 0.02H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7.92 (d,  $J=2.2$  Hz, 0.03H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7.86 (s, 0.04H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7.82 (s, 0.04H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7.80-7.77 (m, 0.08H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7.73-7.61 (m, 1.2H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7.60-7.48 (m, 0.7H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7.45-7.31 (m, 0.84H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 5.28 (d,  $^2J(\text{H,P})=20.5$  Hz, 0.06H, PCH), 5.04 (d,  $^2J(\text{H,P})=19.8$  Hz, 0.1H, PCH), 5.02 (d,  $^2J(\text{H,P})=20.1$  Hz, 0.11H, PCH), 4.93 (d,  $^2J(\text{H,P})=20.2$  Hz, 0.14H, PCH), 4.88 (d,  $^2J(\text{H,P})=20.1$  Hz, 0.33H, PCH), 4.79 (d,  $^2J(\text{H,P})=19.1$  Hz, 0.26H, PCH), 4.17-3.79 (m, 4H,  $\text{POCH}_2$ ), 1.31-1.15 (m, 3.34H,  $\text{CH}_3$ ), 1.13-0.98 (m, 2.66H,  $\text{CH}_3$ )

$^{13}\text{C-NMR}$  125.76 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}=\delta$  (ppm): 135.66 (d,  $^2J(\text{C,P})=4.6$  Hz,  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 135.40 (d,  $^4J(\text{C,P})=2.9$  Hz,  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 131.63-131.24 (m,  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 130.96-130.44 (m,  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 130.07-129.43 (m,  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 63.14-62.92 (m,  $\text{POCH}_2$ ), 62.59-62.38 (m,  $\text{POCH}_2$ ), 47.61 (d,  $^1J(\text{C,P})=137.5$  Hz, PC), 16.54-15.55 (m,  $\text{CH}_3$ )

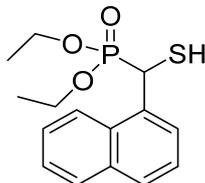
$\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{Cl}_2\text{O}_3\text{PS}$  [329.17]

HRMS (ESI)  $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{Cl}_2\text{O}_3\text{PS}+\text{H}^+$   $[\text{M}+\text{H}^+]$

Berechnet: 328.99293

Gefunden: 328.99298

## Diethyl(mercapto(naphthalen-1-yl)methyl)phosphonat 4



Hergestellt aus **Diethyl(naphthalen-1-ylmethyl)phosphonat** (13.91 g, 50 mmol) nach **AAV 2**.

Ausbeute 84 % gelbes Öl

$^1\text{H-NMR}$  500.13 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}=\delta$  (ppm): 8.30 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7.95 (d,  $^3J(\text{H,H})=7.6$  Hz, 1.20H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7.88 (d,  $^3J(\text{H,H})=7.9$  Hz, 1.80H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7.64–7.46 (m, 3H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 5.32–5.18 (m, 1H, PCH), 4.19–4.10 (m, 2H,  $\text{POCH}_2$ ), 3.87–3.77 (m, 1H,  $\text{POCH}_2$ ), 3.70–3.60 (m, 1H,  $\text{POCH}_2$ ), 3.59–3.52 (m, 1H, SH), 1.25 (t,  $^3J(\text{H,H})=7.0$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 0.85 (t,  $^3J(\text{H,H})=7.0$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ )

$^{13}\text{C-NMR}$  125.76 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}=\delta$  (ppm): 133.91–133.77 (m,  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 133.24 ( $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 130.51 (d,  $J(\text{C,P})=7.6$  Hz,  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 128.60 ( $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 128.02 ( $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 127.27–126.89 (m,  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 126.49–126.08 (m,  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 125.97–125.64 (m,  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 125.43–125.09 (m,  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 123.86–123.22 (m,  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 62.92 (d,  $^2J(\text{C,P})=7.0$  Hz,  $\text{POCH}_2$ ), 32.29–32.17 (m, PC), 31.20–30.84 (m, PC), 16.45–16.13 (m,  $\text{CH}_3$ ), 16.07–15.53 (m,  $\text{CH}_3$ )

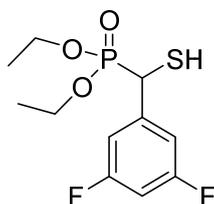
$\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{O}_3\text{PS}$  [310.35]

HRMS (ESI)  $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{O}_3\text{PS}+\text{H}^+$   $[\text{M}+\text{H}^+]$

Berechnet: 311.08653

Gefunden: 311.08691

## Diethyl((3,5-difluorphenyl)(mercapto)methyl)phosphonat 5



Hergestellt aus **Diethyl(3,5-difluorbenzyl)phosphonat** (8.45 g, 32 mmol) nach **AAV 2**.

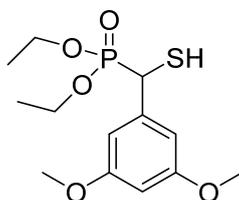
Ausbeute 62 % hellgelber Feststoff

<sup>1</sup>H-NMR 500.13 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 7.32-7.20 (m, 1H, H<sub>arom.</sub>), 7.17 (d, <sup>3</sup>J(H,F)=7.7 Hz, 0.25H, H<sub>arom.</sub>), 7.14 (d, <sup>3</sup>J(H,F)=7.6 Hz, 0.25H, H<sub>arom.</sub>), 7.06 (d, <sup>3</sup>J(H,F)=6.4 Hz, 1.5H, H<sub>arom.</sub>), 5.05 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=20.2 Hz, 0.02H, PCH), 5.03 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=19.9 Hz, 0.1H, PCH), 4.94 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=20.1 Hz, 0.15H, PCH), 4.91 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=20.2 Hz, 0.41H, PCH), 4.84 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=19.1 Hz, 0.32H, PCH), 4.17-4.01 (m, 2H, POCH<sub>2</sub>), 4.00-3.91 (m, 1H, POCH<sub>2</sub>), 3.91-3.80 (m, 1H, POCH<sub>2</sub>), 1.25 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 1.3H, CH<sub>3</sub>), 1.21 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=6.9 Hz, 1.7H, CH<sub>3</sub>), 1.07 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>)

<sup>13</sup>C-NMR 125.76 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 162.04 (dd, <sup>1</sup>J(C,F)=245.9 Hz, <sup>3</sup>J(C,F)=12.8 Hz, C<sub>arom.</sub>), 139.21-138.84 (m, C<sub>arom.</sub>), 138.73-138.39 (m, C<sub>arom.</sub>), 113.16-112.44 (m, C<sub>arom.</sub>), 103.96-103.45 (m, C<sub>arom.</sub>), 63.20-62.89 (m, POCH<sub>2</sub>), 48.17 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=137.2 Hz, PC), 47.85 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=139.3 Hz, PC), 16.58-15.52 (m, CH<sub>3</sub>)

C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>F<sub>2</sub>O<sub>3</sub>PS [296.27]

## Diethyl((3,5-dimethoxyphenyl)(mercapto)methyl)phosphonat 6



Hergestellt aus **Diethyl(3,5-dimethoxybenzyl)phosphonat** (14.41 g, 50 mmol) nach **AAV 2**.

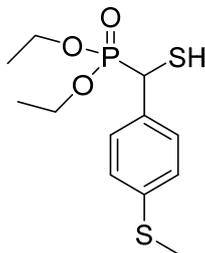
Ausbeute 57 % gelbes Öl

$^1\text{H-NMR}$  500.13 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}=\delta$  (ppm): 6.66-6.62 (m, 1.28H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 6.62-6.60 (m, 0.16H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 6.60-6.58 (m, 0.16H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 6.54-6.50 (m, 0.3H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 6.50-6.45 (m, 0.32H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 6.44-6.38 (m, 0.78H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 4.63 (d,  $^2J(\text{H,P})=19.2$  Hz, 0.06H, PCH), 4.53 (d,  $^2J(\text{H,P})=19.8$  Hz, 0.07H, PCH), 4.47 (d,  $^2J(\text{H,P})=18.3$  Hz, 0.12H, PCH), 4.39 (dd,  $^2J(\text{H,P})=18.9$  Hz,  $^3J(\text{H,H})=9.1$  Hz, 0.64H, PCH), 4.31 (d,  $^2J(\text{H,P})=19.0$  Hz, 0.11H, PCH), 4.16-3.99 (m, 2H,  $\text{POCH}_2$ ), 3.96-3.86 (m, 1H,  $\text{POCH}_2$ ), 3.85-3.76 (m, 1H,  $\text{POCH}_2$ ), 3.75-3.70 (m, 6H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.44 (d,  $^3J(\text{H,H})=^3J(\text{H,P})=9.2$  Hz, SH), 3.42 (d,  $^3J(\text{H,H})=^3J(\text{H,P})=9.2$  Hz, SH), 1.24 (t,  $^3J(\text{H,H})=7.0$  Hz, 3H,  $\text{CCH}_3$ ), 1.07 (t,  $^3J(\text{H,H})=7.0$  Hz, 3H,  $\text{CCH}_3$ )

$^{13}\text{C-NMR}$  125.76 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}=\delta$  (ppm): 160.15-160.00 (m,  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 139.76 (d,  $^2J(\text{C,P})=2.7$  Hz,  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 106.99 (d,  $^3J(\text{C,P})=6.4$  Hz,  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 99.05 (d,  $^5J(\text{C,P})=2.0$  Hz,  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 62.66 (d,  $^2J(\text{C,P})=7.0$  Hz,  $\text{POCH}_2$ ), 62.57 (d,  $^2J(\text{C,P})=7.1$  Hz,  $\text{POCH}_2$ ), 55.20-54.97 (m,  $\text{OCH}_3$ ), 36.47 (d,  $^1J(\text{C,P})=145.5$  Hz, PC), 16.21 (d,  $^3J(\text{C,P})=5.7$  Hz,  $\text{CCH}_3$ ), 15.97 (d,  $^3J(\text{C,P})=5.9$  Hz,  $\text{CCH}_3$ )

$\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{O}_5\text{PS}$  [320.34]

## Diethyl(mercapto(4-(methylthio)phenyl)methyl)phosphonat 7



Hergestellt aus **Diethyl(mercapto(4-(methylthio)phenyl)methyl)phosphonat** (16.46 g, 60 mmol) nach **AAV 2**.

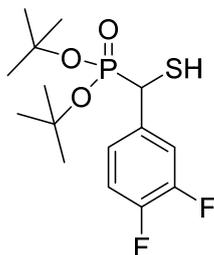
Ausbeute 69 % braunes Öl

$^1\text{H-NMR}$  600.22 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}=\delta$  (ppm): 7.39 (dd,  $^3J(\text{H,H})=8.4$  Hz,  $^4J(\text{H,H})=1.9$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7.31-7.25 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7.25-7.18 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 4.54 (d,  $^2J(\text{H,P})=18.8$  Hz, 0.20H, PCH), 4.47 (dd,  $^2J(\text{H,P})=19.0$  Hz,  $^3J(\text{H,H})=8.9$  Hz, 0.71H, PCH), 4.43 (m, 0.09H, PCH), 4.12-3.98 (m, 2H,  $\text{POCH}_2$ ), 3.40-3.84 (m, 1H,  $\text{POCH}_2$ ), 3.84-3.73 (m, 1H,  $\text{POCH}_2$ ), 3.40 (d,  $^3J(\text{H,H})=^3J(\text{H,P})=8.9$  Hz, SH), 3.38 (d,  $^3J(\text{H,H})=^3J(\text{H,P})=8.9$  Hz, SH), 2.48 (s, 0.96H,  $\text{SCH}_3$ ), 2.48-2.47 (m, 0.3H,  $\text{SCH}_3$ ), 2.46 (s, 1.64H,  $\text{SCH}_3$ ), 2.45-2.44 (m, 0.1H,  $\text{SCH}_3$ ), 1.27-1.15 (m, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.14-1.01 (m, 3H,  $\text{CH}_3$ )

$^{13}\text{C-NMR}$  150.93 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}=\delta$  (ppm): 137.39 (d,  $^5J(\text{C,P})=2.5$  Hz,  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 134.00 (d,  $^2J(\text{C,P})=3.5$  Hz,  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 130.27-130.08 (m,  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 129.21 (d,  $^3J(\text{C,P})=6.2$  Hz,  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 125.53 ( $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 125.40 (d,  $^3J(\text{C,P})=4.4$  Hz,  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 62.7 (d,  $^2J(\text{C,P})=6.8$  Hz,  $\text{POCH}_2$ ), 62.5 (d,  $^2J(\text{C,P})=6.7$  Hz,  $\text{POCH}_2$ ), 35.9 (d,  $^1J(\text{C,P})=146.2$  Hz, PC), 14.5 ( $\text{SCH}_3$ ), 14.3 ( $\text{SCH}_3$ )

$\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{O}_3\text{PS}_2$  [306.37]

## Di-tert-butyl((3,4-difluorophenyl)(mercapto)methyl)phosphonat 8



Hergestellt aus **1** (13.77 g, 43 mmol) nach **AAV 2**.

Ausbeute 54 % weißer Feststoff

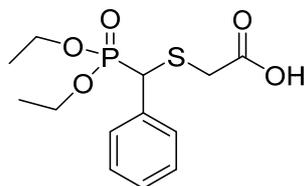
Schmelzpunkt 62 °C

<sup>1</sup>H-NMR 600.22 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 7.51-7.44 (m, 0.9H, H<sub>arom.</sub>), 7.43-7.34 (m, 1H, H<sub>arom.</sub>), 7.31-7.25 (m, 0.8H, H<sub>arom.</sub>), 7.23-7.19 (m, 0.2H, H<sub>arom.</sub>), 7.13-7.08 (m, 0.2H, H<sub>arom.</sub>), 4.48 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=19.6 Hz, 0.03H, PCH), 4.43 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=19.3 Hz, 0.08H, PCH), 4.38 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=19.5 Hz, 0.05H, PCH), 4.33 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=19.9 Hz, 0.04H, PCH), 4.26 (dd, <sup>2</sup>J(H,P)=19.2 Hz, <sup>3</sup>J(H,H)=8.4 Hz, 0.71H, PCH), 4.07 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=19.0 Hz, 0.09H, PCH), 3.35 (d, <sup>3</sup>J(H,H)=<sup>3</sup>J(H,P)=8.4 Hz, SH), 3.34-3.33 (m, SH), 1.41 (s, 6.63H, CH<sub>3</sub>), 1.39-1.37 (m, 0.56H, CH<sub>3</sub>), 1.37-1.35 (m, 0.88H, CH<sub>3</sub>), 1.34 (s, 1.08H, CH<sub>3</sub>), 1.33 (s, 1.21H, CH<sub>3</sub>), 1.32 (s, 5.89H, CH<sub>3</sub>), 1.30 (s, 1.75H, CH<sub>3</sub>)

<sup>13</sup>C-NMR 150.93 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 148.65 (dd, <sup>1</sup>J(C,F)=244.9 Hz, <sup>2</sup>J(C,F)=12.2 Hz, C<sub>arom.</sub>), 148.40 (dd, <sup>1</sup>J(C,F)=243.9 Hz, <sup>2</sup>J(C,F)=11.3 Hz, C<sub>arom.</sub>), 136.79-136.58 (m, C<sub>arom.</sub>), 125.90 (C<sub>arom.</sub>), 117.86 (dd, <sup>2</sup>J(C,F)=18.0 Hz, <sup>3</sup>J(C,F)=<sup>3</sup>J(C,P)=5.3 Hz, C<sub>arom.</sub>), 116.76 (d, <sup>2</sup>J(C,F)=16.9 Hz, C<sub>arom.</sub>), 82.60 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=9.2 Hz, POC), 82.57 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=9.0 Hz, POC), 38.42 (PC), 29.84 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=3.2 Hz, CH<sub>3</sub>), 29.80-29.70 (m, CH<sub>3</sub>), 29.62 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=3.1 Hz, CH<sub>3</sub>)

C<sub>15</sub>H<sub>23</sub>F<sub>2</sub>O<sub>3</sub>PS [352.38]

## 2-(((Diethoxyphosphoryl)(phenyl)methyl)thio)essigsäure 9



Hergestellt aus **Diethyl(mercapto(phenyl)methyl)phosphonat** (1.30 g, 5 mmol) nach **AAV 4**.

Ausbeute 82 % farbloses Öl

$^1\text{H-NMR}$  500.13 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}=\delta$  (ppm): 12.71 (br. s, 1H, OH), 7.43-7.38 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7.38-7.33 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7.33-7.27 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 4.57 (d,  $^2J(\text{H,P})=18.8$  Hz, 0.07H, PCH), 4.47 (d,  $^2J(\text{H,P})=19.6$  Hz, 0.84H, PCH), 4.44 (d,  $^2J(\text{H,P})=19.2$  Hz, 0.09H, PCH), 4.11-3.99 (m, 2H,  $\text{POCH}_2$ ), 3.95-3.84 (m, 1H,  $\text{POCH}_2$ ), 3.83-3.73 (m, 1H,  $\text{POCH}_2$ ), 3.38-3.34 (m, 1H,  $\text{SCH}_2$ ), 3.15 (d,  $^2J(\text{H,H})=15.2$  Hz, 1H,  $\text{SCH}_2$ ), 1.22 (t,  $^3J(\text{H,H})=7.0$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.04 (t,  $^3J(\text{H,H})=7.0$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ )

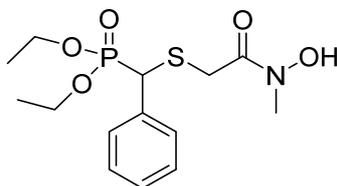
$^{13}\text{C-NMR}$  125.76 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}=\delta$  (ppm): 170.57 (C=O), 135.05 (d,  $^2J(\text{C,P})=5.0$  Hz,  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 129.14 (d,  $^3J(\text{C,P})=6.4$  Hz,  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 128.33 ( $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 127.70 ( $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 62.62 (d,  $^2J(\text{C,P})=6.5$  Hz,  $\text{POCH}_2$ ), 62.49 (d,  $^2J(\text{C,P})=7.0$  Hz,  $\text{POCH}_2$ ), 43.88 (d,  $^1J(\text{C,P})=144.0$  Hz, PC), 33.32 (d,  $^3J(\text{C,P})=7.0$  Hz,  $\text{SCH}_2$ ), 16.14 (d,  $^3J(\text{C,P})=5.5$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 15.92 (d,  $^3J(\text{C,P})=5.5$  Hz,  $\text{CH}_3$ )

$\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{O}_5\text{PS}$  [318.33]

CHN Berechnet (%): C 49.05, H 6.02

Gefunden (%): C 49.23, H 6.28

## Diethyl(((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)thio)(phenyl)methyl)phosphonat 10



Hergestellt aus **Diethyl(mercapto(phenyl)methyl)phosphonat** (9.63 g, 37 mmol) nach **AAV 5**.

Ausbeute 41 % weißer Feststoff

Schmelzpunkt 79 °C

<sup>1</sup>H-NMR 500.13 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 10.02 (br. s, 1H, OH), 7.44-7.39 (m, 2H, H<sub>arom.</sub>), 7.38-7.32 (m, 2H, H<sub>arom.</sub>), 7.32-7.26 (m, 1H, H<sub>arom.</sub>), 4.57 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=19.7 Hz, 1H, PCH), 4.12-3.99 (m, 2H, POCH<sub>2</sub>), 3.95-3.84 (m, 1H, POCH<sub>2</sub>), 3.84-3.73 (m, 1H, POCH<sub>2</sub>), 3.53 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.7 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 3.34 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.7 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 3.06 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 1.22 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.04 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>)

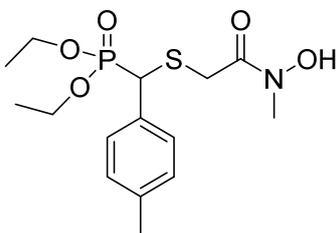
<sup>13</sup>C-NMR 125.76 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 168.41 (C=O), 135.55 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=4.2 Hz, C<sub>arom.</sub>), 129.12 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=6.4 Hz, C<sub>arom.</sub>), 128.23 (C<sub>arom.</sub>), 127.52 (C<sub>arom.</sub>), 62.50 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.9 Hz, POCH<sub>2</sub>), 62.42 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.9 Hz, POCH<sub>2</sub>), 43.37 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=143.6 Hz, PC), 35.72 (NCH<sub>3</sub>), 32.12 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=6.6 Hz, SCH<sub>2</sub>), 16.13 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.6 Hz, CH<sub>3</sub>), 15.92 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.5 Hz, CH<sub>3</sub>)

C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>5</sub>PS [347.37]

CHN Berechnet (%): C 48.41, H 6.38, N 4.03

Gefunden (%): C 48.58, H 6.51, N 3.87

## Diethyl(((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)thio)(*p*-tolyl)methyl)phosphonat 11



Hergestellt aus **Diethyl(mercapto(*p*-tolyl)methyl)phosphonat** (4.11 g, 15 mmol) nach **AAV 5**.

Ausbeute 27 % weißer Feststoff

Schmelzpunkt 57 °C

<sup>1</sup>H-NMR 500.13 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 10.00 (br. s, 1H, OH), 7.29 (d, <sup>3</sup>J(H,H)=7.8 Hz, 2H, H<sub>arom.</sub>), 7.15 (d, <sup>3</sup>J(H,H)=7.8 Hz, 2H, H<sub>arom.</sub>), 4.52 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=19.6 Hz, 1H, PCH), 4.12–3.97 (m, 2H, POCH<sub>2</sub>), 3.94–3.84 (m, 1H, POCH<sub>2</sub>), 3.84–3.72 (m, 1H, POCH<sub>2</sub>), 3.51 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.8 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 3.30–3.26 (m, 1H, SCH<sub>2</sub>), 3.13–3.00 (m, 3H, NCH<sub>3</sub>), 2.34–2.23 (m, 3H, CH<sub>3arom.</sub>), 1.22 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.06 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>)

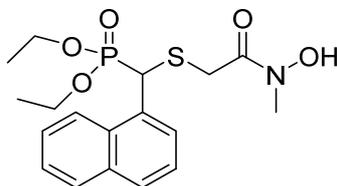
<sup>13</sup>C-NMR 125.76 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 168.46 (C=O), 136.71 (d, <sup>5</sup>J(C,P)=1.9 Hz, C<sub>arom.</sub>), 132.38 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=4.5 Hz, C<sub>arom.</sub>), 129.00 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=6.4 Hz, C<sub>arom.</sub>), 128.79 (C<sub>arom.</sub>), 62.42 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=7.2 Hz, POCH<sub>2</sub>), 62.35 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=7.0 Hz, POCH<sub>2</sub>), 43.06 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=144.2 Hz, PC), 35.71 (NCH<sub>3</sub>), 32.00 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=6.5 Hz, SCH<sub>2</sub>), 20.60 (CH<sub>3arom.</sub>), 16.13 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.6 Hz, CH<sub>3</sub>), 15.95 ppm (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.6 Hz, CH<sub>3</sub>)

C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>5</sub>PS [361.39]

CHN Berechnet (%): C 49.85, H 6.69, N 3.88, S 8.87

Gefunden (%): C 49.74, H 6.73, N 3.70, S 8.92

**Diethyl(((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)thio)(naphthalen-1-yl)methyl)-phosphonat 12**



Hergestellt aus **4** (6.21 g, 20 mmol) nach **AAV 5**.

Ausbeute 70 % weißer Feststoff

Schmelzpunkt 85 °C

<sup>1</sup>H-NMR 500.13 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 10.02 (br. s, 1H, OH), 8.22 (d, <sup>3</sup>J(H,H)=7.6 Hz, 1H, H<sub>arom.</sub>), 7.96 (d, <sup>3</sup>J(H,H)=7.8 Hz, 1H, H<sub>arom.</sub>), 7.89 (d, <sup>3</sup>J(H,H)=8.0 Hz, 1H, H<sub>arom.</sub>), 7.87-7.81 (m, 1H, H<sub>arom.</sub>), 7.62-7.50 (m, 3H, H<sub>arom.</sub>), 5.49 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=19.6 Hz, 1H, PCH), 4.13-4.04 (m, 2H, POCH<sub>2</sub>) 3.90-3.80 (m, 1H, SCH<sub>2</sub>), 3.76-3.64 (m, 2H, POCH<sub>2</sub>), 3.43-3.37 (m, 1H, SCH<sub>2</sub>), 3.06 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 1.24-1.17 (m, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.94-0.86 (m, 3H, CH<sub>3</sub>)

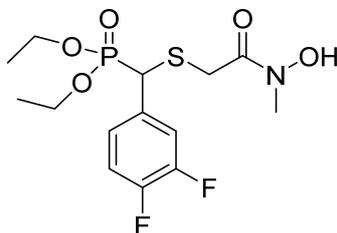
<sup>13</sup>C-NMR 125.76 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 168.60 (C=O), 133.23 (d, J(C,P)=7.5 Hz, C<sub>arom.</sub>), 131.65 (d, J(C,P)=1.8 Hz, C<sub>arom.</sub>), 131.32-130.95 (m, C<sub>arom.</sub>), 128.61 (C<sub>arom.</sub>), 128.08 (C<sub>arom.</sub>), 127.16 (d, J(C,P)=7.5 Hz, C<sub>arom.</sub>), 126.41-126.24 (m, C<sub>arom.</sub>), 125.78 (C<sub>arom.</sub>), 125.22 (C<sub>arom.</sub>), 123.37-123.18 (m, C<sub>arom.</sub>), 62.56 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=7.0 Hz, POCH<sub>2</sub>), 37.46 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=147.51 Hz, PC), 35.72 (NCH<sub>3</sub>), 32.43-32.15 (m, SCH<sub>2</sub>), 16.16 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.8 Hz, CH<sub>3</sub>), 15.80 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.7 Hz, CH<sub>3</sub>)

C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>5</sub>PS [397.43]

CHN Berechnet (%): C 54.40, H 6.09, N 3.52

Gefunden (%): C 54.52, H 6.14, N 3.47

**Diethyl((3,4-difluorphenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)thio)methyl)-phosphonat 13**



Hergestellt aus **2** (2.96 g 20 mmol) nach **AAV 5**.

Ausbeute 44 % weißer Feststoff

Schmelzpunkt 102 °C

<sup>1</sup>H-NMR 500.13 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 10.02 (br. s, 1H, OH), 7.47–7.41 (m, 2H, H<sub>arom.</sub>), 7.28–7.26 (m, 1H, H<sub>arom.</sub>), 4.64 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=20.3 Hz, 1H, PCH), 4.12–4.04 (m, 2H, POCH<sub>2</sub>), 3.97–3.89 (m, 1H, POCH<sub>2</sub>), 3.89–3.82 (m, 1H, POCH<sub>2</sub>), 3.52 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.8 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 3.38 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.9 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 3.05 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 1.23 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.08 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>)

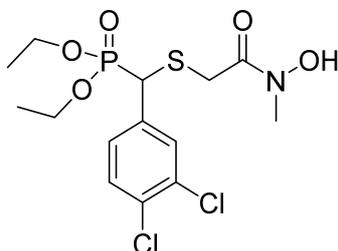
<sup>13</sup>C-NMR 125.76 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 168.11 (C=O), 149.97-149.52 (m, C<sub>arom.</sub>), 148.06-147.56 (m, C<sub>arom.</sub>), 133.57 (C<sub>arom.</sub>), 126.19-125.98 (m, C<sub>arom.</sub>), 117.88 (dd, <sup>2</sup>J(C,F)=17.5 Hz, <sup>3</sup>J(C,F)=<sup>3</sup>J(C,P)=6.2 Hz, C<sub>arom.</sub>), 117.32 (d, <sup>2</sup>J(C,F)=17.3 Hz, C<sub>arom.</sub>), 62.74 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=7.2 Hz, POCH<sub>2</sub>), 62.66 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=7.3 Hz, POCH<sub>2</sub>), 42.49 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=144.1 Hz, PC), 35.72 (NCH<sub>3</sub>), 32.37 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=7.6 Hz, SCH<sub>2</sub>), 16.12 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.7 Hz, CH<sub>3</sub>), 15.96 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.5 Hz, CH<sub>3</sub>)

C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>F<sub>2</sub>NO<sub>5</sub>PS [383.35]

CHN Berechnet (%): C 43.86, H 5.26, N 3.65

Gefunden (%): C 44.09, H 5.41, N 3.55

**Diethyl((3,4-dichlorphenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)thio)methyl)-phosphonat 14**



Hergestellt aus **3** (5.93 g, 18 mmol) nach **AAV 5**.

Ausbeute 51 % weißer Feststoff

Schmelzpunkt 86 °C

<sup>1</sup>H-NMR 500.13 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 10.03 (br. s, 1H, OH), 7.67–7.62 (m, 2H, H<sub>arom.</sub>), 7.44–7.39 (m, 1H, H<sub>arom.</sub>), 4.67 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=20.5 Hz, 1H, PCH), 4.12–4.03 (m, 2H, POCH<sub>2</sub>), 3.99–3.83 (m, 2H, POCH<sub>2</sub>), 3.51 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.8 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 3.40 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.9 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 3.05 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 1.23 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.09 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>)

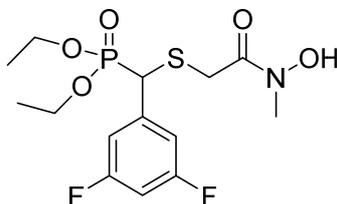
<sup>13</sup>C-NMR 125.76 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 168.03 (C=O), 137.14 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=4.2 Hz, C<sub>arom.</sub>), 130.81 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=6.5 Hz, C<sub>arom.</sub>), 130.73 (C<sub>arom.</sub>), 130.49 (C<sub>arom.</sub>), 130.15 (d, <sup>4</sup>J(C,P)=2.8 Hz, C<sub>arom.</sub>), 129.38 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=6.2 Hz, C<sub>arom.</sub>), 62.84 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.8 Hz, POCH<sub>2</sub>), 62.70 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.9 Hz, POCH<sub>2</sub>), 42.41 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=143.0 Hz, PC), 35.72 (NCH<sub>3</sub>), 32.53 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=7.6 Hz, SCH<sub>2</sub>), 16.12 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.7 Hz, CH<sub>3</sub>), 15.96 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.5 Hz, CH<sub>3</sub>)

C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>5</sub>PS [416.25]

CHN Berechnet (%): C 40.40, H 4.84, N 3.36

Gefunden (%): C 40.65, H 4.83, N 3.30

**Diethyl((3,5-difluorphenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)thio)methyl)-phosphonat 15**



Hergestellt aus **5** (4.44 g, 15 mmol) nach **AAV 5**.

