

Strukturoptimierung von antiplasmodial aktiven Pyrrolopyrazol-, Benzimidazol- und Fosmidomycin-Derivaten

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Sarah Konzuch

aus Holzminden

Düsseldorf, April 2016

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: 31.08.2016

„Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig: Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft, etwas, in das man viel Zeit und Arbeit gesteckt hat, wieder wegzuwerfen.“

Albert Einstein

Für meine Familie

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

(Sarah Konzuch)

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Januar 2011 bis März 2015 am Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Kurz, bei dem ich mich an dieser Stelle für die interessante Themenstellung bedanke. Seine engagierte Betreuung und seine zahlreichen Anregungen haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Stark danke ich für die Bereitschaft, die Arbeit als Mentor und als Zweitgutachter zu betreuen.

Für die Durchführung der biologischen Untersuchungen danke ich Herrn Dr. Benjamin Mordmüller und Frau Dr. Jana Held vom Institut für Tropenmedizin der Eberhard Karls Universität Tübingen, Herrn Prof. Dr. Markus Fischer und Dr. Boris Illarionov von der Universität Hamburg, Frau Prof. Dr. Elizabeth Winzeler und Herrn Dr. Stephan Meister vom Department of Pediatrics der University of California, San Diego und Herrn Dr. Sergio Wittlin vom Department of Medical Parasitology and Infection Biology des Swiss Tropical and Public Health Institute, Basel.

Dr. Finn Hansen danke ich herzlich für die Unterstützung und die kompetenten Hilfestellungen während dieser Arbeit.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Kurz, besonders Claudia Lienau, Michael Leven, Katharina Stenzel, Lukas Spanier, Tanja Knaab und Linda Marek danke ich für die tolle Arbeitsatmosphäre, das freundschaftliche Verhältnis und eine unvergessliche Promotionszeit.

Ein besonderer Dank geht an meine Eltern und meine Schwester, die immer an mich glauben, in jeder Situation die richtigen Worte finden und mir in allen Lebenslagen eine unersetzbare Stütze sind.

Von ganzem Herzen danke ich meinem Freund Stefan, der mit mir durch alle Höhen und Tiefen dieser Arbeit gegangen ist und auf Vieles verzichtet hat, um mich zu unterstützen.

Abkürzungsverzeichnis

abs.	absolut
ACT	artemisinin-based combination therapy
br	breit
BTCAl	Benzyl-2,2,2-trichloracetimidat
CAIBE	Chlorameisensäure- <i>iso</i> -butylester
CC ₅₀	halbmaximale zytotoxische Konzentration
CDI	1,1'-Carbonyldiimidazol
¹³ C-NMR	carbon nuclear magnetic resonance
CHMP	Committee for Medicinal Products for Human Use
CSP	<i>circumsporozoite protein</i>
d	Dublett
DCM	Dichlormethan
DDQ	2,3-Dichlor-5,6-dicyano- <i>p</i> -benzochinon
DHFR	Dihydrofolat-Reduktase
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	deoxyribonucleic acid
DOXP	1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat
DTT	Dithiothreitol
Dxr	1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat -Reduktoisomerase
Dxs	1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase
EC ₅₀	halbmaximale effektive Konzentration
<i>E. coli</i> , <i>Ec</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur
G3P	Glycerinaldehyd-3-phosphat
GNF	Genomics Institute of the Novartis Research Foundation
GSK	<i>GlaxoSmithKline</i>
h	Stunden (engl. hours)
HBsAG	Hepatitis-B-Oberflächenprotein (engl. hepatitis B surface antigen)
HeLa	humanes Zervixkarzinom (Henrietta Lacks)
HEK	humane, embryonale Nierenzellen (engl. Human Embryonic Kidney)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure
HepG2	humanes Leberzellkarzinom (engl human hepatocellular carcinoma)
HIV	human immunodeficiency virus
¹ H-NMR	proton nuclear magnetic resonance

HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. high performance liquid chromatography)
HRP2	histidine rich protein 2
HTS	High-Throughput-Screening
IC ₅₀	halbmaximale inhibitorische Konzentration
IPP	Isopentenylidiphosphat
konz.	konzentriert
LSG	late stage gametocytes
m	Multipllett
MDM2	murine double minute 2
MEP	2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat
MMV	Medicines for Malaria Venture
MOM	Methoxymethyl
MRC-5	humanes, fetales Lungenfibroblast
<i>M. tuberculosis, Mt</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MVA	Mevalonat
MVI	Malaria Vaccine Initiative
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat, reduziert
n. b.	nicht bestimmt
NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
NMRI	Naval Medical Research Institute
<i>o</i>	<i>ortho</i>
<i>p</i>	<i>para</i>
P.	Plasmodium
PAINS	Pan Assay Interferenrence Compounds
PBS	Phosphate Buffered Saline
PfAtp4	P-Typ-ATPase
<i>PfEMP1</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> erythrocyte membrane-proteine 1
Ppm	parts per million
PPTS	Pyridinium <i>p</i> -toluenesulfonate
Pyr	Pyruvat
q	Quartett
reflux	refluxieren
REOS	Rapid Elimination Of Swill
RP	reversed phase
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
Ro5	Rule of Five

RT	Raumtemperatur
s	Singulett
SERCaP	<i>single exposure, radical cure and prophylaxis</i>
SG	Schutzgruppe
spp.	species pluralis
t	Triplett
TBDPS	<i>tert</i> -Butyldiphenylsilyl
TBAB	Tetrabutylammoniumbromid
TBS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
<i>tert</i>	<i>tertiär</i>
TES	Triethylsilyl
TFA	Trifluoressigsäure
THP	Tetrahydropyran-2-yl
TIPS	Triisopropylsilyl
TMS	Trimethylsilyl
TMSBr	Trimethylsilylbromid
TriBAT	2,4,6-Tris(benzyloxy)-1,3,5-triazin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
WHO	World Health Organisation
1, 2, 3, ...	mit arabischen Ziffern bezeichnete Verbindungen werden erstmalig im Rahmen dieser Arbeit beschrieben
I, II, III, ...	mit römischen Ziffern bezeichnete Verbindungen wurden bereits von anderen Autoren beschrieben

1. Einleitung.....	1
1.1. Bedeutung & Verbreitung der Malaria	1
1.2. Vermehrungszyklus des Parasiten	1
1.3. Therapie & Prophylaxe der Malaria	3
1.4. Verschiedene Lebensstadien der Plasmodien als Angriffsziele für Malaria-Therapeutika	8
1.5. Moderne Methoden der Arzneistoffentwicklung	9
1.6. Wirkstoffe in präklinischer und klinischer Entwicklung	10
1.7. Spezifische Inhibition des Targets DOXP-Reduktoisomerase (Dxr) in der mevalonatunabhängigen Isoprenoid-Biosynthese - ein mögliches Target für die Entwicklung von Malaria-Therapeutika	13
2. Leitgedanke der Arbeit	15
3. Optimierung von zwei Leitstrukturen aus der Malaria Box von MMV	16
3.1. Malaria Box von Medicines for Malaria Venture	16
3.2. Auswahl und Eigenschaften der Leitstrukturen	19
3.3. Aufgabenstellung	22
3.4. Synthese und Eigenschaften von Pyrrolopyrazolen als neuartige Antimalariawirkstoffe	23
3.4.1. Strukturelle Variationen der Leitstruktur 1 (MMV396717)	23
3.4.2. Literaturübersicht zur Synthese von Pyrrolopyrazol-Derivaten	24
3.4.3. Resynthese der Leitstruktur 1 (MMV396717)	28
3.4.4. Synthese von Pyrrolopyrazol-Derivaten mit variiertem Molekülregion A.....	36
3.4.5. Synthese von Pyrrolopyrazol-Derivaten mit variiertem Molekülregion B.....	39
3.4.6. Synthese von Pyrrolopyrazol-Derivat 55 mit variiertem Molekülregion C.....	41
3.4.7. Synthese von Pyrrolopyrazol-Derivaten mit variiertem Molekülregion D	42
3.4.8. Synthese von Pyrrolopyrazol-Derivaten mit zwei variierten Molekülregionen	44
3.4.9. Strukturelle Eigenschaften	45
3.4.10. Biologische Evaluation der Pyrrolopyrazol-Derivate	51

3.5. Synthese und Eigenschaften von Benzimidazolen als neuartige Antimalariawirkstoffe	60
3.5.1. Strukturelle Variationen/Optimierung der Leitstruktur II (MMV006962)	60
3.5.2. Literaturübersicht zur Synthese von Benzimidazol-Derivaten	61
3.5.3. Resynthese der Leitstruktur II (MV006962) und Synthese weiterer Benzimidazol-Derivate	68
3.5.4. Strukturelle Eigenschaften	71
3.5.5. Biologische Evaluation der Benzimidazol-Derivate	74
3.6. Zusammenfassung	81
4. Inverse α-substituierte Fosmidomycin-Derivate	87
4.1. Stand der Forschung	87
4.2. Aufgabenstellung	90
4.3. Publikation	91
4.4. Synthese inverser, α -Acylamino-substituierter Fosmidomycin-Derivate	92
4.5. Biologische Evaluation	95
4.6. Strukturbiologie	96
4.7. Zusammenfassung	98
5. Summary	100
6. Experimenteller Teil	106
6.1. Verwendete Geräte und Analysemethoden	106
6.2. Allgemeine Arbeitsvorschriften	107
6.3. Analytische Daten der Verbindungen aus Kapitel 3.4.3.	110
6.4. Analytische Daten der Verbindungen aus Kapitel 3.4.4.	120
6.5. Analytische Daten der Verbindungen aus Kapitel 3.4.5.	148
6.6. Analytische Daten der Verbindungen aus Kapitel 3.4.6.	163
6.7. Analytische Daten der Verbindungen aus Kapitel 3.4.7.	165
6.8. Analytische Daten der Verbindungen aus Kapitel 3.4.8.	178
6.9. Analytische Daten der Verbindungen aus Kapitel 3.5.3.	185

6.10. Analytische Daten der Verbindungen aus Kapitel 4.4.	199
7. Untersuchung der biologischen Aktivität	202
7.1. Untersuchung der antiplasmodialen <i>in vitro</i> -Aktivität gegenüber den <i>P. falciparum</i> -Stämmen 3D7 und Dd2.....	202
7.2. Bestimmung von IC ₅₀ -Werten mittels photometrischem Assay	202
7.3. Untersuchung der antiplasmodialen <i>in vitro</i> -Aktivität gegenüber <i>P. berghei</i> - Leberstadien	203
7.4. Untersuchung der Zytotoxizität an HeLa-Zellen	204
7.5. Untersuchung der antiplasmodialen <i>in vivo</i> -Aktivität	204
8. Literaturverzeichnis	206

1. Einleitung

1.1. Bedeutung & Verbreitung der Malaria

Malaria ist eine der bedeutendsten Infektionskrankheiten weltweit, die jährlich zu hunderttausenden Todesfällen führt, ein Großteil davon in Afrika. Seit 2004, als die Anzahl der Todesfälle aufgrund von Malaria-Infektionen einen Höchstwert von 1.8 Millionen erreichte,¹ konnte die Sterblichkeitsrate mithilfe intensiver Forschungsarbeiten merklich gesenkt werden. Im Jahr 2015 erkrankten laut WHO geschätzte 214 Millionen Menschen an Malaria, davon verliefen 438 000 Krankheitsfälle tödlich.²

Malaria wird durch Protozoen der Gattung *Plasmodium* verursacht, welche während der Blutmahlzeit einer weiblichen *Anopheles*-Mücke übertragen werden. Es gibt fünf humanpathogene *Plasmodien*-Arten, die unterschiedliche Formen der Malaria verursachen: *P. falciparum* (*Malaria tropica*), *P. malariae* (*Malaria quartana*), *P. vivax* (*Malaria tertiana*), *P. ovale* (*Malaria tertiana*) und *P. knowlesi*.³⁻⁴

P. falciparum verursacht die meisten Todesfälle und tritt vorwiegend in Afrika auf. *P. vivax* hingegen ist auch in Asien, in Mittel- und Südamerika und im mittleren Osten endemisch und dadurch weiter verbreitet als *P. falciparum*.⁵ Durch *P. malariae*, *P. ovale* oder *P. knowlesi* hervorgerufene Malaria kommt weitaus seltener vor als durch *P. falciparum* oder *P. vivax* hervorgerufene Malaria.^{4, 6}

P. knowlesi wurde ursprünglich für einen ausschließlich für Affen pathogenen Erreger gehalten. Seit 2004 wurden vermehrt Übertragungen auf den Menschen beobachtet, weshalb der Erreger mittlerweile zu den humanpathogenen *Plasmodien*-Arten gezählt wird.^{3, 7-10}

1.2. Vermehrungszyklus des Parasiten

Der Entwicklungszyklus der *Plasmodien* lässt sich in eine ungeschlechtliche Vermehrung, welche im menschlichen Zwischenwirt stattfindet, und eine geschlechtliche Vermehrung im Endwirt, der weiblichen *Anopheles*-Mücke, unterteilen (Abb. 1).

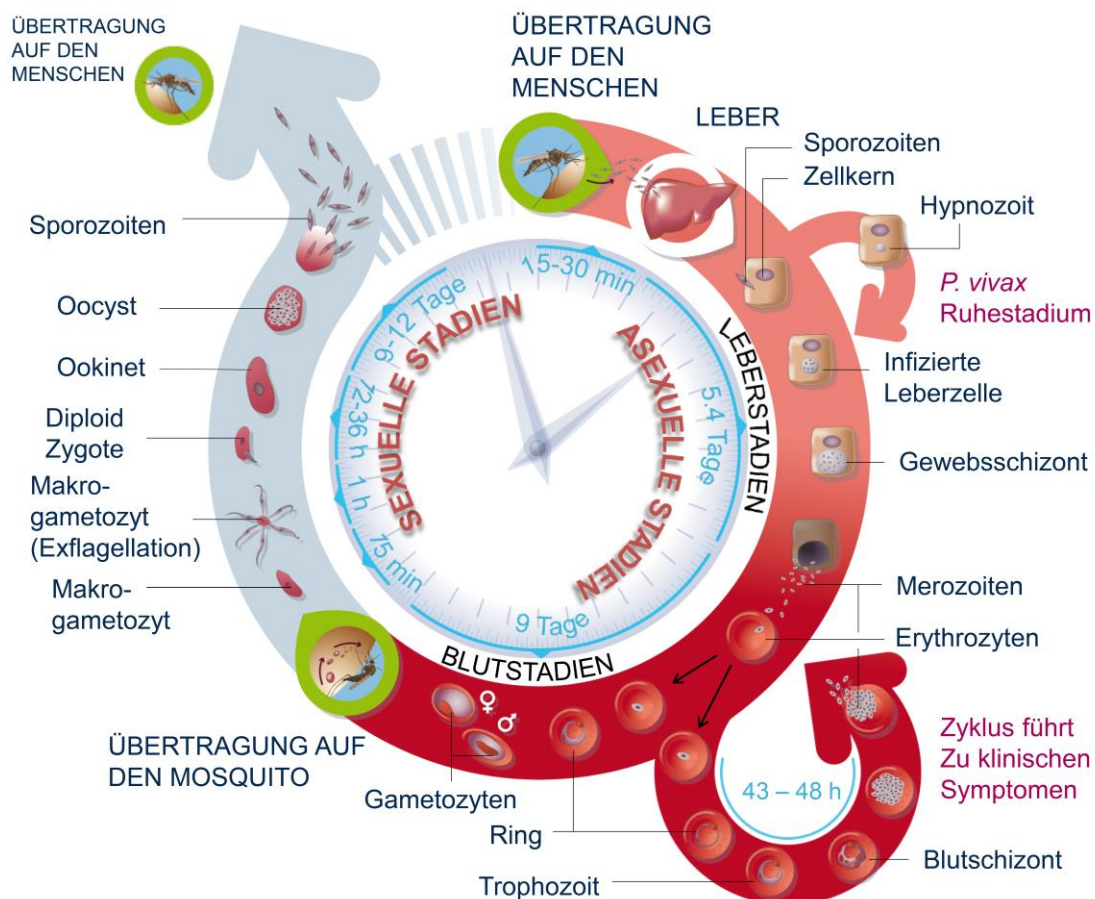


Abbildung 1: Lebenszyklus der Malaria-Erreger *Plasmodium* spp. (modifiziert nach Medicines for Malaria Venture (MMV)¹¹).

Die für den Menschen infektiösen Stadien, die Sporozoiten, gelangen während der Blutmahlzeit über die Speicheldrüsen der weiblichen *Anopheles*-Mücke in die menschliche Blutbahn. Üblicherweise werden dabei maximal 350 bis 400 Sporozoiten übertragen.¹² Nach ca. 30 Minuten erreichen die Sporozoiten die Leber, wo eine erste ungeschlechtliche Vermehrung stattfindet, die exo-erythrozytäre Schizogonie. Aus den Gewebsschizonten, welche während der exo-erythrozytären Schizogonie gebildet werden, entstehen zehntausende Merozoiten.^{4, 13}

Im Falle einer Infektion mit *P. vivax* oder *P. ovale* bilden sich in der Leber außerdem Dauerformen (Hypnozoiten), welche auch noch Jahre später ohne erneute Infektion Rezidive verursachen können.

Die Merozoiten werden nach wenigen Tagen durch den Zerfall der Leberzellen in die Blutbahn freigesetzt, wo es zum Befall der Erythrozyten kommt. Dort findet eine zweite ungeschlechtliche Vermehrung statt, die erythrozytäre Schizogonie. Über das Zwischenstadium der Trophozoiten werden Blutschizonten gebildet. Diese zerfallen nach ihrer Ausreifung und setzen neue Merozoiten frei, welche wiederum noch uninfizierte Erythrozyten befallen, sodass ein neuer erythrozytärer Vermehrungszyklus beginnt.

Ein geringer Anteil der Merozoiten bildet geschlechtliche Formen, die Gametozyten, welche bei erneuter Blutmahlzeit von der weiblichen *Anopheles*-Mücke aufgenommen werden und diese dadurch infizieren. Im Mitteldarm der Mücke folgt der geschlechtliche Vermehrungszyklus des Parasiten, wodurch sich neue Sporozoiten bilden. Diese wandern schließlich in die Speicheldrüsen und stehen so für eine erneute Übertragung auf den Menschen bereit, sodass sich der Lebenszyklus der Parasiten fortsetzen kann.

Da die Vermehrung der Sporozoiten in der Leber keine Symptome verursacht, bleibt diese als Präpatenz bezeichnete Phase vom Patienten unbemerkt. Erst während der erythrozytären Schizogenie treten typische Krankheitssymptome der Malaria, wie Fieber, Durchfall, Übelkeit, Kopf- und Gliederschmerzen auf.

Das intermittierende Fieber wird durch die sich wiederholende Lyse der infizierten Erythrozyten und die damit einhergehende Freisetzung von Entzündungsmediatoren, wie Toxine oder Zytokine, verursacht

Bei Infektionen mit *P. ovale* und *P. vivax* wiederholen sich die Fieberanfälle nach 48 Stunden, bei *P. malariae* nach 72 Stunden, wobei die zeitlichen Abstände der Dauer eines intra-erythrozytären Zyklus entsprechen. Diese regelmäßig auftretenden Fieberschübe fehlen bei Malaria-Infektionen, die durch *P. falciparum* ausgelöst wurden, da der erythrozytäre Zyklus nicht in regelmäßigen Zeitabständen verläuft. Vor allem diese Tatsache erschwert die Diagnose der *Malaria tropica*, wodurch es leicht zu Verwechslungen mit anderen Infektionskrankheiten kommt.¹⁴ Charakteristisch für *Malaria tropica* ist die hohe Parasitenzahl im Blut und die daraus resultierende Zerstörung der Erythrozyten. Da dies oftmals zu einer hämolytischen Anämie führt und die Organe dadurch nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff versorgt werden, kann es in schweren Verlaufsformen zu lebensgefährlichen Komplikationen führen.

Außerdem kommt es bei der *Malaria tropica* zu einer Bildung spezieller Proteine an der Oberfläche der Erythrozyten, den PfEMP1 (*Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane-proteine 1), welche eine Zytoadhärenz bewirken. Dabei handelt es sich um die Bindung der infizierten Erythrozyten an das Endothel kleiner Blutgefäße, wodurch die Parasiten der für sie tödlichen Milzpassage entgehen können. Diese Tatsache macht die *Malaria tropica* zur gefährlichsten Form der Malaria, da es durch den Verschluss der kleinen Gefäße von hypoxischen Gewebeschäden bis zu komplettem Organversagen kommen kann.