Ausbeute 31 % weißer Feststoff

Schmelzpunkt 80 °C

<sup>1</sup>H-NMR 500.13 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 10.04 (br. s, 1H, OH), 7.26–7.17 (m, 1H, H<sub>arom.</sub>), 7.12 (d, <sup>3</sup>J(H,F)=7.1 Hz, 2H, H<sub>arom.</sub>), 4.69 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=20.5 Hz, 1H, PCH), 4.15–4.03 (m, 2H, POCH<sub>2</sub>), 4.01–3.82 (m, 2H, POCH<sub>2</sub>), 3.53 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.8 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 3.42 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.9 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 3.05 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 1.23 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=6.9 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.09 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>)

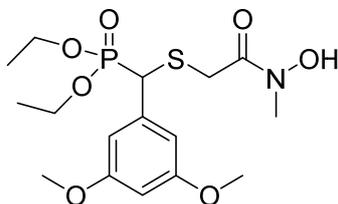
<sup>13</sup>C-NMR 125.76 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 168.04 (C=O), 161.93 (dd, <sup>1</sup>J(C,F)=246.3 Hz, <sup>3</sup>J(C,F)=13.4 Hz, C<sub>arom.</sub>), 140.61–140.45 (m, C<sub>arom.</sub>), 112.27 (dd, <sup>2</sup>J(C,F)=26.3 Hz, <sup>4</sup>J(C,F)=<sup>3</sup>J(C,P)=5.9 Hz, C<sub>arom.</sub>), 103.55–102.96 (m, C<sub>arom.</sub>), 62.89 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.7 Hz, POCH<sub>2</sub>), 62.77 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.8 Hz, POCH<sub>2</sub>), 42.96 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=142.3 Hz, PC), 35.73 (NCH<sub>3</sub>), 32.60 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=7.7 Hz, SCH<sub>2</sub>), 16.12 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.6 Hz, CH<sub>3</sub>), 15.95 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.4 Hz, CH<sub>3</sub>)

C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>F<sub>2</sub>NO<sub>5</sub>PS [383.35]

CHN Berechnet (%): C 43.86, H 5.26, N 3.65

Gefunden (%): C 43.90, H 5.24, N 3.71

**Diethyl((3,5-dimethoxyphenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)thio)methyl)-phosphonat 16**



Hergestellt aus **6** (3.20 g, 10 mmol) nach **AAV 5**.

Ausbeute 37 % weißer Feststoff

Schmelzpunkt 111 °C

<sup>1</sup>H-NMR 500.13 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 10.03 (br. s, 1H, OH), 6.61–6.55 (m, 2H, H<sub>arom.</sub>), 6.47–6.41 (m, 1H, H<sub>arom.</sub>), 4.48 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=19.6 Hz, 1H, PCH), 4.11–4.00 (m, 2H, POCH<sub>2</sub>), 3.97–3.89 (m, 1H, POCH<sub>2</sub>), 3.88–3.79 (m, 1H, POCH<sub>2</sub>), 3.73 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3.53 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.9 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 3.38 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.6 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 3.07 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 1.23 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 3H, CCH<sub>3</sub>), 1.09 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 3H, CCH<sub>3</sub>)

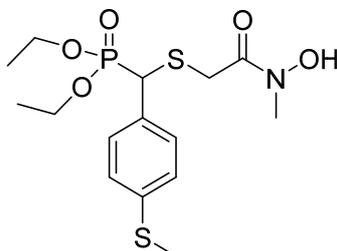
<sup>13</sup>C-NMR 125.76 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 168.43 (C=O), 160.11 (C<sub>arom.</sub>), 137.75 (C<sub>arom.</sub>), 107.37 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=6.6 Hz, C<sub>arom.</sub>), 99.08 (C<sub>arom.</sub>), 62.6 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.6 Hz, POCH<sub>2</sub>), 62.5 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.7 Hz, POCH<sub>2</sub>), 55.10 (OCH<sub>3</sub>), 43.46 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=143.0 Hz, PC), 35.74 (NCH<sub>3</sub>), 32.36 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=7.3 Hz, SCH<sub>2</sub>), 16.17 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.5 Hz, CCH<sub>3</sub>), 16.00 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.8 Hz, CCH<sub>3</sub>)

C<sub>16</sub>H<sub>26</sub>NO<sub>7</sub>PS [407.42]

CHN Berechnet (%): C 47.17, H 6.43, N 3.44

Gefunden (%): C 47.24, H 6.26, N 3.34

**Diethyl(((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)thio)(4-(methylthio)phenyl)methyl)-phosphonat 17**



Hergestellt aus **7** (6.13 g, 20 mmol) nach **AAV 5**.

Ausbeute 42 % weißer Feststoff

Schmelzpunkt 78 °C

<sup>1</sup>H-NMR 600.22 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 10.01 (br. s, 1H, OH), 7.34 (d, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 2H, H<sub>arom.</sub>), 7.24 (d, <sup>3</sup>J(H,H)=8.2 Hz, 2H, H<sub>arom.</sub>), 4.55 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=19.8 Hz, 1H, PCH), 4.11–3.99 (m, 2H, POCH<sub>2</sub>), 3.95–3.88 (m, 1H, POCH<sub>2</sub>), 3.86–3.77 (m, 1H, POCH<sub>2</sub>), 3.52 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.8 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 3.32 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.8 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 2.47 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>), 1.22 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.08 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>)

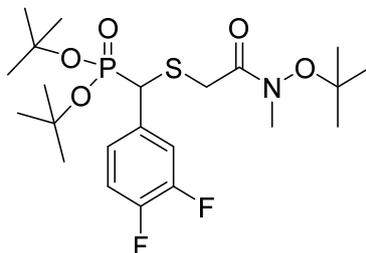
<sup>13</sup>C-NMR 150.93 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 168.38 (C=O), 137.48 (d, <sup>5</sup>J(C,P)=1.6 Hz, C<sub>arom.</sub>), 131.89 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=4.2 Hz, C<sub>arom.</sub>), 129.62 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=6.4 Hz, C<sub>arom.</sub>), 125.49 (C<sub>arom.</sub>), 62.48 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.3 Hz, POCH<sub>2</sub>), 62.45 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.4 Hz, POCH<sub>2</sub>), 42.91 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=144.0 Hz, PC), 35.72 (NCH<sub>3</sub>), 32.07 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=6.5 Hz, SCH<sub>2</sub>), 16.14 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.7 Hz, CH<sub>3</sub>), 15.98 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.4 Hz, CH<sub>3</sub>), 14.39 (SCH<sub>3</sub>)

C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>5</sub>PS<sub>2</sub> [393.45]

CHN Berechnet (%): C 45.79, H 6.15, N 3.56, S 16.30

Gefunden (%): C 45.60, H 6.04, N 3.30, S 16.30

**Di-tert-butyl(((2-(tert-butoxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)thio)(3,4-difluorophenyl)-methyl)phosphonat 18**



Hergestellt aus **8** (3.17 g, 9 mmol) nach **AAV 6**.

Ausbeute 35 % farbloses Öl

<sup>1</sup>H-NMR 500.13 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 7.48-7.34 (m, 2H, H<sub>arom.</sub>), 7.27-7.18 (m, 1H, H<sub>arom.</sub>), 4.37 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=20.1 Hz, 1H, PCH), 3.49 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=15.0 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 3.25 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.9 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 3.14 (s, 0.23H, NCH<sub>3</sub>), 3.10 (s, 2.63, NCH<sub>3</sub>), 3.06 (s, 0.14H, NCH<sub>3</sub>), 1.42 (s, 0.41H, POCCH<sub>3</sub>), 1.41 (s, 0.69H, POCCH<sub>3</sub>), 1.38 (s, 7.28H, POCCH<sub>3</sub>), 1.37 (s, 7.28H, POCCH<sub>3</sub>), 1.34 (s, 0.63H, POCCH<sub>3</sub>), 1.33 (s, 0.61H, POCCH<sub>3</sub>), 1.30 (s, 0.63H, POCCH<sub>3</sub>), 1.27 (s, 0.2H, POCCH<sub>3</sub>), 1.25 (s, 0.27H, POCCH<sub>3</sub>), 1.20 (s, 0.27H, NOCCH<sub>3</sub>) 1.19 (s, 0.34H, NOCCH<sub>3</sub>), 1.15 (s, 8.05H, NOCCH<sub>3</sub>), 1.11 (s, 0.34H, NOCCH<sub>3</sub>)

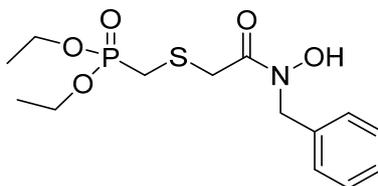
<sup>13</sup>C-NMR 125.76 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 149.93-149.42 (m, C<sub>arom.</sub>) 148.15-147.39 (m, C<sub>arom.</sub>), 134.52-134.33 (m, C<sub>arom.</sub>), 126.56-126.32 (m, C<sub>arom.</sub>), 118.05 (dd, <sup>2</sup>J(C,F)=17.9 Hz, <sup>3</sup>J(C,F)=<sup>3</sup>J(C,P)=6.0 Hz, C<sub>arom.</sub>), 116.93 (d, <sup>2</sup>J(C,F)=17.7 Hz, C<sub>arom.</sub>), 82.74 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=9.2 Hz, POC), 82.54 (NOC), 46.05 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=147.7 Hz, PC), 32.40-32.06 (m, SCH<sub>2</sub>), 29.79 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=3.8 Hz, POCCH<sub>3</sub>), 29.66 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=3.8 Hz, POCCH<sub>3</sub>), 26.94 (NOCCH<sub>3</sub>)\*

C<sub>22</sub>H<sub>36</sub>F<sub>2</sub>NO<sub>5</sub>PS [495.56]

CHN Berechnet (%): C 53.32, H 7.32, N 2.83, S 6.47  
Gefunden (%): C 53.11, H 7.12, N 2.77, S 6.69

\*Die Signale der Carbonylfunktion und der N-Methylgruppe konnten nicht detektiert werden.

## Diethyl(((2-(benzyl(hydroxy)amino)-2-oxoethyl)thio)methyl)phosphonat 19



Hergestellt aus **Diethyl(mercaptomethyl)phosphonat** (1.20 g, 6 mmol) nach **AAV 5**.

Ausbeute 8 % farbloses Öl

$^1\text{H-NMR}$  600.22 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}=\delta$  (ppm): 10.07 (br. s, 1H, OH), 7.37-7.32 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7.31-7.24 (m, 3H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 4.69 (s, 2H,  $\text{PCH}_2$ ), 4.08-3.99 (m, 4H,  $\text{POCH}_2$ ), 3.72 (s, 2H,  $\text{NCH}_2$ ), 3.01 (d,  $^2J(\text{H,H})=12.8$  Hz, 2H,  $\text{SCH}_2$ ), 1.24 (t,  $^3J(\text{H,H})=7.0$  Hz, 6H,  $\text{CH}_3$ )

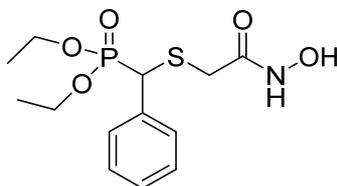
$^{13}\text{C-NMR}$  150.93 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}=\delta$  (ppm): 168.86 (C=O), 136.63 ( $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 128.36-128.10 (m,  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 127.95-127.67 (m,  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 127.26-127.02 (m,  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 61.77 (d,  $^2J(\text{C,P})=6.4$  Hz,  $\text{POCH}_2$ ), 51.28 ( $\text{NCH}_2$ ), 32.93 (d,  $^3J(\text{C,P})=3.2$  Hz,  $\text{SCH}_2$ ), 23.45 (d,  $^1J(\text{C,P})=145.5$  Hz, PC), 16.17 (d,  $^3J(\text{C,P})=5.8$  Hz,  $\text{CH}_3$ )

$\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{NO}_5\text{PS}$  [347.37]

CHN Berechnet (%): C 48.41, H 6.38, N 4.03, S 9.23

Gefunden (%): C 48.67, H 6.48, N 4.09, S 9.31

## Diethyl(((2-hydroxyamino)-2-oxoethyl)thio)(phenyl)methyl)phosphonat 20



Hergestellt aus **Diethyl(mercapto(phenyl)methyl)phosphonat** (0.26 g, 1 mmol) nach **AAV 5**.

Ausbeute 15 % farbloses Öl

Hergestellt aus **29** (0.58 g, 1 mmol) nach **AAV 10**.

Ausbeute 75 % farbloses Öl

<sup>1</sup>H-NMR 500.13 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 10.59 (br. s, 1H, NH), 8.94 (br. s, 1H, OH), 7.44–7.41 (m, 2H, H<sub>arom.</sub>), 7.37–7.34 (m, 2H, H<sub>arom.</sub>), 7.31–7.28 (m, 1H, H<sub>arom.</sub>), 4.62 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=19.7 Hz, 1H, PCH), 4.11–4.02 (m, 2H, POCH<sub>2</sub>), 3.94–3.85 (m, 1H, POCH<sub>2</sub>), 3.83–3.74 (m, 1H, POCH<sub>2</sub>) 3.08 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.0 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 2.88 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=13.9 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 1.22 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.04 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>)

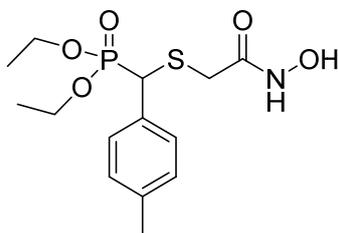
<sup>13</sup>C-NMR 125.76 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 165.80 (C=O), 135.76 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=4.3 Hz, C<sub>arom.</sub>), 129.61 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=6.2 Hz, C<sub>arom.</sub>), 128.71 (C<sub>arom.</sub>), 127.04 (d, <sup>5</sup>J(C,P)=1.5 Hz, C<sub>arom.</sub>), 63.04 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=7.3 Hz, POCH<sub>2</sub>), 62.98 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=7.4 Hz, POCH<sub>2</sub>), 44.39 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=143.9 Hz, PC), 31.83 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=6.5 Hz, SCH<sub>2</sub>), 16.60 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.5 Hz, CH<sub>3</sub>), 16.37 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.5 Hz, CH<sub>3</sub>)

C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>5</sub>PS [333.34]

CHN Berechnet (%): C 46.84, H 6.05, N 4.20

Gefunden (%): C 46.76, H 6.10, N 3.90

## Diethyl(((2-(hydroxyamino)-2-oxoethyl)thio)(*p*-tolyl)methyl)phosphonat 21



Hergestellt aus **Diethyl(mercapto(*p*-tolyl)methyl)phosphonat** (5.49 g, 20 mmol) nach **AAV 5**.

Ausbeute 32 % weißer Feststoff

Schmelzpunkt 123 °C

<sup>1</sup>H-NMR 500.13 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 10.58 (br. s, NH), 10.10 (br. s, NH), 9.24 (br. s, OH), 8.94 (br. s, OH), 7.29 (d, <sup>3</sup>J(H,H)=6.8 Hz, 2H), 7.16 (d, <sup>3</sup>J(H,H)=7.7 Hz, 2H), 4.57 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=19.6 Hz, 1H, PCH), 4.12–3.97 (m, 2H, POCH<sub>2</sub>), 3.95–3.85 (m, 1H, POCH<sub>2</sub>), 3.82–3.71 (m, 1H, POCH<sub>2</sub>), 3.07 (dd, <sup>2</sup>J(H,H)=13.9 Hz, <sup>4</sup>J(H,P)=1.4 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 2.87 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=13.9 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 2.33 (s, 0,2H, CH<sub>3arom.</sub>), 2.29 (s, 2.6H, CH<sub>3arom.</sub>), 2.25 (s, 0.19H, CH<sub>3arom.</sub>), 1.22 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.05 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>)

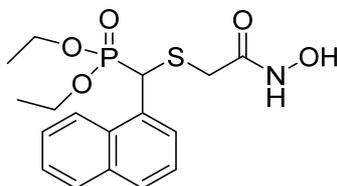
<sup>13</sup>C-NMR 125.76 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 165.36 (C=O), 136.83 (d, <sup>5</sup>J(C,P)=2.4 Hz, C<sub>arom.</sub>), 132.17 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=4.3 Hz, C<sub>arom.</sub>), 129.07 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=6.3 Hz, C<sub>arom.</sub>), 128.85 (C<sub>arom.</sub>), 62.51 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=7.7 Hz, POCH<sub>2</sub>), 62.45 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=8.1 Hz, POCH<sub>2</sub>), 43.61 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=144.2 Hz, PC), 31.31 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=6.4 Hz, SCH<sub>2</sub>), 20.64 (CH<sub>3arom.</sub>), 16.18 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.5 Hz, CH<sub>3</sub>), 15.98 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.5 Hz, CH<sub>3</sub>)

C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>5</sub>PS [347.37]

CHN Berechnet (%): C 48.41, H 6.38, N 4.03, S 9.23

Gefunden (%): C 48.62, H 6.24, N 3.89, S 9.37

## Diethyl(((2-(hydroxyamino)-2-oxoethyl)thio)(naphthalen-1-yl)methyl)phosphonat 22



Hergestellt aus **4** (6.52 g, 21 mmol) nach **AAV 5**.

Ausbeute 52 % weißer Feststoff

Schmelzpunkt 147 °C

<sup>1</sup>H-NMR 500.13 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 10.64 (br. s, 0.04H, NH), 10.60 (br. s, 0.72H, NH), 10.56 (br. s, 0.06H, NH), 10.13 (br. s, 0.08H, NH), 9.24 (br. s, 0.06H, OH), 8.94 (br. s, 0.84H, OH), 8.24 (d, <sup>3</sup>J(H,H)=6.3 Hz, 1H, H<sub>arom.</sub>), 7.96 (d, <sup>3</sup>J(H,H)=7.9 Hz, 1H, H<sub>arom.</sub>), 7.90 (d, <sup>3</sup>J(H,H)=8.1 Hz, 1H, H<sub>arom.</sub>), 7.85-7.74 (m, 1H, H<sub>arom.</sub>), 7.64-7.46 (m, 3H, H<sub>arom.</sub>), 5.63 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=19.3 Hz, 0.81H, PCH), 5.52 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=19.3 Hz, 0.19H, PCH), 4.16-4.00 (m, 2H, POCH<sub>2</sub>), 3.89-3.78 (m, 1H, POCH<sub>2</sub>), 3.73-3.60 (m, 1H, POCH<sub>2</sub>), 3.30 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.0 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 2.94 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=13.9 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 1.29-1.13 (m, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.93-0.81 (m, 3H, CH<sub>3</sub>)

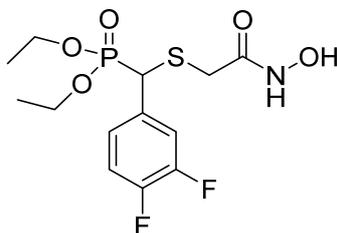
<sup>13</sup>C-NMR 125.76 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 165.77-165.63 (m, C=O), 133.32-133.20 (m, C<sub>arom.</sub>), 131.63-131.51 (m, C<sub>arom.</sub>), 131.28-131.12 (m, C<sub>arom.</sub>), 128.62 (C<sub>arom.</sub>), 128.31-128.05 (m, C<sub>arom.</sub>), 127.41-127.20 (m, C<sub>arom.</sub>), 126.49-126.30 (m, C<sub>arom.</sub>), 125.84 (C<sub>arom.</sub>), 125.27 (C<sub>arom.</sub>), 123.49-123.35 (m, C<sub>arom.</sub>), 62.69 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.8 Hz, POCH<sub>2</sub>), 38.12 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=144.6 Hz, PC), 31.76-31.51 (m, SCH<sub>2</sub>), 16.21 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.6 Hz, CH<sub>3</sub>), 15.84 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.5 Hz, CH<sub>3</sub>)

C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>5</sub>PS [383.40]

CHN Berechnet (%): C 53.26, H 5.78, N 3.65

Gefunden (%): C 53.02, H 5.90, N 3.35

## Diethyl((3,4-difluorphenyl)((2-(hydroxv-amino)-2-oxoethyl)thio)methyl)phosphonat 23



Hergestellt aus **2** (4.15 g, 14 mmol) nach **AAV 5**.

Ausbeute 31 % weißer Feststoff

Schmelzpunkt 105 °C

<sup>1</sup>H-NMR 500.13 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 10.65 (br. s, 0.13H, NH), 10.58 (br. s, 0.79H, NH), 10.23 (br. s, 0.07H, NH), 10.14 (br. s, 0.01H, NH), 9.26 (br. s, 0.08, OH), 9.07 (br. s, 0.12H, OH), 8.95 (br. s, 0.8H, OH), 7.54–7.36 (m, 2H, H<sub>arom.</sub>), 7.36–7.19 (m, 1H, H<sub>arom.</sub>), 4.87 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=19.2 Hz, 0.12H, PCH), 4.67 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=20.5 Hz, 0.88H, PCH), 4.16–4.02 (m, 2H, POCH<sub>2</sub>), 4.00–3.78 (m, 2H, POCH<sub>2</sub>), 3.07 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=13.9 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 2.92 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=13.9 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 1.23 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.08 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>)

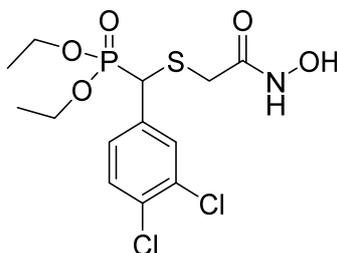
<sup>13</sup>C-NMR 125.76 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 165.00 (C=O), 164.40 (C=O), 148.94 (dd, <sup>1</sup>J(C,F)=244.6 Hz, <sup>2</sup>J(C,F)=12.7 Hz, C<sub>arom.</sub>), 148.78 (d, <sup>1</sup>J(C,F)=246.6 Hz, C<sub>arom.</sub>), 133.46–133.19 (m, C<sub>arom.</sub>), 126.33–126.02 (m, C<sub>arom.</sub>), 117.97 (dd, <sup>2</sup>J(C,F)=18.0 Hz, <sup>3</sup>J(C,F)=<sup>3</sup>J(C,P)=6.1 Hz, C<sub>arom.</sub>), 117.40 (d, <sup>2</sup>J(C,F)=17.0 Hz, C<sub>arom.</sub>), 62.86 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.8 Hz, POCH<sub>2</sub>), 62.75 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.8 Hz, POCH<sub>2</sub>), 48.29 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=139.7 Hz, PC), 43.08 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=144.0 Hz, PC), 31.50 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=7.4 Hz, SCH<sub>2</sub>), 16.16 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.5 Hz, CH<sub>3</sub>), 15.97 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.4 Hz, CH<sub>3</sub>)

C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>F<sub>2</sub>NO<sub>5</sub>PS [369.32]

CHN Berechnet (%): C 42.28, H 4.91, N 3.79

Gefunden (%): C 42.08, H 4.82, N 3.86

**Diethyl((3,4-dichlorophenyl)((2-(hydroxyamino)-2-oxoethyl)thio)methyl)phosphonat 24**



Hergestellt aus **3** (5.93 g, 18 mmol) nach **AAV 5**.

Ausbeute 38 % farbloses Öl

<sup>1</sup>H-NMR 500.13 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 10.66 (br. s, 0.12H, NH), 10.59 (br. s, 0.81H, NH), 10.15 (br. s, 0.07H, NH), 9.26 (br. s, 0.08H, OH), 9.09–9.06 (m, 0.09H, OH), 8.99–8.93 (m, 0.83H, OH), 7.66 (d, <sup>3</sup>J(H,H)=8.3 Hz, 1H, H<sub>arom.</sub>), 7.64–7.58 (m, 1H, H<sub>arom.</sub>), 7.46–7.36 (m, 1H, H<sub>arom.</sub>), 4.91 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=19.3 Hz, 0.09H, PCH), 4.69 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=20.7 Hz, 0.91H, PCH) d, 4.16–4.02 (m, 2H, POCH<sub>2</sub>), 3.98–3.81 (m, 2H, POCH<sub>2</sub>), 3.06 (dd, <sup>2</sup>J(H,H)=13.8 Hz, <sup>4</sup>J(H,P)=1.4 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 2.94 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=13.8 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 1.23 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.09 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>)

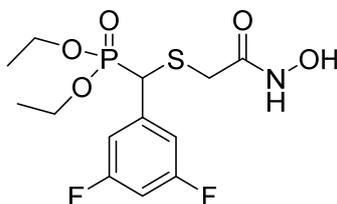
<sup>13</sup>C-NMR 125.76 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 164.86 (C=O), 136.87 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=4.1 Hz, C<sub>arom.</sub>), 130.85 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=6.4 Hz, C<sub>arom.</sub>), 130.78 (d, <sup>4</sup>J(C,P)=1.3 Hz, C<sub>arom.</sub>), 130.53 (d, <sup>5</sup>J(C,P)=1.1 Hz, C<sub>arom.</sub>), 130.26 (d, <sup>4</sup>J(C,P)=3.0 Hz, C<sub>arom.</sub>), 129.41 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=6.1 Hz, C<sub>arom.</sub>), 62.93 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.7 Hz, POCH<sub>2</sub>), 62.75 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.8 Hz, POCH<sub>2</sub>), 42.98 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=143.4 Hz, PC), 31.57 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=7.5 Hz, SCH<sub>2</sub>), 16.15 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.5 Hz, CH<sub>3</sub>), 15.96 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.5 Hz, CH<sub>3</sub>)

C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>5</sub>PS [402.22]

CHN Berechnet (%): C 38.82, H 4.51, N 3.48

Gefunden (%): C 39.10, H 4.69, N 3.42

## Diethyl((3,5-difluorophenyl)((2-(hydroxv-amino)-2-oxoethyl)thio)methyl)-phosphonat 25



Hergestellt aus **5** (4.74 g, 16 mmol) nach **AAV 5**.

Ausbeute 21 % weißer Feststoff

Schmelzpunkt 113 °C

<sup>1</sup>H-NMR 500.13 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 10.66 (br. s, 0.08H, NH), 10.59 (br. s, 0.82H, NH), 10.55 (br. s, 0.03H, NH), 10.16 (br. s, 0.07H, NH), 9.27 (br. s, 0.08H, OH), 9.09-9.06 (m, 0.07H, OH), 9.02-8.92 (m, 0.83H, OH), 8.91 (br. s, 0.02H, OH), 7.22 (m, 1H, H<sub>arom.</sub>), 7.11 (d, <sup>3</sup>J(H,H)=7.8 Hz, 2H, H<sub>arom.</sub>), 4.91 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=19.5 Hz, 0.08H, PCH), 4.69 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=20.7 Hz, 0.92H, PCH), 4.16-4.03 (m, 2H, POCH<sub>2</sub>), 3.08 (dd, <sup>2</sup>J(H,H)=13.9 Hz, <sup>4</sup>J(H,P)=1.4 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 2.96 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=13.9 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 1.23 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.09 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>)

<sup>13</sup>C-NMR 125.76 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 164.86 (C=O), 162.06 (dd, <sup>1</sup>J(C,F)=245.3 Hz, <sup>3</sup>J(C,F)=12.9 Hz, C<sub>arom.</sub>), 140.30-140.13 (m, C<sub>arom.</sub>), 112.33 (dd, <sup>2</sup>J(C,F)=26.03 Hz, <sup>4</sup>J(C,F)=<sup>3</sup>J(C,P)=5.7 Hz, C<sub>arom.</sub>), 103.40-103.31 (m, C<sub>arom.</sub>), 62.99 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.6 Hz, POCH<sub>2</sub>), 62.82 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=7.1 Hz, POCH<sub>2</sub>), 43.50 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=143.8 Hz, PC), 31.67 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=7.1 Hz, SCH<sub>2</sub>), 16.15 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.6 Hz, CH<sub>3</sub>), 16.00 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.4 Hz, CH<sub>3</sub>)

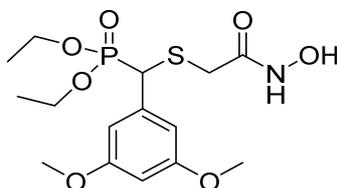
C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>F<sub>2</sub>NO<sub>5</sub>PS [369.32]

CHN Berechnet (%): C 42.28, H 4.91, N 3.79

Gefunden (%): C 42.20, H 4.82, N 3.68

**Diethyl((3,5-dimethoxyphenyl)((2-(hydroxyamino)-2-oxoethyl)thio)methyl)phosphonat**

**26**



Hergestellt aus **6** (5.13 g, 16 mmol) nach **AAV 5**.

Ausbeute 22 % weißer Feststoff

Schmelzpunkt 114 °C

<sup>1</sup>H-NMR 500.13 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 10.65-10.62 (m, 0.07H, NH), 10.61-10.56 (m, 0.8H, NH), 10.55 (br. s, 0.04, NH), 10.12 (br. s, 0.09H, NH), 9.26 (br. s, 0.08H, OH), 9.00-8.98 (m, 0.05H, OH), 8.97-8.92 (m, 0.82H, OH), 8.92-8.89 (m, 0.05H, OH), 6.60-6.54 (m, 2H, H<sub>arom.</sub>), 6.48-6.42 (m, 1H, H<sub>arom.</sub>), 4.52 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=19.7 Hz, 1H, PCH), 4.12-3.99 (m, 2H, POCH<sub>2</sub>), 3.97-3.89 (m, 1H, POCH<sub>2</sub>), 3.87-3.79 (m, 1H, POCH<sub>2</sub>), 3.73 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3.09 (dd, <sup>2</sup>J(H,H)=13.9 Hz, <sup>4</sup>J(H,P)=1.7 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 2.93 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=13.9 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 1.23 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 3H, CCH<sub>3</sub>), 1.09 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 3H, CCH<sub>3</sub>)

<sup>13</sup>C-NMR 125.76 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 165.22 (C=O), 160.12 (C<sub>arom.</sub>), 107.42 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=6.7 Hz, C<sub>arom.</sub>), 100.70 (C<sub>arom.</sub>), 99.16 (C<sub>arom.</sub>), 62.64 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=7.0 Hz, POCH<sub>2</sub>), 62.55 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.9 Hz, POCH<sub>2</sub>), 55.10 (OCH<sub>3</sub>), 44.05 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=143.1 Hz, PC), 31.59 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=6.0 Hz, SCH<sub>2</sub>), 16.19 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.6 Hz, CCH<sub>3</sub>), 16.00 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.6 Hz, CCH<sub>3</sub>)

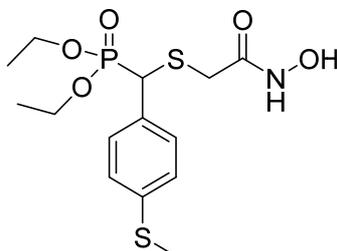
C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>7</sub>PS [393.39]

CHN Berechnet (%): C 45.80, H 6.15, N 3.56

Gefunden (%): C 46.00, H 6.02, N 3.35

**Diethyl(((2-(hydroxyamino)-2-oxoethyl)thio)(4-(methylthio)phenyl)methyl)phosphonat**

**27**



Hergestellt aus **7** (6.13 g, 20 mmol) nach **AAV 5**.