1.3. Therapie & Prophylaxe der Malaria

Mit dem Impfstoff RTS,S/AS01 (MosquirixTM), welcher von GlaxoSmithKline (GSK) in Kooperation mit PATH Malaria Vaccine Initiative (MVI) mithilfe finanzieller Unterstützung von der Melinda Gates Foundation entwickelt wurde, befindet sich erstmals ein Impfstoff im Zulassungsverfahren.¹⁵

RTS,S/AS01 ist ein Fusionsprotein, in dem die C-terminale Region von CSP (circumsporozoite protein) an den N-Terminus des Hepatitis-B-Oberflächenproteins (engl. HBsAG, hepatitis B surface antigen) S gebunden ist. Es handelt sich um einen präerythrozytären Impfstoff, der den parasitären Befall der Leberzellen und somit die Entwicklung von Sporozoiten verhindern.¹⁶

Eine Studie im Rahmen der klinischen Phase III in sieben afrikanischen Ländern (Burkina Faso, Gabun, Ghana, Kenia, Malawi, Mosambik und Tansania) ergab, dass RTS,S/AS01 Malaria-Neuerkrankungen um 31 % bei Säuglingen im Alter zwischen 6-12 Wochen und um 56 % bei Kleinkindern zwischen 5 und 17 Monaten reduzieren kann.¹⁷⁻¹⁸ Aufgrund dieser Ergebnisse erhielt RTS,S/AS01 im Juli letzten Jahres durch das Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) von der Europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA) eine positive Bewertung für die Anwendung des Impfstoffs außerhalb der EU.¹⁸

Da RTS,S/ keinen 100%igen Schutz vor Malaria-Infektionen bietet und die Wirksamkeit des Impfstoffes nach einem Jahr nachlässt, stellen weiterhin etablierte Prophylaxe-Methoden wie zum einen die Vermeidung von Insektenbissen (Expositionsprophylaxe) und zum anderen die Einnahme von Malaria-Medikamenten (medikamentöse Prophylaxe) wesentliche Schutzmaßnahmen dar. Entsprechend dem Übertragungsrisiko werden von der WHO geeignete, präventive Maßnahmen empfohlen (siehe Tab. 1).

Tabelle 1: Übertragungsrisiken von Malaria und Möglichkeiten zur Prävention (modifiziert nach WHO¹⁹).

Übertragungsrisiko		Möglichkeiten zur Prävention	
		Expositionsprophylaxe	Chemoprophylaxe
Typ A	Sehr geringes Übertragungsrisiko	Mückenstichprävention	
Typ B	Risiko einer Infektion durch <i>P. vivax</i>	Mückenstichprävention	Chloroquin, Atovaquon-Proguanil, Doxycyclin oder Mefloquin ^{a,b}
Typ C	Risiko einer Infektion durch <i>P. falciparum</i> in Gebieten mit auftretender Chloroquin- und Sulfadoxin-Pyrimethamin Resistenzen	Mückenstichprävention	Atovaquon-Proguanil, Doxycyclin oder Mefloquin ^{a,c}
Typ D	Risiko einer Infektion durch <i>P. falciparum</i> in Gebieten mit auftretender Multiresistenzen	Mückenstichprävention	Atovaquon-Proguanil, Doxycyclin oder Mefloquin ^{a,d,e}

^aBei Reisen in ländliche Gebiete mit geringem Risiko einer Malaria-Infektion kann alternativ eine Mückenstichprävention mit einer Stand-by-Therapie kombiniert werden. ^bEntsprechend bekannter Sensitivitäten der Parasiten, bekannter Nebenwirkungen und Kontraindikationen ausgewählt. ^cEntsprechend bekannter Nebenwirkungen und Kontraindikationen ausgewählt. ^dEntsprechend gemeldeter Resistenzen, bekannter Nebenwirkungen und Kontraindikationen ausgewählt. ^eIn Gebieten mit auftretenden Multiresistenzen wird Mefloquin zur Chemoprophylaxe nicht mehr empfohlen. Derzeit betrifft dies Kambodscha, Südost-Myanmar und Thailand.

Das Depot an wirksamen Arzneimitteln zur Behandlung von Malaria ist gegenüber der zunehmenden Resistenzentwicklung und damit verbundenen Ausbreitung vergleichsweise gering.

Chinin wird aus der Rinde des Chinarindenbaums (*Cinchona pubescens*) gewonnen und findet bereits seit fast 200 Jahren zum medikamentösen Kampf gegen Malaria Anwendung, sowohl zur Behandlung unkomplizierter als auch komplizierter Malaria (Abb. 2).

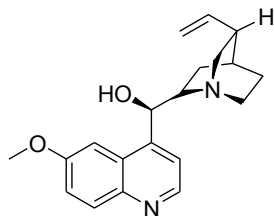


Abbildung 2: Chinin.

Seit der Einführung der ersten synthetischen Malaria-Therapeutika in den 1940er Jahren haben sich nur wenige Arzneistoffe für den klinischen Gebrauch als geeignet erwiesen. Der Gebrauch von verfügbaren Arzneimitteln wird weiterhin durch Resistenzbildung, Nebenwirkungen, zu hohe Kosten und mangelnde Verfügbarkeit einiger Substanzen in betroffenen Gebieten zusätzlich eingeschränkt (Tab. 2).

Tabelle 2: Einschränkungen in der Anwendung von zugelassenen Malaria-Therapeutika (modifiziert nach Nwaka²⁰).

Wirkstoff (-kombination)	Datum der Zulassung	Einschränkungen in der Anwendung
Chinin	19. Jahrhundert	Compliance, Resistenz, Sicherheit
Chloroquin	1947	Resistenz
Primaquin	1950	Sicherheit
Sulfadoxin/Pyrimethamin (Fansidar [®])	1969	Resistenz
Amodiaquin	1975	Sicherheit, Resistenz
Artemisinin	1970er Jahre	Compliance, Kosten, Resistenz
Mefloquin (Lariam [®])	1985	Resistenz, Kosten, Sicherheit
Halofantrine (Halfan [®])*	1988	Resistenz, Kosten, Sicherheit
Artemether/Lumefantrin (Riamet [®] , Coartem [®])	1998	Compliance, Kosten, Resistenzpotential
Atovaquon/Proguanil (Malarone [®])	1998	Kosten, Resistenzpotential

* Aufgrund von Kardiotoxizität und unsicherer Resorption mittlerweile in vielen Ländern nicht mehr zugelassen.

Im Jahr 1971 wurde Artemisinin von *Youyou Tu*, einer chinesischen Professorin für Traditionelle Chinesische Medizin, aus den Blättern des Einjährigen Beifußes (*Artemisia annua*) isoliert.²¹ Im Jahr 2015 erhielt *Youyou Tu* für Ihre wissenschaftliche Leistung den Medizin-Nobelpreis.

In Kombination mit einem weiteren Arzneistoff oder einer Arzneistoffkombination (engl. artemisinin-based combination therapy, ACT) mit höherer Halbwertszeit, wie zum Beispiel die Kombination Arthemether / Lumefantrin, gehören Artemisinin und seine Derivate heute zu den wichtigsten Malariatherapeutika. 2014 wurden laut WHO 337 Millionen Dosen ACTs verschrieben.²

Zur Therapie einer unkomplizierten Malaria durch *P. falciparum* empfiehlt die WHO die Anwendung von ACTs, wobei die aktuelle Resistenzsituation im entsprechenden Gebiet berücksichtigt werden muss. (Abb. 3).²²

Im Falle einer komplizierten *Malaria tropica* erfolgt die Behandlung gemäß der Empfehlung der WHO durch parenteral verabreichtes Artesunat, Arthemether oder Chinin. Im Anschluss folgt eine orale Therapie durch eine ACT oder Chinin in Kombination mit einem Antibiotikum.²²

Bei Infektionen durch *P. vivax* und *P. ovale* empfiehlt die WHO die Verwendung von Primaquin, da es in der Lage ist die hepatischen Dauerformen (Hypnozoiten), welche sich bei Infektionen mit *P. vivax* und *P. ovale* ausbilden, zu eliminieren und eine Radikalkur (engl. radical cure) zu bewirken. Da Primaquin jedoch nur eine geringe blutschizontozide Wirkung aufweist, ist die zusätzliche Gabe eines blutschizontoziden Arzneimittels nötig. Je nach Resistenzsituation empfiehlt die WHO hierbei eine ACT oder Chloroquin, jeweils in Kombination mit Primaquin.²² Durch das erhöhte Risiko unerwünschter Wirkungen für Menschen mit Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Mangel ist Primaquin jedoch nur mit Einschränkungen anwendbar.²³ Mehr als 400 Millionen Menschen weltweit leiden unter diesem Mangel, ein Großteil davon in Malaria-endemischen Gebieten.²⁴ Infektionen durch *P. malariae* oder *P. knowlesi* können mit ACTs oder Chloroquin behandelt werden (Abb. 3).²²

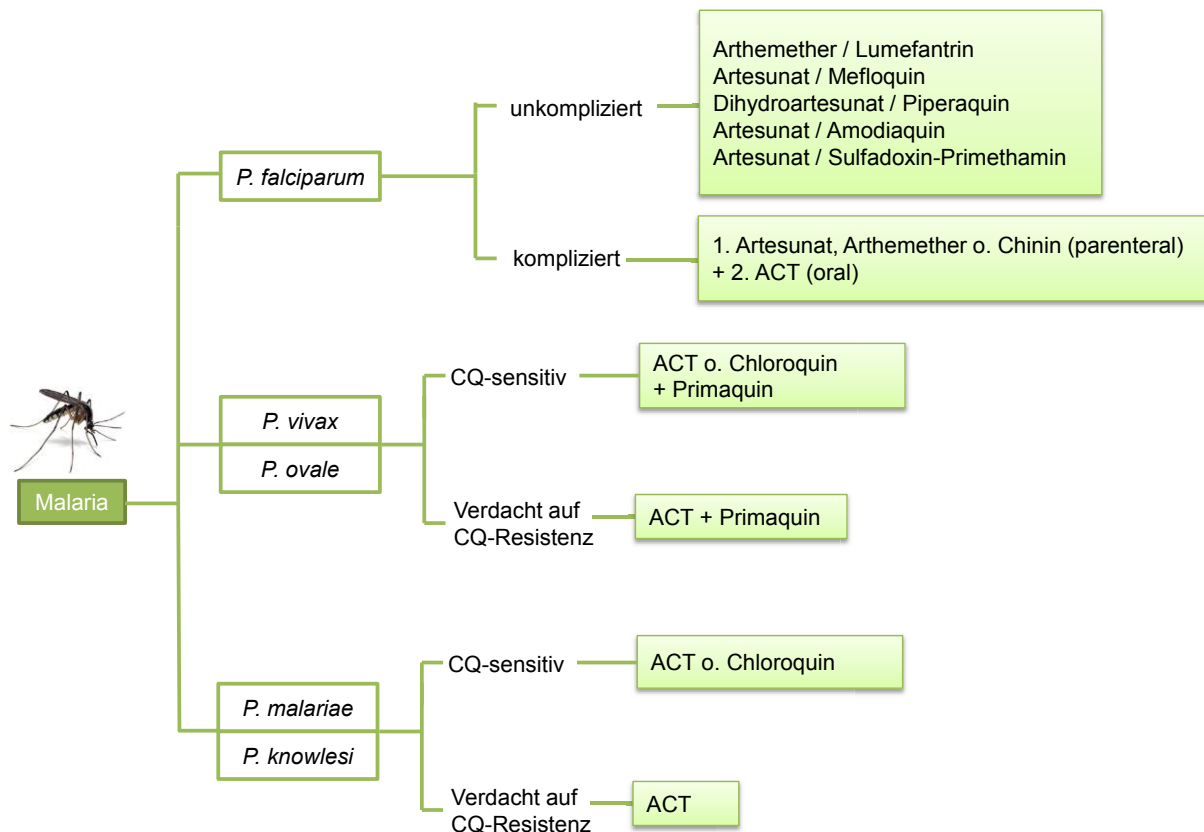


Abbildung 3: Therapiemöglichkeiten der Malaria (modifiziert nach Schlitzer¹⁴).