Ausbeute 16 % gelbliches Öl

<sup>1</sup>H-NMR 600.22 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 10.72 (br. s, 0.02H, NH), 10.58 (br. s, 0.88H, NH), 10.11 (br. s, 0.09H, NH), 10.05 (br. s, 0.01H, NH), 9.25 (br. s, 0.09H, OH), 8.94 (br. s, 0.88H, OH), 8.61 (br. s, 0.01H, OH), 8.59 (br. s, 0.01H, OH), 8.58 (br. s, 0.01H, OH), 7.34 (d, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 2H, H<sub>arom.</sub>), 7.24 (d, <sup>3</sup>J(H,H)=8.1 Hz, 2H, H<sub>arom.</sub>), 4.59 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=19.8 Hz, 1H, PCH), 4.11-4.00 (m, 2H, POCH<sub>2</sub>), 3.96-3.87 (m, 1H, POCH<sub>2</sub>), 3.87-3.77 (m, 1H, POCH<sub>2</sub>), 3.07 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=13.9 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 2.88 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=13.7 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 2.47 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>), 1.23 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.07 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>)

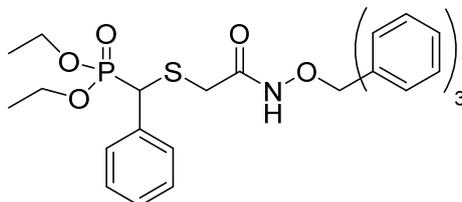
<sup>13</sup>C-NMR 150.93 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 165.27 (C=O), 137.59 (d, <sup>5</sup>J(C,P)=2.2 Hz, C<sub>arom.</sub>), 131.66 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=4.4 Hz, C<sub>arom.</sub>), 129.66 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=6.5 Hz, C<sub>arom.</sub>), 125.52 (C<sub>arom.</sub>), 62.55 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.6 Hz, POCH<sub>2</sub>), 62.53 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.6 Hz, POCH<sub>2</sub>), 43.48 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=144.6 Hz, PC), 31.31 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=6.7 Hz, SCH<sub>2</sub>), 16.17 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.4 Hz, CH<sub>3</sub>), 15.98 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.4 Hz, CH<sub>3</sub>)

C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>5</sub>PS<sub>2</sub> [379.43]

CHN Berechnet (%): C 44.32, H 5.84, N 3.69, S 16.90

Gefunden (%): C 44.40, H 5.85, N 3.59, S 16.73

## Diethyl(((2-oxo-2-((trityloxy)amino)ethyl)thio)(phenyl)methyl)phosphonat 28



Hergestellt aus **9** (0.32 g, 1 mmol) nach **AAV 7**.

Ausbeute 16 % weißer Feststoff

Hergestellt aus **9** (1.59 g, 5 mmol) nach **AAV 8**.

Ausbeute 37 % weißer Feststoff

Hergestellt aus **9** (1.91 g, 6 mmol) nach **AAV 9**.

Ausbeute 55 % weißer Feststoff

Schmelzpunkt 53 °C

<sup>1</sup>H-NMR 500.13 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 8.69 (br. s, 1H, NH), 7.36–7.29 (m, 15H, H<sub>arom.</sub>), 7.27–7.22 (m, 3H, H<sub>arom.</sub>), 7.18–7.11 (m, 2H, H<sub>arom.</sub>), 4.15 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=19.3 Hz, 1H, PCH), 4.06–3.95 (m, 2H, POCH<sub>2</sub>), 3.91–3.81 (m, 1H, POCH<sub>2</sub>), 3.79–3.69 (m, 1H, POCH<sub>2</sub>), 3.27 (dd, <sup>2</sup>J(H,H)=15.4 Hz, <sup>4</sup>J(H,P)=2.0 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 2.88 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=15.4 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 1.20 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.03 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>)

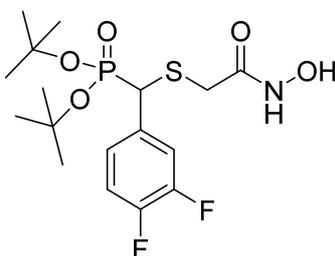
<sup>13</sup>C-NMR 125.76 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 168.49 (C=O), 143.21 (C<sub>arom.</sub>), 134.28 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=4.6 Hz, C<sub>arom.</sub>), 129.08 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=6.2 Hz, C<sub>arom.</sub>), 128.41 (C<sub>arom.</sub>), 128.28 (C<sub>arom.</sub>), 127.78 (C<sub>arom.</sub>), 126.96 (C<sub>arom.</sub>), 73.31 (NOC), 62.71 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.7 Hz, POCH<sub>2</sub>), 62.49 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=7.0 Hz, POCH<sub>2</sub>), 43.93 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=143.7 Hz, PC), 31.15 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=7.4 Hz, SCH<sub>2</sub>), 16.12 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.6 Hz, CH<sub>3</sub>), 15.89 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.5 Hz, CH<sub>3</sub>)

C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>NO<sub>5</sub>PS [423.46]

CHN Berechnet (%): C 66.77, H 5.95, N 2.43

Gefunden (%): C 66.50, H 5.95, N 2.40

**Di-tert-butyl((3,4-difluorophenyl)((2-(hydroxyamino)-2-oxoethyl)thio)methyl)phosphonat**  
**29**



Hergestellt aus **8** (3.17 g, 9 mmol) nach **AAV 6**.

Ausbeute 45 % farbloses Öl

<sup>1</sup>H-NMR 600.22 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO- $\delta$  (ppm): 10.53 (br. s, 0.92H, NH), 10.09 (br. s, 0.08H, NH), 9.22 (br. s, 0.08H, OH), 8.94-8.86 (m, 0.92H, OH), 7.46-7.33 (m, 2H, H<sub>arom.</sub>), 7.28-7.19 (m, 1H, H<sub>arom.</sub>), 4.43 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=20.1 Hz, 1H, PCH), 2.99 (dd, <sup>2</sup>J(H,H)=14.0 Hz, <sup>4</sup>J(H,P)=1.9 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 2.80 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.0 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 1.40-1.35 (m, 18H, CH<sub>3</sub>)

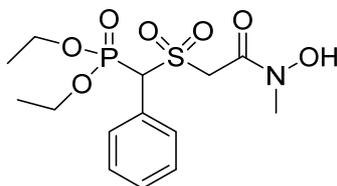
<sup>13</sup>C-NMR 150.93 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO- $\delta$  (ppm): 165.24 (C=O), 148.81 (dd, <sup>1</sup>J(C,F)=244.5 Hz, <sup>2</sup>J(C,F)=12.5 Hz, C<sub>arom.</sub>), 148.53 (dd, <sup>1</sup>J(C,F)=244.9 Hz, <sup>2</sup>J(C,F)=12.8 Hz, C<sub>arom.</sub>), 134.38 (d, <sup>3</sup>J(C,F)=<sup>2</sup>J(C,P)=3.6 Hz, C<sub>arom.</sub>), 126.51-126.28 (m, C<sub>arom.</sub>), 118.00 (dd, <sup>2</sup>J(C,F)=17.8 Hz, <sup>3</sup>J(C,F)=<sup>3</sup>J(C,P)=5.3 Hz, C<sub>arom.</sub>), 116.90 (d, <sup>2</sup>J(C,F)=16.4 Hz, C<sub>arom.</sub>), 82.74 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=9.6 Hz, POC), 82.80 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=9.8 Hz, POC), 46.49 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=148.2 Hz, PC), 31.18 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=7.8 Hz, SCH<sub>2</sub>), 29.78 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=3.5 Hz, CH<sub>3</sub>), 29.65 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=3.8 Hz, CH<sub>3</sub>)

C<sub>17</sub>H<sub>26</sub>F<sub>2</sub>NO<sub>5</sub>PS [425.43]

CHN Berechnet (%): C 48.00, H 6.16, N 3.29, S 7.54

Gefunden (%): C 48.14, H 6.24, N 3.34, S 7.81

**Diethyl(((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)sulfonyl)(phenyl)methyl)phosphonat 30**



Hergestellt aus **10** (1.74 g, 5 mmol) nach **AAV 11**.

Ausbeute 81 % weißer Feststoff

Schmelzpunkt 110 °C

<sup>1</sup>H-NMR 500.13 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 10.44 (br. s, 0.05H, OH), 10.40 (br. s, 0.87H, OH), 10.36 (br. s, 0.03H, OH), 10.00 (br. s, 0.05H, OH), 7.55-7.48 (m, 2H, H<sub>arom.</sub>), 7.46-7.40 (m, 3H, H<sub>arom.</sub>), 5.83 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=20.1 Hz, 1H, PCH), 4.64 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=15.0 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 4.41 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=15.0 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 4.11-3.94 (m, 4H, POCH<sub>2</sub>), 3.19 (s, 0.19H, NCH<sub>3</sub>), 3.15 (s, 2.67H, NCH<sub>3</sub>), 3.11 (s, 0.14H, NCH<sub>3</sub>), 1.18 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.12 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>)

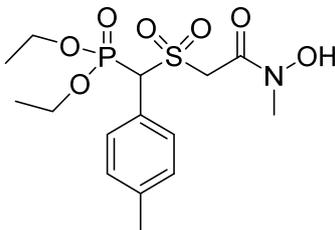
<sup>13</sup>C-NMR 125.76 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 161.53 (C=O), 131.01 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=5.6 Hz, C<sub>arom.</sub>), 129.08 (C<sub>arom.</sub>), 128.63 (C<sub>arom.</sub>), 127.24 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=6.0 Hz, C<sub>arom.</sub>), 65.56 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=136.3 Hz, PC), 63.72 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.5 Hz, POCH<sub>2</sub>), 63.03 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.6 Hz, POCH<sub>2</sub>), 53.97 (SCH<sub>2</sub>), 35.66 (NCH<sub>3</sub>), 15.97 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=6.1 Hz, CH<sub>3</sub>), 15.90 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=6.1 Hz, CH<sub>3</sub>)

C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>7</sub>PS [379.36]

CHN Berechnet (%): C 44.32, H 5.85, N 3.69

Gefunden (%): C 44.58, H 5.82, N 3.54

**Diethyl(((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)sulfonyl)(p-tolyl)methyl)phosphonat 31**



Hergestellt aus **11** (0.72 g, 2 mmol) nach **AAV 11**.

Ausbeute 84 % weißer Feststoff

Schmelzpunkt 105 °C

<sup>1</sup>H-NMR 500.13 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 10.43 (br. s, OH), 10.39 (br. s, OH), 10.35 (br. s, OH), 7.39 (d, <sup>3</sup>J(H,H)=6.9 Hz, 2H, H<sub>arom.</sub>), 7.24 (d, <sup>3</sup>J(H,H)=8.0 Hz, 2H, H<sub>arom.</sub>), 5.78 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=20.1 Hz, 1H, PCH), 4.63 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=15.0 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 4.38 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=15.0 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 4.14-3.92 (m, 4H, POCH<sub>2</sub>), 3.19 (s, 0.29H, NCH<sub>3</sub>), 3.15 (s, 2.54H, NCH<sub>3</sub>), 3.11 (s, 0.17H, NCH<sub>3</sub>), 2.36 (s, 0.25H, CH<sub>3arom.</sub>), 2.32 (s, 2.55H, CH<sub>3arom.</sub>), 2.28 (s, 0.2H, CH<sub>3arom.</sub>), 1.19 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.13 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>)

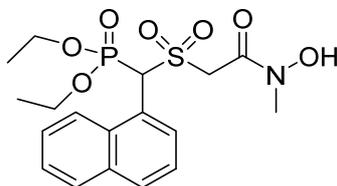
<sup>13</sup>C-NMR 125.76 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 161.55 (C=O), 138.59-138.48 (m, C<sub>arom.</sub>), 130.86 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=5.8 Hz, C<sub>arom.</sub>), 129.19 (C<sub>arom.</sub>), 124.10 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.7 Hz, C<sub>arom.</sub>), 65.22 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=136.6 Hz, PC), 63.59 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.7 Hz, POCH<sub>2</sub>), 62.91 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.5 Hz, POCH<sub>2</sub>), 53.83 (SCH<sub>2</sub>), 35.62 (NCH<sub>3</sub>), 20.69 (CH<sub>3arom.</sub>), 15.96 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=6.2 Hz, CH<sub>3</sub>), 15.91 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=6.0 Hz, CH<sub>3</sub>)

C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>7</sub>PS [393.39]

CHN Berechnet (%): C 45.80, H 6.15, N 3.56, S 8.15

Gefunden (%): C 46.04, H 6.07, N 3.48, S 7.87

**Diethyl(((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)sulfonyl)(naphthalen-1-yl)methyl)-phosphonat 32**



Hergestellt aus **12** (1.99 g, 5 mmol) nach **AAV 11**.

Ausbeute 72 % weißer Feststoff

Schmelzpunkt 141 °C

<sup>1</sup>H-NMR 500.13 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 10.60 (br. s, OH), 10.55 (br. s, OH), 10.51 (br. s, OH), 10.49 (br. s, OH), 10.47 (br. s, 0.06H, OH), 8.25 (d, <sup>3</sup>J(H,H)=8.6 Hz, 0.13H, H<sub>arom.</sub>), 8.21 (d, <sup>3</sup>J(H,H)=8.6 Hz, 0.77H, H<sub>arom.</sub>), 8.17 (d, <sup>3</sup>J(H,H)=8.7 Hz, 0.1H, H<sub>arom.</sub>), 8.11-7.93 (m, 3H, H<sub>arom.</sub>), 7.75-7.64 (m, 1H, H<sub>arom.</sub>), 7.64-7.51 (m, 2H, H<sub>arom.</sub>), 6.91 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=21.1 Hz, 1H, PCH), 4.98 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=15.3 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 4.66 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=15.3 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 4.20-3.86 (m, 4H, POCH<sub>2</sub>), 3.40-3.11 (m, 3H, NCH<sub>3</sub>), 1.25-1.08 (m, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.08-0.89 (m, 3H, CH<sub>3</sub>)

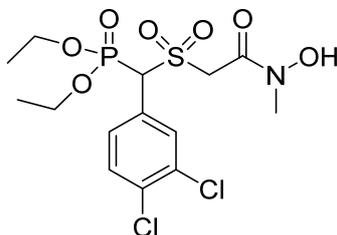
<sup>13</sup>C-NMR 125.76 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 162.11 (C=O), 133.57, 132.25 (d, J(C,P)=6.6 Hz, C<sub>arom.</sub>), 129.73 (C<sub>arom.</sub>), 129.16 (d, J(C,P)=4.7 Hz, C<sub>arom.</sub>), 128.95 (C<sub>arom.</sub>), 127.08 (C<sub>arom.</sub>), 125.97 (C<sub>arom.</sub>), 124.99 (d, J(C,P)=1.7 Hz, C<sub>arom.</sub>), 122.73 (C<sub>arom.</sub>), 122.32 (d, J(C,P)=5.6 Hz, C<sub>arom.</sub>), 64.05 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.5 Hz, POCH<sub>2</sub>), 63.07 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.7 Hz, POCH<sub>2</sub>), 59.50 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=138.3 Hz, PC), 54.55 (SCH<sub>2</sub>), 35.74 (NCH<sub>3</sub>), 15.88 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.4 Hz, CH<sub>3</sub>), 15.83 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.4 Hz, CH<sub>3</sub>)

C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>7</sub>PS [429.42]

CHN Berechnet (%): C 50.34, H 5.63, N 3.26, S 7.47

Gefunden (%): C 50.45, H 5.72, N 3.15, S 7.42

**Diethyl((3,4-dichlorphenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)sulfonyl)methyl)-phosphonat 33**



Hergestellt aus **14** (2.08 g, 5 mmol) nach **AAV 11**.

Ausbeute 59 % hellgelber Feststoff

Schmelzpunkt 135 °C

<sup>1</sup>H-NMR 500.13 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 10.45 (br. s, OH), 10.41 (br. s, OH), 10.37 (br. s, OH), 7.82–7.68 (m, 2H, H<sub>arom.</sub>), 7.5 (d, <sup>3</sup>J(H,H)=8.4 Hz, 1H, H<sub>arom.</sub>), 5.90 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=20.0 Hz, 1H, PCH), 4.62 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=15.0 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 4.51 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=15.0 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 4.18-3.97 (m, 4H, POCH<sub>2</sub>), 3.19 (s, 0.25H, NCH<sub>3</sub>), 3.15 (s, 2.53H, NCH<sub>3</sub>), 3.11 (s, 0.22H, NCH<sub>3</sub>), 1.21 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.16 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>)

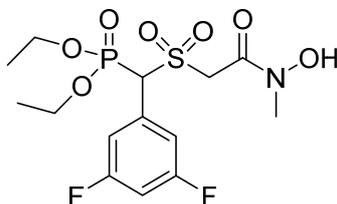
<sup>13</sup>C-NMR 125.76 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 161.12 (C=O), 132.41 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=5.4 Hz, C<sub>arom.</sub>), 132.17 (d, <sup>4</sup>J(C,P)=2.1 Hz, C<sub>arom.</sub>), 131.21 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=6.0 Hz, C<sub>arom.</sub>), 131.15 (C<sub>arom.</sub>), 130.92 (C<sub>arom.</sub>), 128.33 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.8 Hz, C<sub>arom.</sub>), 64.35 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=135.5 Hz, PC), 63.87 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.8 Hz, POCH<sub>2</sub>), 63.36 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.7 Hz, POCH<sub>2</sub>), 54.25 (SCH<sub>2</sub>), 35.64 (NCH<sub>3</sub>), 15.94 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.7 Hz, CH<sub>3</sub>), 15.87 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=6.0 Hz, CH<sub>3</sub>)

C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>7</sub>PS [448.25]

CHN Berechnet (%): C 37.51, H 4.50, N 3.12, S 7.15

Gefunden (%): C 37.77, H 4.49, N 3.05, S 6.93

**Diethyl((3,5-difluorphenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)sulfonyl)methyl)-phosphonat 34**



Hergestellt aus **15** (1.15 g, 3 mmol) nach **AAV 11**.

Ausbeute 66 % weißer Feststoff

Schmelzpunkt 152 °C

<sup>1</sup>H-NMR 500.13 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 10.45 (br. s, OH), 10.41 (br. s, OH), 10.37 (br. s, OH), 7.47–7.34 (m, 1H, H<sub>arom.</sub>), 7.24 (d, <sup>3</sup>J(H,H)=7.4 Hz, 2H, H<sub>arom.</sub>), 5.91 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=19.9 Hz, 1H, PCH), 4.61 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=15.0 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 4.50 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.9 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 4.19-3.97 (m, 4H, POCH<sub>2</sub>), 3.19 (s, 0.21H, NCH<sub>3</sub>), 3.15 (s, 2.47H, NCH<sub>3</sub>), 3.11 (s, 0.17H, NCH<sub>3</sub>), 3.09 (s, 0.15H, NCH<sub>3</sub>), 1.21 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.15 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>)

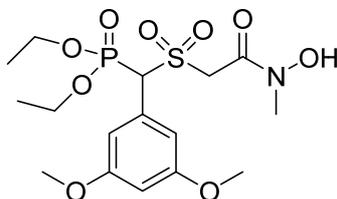
<sup>13</sup>C-NMR 125.76 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 161.93 (dd, <sup>1</sup>J(C,F)=246.4 Hz, <sup>3</sup>J(C,F)=13.1 Hz, C<sub>arom.</sub>), 161.09 (C=O), 131.42-131.07 (m, C<sub>arom.</sub>), 114.22 (dd, <sup>2</sup>J(C,F)=26.9 Hz, <sup>4</sup>J(C,F)=<sup>3</sup>J(C,P)=6.0 Hz, C<sub>arom.</sub>), 105.24-104.73 (m, C<sub>arom.</sub>), 64.71 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=144.1 Hz, PC), 63.92 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.8 Hz, POCH<sub>2</sub>), 63.41 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.5 Hz, POCH<sub>2</sub>), 54.31 (SCH<sub>2</sub>), 35.64 (NCH<sub>3</sub>), 15.94 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.9 Hz, CH<sub>3</sub>), 15.87 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.8 Hz, CH<sub>3</sub>)

C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>F<sub>2</sub>NO<sub>7</sub>PS [415.34]

CHN Berechnet (%): C 40.48, H 4.85, N 3.37, S 7.72

Gefunden (%): C 40.72, H 4.85, N 3.32, S 7.90

**Diethyl((3,5-dimethoxyphenyl)((2-hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)sulfonyl(phenyl)-methyl)phosphonat 35**



Hergestellt aus **16** (0.81 g, 2 mmol) nach **AAV 11**.

Ausbeute 55 % weißer Feststoff

Schmelzpunkt 105 °C

<sup>1</sup>H-NMR 500.13 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 10.43 (br. s, OH), 10.39 (br. s, OH), 10.35 (br. s, OH), 6.74-6.62 (m, 2H, H<sub>arom.</sub>), 6.61-6.51 (m, 1H, H<sub>arom.</sub>), 5.72 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=19.9 Hz, 1H, PCH), 4.61 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=15.0 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 4.42 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.9 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 4.17-3.94 (m, 4H, POCH<sub>2</sub>), 3.79 (s, 0.35H, OCH<sub>3</sub>), 3.75 (s, 5.17H, OCH<sub>3</sub>), 3.71 (s, 0.48H, OCH<sub>3</sub>), 3.19 (s, 0.26H, NCH<sub>3</sub>), 3.15 (s, 2.55H, NCH<sub>3</sub>), 3.11 (s, 0.19H, NCH<sub>3</sub>), 1.20 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 3H, CCH<sub>3</sub>), 1.15 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 3H, CCH<sub>3</sub>)

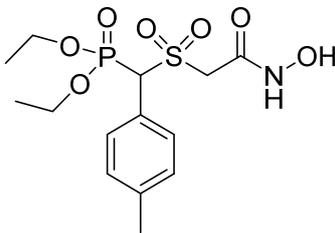
<sup>13</sup>C-NMR 125.76 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 161.46 (C=O), 160.17 (C<sub>arom.</sub>), 129.02 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=5.7 Hz, C<sub>arom.</sub>), 109.28 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.4 Hz, C<sub>arom.</sub>), 100.39 (C<sub>arom.</sub>), 65.48 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=135.6 Hz, PC), 63.71 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.5 Hz, POCH<sub>2</sub>), 63.06 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.6 Hz, POCH<sub>2</sub>), 55.21 (OCH<sub>3</sub>), 53.99 (SCH<sub>2</sub>), 35.64 (NCH<sub>3</sub>), 15.98 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=6.5 Hz, CCH<sub>3</sub>), 15.92 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=6.9 Hz, CCH<sub>3</sub>)

C<sub>16</sub>H<sub>26</sub>NO<sub>9</sub>PS [439.42]

CHN Berechnet (%): C 43.73, H 5.96, N 3.19, S 7.30

Gefunden (%): C 44.00, H 5.97, N 3.17, S 7.16

**Diethyl(((2-(hydroxyamino)-2-oxoethyl)sulfonyl)(*p*-tolyl)methyl)phosphonat 36**



Hergestellt aus **21** (1.04 g, 3 mmol) nach **AAV 11**.

Ausbeute 39 % farbloses Öl

<sup>1</sup>H-NMR 500.13 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 10.95 (br. s, NH), 10.63 (br. s, NH), 9.60 (br. s, OH), 9.38 (br. s, OH), 7.38 (d, <sup>3</sup>J(H,H)=7.6 Hz, 2H, H<sub>arom.</sub>), 7.24 (d, <sup>3</sup>J(H,H)=7.9 Hz, 2H, H<sub>arom.</sub>), 5.77 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=20.3 Hz, 1H, PCH), 4.26 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.2 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 4.15-3.91 (m, 4H, POCH<sub>2</sub>), 3.84 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.2 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 2.32 (s, 3H, CH<sub>3arom.</sub>), 1.20 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.12 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>)

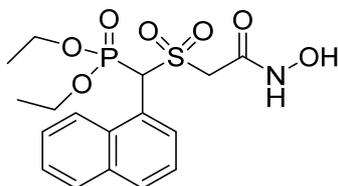
<sup>13</sup>C-NMR 125.76 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 158.30 (C=O), 138.57 (d, <sup>5</sup>J(C,P)=1.3 Hz, C<sub>arom.</sub>), 130.83 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=5.6 Hz, C<sub>arom.</sub>), 129.21 (C<sub>arom.</sub>), 124.09 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=6.0 Hz, C<sub>arom.</sub>), 65.03 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=136.9 Hz, PC), 63.59 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.6 Hz, POCH<sub>2</sub>), 62.98 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.6 Hz, POCH<sub>2</sub>), 55.13 (SCH<sub>2</sub>), 20.70 (CH<sub>3arom.</sub>), 15.99 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.8 Hz, CH<sub>3</sub>), 15.90 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.7 Hz, CH<sub>3</sub>)

C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>7</sub>PS [379.36]

CHN Berechnet (%): C 44.32, H 5.85, N 3.69, S 8.45

Gefunden (%): C 44.38, H 5.85, N 3.77, S 8.16

**Diethyl(((2-(hydroxyamino)-2-oxoethyl)sulfonyl)(naphthalen-1-yl)methyl)phosphonat 37**



Hergestellt aus **22** (1.92 g, 5 mmol) nach **AAV 11**.

Ausbeute 55 % weißer Feststoff

Schmelzpunkt 172 °C

<sup>1</sup>H-NMR 500.13 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 11.10 (br. s, NH), 11.06 (br. s, NH), 11.02 (br. s, NH), 10.80 (br. s, NH), 10.61 (br. s, NH), 9.74 (br. s, OH), 9.51 (br. s, OH), 9.48 (br. s, OH), 9.44 (br. s, OH), 9.15 (br. s, OH), 9.08 (br. s, OH), 8.18 (d, <sup>3</sup>J(H,H)=8.7 Hz, 1H, H<sub>arom.</sub>), 8.08-7.96 (m, 3H, H<sub>arom.</sub>), 7.71-7.54 (m, 3H, H<sub>arom.</sub>), 6.94 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=21.3 Hz, 1H, PCH), 4.85 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.5 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 4.16-3.97 (m, 4H, POCH<sub>2</sub>), 3.95 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.5 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 1.10 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.06 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>)

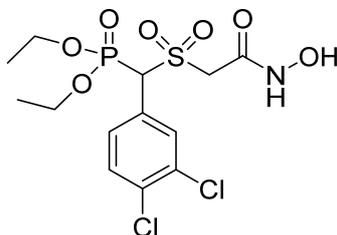
<sup>13</sup>C-NMR 125.76 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 158.91 (C=O), 133.58 (C<sub>arom.</sub>), 132.13 (d, J(C,P)=6.5 Hz, C<sub>arom.</sub>), 129.73 (d, J(C,P)=1.2 Hz, C<sub>arom.</sub>), 129.10 (d, J(C,P)=4.6 Hz, C<sub>arom.</sub>), 128.95 (C<sub>arom.</sub>), 127.09 (C<sub>arom.</sub>), 125.99 (C<sub>arom.</sub>), 125.00 (d, J(C,P)=1.5 Hz, C<sub>arom.</sub>), 122.74 (C<sub>arom.</sub>), 122.32 (d, J(C,P)=5.9 Hz, C<sub>arom.</sub>), 64.06 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.5 Hz, POCH<sub>2</sub>), 63.17 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.6 Hz, POCH<sub>2</sub>), 59.58 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=138.3 Hz, PC), 55.70 (SCH<sub>2</sub>), 15.88 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.4 Hz, CH<sub>3</sub>)

C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>7</sub>PS [415.40]

CHN Berechnet (%): C 49.15, H 5.34, N 3.37, S 7.72

Gefunden (%): C 49.33, H 5.47, N 3.26, S 7.63

**Diethyl((3,4-dichlorphenyl)((2-(hydroxyamino)-2-oxoethyl)sulfonyl)methyl)phosphonat**  
**38**



Hergestellt aus **24** (2.01 g, 5 mmol) nach **AAV 11**.

Ausbeute 51 % weißer Feststoff

Schmelzpunkt 59 °C

<sup>1</sup>H-NMR 500.13 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 10.96 (br. s, NH), 10.66 (br. s, NH), 9.63 (br. s, OH), 9.40 (br. s, OH), 7.80-7.70 (m, 2H, H<sub>arom.</sub>), 7.55-7.46 (m, 1H, H<sub>arom.</sub>), 5.89 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=20.3 Hz, 1H, PCH), 4.17 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.3 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 4.15-4.08 (m, 2H, POCH<sub>2</sub>), 4.07-3.99 (m, 2H, POCH<sub>2</sub>), 3.96 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.3 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 1.22 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.1 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.14 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>)

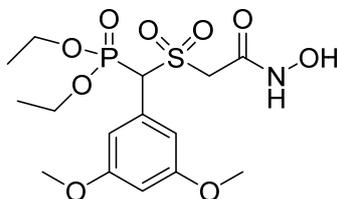
<sup>13</sup>C-NMR 125.76 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 157.86 (C=O), 132.38 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=5.8 Hz, C<sub>arom.</sub>), 132.21 (d, <sup>4</sup>J(C,P)=1.8 Hz, C<sub>arom.</sub>), 131.29-131.10 (m, C<sub>arom.</sub>), 130.98 (C<sub>arom.</sub>), 128.38 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.7 Hz, C<sub>arom.</sub>), 64.14 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=135.5 Hz, PC), 63.83 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.6 Hz, POCH<sub>2</sub>), 63.46 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.6 Hz, POCH<sub>2</sub>), 55.40 (SCH<sub>2</sub>), 15.98 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.6 Hz, CH<sub>3</sub>), 15.86 ppm (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.7 Hz, CH<sub>3</sub>)

C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>7</sub>PS [434.22]

CHN Berechnet (%): C 35.96, H 4.18, N 3.23, S 7.38

Gefunden (%): C 36.20, H 4.32, N 3.08, S 7.08

**Diethyl((3,5-dimethoxyphenyl)((2-(hydroxyamino)-2-oxoethyl)sulfonyl)methyl)-phosphonat 39**



Hergestellt aus **26** (0.79 g, 2 mmol) nach **AAV 11**.

Ausbeute 49 % weißer Feststoff

Schmelzpunkt 145 °C

<sup>1</sup>H-NMR 500.13 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 10.95 (br. s, NH), 10.63 (br. s, NH), 9.60 (br. s, OH), 9.38 (br. s, OH), 6.65 (s, 2H, H<sub>arom.</sub>), 6.58 (s, 1H, H<sub>arom.</sub>), 5.71 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=20.2 Hz, 1H, PCH), 4.23 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.2 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 4.14-3.94 (m, 4H, POCH<sub>2</sub>), 4.88 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.2 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 3.75 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 1.21 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 3H, CCH<sub>3</sub>), 1.14 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 3H, CCH<sub>3</sub>)

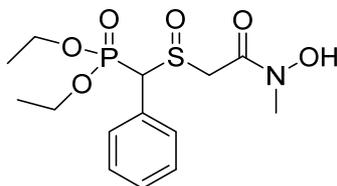
<sup>13</sup>C-NMR 125.76 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 160.20 (C=O), 158.18 (C<sub>arom.</sub>), 128.99 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=5.6 Hz, C<sub>arom.</sub>), 109.26 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.7 Hz, C<sub>arom.</sub>), 100.41 (C<sub>arom.</sub>), 65.29 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=135.7 Hz, PC), 63.71 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.5 Hz, POCH<sub>2</sub>), 63.12 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.5 Hz, POCH<sub>2</sub>), 55.21 (OCH<sub>3</sub>, SCH<sub>2</sub>), 16.01 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.8 Hz, CCH<sub>3</sub>), 15.91 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.7 Hz, CCH<sub>3</sub>)

C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>9</sub>PS [425.39]

CHN Berechnet (%): C 42.35, H 5.69, N 3.29, S 7.54

Gefunden (%): C 42.07, H 5.69, N 3.24, S 7.64

**Diethyl(((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)sulfinyl)(phenyl)methyl)phosphonat 40**



Hergestellt aus **10** (3.47 g, 10 mmol) nach **AAV 11**.

Ausbeute 76 % weißer Feststoff

Schmelzpunkt 119 °C

<sup>1</sup>H-NMR 500.13 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 10.19 (br. s, 0.04H, OH), 10.18-10.12 (m, 0.89H, OH), 10.12-10.10 (m, 0.03H, OH), 9.83 (br. s, 0.04H, OH), 7.49-7.35 (m, 5H, H<sub>arom.</sub>), 5.19 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=18.0 Hz, 0.66H, PCH), 4.83 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=20.8 Hz, 0.34H, PCH), 4.16-4.02 (m, 2H, POCH<sub>2</sub>), 4.02-3.89 (m, 2H, POCH<sub>2</sub>), 3.89-3.79 (m, 0.76H, SCH<sub>2</sub>), 3.74 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.7 Hz, 0.35H, SCH<sub>2</sub>), 3.72 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.6 Hz, 0.51H, SCH<sub>2</sub>), 3.59-3.56 (s, 0.07H, SCH<sub>2</sub>), 3.51 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.7 Hz, 0.31H, SCH<sub>2</sub>), 3.15-3.01 (m, 3H, NCH<sub>3</sub>), 1.27-1.19 (m, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.10 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 1H, CH<sub>3</sub>), 1.00 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 2H, CH<sub>3</sub>)

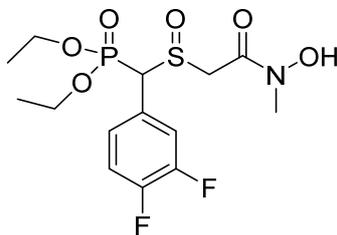
<sup>13</sup>C-NMR 125.76 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 164.76 (C=O), 131.08 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.3 Hz, C<sub>arom.</sub>), 129.85 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=6.9 Hz, C<sub>arom.</sub>), 128.76 (C<sub>arom.</sub>), 128.50 (C<sub>arom.</sub>), 128.36 (C<sub>arom.</sub>), 128.09 (C<sub>arom.</sub>), 62.57 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=139.0 Hz, PC), 62.68 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.6 Hz, POCH<sub>2</sub>), 62.55 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.5 Hz, POCH<sub>2</sub>), 62.41 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.7 Hz, POCH<sub>2</sub>), 62.28 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.5 Hz, POCH<sub>2</sub>), 60.69 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=144.3 Hz, PC), 54.34 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=9.5 Hz, SCH<sub>2</sub>), 53.96 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.3 Hz, SCH<sub>2</sub>), 35.67-35.57 (m, NCH<sub>3</sub>), 16.08 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.8 Hz, CH<sub>3</sub>), 15.91 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.7 Hz, CH<sub>3</sub>), 15.79 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=6.0 Hz, CH<sub>3</sub>)

C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>F<sub>2</sub>NO<sub>6</sub>PS [363.36]

CHN Berechnet (%): C 46.28, H 6.10, N 3.85, S 8.82

Gefunden (%): C 46.54, H 6.16, N 3.78, S 8.99

**Diethyl((3,4-difluorphenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)sulfinyl)methyl)-phosphonat 41**



Hergestellt aus **13** (0.38 g, 1 mmol) nach **AAV 11**.

Ausbeute 62 % farbloses Öl

<sup>1</sup>H-NMR 500.13 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 10.18 (br. s, OH), 10.16 (br. s, OH), 7.61-7.51 (m, 1H, H<sub>arom.</sub>), 7.50-7.40 (m, 1H, H<sub>arom.</sub>), 7.35-7.22 (m, 1H, H<sub>arom.</sub>), 5.28 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=18.2 Hz, 0.3H, PCH), 4.92 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=20.8 Hz, 0.7H, PCH), 4.18-4.06 (m, 2H, POCH<sub>2</sub>), 4.05-3.89 (m, 2H, POCH<sub>2</sub>), 3.82 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.7 Hz, 0.3H, SCH<sub>2</sub>), 3.72 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.7 Hz, 0.7H, SCH<sub>2</sub>), 3.47 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.7 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 3.13 (s, 0.17H, NCH<sub>3</sub>), 3.11-3.06 (m, 2.66H, NCH<sub>3</sub>), 3.05 (s, 0.17H, NCH<sub>3</sub>), 1.24 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.13 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 2.2H, CH<sub>3</sub>), 1.06 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 0.8H, CH<sub>3</sub>)

<sup>13</sup>C-NMR 125.76 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 164.60 (C=O), 164.33 (C=O), 149.43 (dd, <sup>1</sup>J(C,F)=250.1 Hz, <sup>2</sup>J(C,F)=15.5 Hz, C<sub>arom.</sub>), 148.75 (dd, <sup>1</sup>J(C,F)=247.4 Hz, <sup>2</sup>J(C,F)=14.6 Hz, C<sub>arom.</sub>), 128.44-128.17 (m, C<sub>arom.</sub>), 127.21-126.81 (m, C<sub>arom.</sub>), 125.37-125.13 (m, C<sub>arom.</sub>), 119.64 (dd, <sup>2</sup>J(C,F)=17.2 Hz, <sup>3</sup>J(C,F)=<sup>3</sup>J(C,P)=6.3 Hz, C<sub>arom.</sub>), 118.00 (d, <sup>2</sup>J(C,F)=18.6 Hz, C<sub>arom.</sub>), 117.42 (d, <sup>2</sup>J(C,F)=16.6 Hz, C<sub>arom.</sub>), 62.93 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.5 Hz, POCH<sub>2</sub>), 62.73 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.6 Hz, POCH<sub>2</sub>), 62.59 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.5 Hz, POCH<sub>2</sub>), 61.05 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=139.6 Hz, PC), 59.10 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=145.6 Hz, PC), 54.56 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=8.9 Hz, SCH<sub>2</sub>), 54.23 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=3.8 Hz, SCH<sub>2</sub>), 35.62 (NCH<sub>3</sub>), 16.09 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.6 Hz, CH<sub>3</sub>), 15.96 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.6 Hz, CH<sub>3</sub>), 15.87 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.9 Hz, CH<sub>3</sub>)

C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>F<sub>2</sub>NO<sub>6</sub>PS

[399.35]

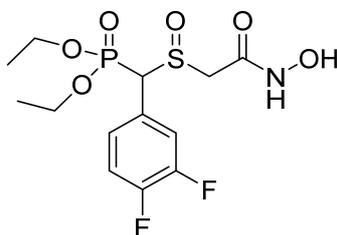
CHN

Berechnet (%): C 42.11, H 5.05, N 3.51, S 8.03

Gefunden (%): C 42.32, H 5.30, N 3.37, S 7.88

**Diethyl((3,4-difluorophenyl)((2-(hydroxylamino)-2-oxoethyl)sulfinyl)methyl)phosphonat**

**42**



Hergestellt aus **23** (1.85 g, 5 mmol) nach **AAV 11**.

Ausbeute 27 % farbloses Öl

<sup>1</sup>H-NMR 500.13 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 10.82 (br. s, NH), 10.71 (br. s, NH), 10.44 (br. s, NH), 10.41 (br. s, NH), 9.39 (br. s, OH), 9.38 (br. s, OH), 9.16 (br. s, OH), 7.61-7.51 (m, 1H, H<sub>arom.</sub>), 7.50-7.40 (m, 1H, H<sub>arom.</sub>), 7.34-7.23 (m, 1H, H<sub>arom.</sub>), 5.32 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=18.4 Hz, 0.25H, PCH), 4.91 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=21.0 Hz, 0.75H, PCH), 4.19-4.06 (m, 2H, POCH<sub>2</sub>), 4.06-3.87 (m, 2H, POCH<sub>2</sub>), 3.47 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=13.4 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 3.31 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=13.5 Hz, 0.3H, SCH<sub>2</sub>), 2.88 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=13.3 Hz, 0.7H, SCH<sub>2</sub>), 1.25 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.13 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 2.3H, CH<sub>3</sub>), 1.06 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=7.0 Hz, 0.7H, CH<sub>3</sub>)

<sup>13</sup>C-NMR 125.76 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 160.85 (C=O), 160.67 (C=O), 149.66 (dd, <sup>1</sup>J(C,F)=271.6 Hz, <sup>2</sup>J(C,F)=15.2 Hz, C<sub>arom.</sub>), 148.80 (dd, <sup>1</sup>J(C,F)=247.8 Hz, <sup>2</sup>J(C,F)=15.7 Hz, C<sub>arom.</sub>), 128.54-128.25 (m, C<sub>arom.</sub>), 127.32-127.09 (m, C<sub>arom.</sub>), 126.65-126.49 (m, C<sub>arom.</sub>), 125.05-124.73 (m, C<sub>arom.</sub>), 119.70 (dd, <sup>2</sup>J(C,F)=17.6 Hz, <sup>3</sup>J(C,F)=<sup>3</sup>J(C,P)=5.5 Hz, C<sub>arom.</sub>), 119.12-118.90 (m, C<sub>arom.</sub>), 118.02 (d, <sup>2</sup>J(C,F)=16.7 Hz, C<sub>arom.</sub>), 117.44 (d, <sup>2</sup>J(C,F)=16.5 Hz, C<sub>arom.</sub>), 62.98 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.6 Hz, POCH<sub>2</sub>), 62.85 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.8 Hz, POCH<sub>2</sub>), 62.76 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.6 Hz, POCH<sub>2</sub>), 62.67 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=6.9 Hz, POCH<sub>2</sub>), 61.02 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=139.7 Hz, PC), 59.15 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=146.2 Hz, PC), 54.54 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=8.9 Hz, SCH<sub>2</sub>), 53.51 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=3.6 Hz, SCH<sub>2</sub>), 16.10 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.7 Hz, CH<sub>3</sub>), 16.08 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.2 Hz, CH<sub>3</sub>), 15.96 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.7 Hz, CH<sub>3</sub>), 15.87 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.6 Hz, CH<sub>3</sub>)

C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>F<sub>2</sub>NO<sub>6</sub>PS

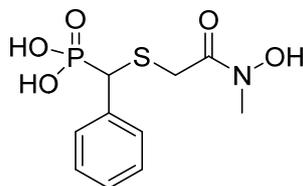
[385.32]

CHN

Berechnet (%): C 40.52, H 4.71, N 3.64, S 8.32

Gefunden (%): C 40.26, H 4.92, N 3.50, S 8.39

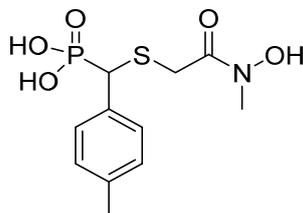
**(((2-(Hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)thio)(phenyl)methyl)phosphonsäure 43**



Hergestellt aus **10** (1.04 g, 3 mmol) nach **AAV 12**. Das Produkt kristallisiert nach Lösen in wenig Acetonitril und Zugabe von einigen Tropfen *n*-Hexan und Ethylacetat in der Kälte aus.

Ausbeute	38 % weißer Feststoff
Schmelzpunkt	112 °C
<sup>1</sup> H-NMR	500.13 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO=δ (ppm): 9.99 (br. s, OH), 7.47–7.35 (m, 2H, H <sub>arom.</sub> ), 7.34–7.26 (m, 2H, H <sub>arom.</sub> ), 7.26–7.18 (m, 1H, H <sub>arom.</sub> ), 4.25 (d, <sup>2</sup> J(H,P)=19.0 Hz, 1H, PCH), 3.50 (d, <sup>2</sup> J(H,H)=14.6 Hz, 1H, SCH <sub>2</sub> ), 3.23 (d, <sup>2</sup> J(H,H)=14.6 Hz, 1H, SCH <sub>2</sub> ), 3.06 (s, 3H, NCH <sub>3</sub> )
<sup>13</sup> C-NMR	125.76 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO=δ (ppm): 168.93 (C=O), 137.36 (d, <sup>2</sup> J(C,P)=3.8 Hz, C <sub>arom.</sub> ), 129.23 (d, <sup>3</sup> J(C,P)=5.8 Hz, C <sub>arom.</sub> ), 127.86 (C <sub>arom.</sub> ), 126.78 (C <sub>arom.</sub> ), 45.72 (d, <sup>1</sup> J(C,P)=139.2 Hz, PC), 35.71 (NCH <sub>3</sub> ), 31.85 (d, <sup>3</sup> J(C,P)=6.2 Hz, SCH <sub>2</sub> )
C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>5</sub> PS	[291.26]
HPLC	Eluent A: wässrige NH <sub>4</sub> OAc Lösung (5 mM), Eluent B: CH <sub>3</sub> CN; Elution: isokratisch (1:1); Laufzeit: 20 Minuten; Flussrate: 1 mL min <sup>-1</sup> ; Detektion: 254 nm; Retentionszeit = 1.870 min; AUC = 99.08 %
HRMS (ESI)	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>5</sub> PS-H <sup>+</sup> [M-H <sup>+</sup> ] Berechnet: 290.02575 Gefunden: 290.02588

**(((2-(Hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)thio)(p-tolyl)methyl)phosphonsäure 44**



Hergestellt aus **11** (0.36 g, 1 mmol) nach **AAV 12**.

Ausbeute 36 % weißer Feststoff

Schmelzpunkt 100 °C

<sup>1</sup>H-NMR 500.13 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 10.92 (br. s, OH), 10.03 (br. s, OH), 7.27 (d, <sup>3</sup>J(H,H)=7.9 Hz, 2H, H<sub>arom.</sub>), 7.10 (d, <sup>3</sup>J(H,H)=7.8 Hz, 2H, H<sub>arom.</sub>), 4.19 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=18.9 Hz, 0.86H, PCH), 4.10 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=19.1 Hz, 0.14H, PCH), 3.48 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.6 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 3.20 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.6 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 3.12-2.99 (m, 3H, NCH<sub>3</sub>), 2.34-2.31 (m, 3H, CH<sub>3arom.</sub>)

<sup>13</sup>C-NMR 125.76 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 168.99 (C=O), 135.87 (C<sub>arom.</sub>), 134.38-134.25 (m, C<sub>arom.</sub>), 129.13 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.7 Hz, C<sub>arom.</sub>), 128.44 (C<sub>arom.</sub>), 45.46 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=139.5 Hz, PC), 35.71 (NCH<sub>3</sub>), 31.91-31.66 (m, SCH<sub>2</sub>), 20.60 (CH<sub>3arom.</sub>)

C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>5</sub>PS [305.28]

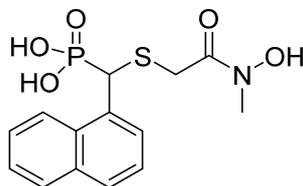
HPLC Eluent: CH<sub>3</sub>CN; Laufzeit: 20 Minuten; Flussrate: 1 mL min<sup>-1</sup>; Detektion: 254 nm; Retentionszeit = 2.753 min; AUC = 95.72 %

HRMS (ESI) C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>5</sub>PS-H<sup>+</sup> [M-H<sup>+</sup>]

Berechnet: 304.04140

Gefunden: 304.04165

**(((2-(Hydroxy(methyl)amino-2-oxoethyl)thio)(naphthalen-1-yl)methyl)phosphonsäure**  
**45**



Hergestellt aus **12** (0.79 g, 2 mmol) nach **AAV 12**.

Ausbeute 55 % weißer Feststoff

Schmelzpunkt 137 °C

<sup>1</sup>H-NMR 500.13 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 10.00 (br. s, OH), 8.20 (d, <sup>3</sup>J(H,H)=6.9 Hz, 1H, H<sub>arom.</sub>), 7.92 (d, <sup>3</sup>J(H,H)=7.9 Hz, 1H, H<sub>arom.</sub>), 7.88 (m, 1H, H<sub>arom.</sub>), 7.83 (d, <sup>3</sup>J(H,H)=8.1 Hz, 1H, H<sub>arom.</sub>), 7.59–7.44 (m, 3H, H<sub>arom.</sub>), 5.19 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=18.3 Hz, 1H, PCH), 3.74 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.2 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 3.34 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.5 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 3.05 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>)

<sup>13</sup>C-NMR 125.76 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 169.11 (C=O), 133.65–133.45 (m, C<sub>arom.</sub>), 133.37–133.15 (m, C<sub>arom.</sub>), 131.44–131.12 (m, C<sub>arom.</sub>), 128.46 (C<sub>arom.</sub>), 127.36 (C<sub>arom.</sub>), 127.05–126.84 (m, C<sub>arom.</sub>), 126.13–125.87 (C<sub>arom.</sub>), 125.47 (C<sub>arom.</sub>), 125.22 (C<sub>arom.</sub>), 123.61 (C<sub>arom.</sub>), 38.71–38.51 (m, PC), 35.72 (NCH<sub>3</sub>), 32.44–32.23 (m, SCH<sub>2</sub>)

C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>5</sub>PS [341.32]

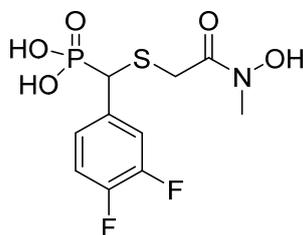
HPLC Eluent A: wässrige NH<sub>4</sub>OAc Lösung (5 mM), Eluent B: CH<sub>3</sub>CN; Elution: isokratisch (1:1); Laufzeit: 20 Minuten; Flussrate: 1 mL min<sup>-1</sup>; Detektion: 254 nm; Retentionszeit = 1.860 min; AUC = 99.39 %

HRMS (ESI) C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>5</sub>PS-H<sup>+</sup> [M-H<sup>+</sup>]

Berechnet: 340.04140

Gefunden: 340.04104

**((3,4-Difluorphenyl)((2-(hydroxymethyl)amino)-2-oxoethylthio)methyl)phosphonsäure**  
**46**



Hergestellt aus **13** (0.38 g, 1 mmol) nach **AAV 12**.

Ausbeute 45 % weißer Feststoff

Schmelzpunkt 137 °C

<sup>1</sup>H-NMR 500.13 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 10.04 (br. s, OH), 7.51-7.31 (m, 2H, H<sub>arom.</sub>), 7.28-7.14 (m, 1H, H<sub>arom.</sub>), 4.28 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=19.6 Hz, 0.83H, PCH), 4.21 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=19.2 Hz, 0.17H, PCH), 3.46 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.6 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 3.23 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.6 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 3.09 (s, 0.21H, NCH<sub>3</sub>), 3.05 (s, 2.54H, NCH<sub>3</sub>), 3.01 ppm (s, 0.25H, NCH<sub>3</sub>)

<sup>13</sup>C-NMR 125.76 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 168.66 (C=O), 148.79 (dd, <sup>1</sup>J(C,F)=244.7 Hz, <sup>2</sup>J(C,F)=11.7 Hz, C<sub>arom.</sub>), 148.34 (dd, <sup>1</sup>J(C,F)=244.8 Hz, <sup>2</sup>J(C,F)=12.5 Hz, C<sub>arom.</sub>), 135.58 (C<sub>arom.</sub>), 126.23-126.01 (m, C<sub>arom.</sub>), 117.80 (dd, <sup>2</sup>J(C,F)=17.7 Hz, <sup>3</sup>J(C,F)=<sup>3</sup>J(C,P)=5.6 Hz, C<sub>arom.</sub>), 116.77 (d, <sup>2</sup>J(C,F)=17.0 Hz, C<sub>arom.</sub>), 45.01 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=137.8 Hz, PC), 35.70 (NCH<sub>3</sub>), 31.88 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=7.4 Hz, SCH<sub>2</sub>)

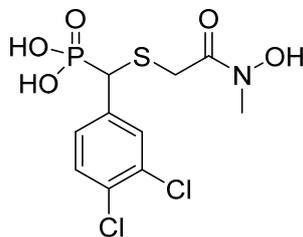
C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>F<sub>2</sub>NO<sub>5</sub>PS [327.24]

CHN Berechnet (%): C 36.70, H 3.70, N 4.28

Gefunden (%): C 36.97, H 4.00, N 3.92

**((3,4-Dichlorphenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)thio)methyl)phosphonsäure**

**47**



Hergestellt aus **14** (0.42 g, 1 mmol) nach **AAV 12**.

Ausbeute 45 % weißer Feststoff

Schmelzpunkt 134 °C

<sup>1</sup>H-NMR 500.13 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 10.01 (br. s, OH), 7.70–7.52 (m, 2H, H<sub>arom.</sub>), 7.45–7.30 (m, 1H, H<sub>arom.</sub>), 4.32 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=19.8 Hz, 0.86H, PCH) 4.24 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=19.8 Hz, 0.14H, PCH), 3.47 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.6 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 3.25 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.6 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 3.12–2.97 (m, 3H, NCH<sub>3</sub>)

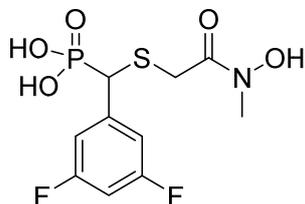
<sup>13</sup>C-NMR 125.76 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 168.55 (C=O), 139.05–138.93 (m, C<sub>arom.</sub>), 130.84 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.8 Hz, C<sub>arom.</sub>), 130.42 (d, <sup>4</sup>J(C,P)=1.3 Hz, C<sub>arom.</sub>), 130.07 (C<sub>arom.</sub>), 129.63 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.8 Hz, C<sub>arom.</sub>), 129.42 (d, <sup>4</sup>J(C,P)=2.3 Hz, C<sub>arom.</sub>), 44.85 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=137.3 Hz, PC), 35.71 (NCH<sub>3</sub>), 31.96 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=7.4 Hz, SCH<sub>2</sub>)

C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>5</sub>PS [358.96]

CHN Berechnet (%): C 33.35, H 3.36, N 3.89

Gefunden (%): C 33.06, H 3.47, N 3.63

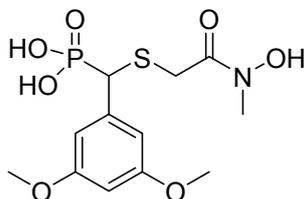
**((3,5-Difluorphenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)thio)methyl)-phosphonsäure 48**



Hergestellt aus **15** (0.38 g, 1 mmol) nach **AAV 12**. Das Produkt kristallisiert nach Lösen in wenig Ethylacetat in der Kälte aus.

Ausbeute	60 % weißer Feststoff
Schmelzpunkt	135 °C
<sup>1</sup> H-NMR	500.13 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO=δ (ppm): 10.01 (br. s, OH), 7.17-7.12 (m, 1H, H <sub>arom.</sub> ), 7.09 (d, <sup>3</sup> J(H,H)=8.3 Hz, 2H, H <sub>arom.</sub> ), 4.33 (d, <sup>2</sup> J(H,P)=19.8 Hz, 0.87H, PCH), 4.25 (d, <sup>2</sup> J(H,P)=19.8 Hz, 0.13H, PCH), 3.48 (d, <sup>2</sup> J(H,H)=14.6 Hz, 1H, SCH <sub>2</sub> ), 3.28 (d, <sup>2</sup> J(H,H)=14.7 Hz, 1H, SCH <sub>2</sub> ), 3.09 (s, 0.31H, NCH <sub>3</sub> ), 3.05 (s, 2.53H, NCH <sub>3</sub> ), 3.01 (s, 0.16H, NCH <sub>3</sub> )
<sup>13</sup> C-NMR	125.76 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO=δ (ppm): 168.54 (C=O), 161.78 (dd, <sup>1</sup> J(C,F)=246.8 Hz, <sup>3</sup> J(C,F)=13.0 Hz, C <sub>arom.</sub> ), 142.47-142.26 (m, C <sub>arom.</sub> ), 112.27 (dd, <sup>2</sup> J(C,F)=25.7 Hz, <sup>4</sup> J(C,F)= <sup>3</sup> J(C,P)=5.7 Hz, C <sub>arom.</sub> ), 102.69-102.16 (m, C <sub>arom.</sub> ), 45.39 (d, <sup>1</sup> J(C,P)=137.5 Hz, PC), 35.69 (NCH <sub>3</sub> ), 32.04 (d, <sup>3</sup> J(C,P)=7.8 Hz, SCH <sub>2</sub> )
C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> F <sub>2</sub> NO <sub>5</sub> PS	[327.24]
HPLC	Eluent A: wässrige NH <sub>4</sub> OAc Lösung (5 mM), Eluent B: CH <sub>3</sub> CN; Elution: isokratisch (1:1); Laufzeit: 20 Minuten; Flussrate: 1 mL min <sup>-1</sup> ; Detektion: 254 nm; Retentionszeit = 1.870 min; AUC = 99.41 %
HRMS (ESI)	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> F <sub>2</sub> NO <sub>5</sub> PS+H <sup>+</sup> [M+H <sup>+</sup> ] Berechnet: 328.02146 Gefunden: 328.02118

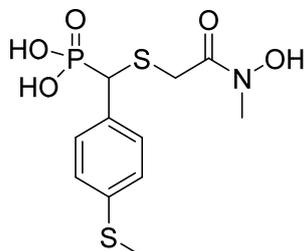
**((3,5-Dimethoxyphenyl)((2-hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)thio(phenyl)-methyl)phosphonsäure 49**



Hergestellt aus **16** (0.41 g, 1 mmol) nach **AAV 12**. Das Produkt kristallisiert nach Lösen in wenig Dichlormethan und Zugabe von wenigen Tropfen *n*-Hexan in der Kälte aus.

Ausbeute	18 % gelber Feststoff
Schmelzpunkt	108 °C
<sup>1</sup> H-NMR	500.13 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO=δ (ppm): 10.02 (br. s, OH), 6.61-6.55 (m, 2H, H <sub>arom.</sub> ), 6.42-6.36 (m, 1H, H <sub>arom.</sub> ), 4.16 (d, <sup>2</sup> J(H,P)=19.1 Hz, 1H, PCH), 3.72 (s, 6H, OCH <sub>3</sub> ), 3.50 (d, <sup>2</sup> J(H,H)=14.6 Hz, 1H, SCH <sub>2</sub> ), 3.27 (d, <sup>2</sup> J(H,H)=14.6 Hz, 1H, SCH <sub>2</sub> ), 3.07 (s, 3H, NCH <sub>3</sub> )
<sup>13</sup> C-NMR	125.76 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO=δ (ppm): 168.60 (C=O), 159.92-159.82 (m, C <sub>arom.</sub> ), 139.56 (d, <sup>5</sup> J(C,P)=1.8 Hz, C <sub>arom.</sub> ), 107.55 (d, <sup>3</sup> J(C,P)=6.0 Hz, C <sub>arom.</sub> ), 98.48 (C <sub>arom.</sub> ), 55.07-54.94 (m, OCH <sub>3</sub> ), 45.91 (d, <sup>1</sup> J(C,P)=139.0 Hz, PC), 35.72 (NCH <sub>3</sub> ), 32.07-31.94 (m, SCH <sub>2</sub> )
C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> NO <sub>7</sub> PS	[351.31]
HPLC	Eluent A: wässrige NH <sub>4</sub> OAc Lösung (5 mM), Eluent B: CH <sub>3</sub> CN; Elution: isokratisch (1:1); Laufzeit: 20 Minuten; Flussrate: 1 mL min <sup>-1</sup> ; Detektion: 254 nm; Retentionszeit = 1.887min; AUC = 99.65 %
HRMS (ESI)	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> NO <sub>7</sub> PS +H <sup>+</sup> [M+H <sup>+</sup> ] Berechnet: 352.06144 Gefunden: 352.06103

**(((2-(Hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)thio)(4-(methylthio)phenyl)methyl)-phosphonsäure 50**



Hergestellt aus **17** (0.79 g, 2 mmol) nach **AAV 12**. Das Produkt kristallisiert nach Lösen in wenig Dichlormethan und Zugabe von wenigen Tropfen Diethylether in der Kälte aus.