Wie bereits erwähnt, stellt die Entwicklung von Resistenzen gegen *Plasmodien*, gegenüber der für Prophylaxe und Therapie der Malaria zur Verfügung stehenden Arzneimitteln, ein großes Problem dar. Chloroquin-resistente *P. falciparum*-Stämme sind in nahezu allen Gebieten bekannt, in denen *P. falciparum* übertragen wird. Artemesinin und seine Derivate stellen die effektivsten, momentan verfügbaren Wirkstoffe dar und sind gleichzeitig die einzig bekannten Arzneistoffe, die eine Aktivität gegen multiresistente *P. falciparum*-Stämme aufweisen. Daher werden in Gebieten mit Chloroquin-resistenten Stämmen von der WHO Artemesinin-basierte Kombinationspräparate als Arzneimittel 1. Wahl zur Behandlung der *Malaria tropica* empfohlen. Als besonders problematisch ist daher die fortschreitende Resistenzbildung gegen diese Wirkstoffklasse anzusehen. Bereits 2008 gab es eine erste Studie über Patienten aus den östlichen Gebieten Thailands an der Grenze zu Kambodscha, die unter Artesunat-Monotherapie eine verzögerte Elimination der Parasiten aufwiesen, was auf eine beginnende Resistenzentwicklung hindeutete.²⁵ In einer Studie im Zeitraum von 2011 bis 2014 konnten Resistenzen von *P. falciparum* gegenüber Artemisinin in Myanmar, Kambodscha, Thailand und Süd-Vietnam nachgewiesen werden.²⁶⁻²⁷

1.4. Verschiedene Lebensstadien der Plasmodien als Angriffsziele für Malaria-Therapeutika

Nahezu alle etablierten Wirkstoffe weisen Aktivität gegenüber asexuellen Blutstadien auf. Zusätzlich gegen Leberstadien und geschlechtliche Formen (Gametozyten) wirken lediglich die schwach blutschizontoziden 8-Aminochinoline, die Dihydrofolat-Reduktase (DHFR)-Inhibitoren Proguanil und Pyrimethamin sowie das Naphthochinon-Derivat Atovaquon. Zudem weisen nur 8-Aminochinoline eine Wirkung gegen Hypnozoiten auf (Abb. 4).

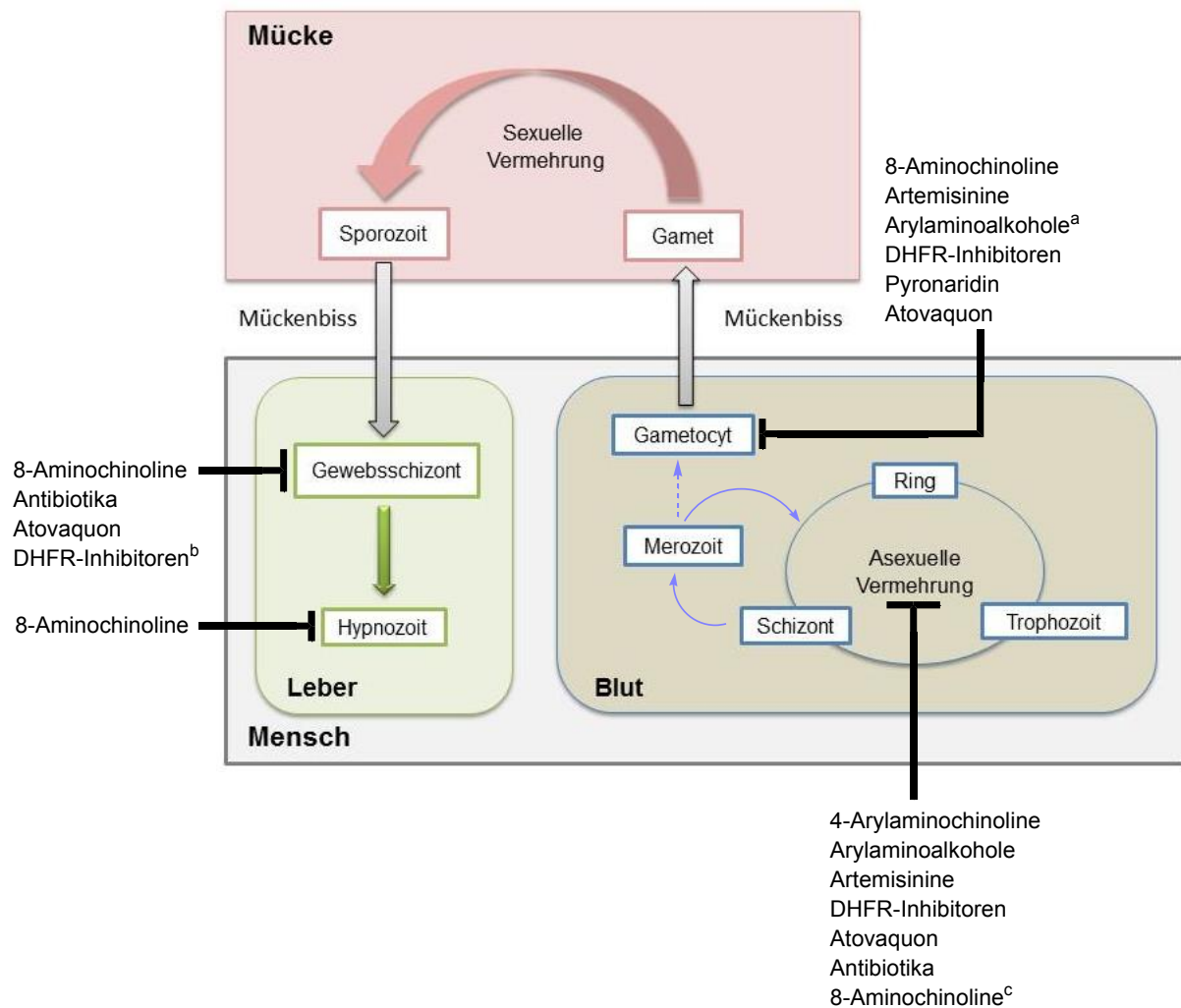


Abbildung 4: Mögliche Angriffspunkte der Wirkstoffklassen auf verschiedene Stadien der Plasmodien (modifiziert nach Stich et al.).⁵ ^aalle derzeit zur Malaria-Therapie eingesetzten Arylaminoalkohole mit Ausnahme von Lumefantrin; ^balle derzeit zur Malaria-Therapie eingesetzten DHFR-Inhibitoren mit Ausnahme von Sulfadoxin; ^cschwach blutschizontozide Wirkung.

Neben blutschizontozid wirkenden Arzneistoffen werden daher dringend solche benötigt, die auch Aktivität gegen andere parasitäre Stadien von *Plasmodium* spp. aufweisen. Durch Transmissionsblockade könnte das Ziel einer endgültigen Eradikation der Malaria erreicht werden. Aus weniger als 1 % der Merozoiten entwickeln sich geschlechtliche Formen, die Gametozyten.²⁸ Die späten Entwicklungsstadien IV und V der Gametozyten (engl. late stage

gametocytes, LSG), welche von der *Anopheles*-Mücke bei ihrer Blutmahlzeit aufgenommen werden, infizieren diese dadurch und setzen somit den Lebenszyklus der Parasiten fort. Daher sind Arzneistoffe, welche Aktivität gegen *P. falciparum*-Gametozyten der Stadien IV und V aufweisen, geeignet um die Parasitenübertragung vom Menschen auf die Mücke zu reduzieren.

Wirkstoffe, die gegen Leberstadien wirken, verhindern die Entwicklung der durch die *Anopheles*-Mücke auf dem Menschen übertragenen Sporozoiten zu Merozoiten und sind dadurch für eine kausale Prophylaxe geeignet. Aus einem Sporozoiten entwickeln sich zehntausende Merozoiten.^{4, 13} Die Parasitenpopulation in den Blutstadien ist also um ein Vielfaches höher, als in den Leberstadien. Deshalb sollte die Infektion während dieses frühen Entwicklungsstadiums leichter zu unterdrücken sein. Zu den aktuell verfügbaren Arzneistoffklassen bzw. Arzneistoffen mit Aktivität gegen Leberstadien zählen Antibiotika (z. B. Clindamycin, Doxycyclin), 8-Aminochinolone (z. B. Primaquin), DHFR-Inhibitoren (z. B. Pyrimethamin, Proguanil) und Atovaquon.

Es werden stetig Arzneistoffe mit neuen Wirkungsmechanismen benötigt, die kausalprophylaktische und transmissionsblockierende Eigenschaften besitzen, um die Gefahr der Resistenzentwicklung gering zu halten und dem Ziel der Eradikation von Malaria näher zu kommen.

1.5. Moderne Methoden der Arzneistoffentwicklung

Zur Entwicklung neuartiger Arzneistoffe sind diverse Methoden zugänglich. Eine Möglichkeit besteht darin, bereits zugelassene oder in klinischer Phase befindliche Arzneistoffe strukturell zu modifizieren, um pharmakokinetische und pharmakodynamische Eigenschaften zu verbessern oder möglicherweise bereits entstandene Resistenzen zu umgehen. Ein Großteil neuer Arzneistoffklassen mit antiplasmodialer Aktivität wird jedoch mittlerweile durch High-Throughput-Screenings (HTS) entdeckt. Ein Vorteil dieser Methode besteht darin, dass Screenings großer Substanzbibliotheken in kürzester Zeit möglich sind, um neue Wirkstoffe zu identifizieren. HTS, in denen der inhibitorische Effekt eines Wirkstoffs auf das Wachstum von *P. falciparum* bestimmt wird, nennt man Zell-basierte Assays oder Phänotyp-basierte Assays. Wird die Substanzbibliothek alternativ auf Aktivität gegen ein bestimmtes Target untersucht, spricht man von Target-basierten Assays (Abb. 5).

Die ersten Hochdurchsatz-Ganz-Zell-Screenings wurden 2008 durchgeführt, wodurch vier Millionen Substanzen auf ihre antiplasmodiale Aktivität untersucht werden konnten. Hierbei wurden mehrere hundert Substanzen identifiziert, die eine bislang unbekannte Aktivität gegen die Blutstadien von *P. falciparum* aufweisen.

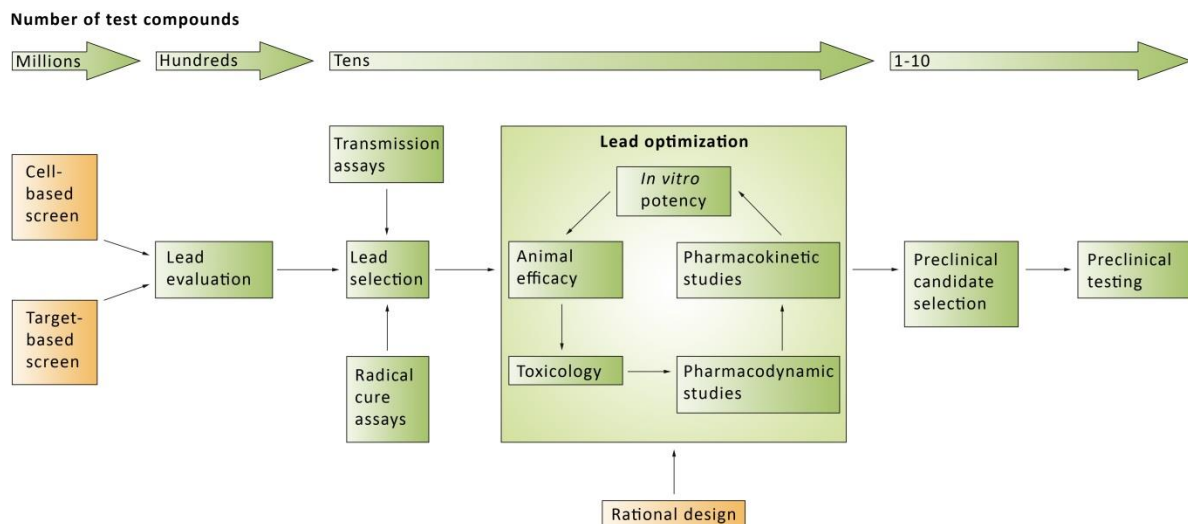


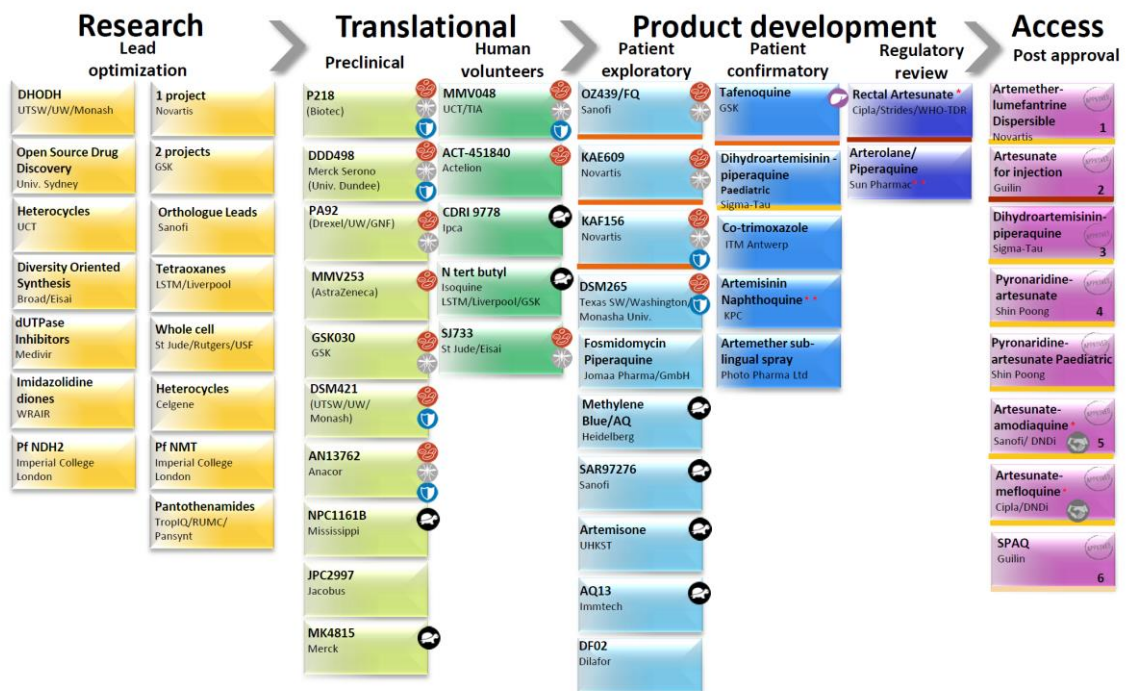
Abbildung 5: Strategie zur Entwicklung von Antimalariamitteln (modifiziert nach Flannery et al.²⁹).

Die aus den entsprechenden Screenings hervorgegangenen Hits (0.4-1.0 %) werden anschließend zur Optimierung und weiteren Eingrenzung der Leitstrukturen computerchemisch untersucht. Die weitere Auswahl basiert auf antiplasmodialer Aktivität, pharmakokinetischen Eigenschaften, synthetischer Verfügbarkeit, Toxizität, Kosten und Neuartigkeit der Strukturen. Mit dem Ziel Leitstrukturen mit transmissionsblockierenden Eigenschaften zu identifizieren folgen aufwendige Radikalkur- und Transmissions-Assays. Die parallel stattfindende Synthese zahlreicher Derivate der Leitstruktur soll zur Maximierung der Bioverfügbarkeit und der antiplasmodialen Aktivität führen. Die besten Kandidaten werden für die präklinische Phase ausgewählt und im Falle geeigneter pharmakokinetischer und pharmakodynamischer Eigenschaften unter Berücksichtigung der Toxizität gegebenenfalls für weitere klinische Untersuchungen zugelassen.

1.6. Wirkstoffe in präklinischer und klinischer Entwicklung

Die Non-Profit-Organisation Medicines for Malaria Venture (MMV) wurde 1999 in der Schweiz gegründet und wird durch Finanzierungen von Regierungsstellen, privaten Stiftungen, internationalen Organisationen, Unternehmen und Privatpersonen unterstützt. Durch die Zusammenarbeit mit mehr als 100 Partnern aus der pharmazeutischen Industrie, wissenschaftlichen Forschung und Malaria-endemischen Ländern unterstützt MMV die Entwicklung und Bereitstellung neuer Arzneimittel zur Behandlung von Malaria. Den aktuellen Forschungsstand zeigt ein durch MMV veröffentlichtes, globales Malaria-Portfolio (Abb. 6, Stand: 1. Quartal 2016).³⁰

Global Portfolio of Antimalarial Medicines



31 March 2016

Footnotes: Brand names 1: Coartem® Dispersible; 2: Artesun®; 3: Eurartesim®; 4: Pyramax® Pyronaridine Artesunate Paediatric; Coarsucam™ ASAQ/Winthrop®; 6: SPAQ-CO™

5:

MMV Medicines for Malaria Venture

Abbildung 6: globales Malaria-Portfolio (modifiziert nach MMV³⁰); Legende: Asexual blood stage activity, Relapse prevention; Transmission reduction (gametocytocidal or sporontocidal); Chemoprevention; Brought into portfolio after approval. Collaboration with DNDI; No progress report in the last two years; * Pending review or approval by WHO pre-qualification, or by regulatory bodies who are ICH members or observers; ** Approved in several countries but not approved by Stringent Regulatory Authority nor WHO pre-qualification.

Unter den zugelassenen Arzneimitteln befinden sich momentan fast ausschließlich Artemisinin-basierte Kombinationspräparate: Coartem® (Arthemether/Lumefantrine), Eurartesim® (Dihydroartemisinin/Piperaquin), Pyramax® (Pyronaridine/Artesunate), ASAQ® (Artesunate/Amodiaquin, Coarsucam®) und ASMQ® (Artesunate/Mefloquin) (Abb. 7).

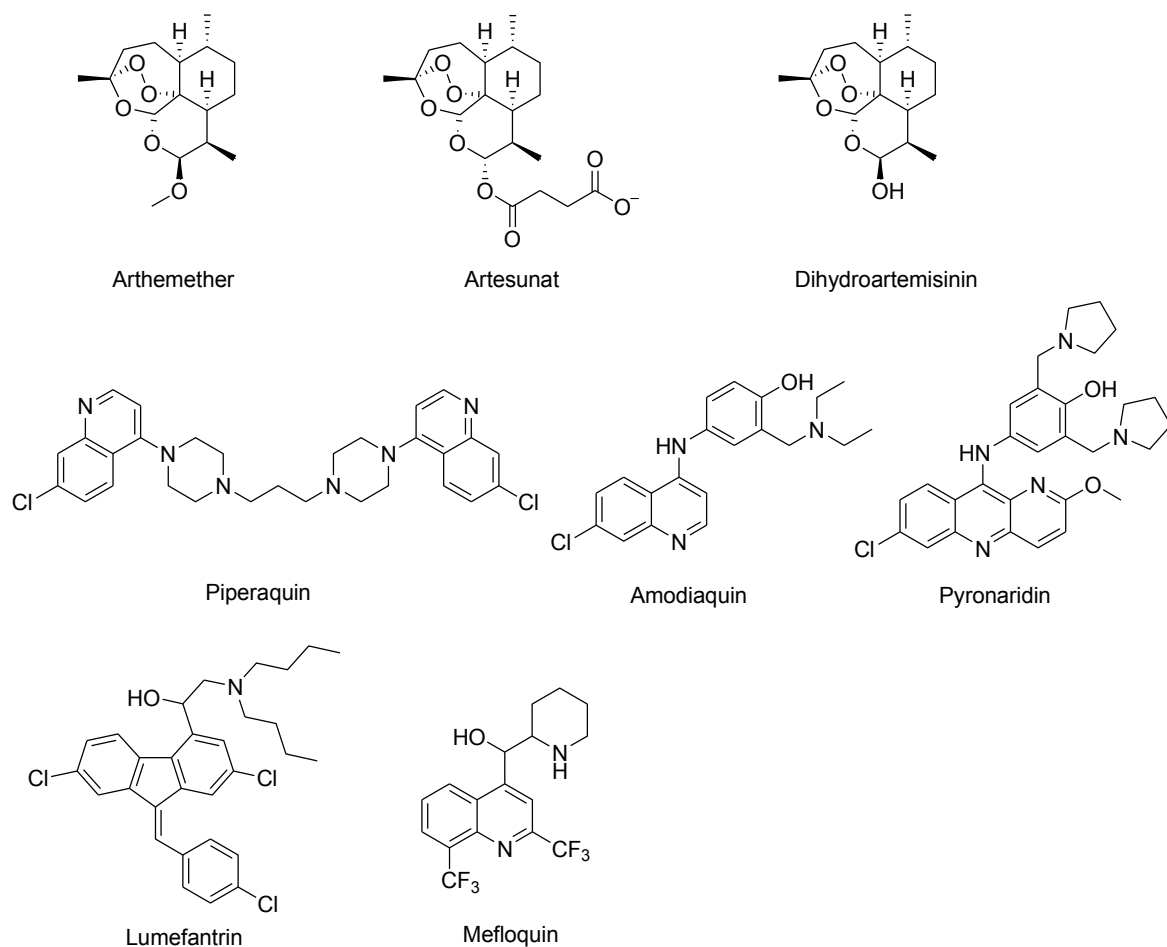


Abbildung 7: In Artemisinin-basierten Kombinationpräparaten enthaltene Malaria-Therapeutika.