Ausbeute 80 % weißer Feststoff

Schmelzpunkt 134 °C

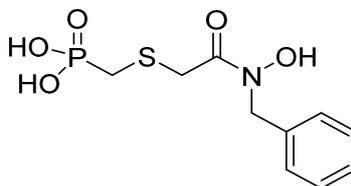
<sup>1</sup>H-NMR 600.22 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 10.00 (br. s, OH), 7.33 (dd, <sup>3</sup>J(H,H)=8.3 Hz, <sup>4</sup>J(H,H)=1.6 Hz, 2H, H<sub>arom.</sub>), 7.20 (d, <sup>3</sup>J(H,H)=8.3 Hz, 2H, H<sub>arom.</sub>), 4.23 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=19.2 Hz, 1H, PCH), 3.48 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.6 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 3.21 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.6 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 3.06 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 2.46 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>)

<sup>13</sup>C-NMR 150.93 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 168.90 (C=O), 136.49 (C<sub>arom.</sub>), 133.93 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=4.1 Hz, C<sub>arom.</sub>), 129.79 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.8 Hz, C<sub>arom.</sub>), 125.49 (C<sub>arom.</sub>), 45.32 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=139.5 Hz, PC), 35.73 (NCH<sub>3</sub>), 31.76 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=6.5 Hz, SCH<sub>2</sub>), 14.65 (SCH<sub>3</sub>)

C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>5</sub>PS<sub>2</sub> [337.34]

HPLC Eluent A: wässrige NH<sub>4</sub>OAc Lösung (5 mM), Eluent B: CH<sub>3</sub>CN; Elution: isokratisch (1:1); Laufzeit: 30 Minuten; Flussrate: 1 mL min<sup>-1</sup>; Detektion: 254 nm; Retentionszeit = 2.011min; AUC = 98.90 %

**(((2-(Benzyl(hydroxy)amino)-2-oxoethyl)thio)methyl)phosphonsäure 51**



Hergestellt aus **19** (0.35 g, 1 mmol) nach **AAV 12**.

Ausbeute 28 % weißer Feststoff

Schmelzpunkt 121 °C

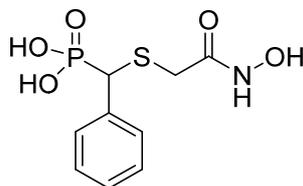
<sup>1</sup>H-NMR 600.22 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 10.11 (br. s, OH), 8.12 (br. s, OH), 7.49-7.40 (m, 0.3H, H<sub>arom.</sub>), 7.38-7.30 (m, 2H, H<sub>arom.</sub>), 7.30-7.22 (m, 2.7H, H<sub>arom.</sub>), 4.69 (s, 2H, PCH<sub>2</sub>), 3.68 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>), 2.74 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=13.0 Hz, 2H, SCH<sub>2</sub>)

<sup>13</sup>C-NMR 150.93 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 169.25 (C=O), 136.71 (C<sub>arom.</sub>), 128.25 (C<sub>arom.</sub>), 127.74 (C<sub>arom.</sub>), 127.11 (C<sub>arom.</sub>), 51.24 (NCH<sub>2</sub>), 32.86 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=3.0 Hz, SCH<sub>2</sub>), 26.50 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=141.9 Hz, PC)

C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>5</sub>PS [291.26]

HPLC Eluent A: wässrige NH<sub>4</sub>OAc Lösung (5 mM), Eluent B: CH<sub>3</sub>CN; Elution: isokratisch (1:1); Laufzeit: 20 Minuten; Flussrate: 1 mL min<sup>-1</sup>; Detektion: 254 nm; Retentionszeit = 1.944 min; AUC = 97.69 %

**(((2-(Hydroxyamino)-2-oxoethyl)thio)(phenyl)methyl)phosphonsäure 52**



Hergestellt aus **20** (0.67 g, 2 mmol) nach **AAV 12**.

Ausbeute 61 % farbloses Öl

<sup>1</sup>H-NMR 500.13 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 10.61 (br. s, NH), 10.17 (br. s, OH), 7.47-7.16 (m, 5H, H<sub>arom.</sub>), 6.41 (br. s, POH), 4.33 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=18.9 Hz, 0.84, PCH), 4.18 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=18.8 Hz, 0.16H, PCH), 3.47-3.36 (m, 0.11H, SCH<sub>2</sub>), 3.29 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.8 Hz, 0.11H, SCH<sub>2</sub>), 3.08 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=13.9 Hz, 0.85H, SCH<sub>2</sub>), 3.00 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.9 Hz, 0.18H, SCH<sub>2</sub>), 2.81 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=13.9 Hz, 0.75H, SCH<sub>2</sub>)

<sup>13</sup>C-NMR 125.76 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 165.95 (C=O), 137.17 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=4.3 Hz, C<sub>arom.</sub>), 129.33 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.8 Hz, C<sub>arom.</sub>), 127.99 (C<sub>arom.</sub>), 126.95 (C<sub>arom.</sub>), 46.20 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=139.2 Hz, PC), 31.48 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=6.1 Hz, SCH<sub>2</sub>)

C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>5</sub>PS [277.23]

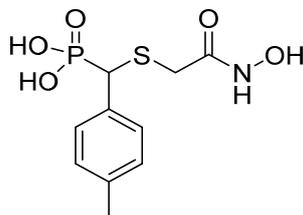
HPLC Eluent A: wässrige NH<sub>4</sub>OAc Lösung (5 mM), Eluent B: CH<sub>3</sub>CN; Elution: isokratisch (1:1); Laufzeit: 20 Minuten; Flussrate: 1 mL min<sup>-1</sup>; Detektion: 254 nm; Retentionszeit = 1.850 min; AUC = 99.82 %

HRMS (ESI) C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>5</sub>PS-H<sup>+</sup> [M-H<sup>+</sup>]

Berechnet: 276.01010

Gefunden: 276.01000

**(((2-(Hydroxyamino)-2-oxoethyl)thio)(p-tolyl)methyl)phosphonsäure 53**



Hergestellt aus **21** (0.69 g, 2 mmol) nach **AAV 12**.

Ausbeute 90 % orangefarbenes Öl

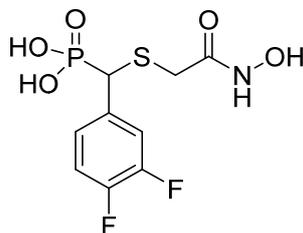
<sup>1</sup>H-NMR 600.22 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 10.54 (br. s, NH), 10.07 (br. s, NH), 10.03 (br. s, OH), 9.88 (br. s, OH), 7.27 (dd, <sup>3</sup>J(H,H)=8.2 Hz, <sup>4</sup>J(H,H)=1.5 Hz, 1H, H<sub>arom.</sub>), 7.25 (d, <sup>3</sup>J(H,H)=7.9 Hz, 1H, H<sub>arom.</sub>), 7.11 (d, <sup>3</sup>J(H,H)=7.7 Hz, 1H, H<sub>arom.</sub>), 7.11 (d, <sup>3</sup>J(H,H)=7.8 Hz, 1H, H<sub>arom.</sub>), 4.28 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=18.8 Hz, 0.29H, PCH), 4.23 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=18.3 Hz, 0.15H, PCH), 4.14 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=18.9 Hz, 0.27H, PCH), 4.11 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=19.0 Hz, 0.12H, PCH), 4.10 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=19.2 Hz, 0.17H, PCH), 3.39 (dd, <sup>2</sup>J(H,H)=14.9 Hz, <sup>4</sup>J(H,P)=1.4 Hz, 0.19H, SCH<sub>2</sub>), 3.37 (dd, <sup>2</sup>J(H,H)=13.4 Hz, <sup>4</sup>J(H,P)=1.4 Hz, 0.13H, SCH<sub>2</sub>), 3.33-3.32 (m, 0.04H, SCH<sub>2</sub>), 3.28 (dd, <sup>2</sup>J(H,H)=14.9 Hz, <sup>4</sup>J(H,P)=1.6 Hz, 0.31H, SCH<sub>2</sub>), 3.19 (dd, <sup>2</sup>J(H,H)=15.3 Hz, <sup>4</sup>J(H,P)=3.4 Hz, 0.09H, SCH<sub>2</sub>), 3.10 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=15.0 Hz, 0.20H, SCH<sub>2</sub>), 3.08 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=13.2 Hz, 0.10H, SCH<sub>2</sub>), 3.06 (dd, <sup>2</sup>J(H,H)=13.7 Hz, <sup>4</sup>J(H,P)=1.5 Hz, 0.27H, SCH<sub>2</sub>), 2.99 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.9 Hz, 0.32H, SCH<sub>2</sub>), 2.87 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.4 Hz, 0.02H, SCH<sub>2</sub>), 2.80 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=13.9 Hz, 0.33H, SCH<sub>2</sub>), 2.28 (s, 3H, CH<sub>3arom.</sub>)

<sup>13</sup>C-NMR 150.93 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO-*d* (ppm): 170.94 (C=O), 169.56 (C=O), 169.52 (C=O), 165.88 (C=O), 136.21-136.08 (m, C<sub>arom.</sub>), 135.98 (d, <sup>5</sup>J(C,P)=1.5 Hz, C<sub>arom.</sub>), 134.01 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=4.3 Hz, C<sub>arom.</sub>), 133.7 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=4.5 Hz, C<sub>arom.</sub>), 133.5 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=4.8 Hz, C<sub>arom.</sub>), 129.24-129.04 (m, C<sub>arom.</sub>), 128.70-128.40 (m, C<sub>arom.</sub>), 45.94 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=139.5 Hz, PC), 45.89 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=139.8 Hz, PC), 45.86 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=139.7 Hz, PC), 45.66 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=139.7 Hz, PC), 34.56 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.6 Hz, SCH<sub>2</sub>), 33.06 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=6.7 Hz, SCH<sub>2</sub>), 32.82 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=7.2 Hz, SCH<sub>2</sub>), 31.37 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=6.4 Hz, SCH<sub>2</sub>), 20.67-20.52 (m, CH<sub>3arom.</sub>)

C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>5</sub>PS [291.26]

HPLC Eluent A: wässrige NH<sub>4</sub>OAc Lösung (5 mM), Eluent B: CH<sub>3</sub>CN; Elution: isokratisch (1:1); Laufzeit: 20 Minuten; Flussrate: 1 mL min<sup>-1</sup>; Detektion: 254 nm; Retentionszeit = 1.833min; AUC = 99.83 %

**((3,4-Difluorphenyl)((2-(hydroxyamino)-2-oxoethyl)thio)methyl)phosphonsäure 54**



Hergestellt aus **23** (0.18 g, 0.5 mmol) nach **AAV 12**.

Ausbeute 42 % hellbraunes Öl

<sup>1</sup>H-NMR 500.13 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 10.57 (br. s, NH), 9.00 (br. s, NOH, POH), 7.63-7.09 (m, 3H, H<sub>arom.</sub>), 4.46 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=19.1 Hz, 0.09H, PCH), 4.36 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=19.6 Hz, 0.59H, PCH), 4.23 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=19.5 Hz, 0.32H, PCH), 3.76-3.62 (m, 0.02H, SCH<sub>2</sub>), 3.62-3.46 (m, 0.06H, SCH<sub>2</sub>), 3.45-3.06 (m, 0.92H, SCH<sub>2</sub>), 13.02 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=13.8 Hz, 0.52H, SCH<sub>2</sub>), 2.81 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=13.8 Hz, 0.48H, SCH<sub>2</sub>)

<sup>13</sup>C-NMR 125.76 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 165.53 (C=O), 148.85 (dd, <sup>1</sup>J(C,F)=244.5 Hz, <sup>2</sup>J(C,F)=12.2 Hz, C<sub>arom.</sub>), 148.47 (dd, <sup>1</sup>J(C,F)=245.6 Hz, <sup>2</sup>J(C,F)=11.4 Hz, C<sub>arom.</sub>), 135.40-134.77 (m, C<sub>arom.</sub>), 126.20 (C<sub>arom.</sub>), 117.88 (dd, <sup>2</sup>J(C,F)=17.5 Hz, <sup>3</sup>J(C,F)=<sup>3</sup>J(C,P)=4.5 Hz, C<sub>arom.</sub>), 116.88 (d, <sup>2</sup>J(C,F)=17.1 Hz, C<sub>arom.</sub>), 45.40 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=137.9 Hz, PC), 45.31 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=137.8 Hz, PC), 33.27 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=7.5 Hz, SCH<sub>2</sub>), 31.35 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=7.1 Hz, SCH<sub>2</sub>)

C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>F<sub>2</sub>NO<sub>5</sub>PS [313.21]

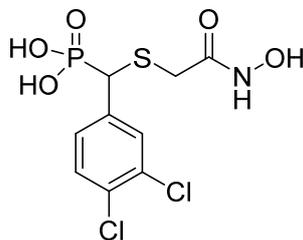
HPLC Eluent A: wässrige NH<sub>4</sub>OAc Lösung (5 mM), Eluent B: CH<sub>3</sub>CN; Elution: isokratisch (1:1); Laufzeit: 20 Minuten; Flussrate: 1 mL min<sup>-1</sup>; Detektion: 254 nm; Retentionszeit = 1.790 min; AUC = 99.76 %

HRMS (ESI) C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>F<sub>2</sub>NO<sub>5</sub>PS-H<sup>+</sup> [M-H<sup>+</sup>]

Berechnet: 311.99126

Gefunden: 311.99107

**((3,4-Dichlorphenyl)((2-(hydroxyamino)-2-oxoethyl)thio)methyl)phosphonsäure 55**



Hergestellt aus **24** (0.20 g, 0.5 mmol) nach **AAV 12**.

Ausbeute 44 % hellbraunes Öl

<sup>1</sup>H-NMR 500.13 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 10.57 (br. s, NH), 10.06 (br. s, NH), 9.26 (br. s, NOH, POH), 8.98 (br. s, NH, POH), 7.71-7.48 (m, 2H, H<sub>arom.</sub>), 7.45-7.24 (m, 1H, H<sub>arom.</sub>), 4.51 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=19.0 Hz, 0.06H, PCH), 4.37 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=19.8 Hz, 0.6H, PCH), 4.24 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=19.9 Hz, 0.34H, PCH), 3.71-3.48 (m, 0,28H, SCH<sub>2</sub>), 3.48-3.32 (m, 0.26H, SCH<sub>2</sub>), 3.31-3.06 (m, 0.55H, SCH<sub>2</sub>), 3.02 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=13.8 Hz, 0.47H, SCH<sub>2</sub>), 2.82 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=13.9 Hz, 0.44H, SCH<sub>2</sub>)

<sup>13</sup>C-NMR 125.76 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 165.42 (C=O), 138.78 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=4.2 Hz, C<sub>arom.</sub>), 130.89 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.9 Hz, C<sub>arom.</sub>), 130.48 (d, <sup>4</sup>J(C,P)=1.1 Hz, C<sub>arom.</sub>), 130.12 (C<sub>arom.</sub>), 129.67 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.7 Hz, C<sub>arom.</sub>), 129.51 (d, <sup>4</sup>J(C,P)=2.7 Hz, C<sub>arom.</sub>), 45.63 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=137.1 Hz, PC), 45.36 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=137.0 Hz, PC), 31.37 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=7.7 Hz, SCH<sub>2</sub>)

C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>5</sub>PS [346.11]

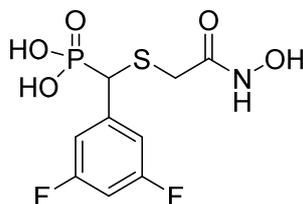
HPLC Eluent A: wässrige NH<sub>4</sub>OAc Lösung (5 mM), Eluent B: CH<sub>3</sub>CN; Elution: isokratisch (1:1); Laufzeit: 20 Minuten; Flussrate: 1 mL min<sup>-1</sup>; Detektion: 254 nm; Retentionszeit = 1.823 min; AUC = 99.95 %

HRMS (ESI) C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>5</sub>PS-H<sup>+</sup> [M-H<sup>+</sup>]

Berechnet: 343.93216

Gefunden: 343.93229

**((3,5-Difluorphenyl)((2-(hydroxyamino)-2-oxoethyl)thio)methyl)phosphonsäure 56**



Hergestellt aus **25** (0.18 g, 0.5 mmol) nach **AAV 12**.

Ausbeute 82 % braunes Öl

<sup>1</sup>H-NMR 600.22 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 11.47 (br. s, NH), 10.57 (br. s, NH), 10.09 (br. s, NH), 8.94 (br. s, OH), 7.21-7.05 (m, 2.5H, H<sub>arom.</sub>), 7.05-6.92 (m, 0.5H, H<sub>arom.</sub>), 4.49 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=20.2 Hz, 0.16H, PCH), 4.37 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=19.8 Hz, 0.53H, PCH), 4.34-4.28 (m, 0.23H, PCH), 4.25 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=19.6 Hz, 0.06H, PCH), 4.25 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=19.6 Hz, 0.02H, PCH), 3.99-3.83 (m, 0.34H, SCH<sub>2</sub>), 3.73-3.65 (m, 0.08H, SCH<sub>2</sub>), 3.59-3.50 (m, 0.09H, SCH<sub>2</sub>), 3.47-3.34 (m, 0.13H, SCH<sub>2</sub>), 3.29 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=15.3 Hz, 0.17H, SCH<sub>2</sub>), 3.25 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=13.4 Hz, 0.09H, SCH<sub>2</sub>), 3.22 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=15.7 Hz, 0.02H, SCH<sub>2</sub>), 3.19 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.7 Hz, 0.04H, SCH<sub>2</sub>), 3.12 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=15.1 Hz, 0.13H, SCH<sub>2</sub>), 3.04 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=13.4 Hz, 0.16H, SCH<sub>2</sub>), 3.03 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=13.9 Hz, 0.37H, SCH<sub>2</sub>), 2.89 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=13.9 Hz, 0.11H, SCH<sub>2</sub>), 2.85 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=13.9 Hz, 0.27H, SCH<sub>2</sub>)

<sup>13</sup>C-NMR 150.93 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 165.36 (C=O), 161.80 (dd, <sup>1</sup>J(C,F)=245.4 Hz, <sup>3</sup>J(C,F)=12.3 Hz, C<sub>arom.</sub>), 142.28-141.70 (m, C<sub>arom.</sub>), 134.37-134.09 (m, C<sub>arom.</sub>), 112.31 (d, <sup>2</sup>J(C,F)=20.3 Hz, C<sub>arom.</sub>), 102.94-102.13 (m C<sub>arom.</sub>), 45.88 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=137.3 Hz, PC), 31.47 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=7.6 Hz, SCH<sub>2</sub>)

C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>F<sub>2</sub>NO<sub>5</sub>PS [313.21]

HPLC Eluent A: wässrige NH<sub>4</sub>OAc Lösung (5 mM), Eluent B: CH<sub>3</sub>CN; Elution: isokratisch (1:1); Laufzeit: 20 Minuten; Flussrate: 1 mL min<sup>-1</sup>; Detektion: 254 nm; Retentionszeit = 1.877 min; AUC = 96.36 %

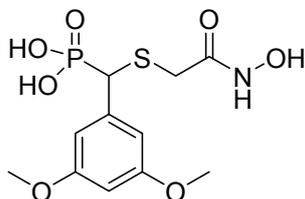
HRMS (ESI)

$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{F}_2\text{NO}_5\text{PS-H}^+$  [M-H<sup>+</sup>]

Berechnet: 311.99126

Gefunden: 311.99131

**((3,5-Dimethoxyphenyl)((2-hydroxyamino)-2-oxoethyl)thio(phenyl)-methyl)-phosphonsäure 57**



Hergestellt aus **26** (0.20 g, 0.5 mmol) nach **AAV 12**.

Ausbeute 16 % hellbraunes Öl

$^1\text{H-NMR}$  500.13 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}=\delta$  (ppm): 10.75-10.51 (br. s, NH), 10.04 (br. s, NH), 8.94 (br. s, OH), 6.97-6.69 (m, 0.29H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 6.67-6.48 (m, 1.71H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 6.47-6.33 (m, 0.85H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 6.33-6.19 (m, 0.15H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 4.13-3.95 (m, 1H, PCH), 3.82-3.78 (m, 0.4H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.77-3.74 (m, 0.92H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.73-3.69 (m, 3.91H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.69-3.66 (m, 0.36H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.66-3.64 (m, 0.41H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.37 (d,  $^2J(\text{H,H})=15.0$  Hz, 0.48H,  $\text{SCH}_2$ ), 3.29 (d,  $^2J(\text{H,H})=14.7$  Hz, 0.24H,  $\text{SCH}_2$ ), 3.24 (d,  $^2J(\text{H,H})=15.6$  Hz, 0.22H,  $\text{SCH}_2$ ), 3.15 (d,  $^2J(\text{H,H})=15.0$  Hz, 0.35H,  $\text{SCH}_2$ ), 3.07 (d,  $^2J(\text{H,H})=13.1$  Hz, 0.43H,  $\text{SCH}_2$ ), 2.86 (d,  $^2J(\text{H,H})=13.8$  Hz, 0.28H,  $\text{SCH}_2$ )

$^{13}\text{C-NMR}$  125.76 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}=\delta$  (ppm): 169.53 (C=O), 160.01-159.82 (m,  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 139.42-138.85 (m,  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 107.92-107.75 (m,  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 107.70-107.47 (m,  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 98.69-98.48 (m,  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 55.11-54.93 (m,  $\text{OCH}_3$ ), 46.42 (d,  $^1J(\text{C,P})=138.6$  Hz, PC), 46.38 (d,  $^1J(\text{C,P})=138.6$  Hz, PC), 32.99 (d,  $^3J(\text{C,P})=7.5$  Hz,  $\text{SCH}_2$ ), 31.55 (d,  $^3J(\text{C,P})=7.1$  Hz,  $\text{SCH}_2$ )

$\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{NO}_7\text{PS}$  [337.28]

HPLC Eluent A: wässrige  $\text{NH}_4\text{OAc}$  Lösung (5 mM), Eluent B:  $\text{CH}_3\text{CN}$ ; Elution: isokratisch (1:1); Laufzeit: 20 Minuten; Flussrate: 1  $\text{mL min}^{-1}$ ; Detektion: 254 nm; Retentionszeit = 1.867 min; AUC = 97.56 %

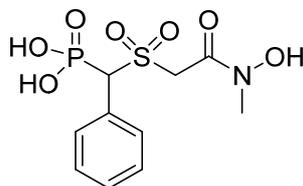
HRMS (ESI)

$C_9H_{10}F_2NO_5PS-H^+$  [M-H<sup>+</sup>]

Berechnet: 336.03123

Gefunden: 336.03118

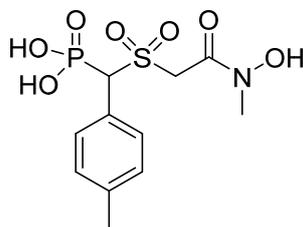
**(((2-(Hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)sulfonyl)(phenyl)methyl)phosphonsäure 58**



Hergestellt aus **30** (0.76 g, 2 mmol) nach **AAV 12**. Das Produkt scheidet sich nach Lösen in wenig Ethylacetat und tropfenweisem Versetzen mit Dichlormethan ab.

Ausbeute	26 % farbloses Öl
<sup>1</sup> H-NMR	500.13 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO=δ (ppm): 10.37 (br. s, OH), 7.55-7.45 (m, 2H, H <sub>arom.</sub> ), 7.43-7.30 (m, 3H, H <sub>arom.</sub> ), 5.50 (d, <sup>2</sup> J(H,P)=19.1 Hz, 0.9H, PCH), 5.42 (d, <sup>2</sup> J(H,P)=19.1 Hz, 0.1H, PCH), 4.95 (d, <sup>2</sup> J(H,H)=15.2 Hz, 0.92H, SCH <sub>2</sub> ), 4.72 (d, <sup>2</sup> J(H,H)=15.0 Hz, 0.08H, SCH <sub>2</sub> ), 4.55 (d, <sup>2</sup> J(H,H)=15.2 Hz, 0.08H, SCH <sub>2</sub> ), 4.34 (d, <sup>2</sup> J(H,H)=15.2 Hz, 0.92H, SCH <sub>2</sub> ), 3.19 (s, 0.15H, NCH <sub>3</sub> ), 3.15 (s, 2.69H, NCH <sub>3</sub> ), 3.11 (s, 0.16H, NCH <sub>3</sub> )
<sup>13</sup> C-NMR	125.76 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO=δ (ppm): 162.23 (C=O), 131.16 (d, <sup>2</sup> J(C,P)=5.2 Hz, C <sub>arom.</sub> ), 128.82 (d, <sup>3</sup> J(C,P)=5.2 Hz, C <sub>arom.</sub> ), 128.25 (C <sub>arom.</sub> ), 128.17 (C <sub>arom.</sub> ), 67.16 (d, <sup>1</sup> J(C,P)=129.4 Hz, PC), 54.02 (SCH <sub>2</sub> ), 35.57 (NCH <sub>3</sub> )
C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>7</sub> PS	[323.26]
HPLC	Eluent A: wässrige NH <sub>4</sub> OAc Lösung (5 mM), Eluent B: CH <sub>3</sub> CN; Elution: isokratisch (1:1); Laufzeit: 20 Minuten; Flussrate: 1 mL min <sup>-1</sup> ; Detektion: 254 nm; Retentionszeit = 1.790 min; AUC = 97.98 %
HRMS (ESI)	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>7</sub> PS+H <sup>+</sup> [M+H <sup>+</sup> ] Berechnet: 324.03068 Gefunden: 324.03014

**(((2-(Hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)sulfonyl)(p-tolyl)methyl)phosphonsäure 59**



Hergestellt aus **31** (0.39 g, 1 mmol) nach **AAV 12**.

Ausbeute 61 % braunes Öl

<sup>1</sup>H-NMR 600.22 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 10.36 (br. s, OH), 7.37 (d, <sup>3</sup>J(H,H)=7.3 Hz, 2H, H<sub>arom.</sub>), 7.18 (d, <sup>3</sup>J(H,H)=7.9 Hz, 2H, H<sub>arom.</sub>), 5.4 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=19.1 Hz, 0.8H, PCH), 5.35 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=18.9 Hz, 0.06H, PCH), 5.13 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=19.0 Hz, 0.06H, PCH), 5.12 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=19.0 Hz, 0.08H, PCH), 4.92 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=15.1 Hz, 0.78H, SCH<sub>2</sub>), 4.77 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.5 Hz, 0.04H, SCH<sub>2</sub>), 4.76 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.5 Hz, 0.04H, SCH<sub>2</sub>), 4.70 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.6 Hz, 0.14H, SCH<sub>2</sub>), 4.52 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=15.1 Hz, 0.06H, SCH<sub>2</sub>), 4.48 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.4 Hz, 0.04H, SCH<sub>2</sub>), 4.44 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.5 Hz, 0.04H, SCH<sub>2</sub>), 4.31 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=15.1 Hz, 0.77H, SCH<sub>2</sub>), 4.24 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.6 Hz, 0.09H, SCH<sub>2</sub>), 3.14 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 2.31 (s, 3H, CH<sub>3arom.</sub>)

<sup>13</sup>C-NMR 150.93 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 162.28 (C=O), 137.66 (C<sub>arom.</sub>), 131.08 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=5.4 Hz, C<sub>arom.</sub>), 128.76 (C<sub>arom.</sub>), 125.75 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=5.3 Hz, C<sub>arom.</sub>), 66.90 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=130.1 Hz, PC), 53.96 (SCH<sub>2</sub>), 35.58 (NCH<sub>3</sub>), 20.71 (CH<sub>3arom.</sub>)

C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>7</sub>PS [337.28]

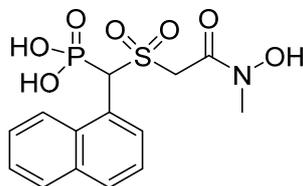
HPLC Eluent A: wässrige NH<sub>4</sub>OAc Lösung (5 mM), Eluent B: CH<sub>3</sub>CN; Elution: isokratisch (1:1); Laufzeit: 20 Minuten; Flussrate: 1 mL min<sup>-1</sup>; Detektion: 254 nm; Retentionszeit = 1.897 min; AUC = 99.64 %

HRMS (ESI) C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>7</sub>PS-H<sup>+</sup> [M-H<sup>+</sup>]

Berechnet: 336.0312

Gefunden: 336.0308

**(((2-(Hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)sulfonyl)(naphthalen-1-yl)methyl)-  
phosphonsäure 60**



Hergestellt aus **32** (0.43 g, 1 mmol) nach **AAV 12**.

Ausbeute 34 % beigefarbenes Öl

<sup>1</sup>H-NMR 600.22 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 10.46 (br. s, OH), 8.23 (d, <sup>3</sup>J(H,H)=8.6 Hz, 0.8H, H<sub>arom.</sub>), 8.19-8.14 (m, 0.2H, H<sub>arom.</sub>), 8.08 (d, <sup>3</sup>J(H,H)=7.2 Hz, 1H, H<sub>arom.</sub>), 8.01-7.94 (m, 2H, H<sub>arom.</sub>), 7.65-7.59 (m, 1H, H<sub>arom.</sub>), 7.58-7.52 (m, 2H, H<sub>arom.</sub>), 6.65 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=20.3 Hz, 0.79H, PCH), 6.55 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=21.0 Hz, 0.05H, PCH), 6.27 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=20.1 Hz, 0.07H, PCH), 6.18 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=20.1 Hz, 0.09H, PCH), 5.29 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=15.3 Hz, 0.78H, SCH<sub>2</sub>), 5.23 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.8 Hz, 0.1H, SCH<sub>2</sub>), 5.17 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.9 Hz, 0.12H, SCH<sub>2</sub>), 4.84 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=15.0 Hz, 0.04H, SCH<sub>2</sub>), 4.73 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=15.0 Hz, 0.07H, SCH<sub>2</sub>), 4.60 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.8 Hz, 0.09H, SCH<sub>2</sub>), 4.51 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=15.4 Hz, 0.71H, SCH<sub>2</sub>), 4.38 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.8 Hz, 0.09H, SCH<sub>2</sub>), 3.34-3.29 (m, 0.16H, NCH<sub>3</sub>), 3.19 (s, 2.84H, NCH<sub>3</sub>)

<sup>13</sup>C-NMR 150.93 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 162.78 (C=O), 133.54 (C<sub>arom.</sub>), 132.68 (d, J(C,P)=6.2 Hz, C<sub>arom.</sub>), 128.96 (d, J(C,P)=4.3 Hz, C<sub>arom.</sub>), 128.85 (C<sub>arom.</sub>), 128.63 (C<sub>arom.</sub>), 126.57 (C<sub>arom.</sub>), 125.60 (C<sub>arom.</sub>), 125.03-124.87 (m, C<sub>arom.</sub>), 124.31 (d, J(C,P)=5.0 Hz, C<sub>arom.</sub>), 123.44 (C<sub>arom.</sub>), 60.81 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=131.2 Hz, PC), 54.47 (SCH<sub>2</sub>), 35.68 (NCH<sub>3</sub>), 34.59 (NCH<sub>3</sub>)

C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>7</sub>PS [373.32]

HPLC Eluent A: wässrige NH<sub>4</sub>OAc Lösung (5 mM), Eluent B: CH<sub>3</sub>CN; Elution: isokratisch (1:1); Laufzeit: 20 Minuten; Flussrate: 1 mL min<sup>-1</sup>; Detektion: 254 nm; Retentionszeit = 1.877 min; AUC = 99.97 %

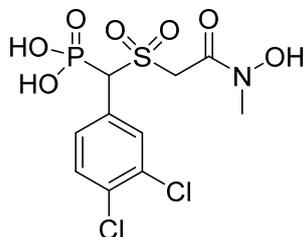
HRMS (ESI)

$C_{14}H_{16}NO_7PS - H^+ [M-H^+]$

Berechnet: 372.0312

Gefunden: 372.0309

**((3,4-Dichlorphenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)sulfonyl)methyl)-phosphonsäure 61**



Hergestellt aus **33** (0.45 g, 1 mmol) nach **AAV 12**.