Hingegen mangelt es in den fortgeschrittenen Entwicklungsphasen an Arzneistoffklassen mit neuen Wirkungsmechanismen, was im Hinblick auf die Zunahme antiplasmodialer Resistenzen bedenklich erscheint. Um dem Ziel der Eradikation der Malaria näher zu kommen, liegt der Schwerpunkt MMV-geförderter Projekte in der Entwicklung neuer Wirkstoffe und Wirkstoffkombinationen mit neuen Wirkmechanismen und multipler Aktivität gegenüber asexuellen Blutstadien, Leberstadien und sexuellen Stadien.

Demnach wären Patienten im Idealfall nach einer einzigen verabreichten Dosis parasitenefrei und gleichzeitig vor einer Neuinfektion geschützt (SERCaP; *single exposure, radical cure and prophylaxis*).^{29, 31}

Ein vielversprechender Wirkstoff ist das Spiroindolon KAE609, welches dual gegen die asexuellen Blutstadien von *Plasmodium falciparum* und *Plasmodium vivax* wirkt (Abb. 8). In einem *in vivo*-Experiment mit *Plasmodium berghei*-infizierten Mäusen konnten diese durch eine einmalig, oral verabreichte Dosis geheilt werden.³² Außerdem weist KAE609 als erste Substanz seit 20 Jahren einen neuartigen Wirkungsmechanismus auf. Es wird angenommen, dass dieser Wirkstoff die für den Parasiten lebenswichtige P-Typ-ATPase (PfAtp4) adressiert.³³

Das Imidazolpiperazin KAF156 stellt ebenfalls eine neue Wirkstoffklasse dar und weist Aktivität gegen asexuelle Blutstadien, Leberstadien und Gametozyten auf (Abb. 8). KAF156 wurde wie KAE609 durch die Optimierung einer Leitstruktur entwickelt, welche mithilfe eines Zell-basierten HTS identifiziert werden konnte.³³⁻³⁵

Das synthetische Peroxid (OZ439) weist eine antiplasmodiale Aktivität gegenüber dem multiresistenten *P. falciparum*-Stamm K1 im nanomolaren Bereich auf. OZ439 befindet sich als Wirkstoffkombination mit Ferroquin in klinischer Phase II. Sie sollen eine Alternative zu den derzeit verwendeten Artemisinin-basierten Kombinationspräparaten bieten (Abb. 8).³⁰

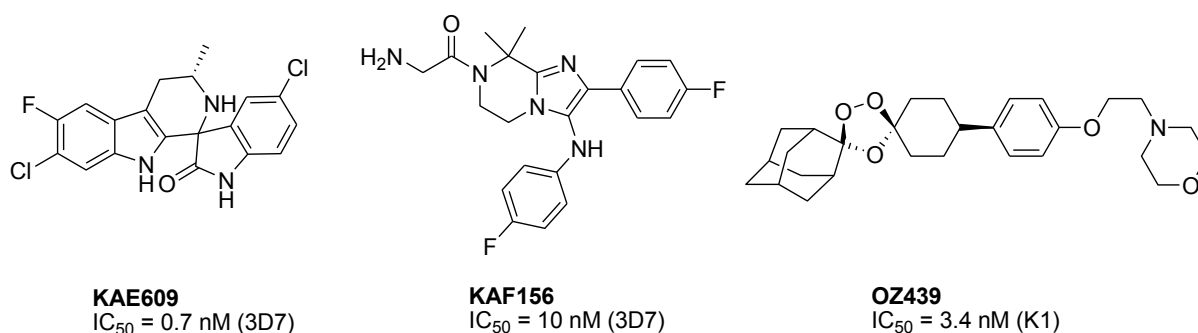


Abbildung 8: Malaria-Therapeutika in Entwicklung.

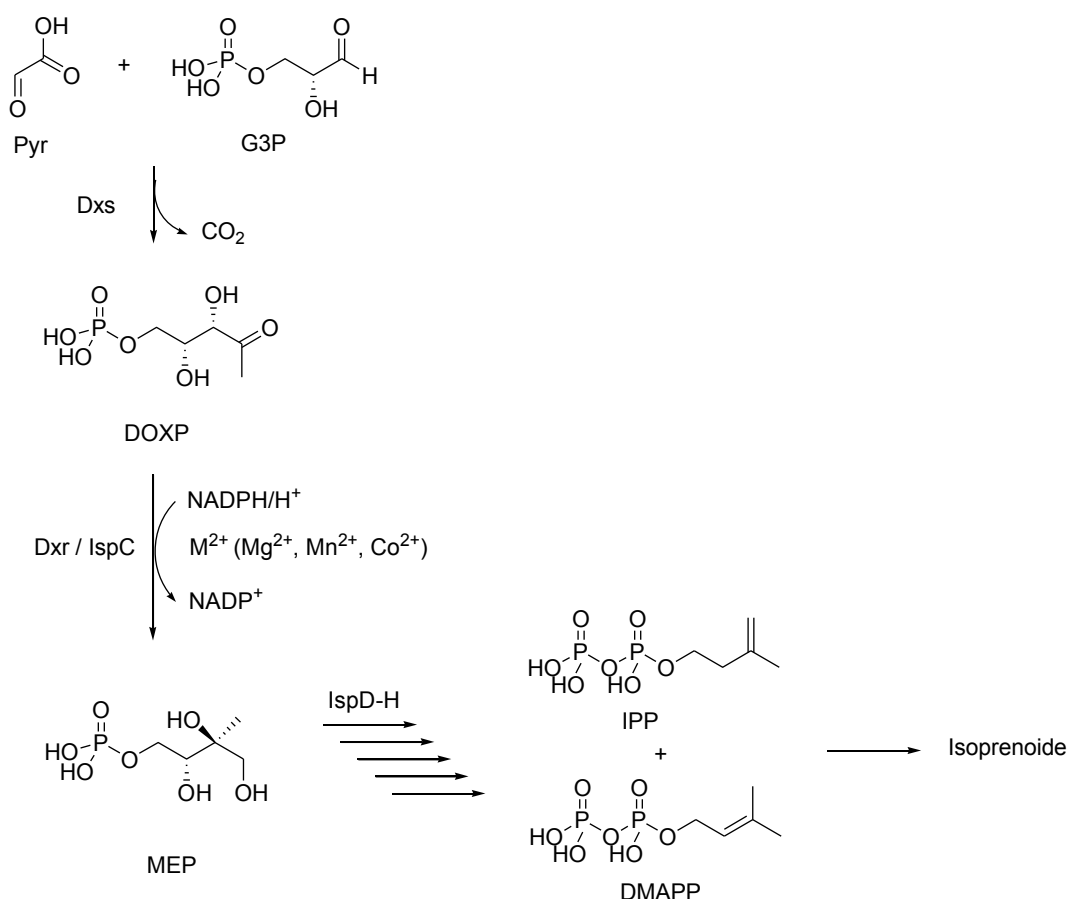
1.7. Spezifische Inhibition des Targets DOXP-Reduktoisomerase (Dxr) in der mevalonatunabhängigen Isoprenoid-Biosynthese - ein mögliches Target für die Entwicklung von Malaria-Therapeutika

Der strukturelle Grundbaustein aller Isoprenoide ist Isopren. Ausgangspunkt der Biosynthese von Isoprenoiden ist allerdings nicht Isopren selbst, sondern das aktivierte Isopentenylidiphosphat (IPP) und dessen Isomer Dimethylallyldiphosphat (DMAPP).

Bis in die 90er Jahre wurde angenommen, dass die Biosynthese von IPP und DMAPP in allen Organismen über den Mevalonat-Weg (MVA-Weg) verläuft. Erst mit der Entdeckung des mevalonatunabhängigen Biosynthesewegs (MEP-Weg) von IPP und DMAPP 1993 von Rohmer wurde diese Annahme entkräftet. Bei der Mehrheit der Eukaryoten (darunter Menschen und Säugetiere), wie auch Archaeen und Pilzen verläuft die Synthese von IPP und DMAPP über den MVA-Weg. Der MEP-Weg hingegen tritt bei vielen Bakterien, Algen und Apicomplexa (darunter *Plasmodien* spp.) auf. Die Synthese spezifischer Inhibitoren des MEP-Weges ist demnach ein potentiell erfolgversprechender Ansatzpunkt für die Wirkstoffentwicklung zur Bekämpfung von Malaria.

Ausgehend von Pyruvat (Pyr) und Glycerinaldehyd-3-phosphat (G3P) findet in dem ersten Schritt des MEP-Wegs eine durch 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase (DOXP-Synthase, Dxs) katalysierte Acyloin-Kondensation statt, wodurch unter CO₂-Freisetzung 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (DOXP) gebildet wird.

Der nächste Reaktionsschritt, welcher eine intramolekulare Umlagerung mit anschließender Reduktion von DOXP zu 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (MEP) beinhaltet, wird von DOXP-Reduktoisomerase (Dxr, IspC) katalysiert. Außerdem sind an der Reaktion NADPH und ein zweiwertiges Metallkation (Mg^{2+} , Mn^{2+} oder Co^{2+}) beteiligt. Nach fünf weiteren, durch die Enzyme IspD, IspE, IspF, IspG und IspH katalysierten Reaktionsschritten wird MEP zu DMAPP und IPP umgesetzt (Schema 1).



Schema 1: Mevalonatunabhängiger Isoprenoid-Biosyntheseweg.

Potente Inhibitoren der *P. falciparum* Dxr (*Pf*Dxr) sind FR900098 und dessen Formyl-Analogon Fosmidomycin, welche in Abschnitt 4 näher vorgestellt und diskutiert werden sollen (Abb. 9).

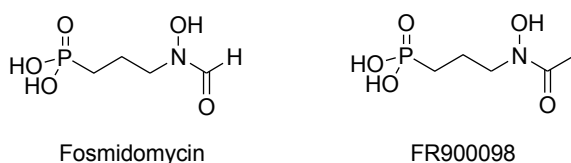


Abbildung 9: Strukturformeln von Fosmidomycin und FR900098.

2. Leitgedanke der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche Projekte bearbeitet, welche beide die Entwicklung von Wirkstoffen gegen Malariaparasiten der Gattung *Plasmodium* spp. thematisieren.

Das erste Projekt befasst sich mit der Optimierung von zwei gegenüber asexuellen Blutstadien wirksamer Leitstrukturen aus der Malaria Box von MMV. Diese Hits sind zuvor durch ein Target-basiertes Screening der 400 Substanzen aus der Malaria Box als *PfDxr*-Inhibitoren identifiziert worden.

Zur Bestätigung und Ergänzung der bereits durch MMV bereitgestellten, antiplasmodialen *in vitro*-Aktivitäten der Leitstrukturen wurden diese zunächst resynthetisiert. Anschließend folgte Synthese strukturverwandter Derivate und die Untersuchung der antiplasmodialen *in vitro*-Aktivität gegenüber dem Chloroquin-sensitiven *P. falciparum*-Stamm 3D7, dem multiresistenten Stamm Dd2[†] sowie der enzymhemmenden Aktivität gegenüber *PfDxr* durch kooperierende Arbeitsgruppen. Um eine Aussage über die Selektivität der synthetisierten Verbindungen machen zu können, wurden zudem Zytotoxizitätsbestimmungen unter Verwendung verschiedener Zelllinien durch kooperierende Arbeitsgruppen durchgeführt. Da Wirkstoffe mit Aktivität gegenüber mehreren Lebensstadien der Plasmodien von besonderem Interesse sind, wurden ausgewählte Vertreter auch hinsichtlich ihrer Aktivität gegenüber extraerythrozytären Formen von *P. berghei* (*P. berghei* EEF) untersucht. Zudem wurde jeweils ein Derivat beider Leitstrukturen mit vielversprechender *in vitro*-Aktivität für ein *in vivo*-Experiment ausgewählt.

In der Arbeitsgruppe Kurz wurden in den letzten Jahren zahlreiche inverse Carba-, Oxa- und Thia- Analoga von Fosmidomycin mit Aktivität gegenüber *P. falciparum* Dxr entwickelt. Daher umfasst das zweite Projekt abschließende Untersuchungen von Struktur-Wirkungs-Beziehungen inverser Fosmidomycin-Analoga basierend auf den Erkenntnissen dieser vorangegangenen Arbeiten. Neben der Untersuchung der antiplasmodialen *in vitro*-Aktivität und der Aktivität gegenüber *PfDxr* wurde zusätzlich die Aktivität gegenüber *EcDxr* und *MtDxr* untersucht. Von den inversen Fosmidomycin-Analoga, welche die besten Enzymhemmungen von *PfDxr* aufzeigten, sollten zudem durch Kooperationspartner mittels X-Ray-Analyse die Bindungsmodi an *PfDxr* aufgeklärt werden.

[†] Der *P. falciparum*-Stamm Dd2 ist resistent gegen Chloroquin, Chinin, Pyrimethamin und Sulfadoxin.

3. Optimierung von zwei Leitstrukturen aus der Malaria Box von MMV

3.1. Malaria Box von Medicines for Malaria Venture

Im Rahmen der Entwicklung der Malaria Box wurden seit 2008 ca. sechs Millionen Substanzen auf ihre Aktivität gegen asexuelle Blutstadien von *P. falciparum* untersucht, wodurch ca. 20 000 antiplasmodial wirksame Substanzen identifiziert werden konnten (Abb. 10).³⁶ Dieses Ergebnis wurde größtenteils durch die Forschungseinrichtungen des Genomics Institute of the Novartis Research Foundation (GNF), GlaxoSmithKline (GSK) und St. Jude Children's Research Hospital öffentlich zugänglich gemacht.³⁷⁻³⁹ Auf Basis dieser veröffentlichten Screening-Ergebnisse stellte MMV unter Berücksichtigung weiterer Faktoren eine Bibliothek aus 400 Substanzen mit Aktivität gegen asexuelle Blutstadien zusammen, die Malaria Box. Diese Substanzbibliothek kann von Forschungsgruppen kostenfrei angefordert werden. Das Konzept ermöglicht einerseits neue Projekte zur Aufklärung von Wirkungsmechanismen, andererseits bietet es einen guten Ausgangspunkt für eine Leitstrukturoptimierung.

Um die Zusammenarbeit zwischen den einzelnen Forschungsgruppen zu unterstützen und voranzutreiben, fordert MMV Forschungsergebnisse, die aus Untersuchungen mit Substanzen aus der Malaria Box hervorgegangen sind, ebenfalls öffentlich zugänglich zu machen.

Der genaue Auswahlprozess der 400 Substanzen ist in Abbildung 10 dargestellt. In Abhängigkeit von kommerzieller Verfügbarkeit, chemischer Diversität, biologischer Aktivität und Zytotoxizität wurden aus 20 000 antiplasmodial wirksamen Substanzen aus den Bibliotheken von GNF, GSK und St. Jude Children's Research Hospital insgesamt 200 'drug-like' und 200 'probe-like' Verbindungen ausgewählt (Abb. 10).

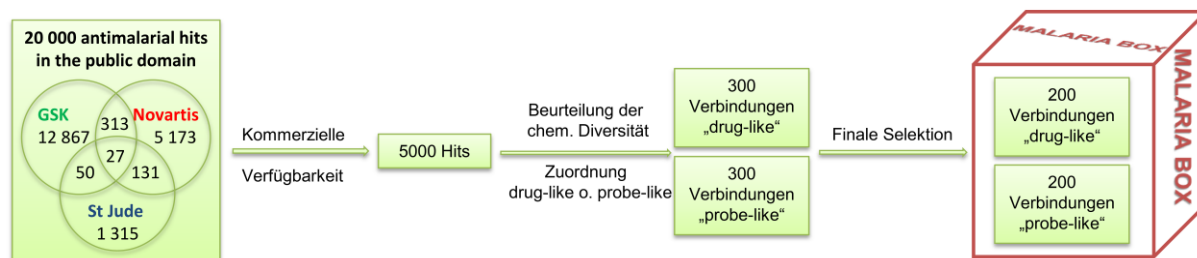


Abbildung 10: Auswahlprozess der 200 „drug-like“ und 200 „probe-like“ Substanzen der Malaria Box (modifiziert nach MMV⁴⁰ und Spangenberg et al.³⁶).

Um die Kosten für Resynthesen gering zu halten, wurde die Substanzbibliothek zunächst auf kommerziell verfügbare Substanzen eingeschränkt, wodurch sich die Anzahl von 20 000 Verbindungen auf ca. 5000 Hits reduzierte. Es folgten Abschätzungen der chemischen

Diversität, um die Auswahl weiter einzuschränken. Zur anschließenden Prüfung der „druglikeness“ wurden die Computer-unterstützten und experimentellen Filter REOS (Rapid Elimination Of Swill) und PAINS (Pan Assay Interference Compounds) eingesetzt.⁴¹⁻⁴² Hierbei wurde unter anderem die orale Verfügbarkeit (Rule of 5) der Substanzen berücksichtigt. Außerdem wurde auf Substanzeigenschaften geprüft, welche biologische Assays beeinträchtigen könnten, wie zum Beispiel toxische und reaktive Molekülgruppen. Die verbliebenen 600 Substanzen wurden auf antiplasmodiale Aktivität gegenüber dem Chloroquin-sensitiven *P. falciparum*-Stamm 3D7 und auf ihre Zytotoxizität gegenüber HEK-293-Zellen[‡] getestet. Diejenigen Substanzen mit einem EC_{50} (*Pf*3D7) $< 4 \mu M$ und einem Selektivitätsindex $SI \{CC_{50} (HEK-293) / EC_{50} (Pf3D7)\} < 10$ wurden zuletzt einer finalen Selektion unterzogen und für die Malaria Box ausgewählt.

Die Bioverfügbarkeit eines Arzneistoffs kann z. B. mithilfe der von Lipinski 1997 empirisch entwickelten Rule of Five (Ro5) abgeschätzt werden.⁴³ Demnach sollte ein Arzneistoff

- nicht mehr als fünf Donatoren von Wasserstoffbrückenbindungen
- nicht mehr als zehn Akzeptoren von Wasserstoffbrückenbindungen
- einen Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient (logP-Wert) von maximal fünf
- ein Molekulargewicht von nicht mehr als 500 g/mol

besitzen. Ein Großteil der in der Malaria Box befindlichen Substanzen erfüllt diese Regeln (Abb.11).

[‡] HEK-293 = Humane, embryonale Nierenzellen

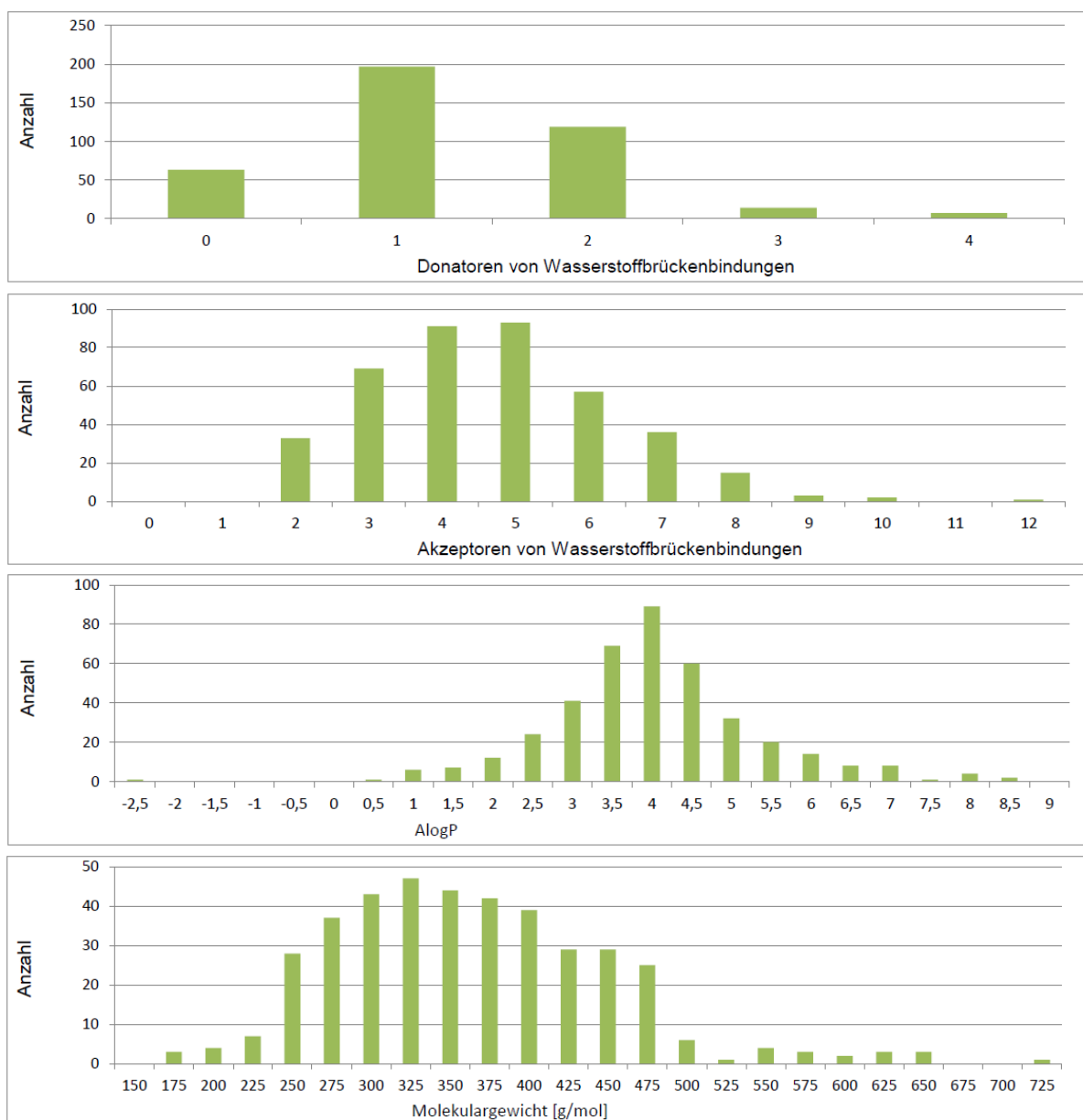


Abbildung 11: Verteilung von Wasserstoffbrückendonatoren, -akzeptoren, AlogP-Werte und Molekulargewichten der Substanzen aus der Malaria Box.