Ausbeute 17 % braunes Öl

<sup>1</sup>H-NMR 600.22 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 10.47 (br. s, OH), 7.79-7.76 (m, 0.03H, H<sub>arom.</sub>), 7.76-7.75 (m, 0.03H, H<sub>arom.</sub>), 7.75-7.71 (m, 0.94H, H<sub>arom.</sub>), 7.68 (d, <sup>3</sup>J(H,H)=8.4 Hz, 1H, H<sub>arom.</sub>), 7.46 (d, <sup>3</sup>J(H,H)=8.3 Hz, 1H, H<sub>arom.</sub>), 5.50 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=18.7 Hz, 0.95H, PCH), 5.28 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=18.4 Hz, 0.02H, PCH), 5.21 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=18.3 Hz, 0.03H, PCH), 4.90 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=15.2 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 4.42 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=15.2 Hz, 0.9H, SCH<sub>2</sub>), 4.37 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.5 Hz, 0.07H, SCH<sub>2</sub>), 4.30 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=15.4 Hz, 0.03H, SCH<sub>2</sub>), 3.15 (s, NCH<sub>3</sub>)

<sup>13</sup>C-NMR 150.93 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 161.91 (C=O), 132.46 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=4.7 Hz, C<sub>arom.</sub>), 131.57 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=4.8 Hz, C<sub>arom.</sub>), 131.26 (C<sub>arom.</sub>), 130.66 (C<sub>arom.</sub>), 130.40 (C<sub>arom.</sub>), 130.11 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=4.9 Hz, C<sub>arom.</sub>), 66.13 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=126.6 Hz, PC), 54.18 (SCH<sub>2</sub>), 35.55 (NCH<sub>3</sub>)

C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>7</sub>PS [392.14]

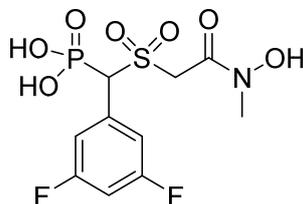
HPLC Eluent A: wässrige NH<sub>4</sub>OAc Lösung (5 mM), Eluent B: CH<sub>3</sub>CN; Elution: isokratisch (1:1); Laufzeit: 20 Minuten; Flussrate: 1 mL min<sup>-1</sup>; Detektion: 254 nm; Retentionszeit = 1.817 min; AUC = 97.89 %

HRMS (ESI) C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>7</sub>PS -H<sup>+</sup> [M-H<sup>+</sup>]

Berechnet: 389.9376

Gefunden: 389.9377

**((3,5-Difluorphenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)sulfonyl)methyl)-phosphonsäure 62**



Hergestellt aus **34** (0.42 g, 1 mmol) nach **AAV 12**.

Ausbeute 80 % braunes Öl

<sup>1</sup>H-NMR 600.22 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO-*d* (ppm): 10.48 (br. s, NOH), 7.33-7.27 (m, 1H, H<sub>arom.</sub>), 7.23 (d, <sup>3</sup>J(H,F)=7.6 Hz, 0.45H, H<sub>arom.</sub>), 7.19 (d, <sup>3</sup>J(H,F)=7.1 Hz, 1.55H, H<sub>arom.</sub>), 5.51 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=18.6 Hz, 0.71H, PCH), 5.39 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=18.1 Hz, 0.07H, PCH), 5.29 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=18.5 Hz, 0.06H, PCH), 5.22 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=17.5 Hz, 0.16H, PCH), 4.97 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=15.0 Hz, 0.07H, SCH<sub>2</sub>), 4.88 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=15.1 Hz, 0.58H, SCH<sub>2</sub>), 4.71 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.1 Hz, 0.06H, SCH<sub>2</sub>), 4.63 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.4 Hz, 0.23H, SCH<sub>2</sub>), 4.57 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.5 Hz, 0.06H, SCH<sub>2</sub>), 4.42 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=15.1 Hz, 0.78H, SCH<sub>2</sub>), 4.37 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.4 Hz, 0.22H, SCH<sub>2</sub>), 3.74 (br. s, POH), 3.15 (NCH<sub>3</sub>)

<sup>13</sup>C-NMR 150.93 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO-*d* (ppm): 161.86 (C=O), 161.73 (dd, <sup>1</sup>J(C,F)=245.5 Hz, <sup>3</sup>J(C,F)=12.9 Hz, C<sub>arom.</sub>), 133.13-132.96 (m, C<sub>arom.</sub>), 114.27 (dd, <sup>2</sup>J(C,F)=21.0 Hz, <sup>4</sup>J(C,F)=<sup>3</sup>J(C,P)=5.2 Hz, C<sub>arom.</sub>), 104.24-103.81 (m, C<sub>arom.</sub>), 66.53 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=127.4 Hz, PC), 54.21 (SCH<sub>2</sub>), 35.57 (NCH<sub>3</sub>)

C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>F<sub>2</sub>NO<sub>7</sub>PS [359.24]

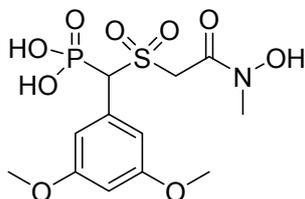
HPLC Eluent A: wässrige NH<sub>4</sub>OAc Lösung (5 mM), Eluent B: CH<sub>3</sub>CN; Elution: isokratisch (1:1); Laufzeit: 20 Minuten; Flussrate: 1 mL min<sup>-1</sup>; Detektion: 254 nm; Retentionszeit = 1.780 min; AUC = 99.73 %

MS (ESI) C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>F<sub>2</sub>NO<sub>7</sub>PS -H<sup>+</sup> [M-H<sup>+</sup>]

Berechnet: 358.0

Gefunden: 358.0

**((3,5-Dimethoxyphenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)sulfonyl)methyl)-phosphonsäure 63**



Hergestellt aus **35** (0.22 g, 0.5 mmol) nach **AAV 12**.

Ausbeute 41 % beigefarbenes Öl

<sup>1</sup>H-NMR 600.22 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 10.54 (br. s, NOH), 6.76-6.72 (m, 0.2H, H<sub>arom.</sub>), 6.72-6.62 (m, 1.8H, H<sub>arom.</sub>), 6.55-6.46 (m, 1H, H<sub>arom.</sub>), 5.33 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=18.9 Hz, 0.61H, PCH), 5.21 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=18.3 Hz, 0.39H, PCH), 5.00 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=15.2 Hz, 0.28H, SCH<sub>2</sub>), 4.91 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=15.1 Hz, 0.5H, SCH<sub>2</sub>), 4.64 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.4 Hz, 0.22H, SCH<sub>2</sub>), 4.55 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.8 Hz, 0.17H, SCH<sub>2</sub>), 4.32 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=15.1 Hz, 0.47H, SCH<sub>2</sub>), 4.31 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.6 Hz, 0.19H, SCH<sub>2</sub>), 4.23 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=13.9 Hz, 0.17H, SCH<sub>2</sub>), 3.76-3.70 (m, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3.65 (br. s, POH), 3.17-3.12 (m, 3H, NCH<sub>3</sub>)

<sup>13</sup>C-NMR 150.93 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 162.19 (C=O), 159.84 (C<sub>arom.</sub>), 159.71 (C<sub>arom.</sub>), 109.62 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=3.1 Hz, C<sub>arom.</sub>), 99.60 (C<sub>arom.</sub>), 55.13-54.96 (m, OCH<sub>3</sub>), 54.12-54.03 (m, SCH<sub>2</sub>), 35.54 (NCH<sub>3</sub>)

C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>9</sub>PS [383.31]

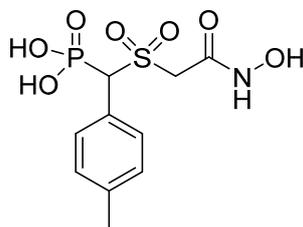
HPLC Eluent A: wässrige NH<sub>4</sub>OAc Lösung (5 mM), Eluent B: CH<sub>3</sub>CN; Elution: isokratisch (1:1); Laufzeit: 20 Minuten; Flussrate: 1 mL min<sup>-1</sup>; Detektion: 254 nm; Retentionszeit = 1.853 min; AUC = 99.86 %

HRMS (ESI) C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>9</sub>PS -H<sup>+</sup> [M-H<sup>+</sup>]

Berechnet: 382.0367

Gefunden: 382.0356

**(((2-(Hydroxyamino)-2-oxoethyl)sulfonyl)(p-tolyl)methyl)phosphonsäure 64**



Hergestellt aus **36** (0.38 g, 1 mmol) nach **AAV 12**.

Ausbeute 92 % braunes Öl

$^1\text{H-NMR}$  600.22 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}=\delta$  (ppm): 10.88 (br. s, NH), 10.54 (br. s, NH), 10.10 (br. s, NH), 9.33 (br. s, OH), 7.42 (d,  $^3J(\text{H,H})=7.7$  Hz, 0.19H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7.40-7.38 (m, 0.25H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7.36 (d,  $^3J(\text{H,H})=7.7$  Hz, 1.56H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7.22-7.20 (m, 0.12H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7.18 (d,  $^3J(\text{H,H})=7.8$  Hz, 1.88H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 5.40 (d,  $^2J(\text{H,P})=19.3$  Hz, 0.7H, PCH), 5.27 (d,  $^2J(\text{H,P})=19.0$  Hz, 0.04H, PCH), 5.25 (d,  $^2J(\text{H,P})=18.6$  Hz, 0.04H, PCH), 5.21 (d,  $^2J(\text{H,P})=18.9$  Hz, 0.02H, PCH), 5.16 (d,  $^2J(\text{H,P})=19.0$  Hz, 0.12H, PCH), 5.12 (d,  $^2J(\text{H,P})=21.9$  Hz, 0.04H, PCH), 5.09 (d,  $^2J(\text{H,P})=22.1$  Hz, 0.04H, PCH), 4.84 (d,  $^2J(\text{H,H})=15.1$  Hz, 0.05H,  $\text{SCH}_2$ ), 4.80 (d,  $^2J(\text{H,H})=14.2$  Hz, 0.11H,  $\text{SCH}_2$ ), 4.70 (d,  $^2J(\text{H,H})=14.6$  Hz, 0.11H,  $\text{SCH}_2$ ), 4.59 (d,  $^2J(\text{H,H})=14.2$  Hz, 0.7H,  $\text{SCH}_2$ ), 4.48 (d,  $^2J(\text{H,H})=14.3$  Hz, 0.02H,  $\text{SCH}_2$ ), 4.44 (d,  $^2J(\text{H,H})=14.5$  Hz, 0.01H,  $\text{SCH}_2$ ), 4.25 (d,  $^2J(\text{H,H})=14.7$  Hz, 0.12H,  $\text{SCH}_2$ ), 4.21 (d,  $^2J(\text{H,H})=15.2$  Hz, 0.05H,  $\text{SCH}_2$ ), 4.09 (d,  $^2J(\text{H,H})=14.4$  Hz, 0.1H,  $\text{SCH}_2$ ), 3.74 (d,  $^2J(\text{H,H})=13.2$  Hz, 0.73H,  $\text{SCH}_2$ ), 2.30 (s, 3H,  $\text{CH}_{3\text{arom.}}$ )

$^{13}\text{C-NMR}$  150.93 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}=\delta$  (ppm): 158.86 (C=O), 137.65 ( $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 131.14-130.92 (m,  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 128.77 ( $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 125.80 (d,  $^3J(\text{C,P})=5.3$  Hz,  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 66.78 (d,  $^1J(\text{C,P})=130.2$  Hz, PC), 55.21 ( $\text{SCH}_2$ ), 20.69 ( $\text{CH}_{3\text{arom.}}$ )

$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{NO}_7\text{PS}$  [323.26]

HPLC Eluent A: wässrige  $\text{NH}_4\text{OAc}$  Lösung (5 mM), Eluent B:  $\text{CH}_3\text{CN}$ ; Elution: isokratisch (1:1); Laufzeit: 20 Minuten; Flussrate: 1  $\text{mL min}^{-1}$ ; Detektion: 254 nm; Retentionszeit = 1.833 min; AUC = 99.89 %

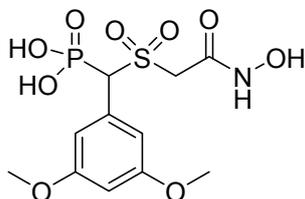
MS (ESI)

$C_{10}H_{14}NO_7PS-H^+$  [M-H<sup>+</sup>]

Berechnet: 322.0

Gefunden: 322.0

**((3,5-Dimethoxyphenyl)((2-(hydroxylamino)-2-oxoethyl)sulfonyl)methyl)phosphonsäure**  
**65**



Hergestellt aus **39** (0.43 g, 1 mmol) nach **AAV 12**.

Ausbeute 80 % weißer Feststoff

Schmelzpunkt 167 °C

<sup>1</sup>H-NMR 600.22 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 10.89 (br. s, NH), 10.55 (br. s, NH), 10.09 (br. s, NH), 9.58 (br. s, OH), 9.35 (br. s, OH), 6.93-6.91 (m, 0.05H, H<sub>arom.</sub>), 6.80-6.75 (m, 0.07H, H<sub>arom.</sub>), 6.73-6.72 (m, 0.03H, H<sub>arom.</sub>), 6.72-6.70 (m, 0.05H, H<sub>arom.</sub>), 6.65 (s, 1.8H, H<sub>arom.</sub>), 6.59-6.56 (m, 0.11H, H<sub>arom.</sub>), 6.55-6.50 (m, 0.84H, H<sub>arom.</sub>), 6.41-6.38 (m, 0.05H, H<sub>arom.</sub>), 6.13 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=19.3 Hz, 0.02H, PCH), 5.82 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=19.2 Hz, 0.02H, PCH), 5.35 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=19.3 Hz, 0.77H, PCH), 5.26 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=19.6 Hz, 0.07H, PCH), 5.13 (d, <sup>2</sup>J(H,P)=19.1 Hz, 0.12H, PCH), 5.02 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.2 Hz, 0.02H, SCH<sub>2</sub>), 4.80 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=15.0 Hz, 0.05H, SCH<sub>2</sub>), 4.77 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=13.9 Hz, 0.04H, SCH<sub>2</sub>), 4.64 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.6 Hz, 0.09H, SCH<sub>2</sub>), 4.53 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.2 Hz, 0.33H, SCH<sub>2</sub>), 4.44 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.2 Hz, 0.19H, SCH<sub>2</sub>), 4.39 (br. s, POH), 4.28 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.6 Hz, 0.14H, SCH<sub>2</sub>), 4.23 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=16.2 Hz, 0.13H, SCH<sub>2</sub>), 3.78 (d, <sup>2</sup>J(H,H)=14.2 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 3.74 (s, 5.6H, OCH<sub>3</sub>), 3.72 (s, 0.4H, OCH<sub>3</sub>)

<sup>13</sup>C-NMR 150.93 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO=δ (ppm): 159.91 (C=O), 158.75 (C<sub>arom.</sub>), 130.67 (d, <sup>2</sup>J(C,P)=5.2 Hz, C<sub>arom.</sub>), 109.49 (d, <sup>3</sup>J(C,P)=4.9 Hz, C<sub>arom.</sub>), 99.68 (C<sub>arom.</sub>), 67.02 (d, <sup>1</sup>J(C,P)=128.7 Hz, PC), 55.27-54.93 (m, OCH<sub>3</sub>, SCH<sub>2</sub>)

C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>9</sub>PS [369.28]

HPLC Eluent A: wässrige NH<sub>4</sub>OAc Lösung (5mM), Eluent B: CH<sub>3</sub>CN; Elution: isokratisch (1:1); Laufzeit: 20 Minuten; Flussrate: 1 mL min<sup>-1</sup>; Detektion: 254 nm; Retentionszeit = 1.833 min; AUC = 99.58 %

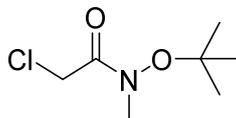
HRMS (ESI)

$C_{11}H_{16}NO_9PS-H^+$  [M-H<sup>+</sup>]

Berechnet: 368.0211

Gefunden: 368.0205

**N-(tert-Butoxy)-2-chlor-N-methylacetamid 66**



Hergestellt aus Benzyltert-butoxy(methyl)carbammat (2.37 g, 10 mmol) nach **AAV 3**.

Ausbeute	77 % gelbes Öl
<sup>1</sup> H-NMR	500.13 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO=δ (ppm): 4.45 (s, 2H, ClCH <sub>2</sub> ), 3.19 (s, 3H, NCH <sub>3</sub> ), 1.27 (s, 9H, CCH <sub>3</sub> )
<sup>13</sup> C-NMR	125.76 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO=δ (ppm): 170.06-169.39 (m, C=O), 82.95 (NOC), 41.93 (ClCH <sub>2</sub> ), 27.00 (NOCCH <sub>3</sub> )*
C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> ClNO <sub>2</sub>	[179.64]

---

\*Die Signale der Carbonylfunktion und der N-Methylgruppe konnten nicht detektiert werden.

## **8.4 Biologische Evaluation**

### **8.4.1 Untersuchungen zur *in vitro*-Aktivität**

#### **Inhibition von IspC-Enzymen**

Untersuchungen an rekombinanten IspC-Enzymen von *Plasmodium falciparum* (PfIspC), *Mycobacterium tuberculosis* (MtIspC) sowie *Escherichia coli* (EcIspC) wurden an der Hamburg School of Food Science der Universität Hamburg im Arbeitskreis von *Markus Fischer* durchgeführt.

#### **Genexpression und Proteinreinigung des PfIspC-Enzyms<sup>[180]</sup>**

Expression des PfIspC-Gens in dem betreffenden *E. coli*-Laborstamm wurde wie 2010 von *Behrendt* und Mitarbeitern beschrieben durchgeführt.<sup>[102]</sup> Der rekombinante *E. coli*-Stamm M15 pREP4 pQEIspCplasmid wurde in LB-Medium\*, angereichert mit Ampicillin (180 mg L<sup>-1</sup>) und Kanamycin (50 mg L<sup>-1</sup>), bis zu einer optischen Dichte von 0.6 kultiviert. Nach Zusatz von Isopropylthiogalactosid zu einer finalen Konzentration von 1 mM wurde die Zellsuspension über Nacht bei 30°C unter Schütteln (120 rpm) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, mit 0.9 %iger NaCl-Lösung gewaschen und in einer Pufferlösung bestehend aus 100 mM Tris-Hydrochlorid (pH 7.4), welches 0.5 M NaCl and 20 mM Imidazol enthielt, resuspendiert. Nach der Zellwandruptur (durchgeführt mittels des Geräts Basic Z Model, Constant Systems Limited, Northamptonshire, UK) wurde die Suspension zentrifugiert und der Überstand auf eine zuvor mit oben genannter Pufferlösung äquilibrierte Ni<sup>2+</sup>-chelatisierende Sepharose Fast Flow<sup>®</sup> Säule (Volumen 40 mL) aufgetragen. Die Säule wurde zur Entfernung von ungebundenem Protein mit 100 mM Tris-Hydrochlorid (pH 7.4), welches 0.5 M NaCl und 100 mM Imidazol enthielt, gespült. Anschließend wurde die Säule mit 100 mM Tris-Hydrochlorid (pH 7.4), welches 0.5 M NaCl und 250 mM Imidazol enthielt, entwickelt. Nach der Vereinigung von Fraktionen wurden diese über Nacht gegen 50 mM Tris-Hydrochlorid (pH 7.4), welches 2 mM DTT und 0.02 % NaN<sub>3</sub> enthielt, dialysiert. IspC-Protein von *Plasmodium falciparum* (PfIspC) konnte mit einer Reinheit von annähernd 95 % erhalten werden. Die Reinheit wurde mittels SDS-PAGE Analyse ermittelt.

---

\*LB-Medium = lysogeny broth Medium. Medium, das ursprünglich von *Bertani* entwickelt wurde um u.a. *Shigella*-Wachstum zu optimieren und seither als Nährmedium zur Kultivierung von Bakterien weit verbreitet ist.<sup>[202]</sup>

### **Gewinnung von *EcIspC* und *MtIspC***

Das *EcIspC*-Protein konnte analog der von *Hecht* und Mitarbeitern 2001 veröffentlichten Methode gewonnen werden.<sup>[204]</sup> Die Reinigung von *MtIspC* erfolgte mittels Äffinitätschromatographie an einer Ni<sup>2+</sup>-chelatisierenden Säule wie für *PfIspC* beschrieben.<sup>[102]</sup>

### **IC<sub>50</sub>-Wert-Bestimmung mittels photometrischem Assay<sup>[180]</sup>**

Für die Durchführung der Assays wurden 96-Well-Mikrotiterplatten (Nunc, Cat. No. 781602) mit transparentem flachen Boden verwendet. Die Assaylösungen, deren Gesamtvolumen 200 µL betrug, enthielten die nachfolgend genannten Bestandteile: 100 mM Tris-Hydrochlorid (pH 7.6), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 0.5 mM NADPH, 0.02 U des IspC-Proteins und die zu testende Substanz. Die Verdünnungsreihen (1:3) der Testsubstanzen deckten nahezu einen Konzentrationsbereich von ca. 200-0.003 µM ab. Durch Zusatz von 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat bis zu einer finalen Konzentration von 0.5-5.0 mM in 100 mM Tris-Hydrochlorid (pH 8) wurde die enzymatische Reaktion gestartet. Die Reaktionskontrolle der enzymatischen Umsetzung erfolgte photometerisch. Hierfür wurde bei Raumtemperatur und bei einer Wellenlänge von 340 nm mit Hilfe des Mikrotiterplattenlesers SpectraMax M5 (Molecular Devices, Biberach an der Riss, Deutschland) der NADPH-Umsatz ermittelt. Die IC<sub>50</sub>-Werte (Mittelwert ± Standardabweichung berechnet aus mindestens 7 Messpunkten) wurden durch nichtlineare Regression mittels des Programms Dynafit bestimmt.<sup>[205-206]</sup>

### **Antiplasmodiale Aktivität**

Untersuchungen zur Bestimmung der antiplasmodialen Aktivität der Testsubstanzen an den *Plasmodium falciparum* Laborstämmen 3D7 und Dd2 wurden am Institut für Tropenmedizin der Eberhard Karls Universität Tübingen im Arbeitskreis von *Benjamin Mordmüller* durchgeführt.

Die für die Untersuchungen verwendeten Parasiten wurden wie von *Trager et al.* beschrieben in kontinuierlicher Kultur gehalten.<sup>[180, 207]</sup> Hierzu wurden Parasiten des Chloroquin-sensitiven *P. falciparum* Laborstamms 3D7 und des Chloroquin-resistenten Stamms Dd2 in einem Inkubator bei 37 °C in einer Atmosphäre von 5 % CO<sub>2</sub> und 5 % O<sub>2</sub> bei einem Hämatokritwert von 5 % in Erythrozyten der Blutgruppe 0 Rhesus positiv in vollständigem Kulturmedium

(RPMI\* 1640, 25 mM 4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-*N'*-4-butansulfonsäure, 2 mM L-Glutamin, 50 µg mL<sup>-1</sup> Gentamycin und 0.5 % w/v Albumax) mit täglichem Wechsel des Mediums kultiviert. Synchronisation der Parasitenkultur wurde mit Sorbitol durchgeführt.<sup>[208]</sup> Die Testsubstanzen wurden in DMSO gelöst, sodass Stammkonzentrationen zwischen 25 und 100 mM erreicht wurden. Weitere Verdünnungen wurden mit vollständigem Kulturmedium vorgenommen. Die finalen Konzentrationen des Lösemittels beeinträchtigten das Parasitenwachstum nicht. Die Aktivität der Testverbindungen wurde durch Messung von HRP2<sup>†</sup> mit Hilfe eines ELISA<sup>‡</sup> entsprechend eines Standardverfahrens bestimmt.<sup>[210]</sup> Hierzu wurden 96-Well-Mikrotiterplatten mit einer 3-fachen Verdünnung der entsprechenden Testsubstanz beschickt. Anschließend wurden diese mit Parasiten im Ringstadium (Parasitämie 0.05 %, Hämatokrit 1.5 %) versetzt, sodass pro Well ein Volumen von 225 µL vorlag. Nach dreitägiger Inkubation wurden die Platten vor Durchführung des HRP2-ELISAs zwei Mal eingefroren und wieder aufgetaut. Chloroquin wurde als interne Kontrolle ebenfalls in jedem Assay evaluiert. Alle Testungen wurden zwei Mal durchgeführt. IC<sub>50</sub>-Werte wurden durch Analyse der Konzentrations-Effekt-Kurven mittels nichtlinearer Regression ermittelt. Hierzu wurde das drc-Paket (v0.9.0) der Software R (v2.6.1) genutzt.<sup>[180, 211-212]</sup>

#### **8.4.2 Kristallisation und Strukturaufklärung**

Untersuchungen zur dreidimensionalen Struktur von *Pf*IspC im Komplex mit Mn<sup>2+</sup>, NADPH und IspC-Inhibitoren<sup>[180]</sup> wurden am Center for Integrated Protein Science Munich, Lehrstuhl für Biochemie der Technischen Universität München, im Arbeitskreis von *Michael Groll* durchgeführt.

Das *Pf*IspC Protein (11 mg mL<sup>-1</sup> in 50 mM Tris-Hydrochlorid (pH 7.4), welches 2 mM DTT<sup>§</sup> und 0.02 % NaN<sub>3</sub> enthielt) wurde vor der Kristallisation mit 1.5 mM **43** (als Racemat vorliegend) sowie mit 640 µM MnCl<sub>2</sub> und 800 µM NADPH inkubiert.<sup>[180]</sup> Die Kristalle wurden durch die „sitting drop vapor diffusion“-Methode bei einer Temperatur von 20 °C generiert. Die Tröpfchen enthielten 0.1 µL der Proteinlösung und 0.1 µL der Reservoirolösung

---

\*RPMI = Roswell Park Memorial Institute. RPMI-1640 ist ein Zellkulturmedium, das an diesem Institut entwickelt wurde.

†HRP2 = *histidine-rich protein 2*. Dieses von *Plasmodium falciparum* produzierte Protein ist ein Parameter für die Entwicklung und Proliferation des Parasiten und kann somit als Maß für dessen Wachstumshemmung und dessen Empfindlichkeit gegenüber bspw. Arzneistoffen herangezogen werden.<sup>[209]</sup>

‡ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay

§DTT = (2*R*,3*R*)-1,4-Dimercaptobutan-2,3-diol

(2 % PEG4000, 100 mM Natriumacetat und 15 % MPD\*, pH 5.0). Die Kristalle wuchsen innerhalb von 6 Wochen bis zu einer finalen Größe von  $500 \times 100 \times 50 \mu\text{m}^3$ . Cokristalle von *PflspC* wurden ohne zusätzliches Kryoprotektivum in einem Stickstoffstrom bei 100 K unterkühlt (Oxford Cryo Systems). Durch den Gebrauch von Synchrotronstrahlung (X06SA beamline, Swiss Light Source, Villigen, Schweiz) konnte bei einer Auflösung von 2 Å ein nativer Datensatz generiert werden.<sup>[180]</sup> Die Bearbeitung der Daten erfolgte mit Hilfe der Programme XDS<sup>[213]</sup> und XSCALE. Die Kristallstrukturanalyse wurde mittels der Methode „molecular replacement“ durchgeführt, wobei hierfür die bei der Proteindatenbank hinterlegten Koordinaten von *PflspC* genutzt wurden (RCSB PDB<sup>†</sup> code 3AU8).<sup>[206]</sup> Das Programm REFMAC5 wurde für Berechnungen zur Verfeinerung der makromolekularen Strukturen eingesetzt.<sup>[214]</sup> Das Modell wurde mit Hilfe des interaktiven dreidimensionalen Graphikprogramms MAIN vervollständigt.<sup>[215]</sup> Die Atomkoordinaten für *PflspC* im Komplex mit **45** (*S*-Enantiomer),  $\text{Mn}^{2+}$  und NADPH wurden in der RCSB Proteindatenbank unter dem Zugangscode 4KP7 hinterlegt.<sup>[180]</sup>

#### **8.4.3 Zytotoxizitätsuntersuchungen an HeLa-Zellen**

Untersuchungen zur Bestimmung der Toxizität ausgewählter Verbindungen gegenüber Säugetierzellen wurden am Institut für Tropenmedizin der Eberhard Karls Universität Tübingen im Arbeitskreis von *Benjamin Mordmüller* durchgeführt.

Die Zytotoxizitätsuntersuchungen erfolgten an HeLa-Zellen nach der von *Borenfreund et al.* veröffentlichten Methode.<sup>[216]</sup> Eine Zellsuspension von 200 000 Zellen pro mL in DMEM-Komplettmedium<sup>‡</sup> wurde hierzu in 96-Well-Mikrotiterplatten mit der entsprechenden Testsubstanz versetzt. Die Testsubstanzen wurden zuvor in einer Konzentration von 1 mM in dem Medium gelöst. Hiervon wurde eine Verdünnungsreihe erstellt, die insgesamt den Bereich 1 mM- $3 \cdot 10^{-5}$  mM abdeckte. Alle Verdünnungsschritte wurden mit dem Medium durchgeführt. Die Zellen wurden für 24 h bei 37 °C in einer Atmosphäre von 5 %  $\text{CO}_2$  und 5 %  $\text{O}_2$  mit der Testsubstanz inkubiert. Anschließend wurde das Medium von den Zellen entfernt und diese wurden stattdessen mit Neutralrot-Medium (0.05 g Neutralrot/L DMEM-Medium) versetzt. Nach Inkubation der Zellkultur für 3h mit dem Neutralrot-Medium bei 37 °C in einer Atmosphäre von 5 %  $\text{CO}_2$  und 5 %  $\text{O}_2$  wurde das Medium entfernt und die

---

\*MPD = 2-Methyl-2,4-pentandiol

†RCSB PDB = Research Collaboratory for Structural Bioinformatics at Rutgers University, Protein Data Bank

‡DMEM = Dulbecco's Minimum Essential Medium

Zellen mit PBS-Lösung\* gewaschen. Nach dem Entfernen der PBS-Lösung wurde die Zellkultur mit einer Lösung, die 50 % Ethanol (96 %ig) und 1 % Eisessig enthielt, versetzt und die Mikrotiterplatte geschüttelt. Anschließend wurde mittels eines Mikrotiterplattenlesers bei 540 nm die Absorption ermittelt und so die Aufnahme von Nautralrot in die Zellen bestimmt.

#### **8.4.4 Standard-Peters-Test zur Untersuchung der antiplasmodialen *in vivo*-Aktivität an mit *P. berghei* infizierten Mäusen**

Die Untersuchung der antiplasmodialen *in vivo*-Aktivität wurde im Arbeitskreis von *Sergio Wittlin* (Swiss Tropical and Public Health Institute, Basel) durchgeführt.

Mittels eines Standard-Peters-Tests an mit *P. berghei* infizierten Mäusen wurde die antiplasmodiale *in vivo*-Aktivität von Verbindung **48** bestimmt.<sup>[60]</sup> Den Versuchstieren wurde von der Testsubstanz täglich 50 mg/kg Körpergewicht intravenös appliziert. Die Testsubstanz wurde hierzu in Tween 80 und Ethanol (Verhältnis 70:30) gelöst und anschließend 10-mal mit Wasser verdünnt. Die Testgruppe und die Kontrollgruppe bestanden aus je drei Mäusen. Insgesamt erfolgte die intravenöse Applikation vier Mal – 4, 24, 48 und 72 Stunden nach der Infektion. Das Blut für die Bestimmung der Parasitämie wurde 96 Stunden nach der Infektion gesammelt. Nach 4 Tagen wurden die Mäuse der Kontrollgruppe getötet, da diese unbehandelt nach 6 Tagen verstorben wären und ihnen weiteres unnötiges Leiden so erspart werden konnte. Die Aktivität bzw. Reduktion der Parasitämie wurde wie folgt berechnet: [(Parasitämie der Kontrollgruppe) - (Parasitämie der behandelten Gruppe)] / (Parasitämie der Kontrollgruppe).

#### **8.4.5 Racematspaltung**

Die Racematspaltung von Verbindung **43** wurde an der Hamburg School of Food Science der Universität Hamburg von *Tobias Gräwert* durchgeführt.<sup>[180]</sup>

Hierzu wurde die Anlage HP series 1100 von Agilent verwendet. Als Säule diente Chiralcel<sup>®</sup> OZ-H von Chiral Technologies Europe (5 µm Partikelgröße, 250 mm × 4.6 mm) in Kombination mit der zugehörigen Vorsäule bestehend aus Cartridge Holder (4.0 mm × 10 mm) und Cartridges (5 µm Partikelgröße, 4.0 mm × 10 mm). Als Methode wurde eine isokratische Elution aus *n*-Heptan und Propan-2-ol (0.1 % Trifluoressigsäure

---

\*PBS = Phosphate Buffered Saline

enthaltend) im Verhältnis 70:30 mit einer Flussrate von 1 mL min<sup>-1</sup> und Detektion bei 240 nm genutzt. Die Säulentemperatur betrug 25 °C. Injiziert wurden jeweils 50 µL einer Lösung von **43** in *n*-Heptan und Propan-2-ol (70:30, 34.3 mM).<sup>[180]</sup>

### Charakterisierung der Enantiomere von 43

Die Enantiomere wurden durch eine LC-MS-Analyse und durch die Bestimmung der Drehwerte charakterisiert.<sup>[180]</sup>

### LC-MS

Als Anlage wurde das Modell HPLC-System 1200 der Firma Agilent (Santa Clara, Kalifornien, USA) bestehend aus einer Pumpe (G1312B), einem gekühlten Autosampler (G1367D), einem Degaser (G1379B) und einem temperierbaren Säulenkompartiment (G1316) verwendet. Das HPLC-System war gekoppelt an das Massenspektrometer API4000 der Firma ABSciex (Framingham, Massachusetts, USA), ausgestattet mit Turbo V IonSpray source zur Elektronenspray-Ionisation. Als Säule wurde Phenomenex Synergy C<sub>12</sub> (150 mm x 2 mm, 2 µm, 80 Å) verwendet. Die Elution erfolgte isokratisch mit Wasser/Methanol (3:1) und 0.1 % Ameisensäure sowie einer Flussrate von 0.2 mL\*min<sup>-1</sup>. Das Retentionsvolumen für das Racemat und für die einzelnen Enantiomere betrug 0.74 mL. Die Datenverarbeitung erfolgte mit der Software ABSciex „Analyst“ (Version 1.6.2, Framingham, Massachusetts, USA). Das Gerät API4000 wurde im multiple-reaction-monitoring (mrm) Modus benutzt.<sup>[180]</sup>

m/z berechnet: 290.0; gefunden: 289.9

### Polarimetrie

Die polarimetrische Analyse der Enantiomere wurde von *Ulrich Riederer* (Institut für Pharmazie, Universität Hamburg) durchgeführt. Die Drehwerte wurden mit einem P8000 Polarimeter der Krüss Optronic GmbH (Hamburg, Deutschland) bestimmt. Die Messungen wurden bei 20 °C mit Methanol und 0.1 % Trifluoressigsäure als Lösungsmittel durchgeführt.<sup>[180]</sup>

Enantiomer 1:  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -80.67 \text{ } ^\circ\text{cm}^3\text{g}^{-1}\text{dm}^{-1}$  (c = 0.011 g\*cm<sup>-3</sup> in Methanol mit 0.1% Trifluoressigsäure).

Enantiomer 2:  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +80.53 \text{ } ^\circ\text{cm}^3\text{g}^{-1}\text{dm}^{-1}$  (c = 0.001 g\*cm<sup>-3</sup> in Methanol mit 0.1% Trifluoressigsäure).

## **9 Literaturverzeichnis**

- [1] WHO *World Malaria Report 2014*; World Health Organization: 2014.
- [2] Gallup J, Sachs J. The economic burden of malaria. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2001; **64**: (1 suppl), 85-96.
- [3] Adl SM, Simpson AGB, Lane CE, Lukeš J, Bass D, Bowser SS, Brown MW, Burki F, Dunthorn M, Hampl V, Heiss A, Hoppenrath M, Lara E, le Gall L, Lynn DH, McManus H, Mitchell EAD, Mozley-Stanridge SE, Parfrey LW, Pawlowski J, Rueckert S, Shadwick L, Schoch CL, Smirnov A, Spiegel FW. The Revised Classification of Eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 2012; **59**: (5), 429-514.
- [4] Tuteja R. Malaria – an overview. *FEBS Journal* 2007; **274**: (18), 4670-4679.
- [5] Klein EY. Antimalarial drug resistance: a review of the biology and strategies to delay emergence and spread. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2013; **41**: (4), 311-317.
- [6] Bell D, Wongsrichanalai C, Barnwell JW. Ensuring quality and access for malaria diagnosis: how can it be achieved? *Nat Rev Micro*.
- [7] WHO, *Guidelines for the Treatment of Malaria*. 3 ed.; World Health Organization: 2015.
- [8] Delves M, Plouffe D, Scheurer C, Meister S, Wittlin S, Winzeler EA, Sinden RE, 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.
- [9] Wells TNC, Alonso PL, Gutteridge WE. New medicines to improve control and contribute to the eradication of malaria. *Nat Rev Drug Discov* 2009; **8**: (11), 879-891.
- [10] Rosenthal PJ, Meshnick SR. Hemoglobin catabolism and iron utilization by malaria parasites. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1996; **83**: (2), 131-139.
- [11] Crutcher JM, SL H, Malaria. In *Medical Microbiology*, 4 ed.; S, B., Ed. University of Texas Medical Branch at Galveston: Galveston Texas, 1996.
- [12] Aguilar R, Magallon-Tejada A, Achtman AH, Moraleta C, Joice R, Cisteró P, Li Wai Suen CSN, Nhabomba A, Macete E, Mueller I, Marti M, Alonso PL, Menéndez C, Schofield L, Mayor A, *Molecular evidence for the localization of Plasmodium falciparum immature gametocytes in bone marrow*. 2014; Vol. 123, p 959-966.
- [13] Kumar S, Kumari R, Pandey R. New insight-guided approaches to detect, cure, prevent and eliminate malaria. *Protozoa* 2015; **252**: (3), 717-753.
- [14] Mazier D, Renia L, Snounou G. A pre-emptive strike against malaria's stealthy hepatic forms. *Nat Rev Drug Discov* 2009; **8**: (11), 854-864.
- [15] Eckstein-Ludwig U, Webb RJ, van Goethem IDA, East JM, Lee AG, Kimura M, O'Neill PM, Bray PG, Ward SA, Krishna S. Artemisinins target the SERCA of Plasmodium falciparum. *Nature* 2003; **424**: (6951), 957-961.

- [16] WHO, *International travel and health*. World Health Organization: 2012.
- [17] Woodrow CJ, Haynes RK, Krishna S. Artemisinins. *Postgraduate Medical Journal* 2005; **81**: (952), 71-78.
- [18] Keating G. Dihydroartemisinin/Piperaquine. *Drugs* 2012; **72**: (7), 937-961.
- [19] Kain KC, Shanks GD, Keystone JS. Malaria Chemoprophylaxis in the Age of Drug Resistance. I. Currently Recommended Drug Regimens. *Clinical Infectious Diseases* 2001; **33**: (2), 226-234.
- [20] AlKadi HO. Antimalarial Drug Toxicity: A Review. *Chemotherapy* 2007; **53**: (6), 385-391.
- [21] Wesche DL, Schuster BG, Wang W-X, Woosley RL. Mechanism of cardiotoxicity of halofantrine. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 2000; **67**: (5), 521-529.
- [22] Sullivan DJ, Matile H, Ridley RG, Goldberg DE. A Common Mechanism for Blockade of Heme Polymerization by Antimalarial Quinolines. *Journal of Biological Chemistry* 1998; **273**: (47), 31103-31107.
- [23] Chang C, Lin-Hua T, Jantanavivat C. Studies on a new antimalarial compound: Pyronaridine. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1992; **86**: (1), 7-10.
- [24] Auparakkitanon S, Chapoomram S, Kuaha K, Chirachariyavej T, Wilairat P. Targeting of Hematin by the Antimalarial Pyronaridine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2006; **50**: (6), 2197-2200.
- [25] Fernando D, Rodrigo C, Rajapakse S. Primaquine in vivax malaria: an update and review on management issues. *Malaria Journal* 2011; **10**: (1), 351.
- [26] Cordel H, Cailhol J, Matheron S, Bloch M, Godineau N, Consigny P-H, Gros H, Campa P, Bouree P, Fain O, Ralaimazava P, Bouchaud O. Atovaquone-proguanil in the treatment of imported uncomplicated Plasmodium falciparum malaria: a prospective observational study of 553 cases. *Malaria Journal* 2013; **12**: (1), 399.
- [27] Duffy S, Avery V. Identification of inhibitors of Plasmodium falciparum gametocyte development. *Malaria Journal* 2013; **12**: (1), 408.
- [28] Wiesner J, Ortmann R, Jomaa H, Schlitzer M. New Antimalarial Drugs. *Angewandte Chemie International Edition* 2003; **42**: (43), 5274-5293.
- [29] Castelli F, Odolini S, Autino B, Foca E, Russo R. Malaria Prophylaxis: A Comprehensive Review. *Pharmaceuticals* 2010; (3), 3212-3239.
- [30] Achan J, Talisuna A, Erhart A, Yeka A, Tibenderana J, Baliraine F, Rosenthal P, D'Alessandro U. Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. *Malaria Journal* 2011; **10**: (1), 144.

- [31] Wilairatana P, Krudsood S, Tangpukdee N. Appropriate Time for Primaquine Treatment to Reduce Plasmodium falciparum Transmission in Hypoendemic Areas. *Korean J Parasitol* 2010; **48**: (2), 179-182.
- [32] Arango EM, Upegui YA, Carmona-Fonseca J. Efficacy of different primaquine-based antimalarial regimens against Plasmodium falciparum gametocytemia. *Acta Tropica* 2012; **122**: (2), 177-182.
- [33] Eziefula AC, Bousema T, Yeung S, Kanya M, Owaraganise A, Gabagaya G, Bradley J, Grignard L, Lanke KHW, Wanzira H, Mpimbaza A, Nsohya S, White NJ, Webb EL, Staedke SG, Drakeley C. Single dose primaquine for clearance of Plasmodium falciparum gametocytes in children with uncomplicated malaria in Uganda: a randomised, controlled, double-blind, dose-ranging trial. *The Lancet Infectious Diseases* 2014; **14**: (2), 130-139.
- [34] WHO, Global malaria vaccine pipeline. World Health Organization: 2014. URL: [http://www.who.int/immunization/research/development/Rainbow\\_tables/en/](http://www.who.int/immunization/research/development/Rainbow_tables/en/) (22.05.2015)
- [35] WHO, Malaria vaccine development. World Health Organization. URL: <http://www.who.int/malaria/areas/vaccine/en/> (22.05.2015).
- [36] Ballou WR. The development of the RTS,S malaria vaccine candidate: challenges and lessons. *Parasite Immunology* 2009; **31**: (9), 492-500.
- [37] First Results of Phase 3 Trial of RTS,S/AS01 Malaria Vaccine in African Children. *New England Journal of Medicine* 2011; **365**: (20), 1863-1875.
- [38] Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. *The Lancet* (0).
- [39] Coatney GR. Pitfalls in a Discovery: The Chronicle of Chloroquine. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1963; **12**: (2), 121-128.
- [40] Wellems TE, Plowe CV. Chloroquine-Resistant Malaria. *Journal of Infectious Diseases* 2001; **184**: (6), 770-776.
- [41] Payne D. Spread of chloroquine resistance in Plasmodium falciparum. *Parasitology Today* 1987; **3**: (8), 241-246.
- [42] Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyto AP, Tarning J, Lwin KM, Ariey F, Hanpithakpong W, Lee SJ, Ringwald P, Silamut K, Imwong M, Chotivanich K, Lim P, Herdman T, An SS, Yeung S, Singhasivanon P, Day NPJ, Lindegardh N, Socheat D, White NJ. Artemisinin Resistance in Plasmodium falciparum Malaria. *The New England journal of medicine* 2009; **361**: (5), 455-467.
- [43] Leang R, Taylor WRJ, Bouth DM, Song L, Tarning J, Char MC, Kim S, Witkowski B, Duru V, Domergue A, Khim N, Ringwald P, Menard D. Evidence of falciparum malaria multidrug resistance to artemisinin and piperazine in western Cambodia: dihydroartemisinin-piperazine open-label multicenter clinical assessment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2015.

- [44] MMV MMV. URL: <http://www.mmv.org/> (11.05.2015).
- [45] MMV MMV's Partnership Network. URL: <http://www.mmv.org/partnering/mmv-partnership-network> (11.05.2015).
- [46] MMV Malariabox. URL: <http://www.mmv.org/malariabox> (11.05.2015).
- [47] MMV Global Malaria Portfolio, classified by Therapeutic Type, 2Q 2015. URL: <http://www.mmv.org/research-development/rd-portfolio> (27.07.2015).
- [48] LaCrue AN, Sáenz FE, Cross RM, Udenze KO, Monastyrskyi A, Stein S, Mutka TS, Manetsch R, Kyle DE. 4(1H)-Quinolones with Liver Stage Activity against *Plasmodium berghei*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2013; **57**: (1), 417-424.
- [49] Miley GP, Pou S, Winter R, Nilsen A, Li Y, Kelly JX, Stickles AM, Mather MW, Forquer IP, Pershing AM, White K, Shackelford D, Saunders J, Chen G, Ting L-M, Kim K, Zakharov LN, Donini C, Burrows JN, Vaidya AB, Charman SA, Riscoe MK. ELQ-300 prodrugs for enhanced delivery and single dose cure of malaria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2015.
- [50] Nilsen A, LaCrue AN, White KL, Forquer IP, Cross RM, Marfurt J, Mather MW, Delves MJ, Shackelford DM, Saenz FE, Morrisey JM, Steuten J, Mutka T, Li Y, Wirjanata G, Ryan E, Duffy S, Kelly JX, Sebayang BF, Zeeman A-M, Noviyanti R, Sinden RE, Kocken CHM, Price RN, Avery VM, Angulo-Barturen I, Jiménez-Díaz MB, Ferrer S, Herreros E, Sanz LM, Gamo F-J, Bathurst I, Burrows JN, Siegl P, Guy RK, Winter RW, Vaidya AB, Charman SA, Kyle DE, Manetsch R, Riscoe MK. Quinolone-3-Diarylethers: A New Class of Antimalarial Drug. *Science Translational Medicine* 2013; **5**: (177), 177ra37.
- [51] Spillman Natalie J, Allen Richard JW, McNamara Case W, Yeung Bryan KS, Winzeler Elizabeth A, Diagana Thierry T, Kirk K. Na<sup>+</sup> Regulation in the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum* Involves the Cation ATPase PfATP4 and Is a Target of the Spiroindolone Antimalarials. *Cell Host & Microbe* 2013; **13**: (2), 227-237.
- [52] Kuhlen KL, Chatterjee AK, Rottmann M, Gagaring K, Borboa R, Buenviaje J, Chen Z, Francek C, Wu T, Nagle A, Barnes SW, Plouffe D, Lee MCS, Fidock DA, Graumans W, van de Vegte-Bolmer M, van Gemert GJ, Wirjanata G, Sebayang B, Marfurt J, Russell B, Suwanarusk R, Price RN, Nosten F, Tungtaeng A, Gettayacamin M, Sattabongkot J, Taylor J, Walker JR, Tully D, Patra KP, Flannery EL, Vinetz JM, Renia L, Sauerwein RW, Winzeler EA, Glynn RJ, Diagana TT. KAF156 Is an Antimalarial Clinical Candidate with Potential for Use in Prophylaxis, Treatment, and Prevention of Disease Transmission. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2014; **58**: (9), 5060-5067.
- [53] Caldarelli SA, El Fangour S, Wein S, Tran van Ba C, Périgaud C, Pellet A, Vial HJ, Peyrottes S. New Bis-thiazolium Analogues as Potential Antimalarial Agents: Design, Synthesis, and Biological Evaluation. *Journal of Medicinal Chemistry* 2013; **56**: (2), 496-509.
- [54] Caldarelli SA, Boisbrun M, Alarcon K, Hamzé A, Ouattara M, Salom-Roig X, Maynadier M, Wein S, Peyrottes S, Pellet A, Calas M, Vial H. Exploration of potential prodrug approach of the bis-thiazolium salts T3 and T4 for orally delivered antimalarials. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2010; **20**: (13), 3953-3956.

- [55] Coteron JM, Marco M, Esquivias J, Deng X, White KL, White J, Koltun M, El Mazouni F, Kokkonda S, Katneni K, Bhamidipati R, Shackelford DM, Angulo-Barturen I, Ferrer SB, Jiménez-Díaz MB, Gamo F-J, Goldsmith EJ, Charman WN, Bathurst I, Floyd D, Matthews D, Burrows JN, Rathod PK, Charman SA, Phillips MA. Structure-Guided Lead Optimization of Triazolopyrimidine-Ring Substituents Identifies Potent Plasmodium falciparum Dihydroorotate Dehydrogenase Inhibitors with Clinical Candidate Potential. *Journal of Medicinal Chemistry* 2011; **54**: (15), 5540-5561.
- [56] Dormoi J, Pascual A, Briolant S, Amalvict R, Charras S, Baret E, Huyghues des Etages E, Feraud M, Pradines B. Proveblue (Methylene Blue) as an Antimalarial Agent: In Vitro Synergy with Dihydroartemisinin and Atorvastatin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2012; **56**: (6), 3467-3469.
- [57] Dormoi J, Briolant S, Desgrouas C, Pradines B. Efficacy of Proveblue (Methylene Blue) in an Experimental Cerebral Malaria Murine Model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2013; **57**: (7), 3412-3414.
- [58] Tekwani B, Walker L. 8-Aminoquinolines: future role as antiprotozoal drugs. *Current Opinion in Infectious Diseases* 2006; **19**: (6), 623-631.
- [59] Moehrle JJ, Duparc S, Siethoff C, Giersbergen PLM, Craft JC, Arbe-Barnes S, Charman SA, Gutierrez M, Wittlin S, Vennerstrom JL. First-in-man safety and pharmacokinetics of synthetic ozonide OZ439 demonstrates an improved exposure profile relative to other peroxide antimalarials. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2013; **75**: (2), 524-537.
- [60] Charman SA, Arbe-Barnes S, Bathurst IC, Brun R, Campbell M, Charman WN, Chiu FCK, Chollet J, Craft JC, Creek DJ, Dong Y, Matile H, Maurer M, Morizzi J, Nguyen T, Papastogiannidis P, Scheurer C, Shackelford DM, Sriraghavan K, Stingelin L, Tang Y, Urwyler H, Wang X, White KL, Wittlin S, Zhou L, Vennerstrom JL. Synthetic ozonide drug candidate OZ439 offers new hope for a single-dose cure of uncomplicated malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011; **108**: (11), 4400-4405.
- [61] Wang X, Dong Y, Wittlin S, Charman SA, Chiu FCK, Chollet J, Katneni K, Mannila J, Morizzi J, Ryan E, Scheurer C, Steuten J, Santo Tomas J, Snyder C, Vennerstrom JL. Comparative Antimalarial Activities and ADME Profiles of Ozonides (1,2,4-trioxolanes) OZ277, OZ439, and Their 1,2-Dioxolane, 1,2,4-Trioxane, and 1,2,4,5-Tetraoxane Isosteres. *Journal of Medicinal Chemistry* 2013; **56**: (6), 2547-2555.
- [62] Lell B, Ruangweerayut R, Wiesner J, Missinou MA, Schindler A, Baranek T, Hintz M, Hutchinson D, Jomaa H, Kreamsner PG. Fosmidomycin, a Novel Chemotherapeutic Agent for Malaria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2003; **47**: (2), 735-738.
- [63] Missinou MA, Borrmann S, Schindler A, Issifou S, Adegnika AA, Matsiegui P-B, Binder R, Lell B, Wiesner J, Baranek T, Jomaa H, Kreamsner PG. Fosmidomycin for malaria. *The Lancet* 2002; **360**: (9349), 1941-1942.
- [64] Borrmann S, Adegnika AA, Matsiegui P-B, Issifou S, Schindler A, Mawili-Mboumba DP, Baranek T, Wiesner J, Jomaa H, Kreamsner PG. Fosmidomycin-Clindamycin for Plasmodium falciparum Infections in African Children. *Journal of Infectious Diseases* 2004; **189**: (5), 901-908.

- [65] Borrmann S, Issifou S, Esser G, Adegnika AA, Ramharter M, Matsiegui PB, Oyakhirome S, Mawili-Mboumba DP, Missinou MA, Kun JFJ, Jomaa H, Kreamsner PG. Fosmidomycin-clindamycin for the treatment of Plasmodium falciparum malaria. *Journal of Infectious Diseases* 2004; **190**: (9), 1534-1540.
- [66] Borrmann S, Lundgren I, Oyakhirome S, Impouma B, Matsiegui P-B, Adegnika AA, Issifou S, Kun JFJ, Hutchinson D, Wiesner J, Jomaa H, Kreamsner PG. Fosmidomycin plus Clindamycin for Treatment of Pediatric Patients Aged 1 to 14 Years with Plasmodium falciparum Malaria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2006; **50**: (8), 2713-2718.
- [67] Borrmann S, Adegnika AA, Moussavou F, Oyakhirome S, Esser G, Matsiegui P-B, Ramharter M, Lundgren I, Kombila M, Issifou S, Hutchinson D, Wiesner J, Jomaa H, Kreamsner PG. Short-Course Regimens of Artesunate-Fosmidomycin in Treatment of Uncomplicated Plasmodium falciparum Malaria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2005; **49**: (9), 3749-3754.
- [68] Kuroda Y, Okuhara M, Goto T, Okamoto M, Terano H, Kohsaka M, Aoki H, Imanaka H. Studies on New Phosphonic Acid Antibiotics .4. Structure Determination of FR-33289, FR-31564 and FR-32863. *Journal of Antibiotics* 1980; **33**: (1), 29-35.
- [69] Okuhara M, Kuroda Y, Goto T, Okamoto M, Terano H, Kohsaka M, Aoki H, Imanaka H. Studies on New Phosphonic Acid Antibiotics .3. Isolation and Characterization of FR-31564, FR-32863 and FR-33289. *Journal of Antibiotics* 1980; **33**: (1), 24-28.
- [70] Proteau PJ. 1-Deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase: an overview. *Bioorganic Chemistry* 2004; **32**: (6), 483-493.
- [71] Rohmer M, Bouvier-Nave P, Ourisson G. Distribution of Hopanoid Triterpenes in Prokaryotes. *Journal of General Microbiology* 1984; **130**: (5), 1137-1150.
- [72] Rohmer M, Knani M, Simonin P, Sutter B, Sahn H. Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochemical Journal* 1993; **295**: (Pt 2), 517-524.
- [73] Rohmer M, Seemann M, Horbach S, Bringer-Meyer S, Sahn H. Glyceraldehyde 3-Phosphate and Pyruvate as Precursors of Isoprenic Units in an Alternative Non-mevalonate Pathway for Terpenoid Biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society* 1996; **118**: (11), 2564-2566.
- [74] Jomaa H, Wiesner J, Sanderbrand S, Altincicek B, Weidemeyer C, Hintz M, Turbachova I, Eberl M, Zeidler J, Lichtenthaler HK, Soldati D, Beck E. Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. *Science* 1999; **285**: (5433), 1573-1576.
- [75] Rohdich F, Bacher A, Eisenreich W. Isoprenoid biosynthetic pathways as anti-infective drug targets. *Biochemical Society Transactions* 2005; **33**, 785-791.
- [76] Hoeffler J-F, Hemmerlin A, Grosdemange-Billiard C, Bach TJ, 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. *Biochemical Journal* 2002; **366**: (Pt 2), 573-583.

- [77] Lichtenthaler HK, Schwender J, Disch A, Rohmer M. Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Letters* 1997; **400**: (3), 271-274.
- [78] Rodriguez-Concepcion M. The MEP Pathway: A New Target for the Development of Herbicides, Antibiotics and Antimalarial Drugs. *Current Pharmaceutical Design* 2004; **10**: (19), 2391-2400.
- [79] Hirsch AKH, Diederich F. The Non-Mevalonate Pathway to Isoprenoid Biosynthesis: A Potential Source of New Drug Targets. *CHIMIA International Journal for Chemistry* 2008; **62**: (4), 226-230.
- [80] Wiesner J, Reichenberg A, Heinrich S, Schlitzer M, Jomaa H. The Plastid-Like Organelle of Apicomplexan Parasites as Drug Target. *Current Pharmaceutical Design* 2008; **14**: (9), 855-871.
- [81] Khan S, Sharma A, Jamwal A, Sharma V, Pole AK, Thakur KK, Sharma A. Uneven spread of cis- and trans-editing aminoacyl-tRNA synthetase domains within translational compartments of *P. falciparum*. *Scientific Reports* 2011; **1**, 188.
- [82] Botté CY, Dubar F, McFadden GI, Marechal E, Biot C. Plasmodium falciparum Apicoplast Drugs: Targets or Off-Targets? *Chemical Reviews* 2012; **112**: (3), 1269-1283.
- [83] Yeh E, DeRisi JL. Chemical Rescue of Malaria Parasites Lacking an Apicoplast Defines Organelle Function in Blood-Stage Plasmodium falciparum. *PLoS Biol.* 2011; (9), e1001138.
- [84] Waller RF, McFadden GI. The apicoplast: A review of the derived plastid of apicomplexan parasites. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2005; (7), 57-79.
- [85] Cassera MB, Gozzo FC, D'Alexandri FL, Merino EF, del Portillo HA, Peres VJ, Almeida IC, Eberlin MN, Wunderlich G, Wiesner J, Jomaa H, Kimura EA, Katzin AM. The Methylerythritol Phosphate Pathway Is Functionally Active in All Intraerythrocytic Stages of Plasmodium falciparum. *Journal of Biological Chemistry* 2004; **279**: (50), 51749-51759.
- [86] Odom AR, Van Voorhis WC. Functional genetic analysis of the Plasmodium falciparum deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase gene. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2010; **170**: (2), 108-111.
- [87] Argyrou A, Blanchard JS. Kinetic and Chemical Mechanism of Mycobacterium tuberculosis 1-Deoxy-d-xylulose-5-phosphate Isomeroeductase. *Biochemistry* 2004; **43**: (14), 4375-4384.
- [88] Wong U, Cox RJ. The Chemical Mechanism of D-1-Deoxyxylulose-5-phosphate Reductoisomerase from Escherichia coli. *Angewandte Chemie International Edition* 2007; **46**: (26), 4926-4929.
- [89] Koppisch AT, Fox DT, Blagg BSJ, Poulter CD. E. coli MEP Synthase: Steady-State Kinetic Analysis and Substrate Binding†. *Biochemistry* 2002; **41**: (1), 236-243.
- [90] 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. *Journal of Biological Chemistry* 2003; **278**: (20), 18401-18407.

[91] 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 Letters* 1998; **39**: (43), 7913-7916.

[92] Umeda T, Tanaka N, Kusakabe Y, Nakanishi M, Kitade Y, Nakamura KT. Molecular basis of fosmidomycin's action on the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Scientific Reports* 2011; **1**.

[93] Murakawa T, Sakamoto H, Fukada S, Konishi T, Nishida M. Pharmacokinetics of fosmidomycin, a new phosphonic acid antibiotic. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1982; **21**: (2), 224-230.

[94] Kuemmerle HP, Murakawa T. Pharmacokinetic evaluation of fosmidomycin, a new phosphonic acid antibiotic. *Chemioterapia* 1987; (6), 113-119.

[95] Wiesner J, Henschker D, Hutchinson DB, Beck E, Jomaa H. In Vitro and In Vivo Synergy of Fosmidomycin, a Novel Antimalarial Drug, with Clindamycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2002; **46**: (9), 2889-2894.

[96] Na-Bangchang K, Ruengweerayut 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), 70.

[97] Kurz T, Geffken D, Wackendorff C. Carboxylic Acid Analogs of Fosmidomycin. *Zeitschrift für Naturforschung* 2003; **58**, 457-461.

[98] Perruchon J, Ortmann R, Altenkämper 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**: (8), 1232-1241.

[99] Zinglé 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 *Journal of Organic Chemistry* 2010; **75**, 3203-3207.

[100] Brücher K, Gräwert T, Konzuch S, Held J, Lienau C, Behrendt C, Illarionov B, Maes L, Bacher A, Wittlin S, Mordmüller B, Fischer M, Kurz T. Prodrugs of Reverse Fosmidomycin Analogues. *Journal of Medicinal Chemistry* 2015; **58**: (4), 2025-2035.

[101] Konzuch S, Umeda T, Held J, Hähn S, Brücher K, Lienau C, Behrendt CT, Gräwert T, Bacher A, Illarionov B, Fischer M, Mordmüller B, Tanaka N, Kurz T. Binding Modes of Reverse Fosmidomycin Analogs toward the Antimalarial Target IspC. *Journal of Medicinal Chemistry* 2014; **57**: (21), 8827-8838. DOI: [10.1021/jm500850y](https://doi.org/10.1021/jm500850y)

[102] Behrendt CT, Kunfermann A, Illarionova V, Matheussen A, Graewert T, Groll M, Rohdich F, Bacher A, Eisenreich W, Fischer M, Maes L, Kurz T. Synthesis and

222

Antiplasmodial Activity of Highly Active Reverse Analogues of the Antimalarial Drug Candidate Fosmidomycin. *Chemmedchem* 2010; **5**: (10), 1673-1676.

[103] Jansson AM, Więckowska A, Björkelid C, Yahiaoui S, Sooriyaarachchi S, Lindh M, Bergfors T, Dharavath S, Desroses M, Suresh S, Andaloussi M, Nikhil R, Sreevalli S, Srinivasa BR, Larhed M, Jones TA, Karlén A, Mowbray SL. DXR Inhibition by Potent Mono- and Disubstituted Fosmidomycin Analogues. *Journal of Medicinal Chemistry* 2013; **56**: (15), 6190-6199.

[104] Ortmann R, Wiesner J, Silber K, Klebe G, Jomaa H, Schlitzer M. Novel Deoxyxylulosephosphate-Reductoisomerase Inhibitors: Fosmidomycin Derivatives with Spacious Acyl Residues. *Archiv der Pharmazie* 2007; **340**: (9), 483-490.

[105] 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. *Chemistry & Biodiversity* 2008; **5**: (4), 643-656.

[106] Kurz T, Geffken D, Wackendorff C. Hydroxyurea Analogues of Fosmidomycin. *Zeitschrift für Naturforschung* 2003; **58**: (B), 106-110.

[107] Brücher K. Synthese und biologische Evaluation von inversen  $\alpha$ -substituierten,  $\beta$ -oxaisosteren Fosmidomycin-Analoga und Derivaten mit Benzamid-Teilstruktur. *Dissertationsschrift*, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Deutschland), 2012.

[108] Mercklé L, de Andrés-Gómez A, Dick B, Cox RJ, Godfrey CRA. A Fragment-Based Approach to Understanding Inhibition of 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase. *ChemBioChem* 2005; **6**: (10), 1866-1874.

[109] Faisca Phillips AM, Nogueira F, Murtinheira F, Barros MT. Synthesis and antimalarial evaluation of prodrugs of novel fosmidomycin analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2015; **25**: (10), 2112-2116.

[110] Midrier C, Montel S, Braun R, Haaf K, Willms L, van der Lee A, Volle J-N, Pirat J-L, Virieux D. Fosmidomycin analogues with N-hydroxyimidazole and N-hydroxyimidazolone as a chelating unit. *RSC Advances* 2014; **4**: (45), 23770-23778.

[111] Kuntz L, Tritsch D, Grosdemange-Billiard C, Hemmerlin A, Willem A, Bacht TJ, Rohmer M. Isoprenoid biosynthesis as a target for antibacterial and antiparasitic drugs: phosphonohydroxamic acids as inhibitors of deoxyxylulose phosphate reducto-isomerase. *Biochemical Journal* 2005; **386**, 127-135.

[112] Brücher K, Illarionov B, Held J, Tschan S, Kunfermann A, Pein MK, Bacher A, Graewert T, Maes L, Mordmueller B, Fischer M, Kurz T.  $\alpha$ -Substituted  $\beta$ -Oxa Isosteres of Fosmidomycin: Synthesis and Biological Evaluation. *Journal of Medicinal Chemistry* 2012; **55**: (14), 6566-6575.

[113] Behrendt C. Synthese und biologische Evaluation inverser  $\alpha$ -Aryl-substituierter Fosmidomycin-Analoga. *Dissertationsschrift*, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Deutschland), 2011.

- [114] Behrendt CT, Kunfermann A, Illarionova V, Matheussen A, Pein MK, Graewert 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). *Journal of Medicinal Chemistry* 2011; **54**: (19), 6796-6802.
- [115] Haemers T, Wiesner J, Giessmann D, Verbrugghen T, Hillaert U, Ortmann R, Jomaa H, Link A, Schlitzer M, Van Calenbergh S. Synthesis of beta- and gamma-oxa isosteres of fosmidomycin and FR900098 as antimalarial candidates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2008; **16**: (6), 3361-3371.
- [116] Haemers T, Wiesner J, Busson R, Jomaa H, Van Calenbergh S. Synthesis of  $\alpha$ -Aryl-Substituted and Conformationally Restricted Fosmidomycin Analogues as Promising Antimalarials. *European Journal of Organic Chemistry* 2006; **2006**: (17), 3856-3863.
- [117] Devreux V, Wiesner J, Goeman JL, Van der Eycken J, Jomaa H, Van Calenbergh S. Synthesis and Biological Evaluation of Cyclopropyl Analogues of Fosmidomycin as Potent Plasmodium falciparum Growth Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* 2006; **49**: (8), 2656-2660.
- [118] Devreux V, Wiesner J, Jomaa H, Van der Eycken J, Van Calenbergh S. Synthesis and evaluation of  $\alpha,\beta$ -unsaturated  $\alpha$ -aryl-substituted fosmidomycin analogues as DXR inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2007; **17**: (17), 4920-4923.
- [119] Kurz T, Schlüter K, Pein M, Behrendt C, Bergmann B, Walter RD. Conformationally Restrained Aromatic Analogues of Fosmidomycin and FR900098. *Archiv der Pharmazie* 2007; **340**: (7), 339-344.
- [120] Verbrugghen T, Cos P, Maes L, Van Calenbergh S. Synthesis and Evaluation of alpha-Halogenated Analogues of 3-(Acetylhydroxyamino)propylphosphonic Acid (FR900098) as Antimalarials. *Journal of Medicinal Chemistry* 2010; **53**: (14), 5342-5346.
- [121] Verbrugghen T, Vandurm P, Pouyez J, Maes L, Wouters J, Van Calenbergh S. Alpha-Heteroatom Derivatized Analogues of 3-(Acetylhydroxyamino)propyl Phosphonic Acid (FR900098) as Antimalarials. *Journal of Medicinal Chemistry* 2013; **56**: (1), 376-380.
- [122] Haemers T, Wiesner J, Poecke SV, Goeman J, Henschker D, Beck E, Jomaa H, Calenbergh SV. Synthesis of  $\alpha$ -substituted fosmidomycin analogues as highly potent Plasmodium falciparum growth inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2006; **16**: (7), 1888-1891.
- [123] Xue J, Diao J, Cai G, Deng L, Zheng B, Yao Y, Song Y. Antimalarial and Structural Studies of Pyridine-Containing Inhibitors of 1-Deoxyxylulose-5-phosphate Reductoisomerase. *ACS Medicinal Chemistry Letters* 2013; **4**: (2), 278-282.
- [124] Chofor R, Sooriyaarachchi S, Risseeuw MDP, Bergfors T, Pouyez J, Johnny C, Haymond A, Everaert A, Dowd CS, Maes L, Coenye T, Alex A, Couch RD, Jones TA, Wouters J, Mowbray SL, Van Calenbergh S. Synthesis and Bioactivity of  $\beta$ -Substituted Fosmidomycin Analogues Targeting 1-Deoxy-d-xylulose-5-phosphate Reductoisomerase. *Journal of Medicinal Chemistry* 2015; **58**: (7), 2988-3001.

- [125] Kurz T, Behrendt C, Pein M, Kaula U, Bergmann B, Walter RD.  $\gamma$ -Substituted Bis(pivaloyloxymethyl)ester Analogues of Fosmidomycin and FR900098. *Archiv der Pharmazie* 2007; **340**: (12), 661-666.
- [126] Ando W, Tsu H. A Facile Preparation of Aliphatic Hydroxamic Acid from N,N,O-Tris(trimethylsilyl)hydroxylamine and Acid Chloride. *Synthetic Communications* 1983; **13**: (12), 1053-1056.
- [127] Miolati A. Ueber eine neue Bildungsweise der Hydroxamsäuren der Fettreihe. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 1892; **25**: (1), 699-701.
- [128] Marek L, Hamacher A, Hansen FK, Kuna K, Gohlke H, Kassack MU, Kurz T. Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitors with a Novel Connecting Unit Linker Region Reveal a Selectivity Profile for HDAC4 and HDAC5 with Improved Activity against Chemoresistant Cancer Cells. *Journal of Medicinal Chemistry* 2013; **56**: (2), 427-436.
- [129] LaLonde RL, Wang ZJ, Mba M, Lackner AD, Toste FD. Gold(I)-Catalyzed Enantioselective Synthesis of Pyrazolidines, Isoxazolidines, and Tetrahydrooxazines. *Angewandte Chemie International Edition* 2010; **49**: (3), 598-601.
- [130] Burke J, Terrence R., Li Z-H, Bolen JB, Marquez VE. Phosphonate-Containing Inhibitors of Tyrosine-Specific Protein Kinases. *Journal of Medicinal Chemistry* 1991; **34**: (5), 1577-1581.
- [131] Bessodes M, Komiotis D, Antonakis K. Rapid and selective detritylation of primary alcohols using formic acid. *Tetrahedron Letters* 1986; **27**: (5), 579-580.
- [132] Mikolajczyk M, Grzejszczak S, Chęfczyńska A, Zatorski A. Organosulfur Compounds .23. Addition of Elemental Sulfur to Phosphonate Carbanions and Its Application for Synthesis of Alpha-Phosphoryl Organosulfur Compounds - Synthesis of Aromatic Ketones. *Journal of Organic Chemistry* 1979; **44**: (17), 2967-2972.
- [133] Takeuchi K, Takatsu H, Takehara S, Osawa M. Fluorine-substituted-4-alkenylbenzoic acid and derivatives thereof, and nematic liquid crystal composition containing cyanophenyl benzoate derivatives and liquid crystal display system using the same. 2001.
- [134] Chen G, Shan W, Wu Y, Ren L, Dong J, Ji Z. Synthesis and Anti-inflammatory Activity of Resveratrol Analogs. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 2005; **53**: (12), 1587-1590.
- [135] Saunders BC, Stacey GJ, Wild F, Wilding IGE. 139. Esters containing phosphorus. Part V. Esters of substituted phosphonic and phosphonous acids. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* 1948; (0), 699-703.
- [136] Arbusow BA. Michaelis-Arbusow- und Perkow-Reaktionen. *Pure and Applied Chemistry* 1964; **9**: (2), 307-335.
- [137] Creary X, Mehrsheikhmohammadi ME. The Nature of Cationic Intermediates Derived from Alpha-Thiophosphoryl and Alpha-Thiocarbonyl Mesylates - Neighboring Thiophosphoryl and Thiocarbonyl Participation. *Journal of Organic Chemistry* 1986; **51**: (1), 7-15.

- [138] Hoffman RV, Nayyar NK. A Facile Preparation of N-(Isopropoxyalkyl) Amides by Generation and Trapping of N-Acyliminium Ions from Ionization-Rearrangement Reactions of N-Triflyloxy Amides. *The Journal of Organic Chemistry* 1994; **59**: (13), 3530-3539.
- [139] Casadei MA, Dirienzo B, Inesi A, Moracci FM. Electrochemical Studies on Haloamides .3. Haloacetamides and Haloacetohydroxamates. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions I* 1992; (3), 375-378.
- [140] Puerto Galvis CE, Kouznetsov VV. An unexpected formation of the novel 7-oxa-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-ene skeleton during the reaction of furfurylamine with maleimides and their bioprospection using a zebrafish embryo model. *Organic & Biomolecular Chemistry* 2013; **11**: (3), 407-411.
- [141] Aschwanden P, Geisser RW, Kleinbeck F, Carreira EM. Reduction of 2,3-Dihydroisoxazoles to  $\beta$ -Amino Ketones and  $\beta$ -Amino Alcohols. *Organic Letters* 2005; **7**: (25), 5741-5742.
- [142] Gangjee A, Dubash NP, Kisliuk RL. Synthesis of novel, nonclassical 2-amino-4-oxo-6-(aryltio)ethylpyrrolo[2,3-d] pyrimidines as potential inhibitors of thymidylate synthase. *Journal of Heterocyclic Chemistry* 2001; **38**: (2), 349-354.
- [143] Ohsugi S-i, Nishide K, Oono K, Okuyama K, Fudesaka M, Kodama S, Node M. New odorless method for the Corey–Kim and Swern oxidations utilizing dodecyl methyl sulfide (Dod-S-Me). *Tetrahedron* 2003; **59**: (42), 8393-8398.
- [144] Saha A, Ranu BC. Transition metal-free activation of allylic acetates toward regioselective S-allylation of thiols. *Tetrahedron Letters* 2010; **51**: (14), 1902-1905.
- [145] Dijkstra G, Kruizinga WH, Kellogg RM. An assessment of the causes of the "cesium effect". *The Journal of Organic Chemistry* 1987; **52**: (19), 4230-4234.
- [146] McKenna CE, Higa MT, Cheung NH, McKenna M-C. The facile dealkylation of phosphonic acid dialkyl esters by bromotrimethylsilane. *Tetrahedron Letters* 1977; **18**: (2), 155-158.
- [147] Conibear AC, Lobb KA, Kaye PT.  $^{31}\text{P}$  NMR kinetic study of the tandem cleavage of phosphonate esters by bromotrimethylsilane. *Tetrahedron* 2010; **66**: (43), 8446-8449.
- [148] Welch JT, Seper KW. Synthesis, regioselective deprotonation, and stereoselective alkylation of fluoro ketimines. *The Journal of Organic Chemistry* 1988; **53**: (13), 2991-2999.
- [149] Wild J, Goetz N, Will W, Kohler R-D, Plath P. Preparation of O-Substituted Hydroxylamines. 1992.
- [150] BVBA AO *Sicherheitsdatenblatt Hydrazine hydrate, 100%*; Acros Organics BVBA: 2013.
- [151] BVBA AO *Sicherheitsdatenblatt Ethanolamine*; Acros Organics BVBA: 2013.
- [152] Staab HA, Bauer H, Schneider KM, Syntheses of Amides and Analogous Compounds with CO-NR Functions (Part 1). In *Azolides in Organic Synthesis and Biochemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 2003; pp 129-186.

- [153] Staab HA, Bauer H, Schneider KM, Reactivity of Azolides. In *Azolides in Organic Synthesis and Biochemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 2003; pp 1-12.
- [154] Staab HA, Bauer H, Schneider KM, Preparation and Properties of Azolides. In *Azolides in Organic Synthesis and Biochemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 2003; pp 13-25.
- [155] Staab HA, Maleck G. Über den Mechanismus der Reaktion von N,N'-Carbonyl-diazolen mit Carbonsäuren zu Carbonsäure-azoliden. *Chemische Berichte* 1966; **99**: (9), 2955-2961.
- [156] Staab HA. New Methods of Preparative Organic Chemistry IV. Syntheses Using Heterocyclic Amides (Azolides). *Angewandte Chemie International Edition in English* 1962; **1**: (7), 351-367.
- [157] Nakajima N, Ikada Y. Mechanism of Amide Formation by Carbodiimide for Bioconjugation in Aqueous Media. *Bioconjugate Chemistry* 1995; **6**: (1), 123-130.
- [158] Khorana HG. The Chemistry of Carbodiimides. *Chemical Reviews* 1953; **53**: (2), 145-166.
- [159] Mahadik GS, Knott SA, Szczepura LF, Hitchcock SR.  $\beta$ -Hydroxy and  $\beta$ -(*o*-diphosphino)benzoyloxy(*o*-diphosphino) benzamides as ligands for asymmetric allylic alkylation. *Tetrahedron: Asymmetry* 2009; **20**: (10), 1132-1137.
- [160] Dhawan B, Redmore D. Rearrangement of a Di-*t*-butyl Aryl Phosphate to a Di-*t*-butyl (2-Hydroxyaryl) phosphonate. A Convenient Preparation of (2-Hydroxyphenyl)-and (2-Hydroxy 5-Methoxy Phenyl) Phosphonic Acids. *Synthetic Communications* 1985; **15**: (5), 411-416.
- [161] Li P, Zhang M, Peach ML, Liu H, Yang D, Roller PP. Concise and Enantioselective Synthesis of Fmoc-Pmp(Bu<sup>t</sup>)<sub>2</sub>-OH and Design of Potent Pmp-Containing Grb2-SH2 Domain Antagonists. *Organic Letters* 2003; **5**: (No. 17), 3095-3098.
- [162] Pohjakallio A, Pihko PM. Enantioselective Synthesis of 2-Isioxazolines by a One-Flask Conjugate Addition/Oxime-Transfer Process. *Chemistry – A European Journal* 2009; **15**: (16), 3960-3964.
- [163] Hirner S, Kirchner DK, Somfai P. Synthesis of  $\alpha$ -Amino Acids by Umpolung of Weinreb Amide Enolates. *European Journal of Organic Chemistry* 2008; **2008**: (33), 5583-5589.
- [164] Phenolic Compounds and Recording Materials Containing the Same. EP1219598, 2002.
- [165] Novel benzothiepinines having activity as inhibitors of ileal bile acid transport and taurocholate uptake. US2002/13476, 2002.
- [166] GLYT2 Modulators. WO2005/44810, 2005.
- [167] Metabotropic Glutamate Receptor Modulators. WO2012/85167, 2012.

- [168] Therapeutic Agents. WO2004/113282, 2004.
- [169] Gassman PG, Drewes HR. The Ortho Functionalization Of Aromatic Amines. Benzoylation, Formylation, and Vinylation of Anilines. *Journal of the American Chemical Society* 1978; **100**: (24), 7600-7610.
- [170] Liu F, Fu Z, Liu Y, Lu C, Wu Y, Xie F, Ye Z, Zhou X, Yin D. A Simple and Environmentally Benign Method for Sulfoxidation of Sulfides with Hydrogen Peroxide. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 2010; **49**: (5), 2533-2536.
- [171] Rábai J, Kapovits I, Tanács B, Tamás J. Phenyltrimethylammonium Tribromide for Selective Oxidation of Sulfides to Sulfoxides. A Convenient Synthesis of Sulfinyl-18O-Labelled Sulfoxide Carboxylic Acids. *Synthesis* 1990; **1990**: (09), 847-849.
- [172] Lion CJ, Matthews CS, Stevens MFG, Westwell AD. Synthesis, Antitumor Evaluation, and Apoptosis-Inducing Activity of Hydroxylated (E)-Stilbenes. *Journal of Medicinal Chemistry* 2005; **48**: (4), 1292-1295.
- [173] Weiss U, Andersson JT. Synthesis of fluorinated polycyclic aromatic hydrocarbons through a photochemical cyclization. *Polycyclic Aromatic Compounds* 2002; **22**: (1), 71-85.
- [174] Fitzpatrick NJ, Mageswaran R. Theoretical study of hydroxamic acids. *Polyhedron* 1989; **8**: (18), 2255-2263.
- [175] Brown DA, Glass WK, Mageswaran R, Girmay B. cis–trans Isomerism in monoalkylhydroxamic acids by <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry* 1988; **26**: (11), 970-973.
- [176] Brown DA, Glass WK, Mageswaran R, Mohammed SA. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR studies of isomerism in hydroxamic acids. *Magnetic Resonance in Chemistry* 1991; **29**: (1), 40-45.
- [177] Kakkar R, Grover R, Chadha P. Conformational behavior of some hydroxamic acids. *Organic & Biomolecular Chemistry* 2003; **1**: (12), 2200-2206.
- [178] Mac Sweeney A, Lange R, Fernandes RPM, Schulz H, Dale GE, Douangamath A, Proteau PJ, 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. *Journal of Molecular Biology* 2005; **345**: (1), 115-127.
- [179] 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. *Journal of Biological Chemistry* 2003; **278**: (20), 18401-18407.
- [180] Kunfermann A, Lienau C, Illarionov B, Held J, Gräwert T, Behrendt CT, Werner P, Hähn S, Eisenreich W, Riederer U, Mordmüller B, Bacher A, Fischer M, Groll M, Kurz T. IspC as Target for Antiinfective Drug Discovery: Synthesis, Enantiomeric Separation, and Structural Biology of Fosmidomycin Thia Isosters. *Journal of Medicinal Chemistry* 2013; **56**: (20), 8151-8162.

DOI: 10.1021/jm4012559 URL: <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jm4012559>

- [181] Andaloussi M, Henriksson LM, Wieckowska A, Lindh M, Bjorkelid C, Larsson AM, Suresh S, Iyer H, Srinivasa BR, Bergfors T, Unge T, Mowbray SL, Larhed M, Jones TA, Karlén A. Design, Synthesis, and X-ray Crystallographic Studies of alpha-Aryl Substituted Fosmidomycin Analogues as Inhibitors of Mycobacterium tuberculosis 1-Deoxy-D-xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase. *Journal of Medicinal Chemistry* 2011; **54**: (14), 4964-4976.
- [182] Gilbert IH. Drug Discovery for Neglected Diseases: Molecular Target-Based and Phenotypic Approaches. *Journal of Medicinal Chemistry* 2013; **56**: (20), 7719-7726.
- [183] Butera JA. Phenotypic Screening as a Strategic Component of Drug Discovery Programs Targeting Novel Antiparasitic and Antimycobacterial Agents: An Editorial. *Journal of Medicinal Chemistry* 2013; **56**: (20), 7715-7718.
- [184] Guiguemde WA, Shelat Anang A, Garcia-Bustos Jose F, Diagana TT, Gamo F-J, Guy RK. Global Phenotypic Screening for Antimalarials. *Chemistry & Biology* 2012; **19**: (1), 116-129.
- [185] Sykes ML, Avery VM. Approaches to Protozoan Drug Discovery: Phenotypic Screening. *Journal of Medicinal Chemistry* 2013; **56**: (20), 7727-7740.
- [186] Lee JA, Uhlik MT, Moxham CM, Tomandl D, Sall DJ. Modern Phenotypic Drug Discovery Is a Viable, Neoclassic Pharma Strategy. *Journal of Medicinal Chemistry* 2012; **55**: (10), 4527-4538.
- [187] Flannery EL, Chatterjee AK, Winzeler EA. Antimalarial drug discovery - approaches and progress towards new medicines. *Nat Rev Micro* 2013; **11**: (12), 849-862.
- [188] Sangari FJ, Pérez-Gil J, Carretero-Paulet L, García-Lobo JM, Rodríguez-Concepción M. A new family of enzymes catalyzing the first committed step of the methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010; **107**: (32), 14081-14086.
- [189] Pérez-Gil J, Calisto BM, Behrendt CT, Kurz T, Fita I, Rodríguez-Concepción M. Crystal Structure of Bacterial Enzyme Reveals a Potential Target for New Antibiotics: Crystal Structure of *Brucella abortus* Deoxyxylulose-5-phosphate Reductoisomerase-like (DRL) Enzyme Involved in Isoprenoid Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* 2012; **287**: (19), 15810.
- [190] Kurz T, Schlueter K, Kaula U, Bergmann B, Walter RD, Geffken D. Synthesis and antimalarial activity of chain substituted pivaloyloxymethyl ester analogues of Fosmidomycin and FR900098. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2006; **14**: (15), 5121-5135.
- [191] Schlueter K, Walter RD, Bergmann B, Kurz T. Arylmethyl substituted derivatives of Fosmidomycin: Synthesis and antimalarial activity. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2006; **41**: (12), 1385-1397.
- [192] 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. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2001; **11**: (6), 833-835.

- [193] Lienau C, Konzuch S, Gräwert T, Illarionov B, Bacher A, Fischer M, Tanaka N, Kurz T. Inhibition of the Non-Mevalonate Isoprenoid Pathway by Reverse Hydroxamate Analogues of Fosmidomycin. *Procedia Chemistry* 2015; **14**, 108-116.
- [194] Dhiman RK, Schaeffer ML, Bailey AM, Testa CA, Scherman H, Crick DC. 1-Deoxy-d-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase (IspC) from *Mycobacterium tuberculosis*: towards Understanding Mycobacterial Resistance to Fosmidomycin. *Journal of Bacteriology* 2005; **187**: (24), 8395-8402.
- [195] Nordqvist A, Björkelid C, Andaloussi M, Jansson AM, Mowbray SL, 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. *The Journal of Organic Chemistry* 2011; **76**: (21), 8986-8998.
- [196] Brown A, Parish T. Dxr is essential in *Mycobacterium tuberculosis* and fosmidomycin resistance is due to a lack of uptake. *BMC Microbiology* 2008; **8**: (1), 78.
- [197] Nguyen L, Thompson CJ. Foundations of antibiotic resistance in bacterial physiology: the mycobacterial paradigm. *Trends in Microbiology* 2006; **14**: (7), 304-312.
- [198] Sakamoto Y, Furukawa S, Ogihara H, Yamasaki M. Fosmidomycin Resistance in Adenylate Cyclase Deficient (cya) Mutants of *Escherichia coli*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2003; **67**: (9), 2030-2033.
- [199] Baumeister S, Winterberg M, Durantou C, Huber SM, 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. *Molecular Microbiology* 2006; **60**: (2), 493-504.
- [200] Baumeister S, Wiesner J, Reichenberg A, Hintz M, Bietz S, Harb OS, Roos DS, Kordes M, Friesen J, Matuschewski K, Lingelbach K, Jomaa H, Seeber F. Fosmidomycin Uptake into *Plasmodium* and *Babesia*-Infected Erythrocytes Is Facilitated by Parasite-Induced New Permeability Pathways. *PLoS ONE* 2011; **6**: (5), e19334.
- [201] Kirk K, *Membrane Transport in the Malaria-Infected Erythrocyte*. 2001; Vol. 81, p 495-537.
- [202] Bertani G. Studies on Lysogenesis I. The Mode of Phage Liberation by Lysogenic *Escherichia Coli*. *Journal of Bacteriology* 1951; **62**: (3), 293-300.
- [203] Bertani G. Lysogeny at Mid-Twentieth Century: P1, P2, and Other Experimental Systems. *Journal of Bacteriology* 2004; **186**: (3), 595-600.
- [204] Hecht S, Wungsintaweekul J, Rohdich F, Kis K, Radykewicz T, Schuhr CA, 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 *Journal of Organic Chemistry* 2001; **66**: (23), 7770-7775.

- [205] Kuzmic P. Program DYNAFIT for the analysis of enzyme kinetic data: Application to HIV proteinase. *Analytical Biochemistry* 1996; **237**: (2), 260-273.
- [206] Press WH, Teukolsky SA, Vetterling WT, Flannery BP, *Numerical Recipes: The Art of Scientific Computing*. Cambridge University Press: New York, 2007; Vol. 3.
- [207] Trager W, Jensen JB. Human Malaria Parasites in Continuous Culture. *Science* 1976; **193**: (4254), 673-675.
- [208] Lambros C, Vanderberg JP. Synchronization of Plasmodium-Falciparum Erythrocytic Stages in Culture. *Journal of Parasitology* 1979; **65**: (3), 418-420.
- [209] Noedl H, Wernsdorfer WH, Miller RS, Wongsrichanalai C. Histidine-Rich Protein II: a Novel Approach to Malaria Drug Sensitivity Testing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2002; **46**: (6), 1658-1664.
- [210] Noedl H, Bronnert J, Yingyuen K, Herwig BA, 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. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2005; **49**: (8), 3575-3577.
- [211] R Development Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing 1:26673: Vienna (Austria), 2008.
- [212] Ritz C, Streibig JC. Bioassay Analysis Using R. *Journal of Statistical Software* 2005; **12**: (5).
- [213] Kabsch W. Automatic Processing of Rotation Diffraction Data from Crystals of Initially Unknown Symmetry and Cell Constants. *Journal of Applied Crystallography* 1993; **26**, 795-800.
- [214] Murshudov GN, Vagin AA, Dodson EJ. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 1997; **53**, 240-255.
- [215] Turk D. *Dissertationsschrift*. Technische Universität München (Deutschland), 1992.
- [216] Borenfreund E, Puerner J. A simple quantitative procedure using monolayer culture for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). *Journal of Tissue Culture Methods* 1984; **9**, 7-9.
- [217] Clavier H, Boulanger L, Audic N, Toupet L, Mauduit M, Guillemin J. Design and synthesis of imidazolium salts derived from (l)-valine. Investigation of their potential in chiral molecular recognition. *Chemical Communications* 2004; (10), 1224-1225.
- [218] Mayr H, Basso N, Hagen G. Kinetics of hydride-transfer reactions from hydrosilanes to carbenium ions. Substituent effects in silicenium ions. *Journal of the American Chemical Society* 1992; **114**, 3060-3066.