3.2. Auswahl und Eigenschaften der Leitstrukturen

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe *Fischer* ein Screening der 400 Substanzen der Malaria Box gegen *PfDxr* durchgeführt. Hierbei wurden zwei Substanzen, **1** (MMV396717) und **II** (MMV006962), als *PfDxr*-Inhibitoren mit IC_{50} -Werten unter 100 μM identifiziert und als Leitstrukturen ausgewählt (Abb. 12).[§]

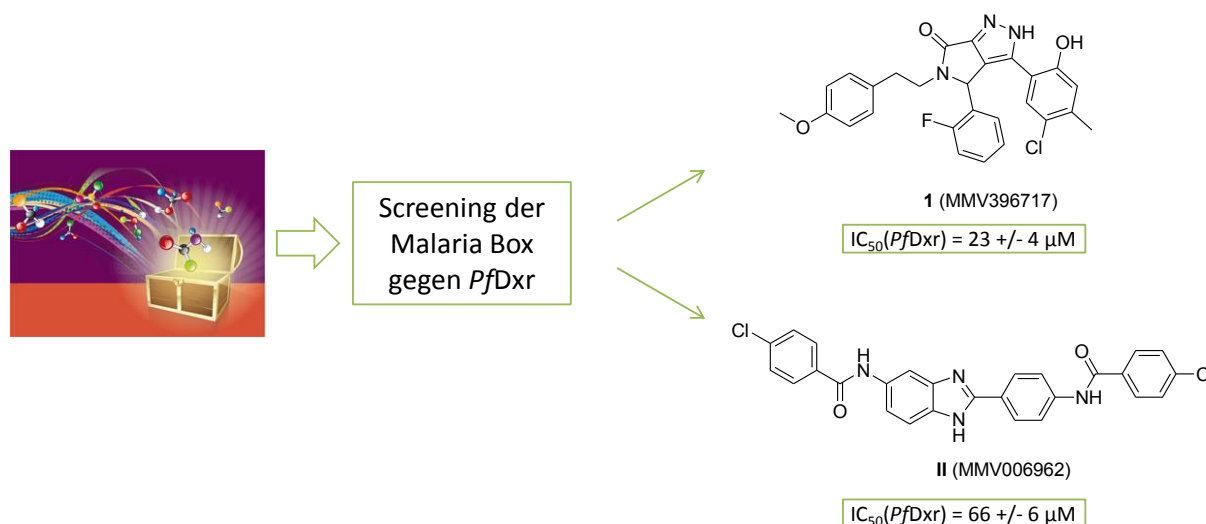


Abbildung 12: Screening der Substanzen aus der Malaria Box gegen *PfDxr* und die daraus hervorgegangenen Leitstruktur **1** (MMV396717) und **II** (MMV006962).

Die Leitstruktur **1** (MMV396717) ist zwar bei Chemikalienherstellern aus Deutschland, USA, Ukraine, Russland, Frankreich, Kanada und Hong Kong hauptsächlich im Milligramm-Maßstab kommerziell erhältlich, eine Synthese ist in der Literatur allerdings bislang nicht beschrieben worden. Die Leitstruktur **II** (MMV006962) hingegen wurde 2006 von *Mark L. Richards* et al. synthetisiert und ist somit literaturbekannt.⁴⁴

Im Anschluss an das Dxr-Screening wurden die bereits durch MMV zur Verfügung gestellten antiplasmodialen *in vitro*-Daten der ausgewählten Leitstrukturen durch Kooperationspartner der Arbeitsgruppe *Kurz* bestätigt und ergänzt, um das antiplasmodiale Wirkspektrum der Substanzen näher zu charakterisieren.

Die Hemmwirkung der Leitstrukturen **1** (MMV396717) und **II** (MMV006962) gegenüber den *P. falciparum*-Stämmen 3D7 und Dd2 wurde durch die Arbeitsgruppe *Benjamin Mordmüller* evaluiert. Die Substanzen zeigen IC_{50} -Werte im niedrigen mikromolaren bis submikromolaren Bereich. Die durch die kooperierende Arbeitsgruppe *Markus Fischer* durchgeführte Untersuchung zur Enzymhemmung von *PfDxr* hingegen ist bei der Leitstruktur **1** (MMV396717) um das Zehnfache stärker, bei der Leitstruktur **II** (MMV006962) sogar um das

[§] Die Leitstruktur **1** ist in der Malaria Box von MMV als 1*H*-Tautomer dargestellt. Im Laufe dieser Arbeit konnte mittels Röntgenstrukturanalyse gezeigt werden, dass diese Substanzklasse im kristallinen Zustand in 2*H*-Position protoniert vorliegt. Daher werden die Leitstruktur **1** (MMV396717) und die synthetisierten Derivate in dieser Arbeit in der 2*H*-Form dargestellt.

275-fache. Dieses Ergebnis zeigt, dass die *Pf*Dxr-Inhibition nur mit einem geringen Anteil zu der antiplasmodialen Wirkung beiträgt. Die Leitstruktur **II** (MMV006962) weist zudem eine Wachstumsinhibition extraerythrozytärer Formen von *Plasmodium berghei* im nanomolaren Bereich auf (Tab. 3), welche durch die kooperierende Arbeitsgruppe *Elizabeth Winzeler* evaluiert wurden.

Für die Bestimmung der Zytotoxizität wurden die Zelllinien HepG2^{**}, MRC-5^{††} und HeLa^{‡‡} herangezogen.^{§§} Mit Ausnahme der Leitstruktur **II** (MMV006962) gegenüber HepG2-Zellen (HepG2 IC₅₀ = 1.6 µM) zeigen die Verbindungen sehr geringe bis keine zytotoxische Effekte gegenüber den betrachteten Zelllinien.

Die Untersuchung der *in vitro*-Aktivität gegenüber *P. falciparum* Gametozyten der Stadien IV und V erfolgte durch die Arbeitsgruppe *Vicky Avery*. Die Leitstruktur **II** (MMV006962) weist mit einem IC₅₀-Wert von 3.0 µM eine moderate Aktivität auf, die Leitstruktur **1** (MMV396717) hingegen kann als inaktiv angesehen werden.

Tabelle 3: antiplasmodiale und zytotoxische Eigenschaften der Leitstrukturen **1** (MMV396717) und **II** (MMV006962).

	1 (MMV396717)	II (MMV006962)
<i>Pf</i> 3D7 EC ₅₀ [µM] ^a	0.92	0.99
<i>Pf</i> 3D7 IC ₅₀ [µM] ^{b,f}	2.6	0.24
<i>Pf</i> Dd2 IC ₅₀ [µM] ^{b,f}	2.0	0.091
<i>Pf</i> Dxr IC ₅₀ [µM] ^{c,g}	23 ± 4.0	66 ± 6.0
<i>Pb</i> EEF IC ₅₀ [µM] ^d	14	0.093
HepG2 IC ₅₀ [µM] ^d	16	1.6
MRC-5 IC ₅₀ [µM] ^a	> 32	> 32
HeLa IC ₅₀ [µM] ^b	30	19
<i>Pf</i> LSG IC ₅₀ [µM] ^e	100 % at 40 µM	3.0

^aVon MMV im Vorfeld dieser Arbeit zur Verfügung gestellte Daten; ^bIn der Arbeitsgruppe von *Benjamin Mordmüller* (Eberhard Karls Universität Tübingen) im Rahmen dieser Arbeit evaluierte Daten; ^cIn der Arbeitsgruppe von *Markus Fischer* (Universität Hamburg) im Vorfeld dieser Arbeit bestimmte IC₅₀-Wert der Originalsubstanz aus der Malaria Box; ^dIn der Arbeitsgruppe von *Elizabeth Winzeler* (Genomics Institute of the Novartis Research Foundation) im Rahmen dieser Arbeit evaluierte Daten; ^eIn der Arbeitsgruppe von *Vicky Avery* (Griffith University Nathan) im Rahmen dieser Arbeit evaluierte Daten; ^fMittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Doppelbestimmungen; ^gMittelwerte +/- Standardabweichung aus nichtlinearer Regression aus 3-9 Messpunkten.⁴⁵⁻⁴⁶

^{**} HepG2 = humanes Leberzellkarzinom

^{††} MRC-5 = humanes, fetales Lungenfibroblast

^{‡‡} HeLa = humanes Zervixkarzinom

^{§§} Die an dieser Arbeit beteiligten Kooperationspartner haben in ihren Arbeitsgruppen unterschiedliche Assays zur Bestimmung der *in vitro*-Zytotoxizität etabliert. Daher erfolgte die Bestimmung der Zytotoxizität gegenüber HeLa-Zellen in der Arbeitsgruppe von *Benjamin Mordmüller*, die Bestimmung der Zytotoxizität gegenüber HepG2-Zellen hingegen wurde in der Arbeitsgruppe von *Elizabeth Winzeler* durchgeführt. Zytotoxizitätsdaten gegenüber MRC-5-Zellen wurden von MMV zur Verfügung gestellt.

Die Anzahl der Akzeptoren und Donatoren für Wasserstoffbrückenbindungen der Leitstrukturen liegen nach Lipinski's Rule of Five in einem akzeptablen Bereich. Die AlogP-Werte⁴⁷ beider Substanzen weisen jedoch auf eine zu hohe Lipophilie und schlechte Wasserlöslichkeit hin.^{***} Das zu hohe Molekulargewicht von Leitstruktur II (MMV006962) könnte zusätzlich eine geringe Membranpermeation mit sich bringen (Tab. 4). Beide Leitstrukturen besitzen demnach vermutlich nur eine eingeschränkte orale Bioverfügbarkeit, daher bezeichnet MMV sie als probe-like.

Tabelle 4: molekulare Eigenschaften der Leitstrukturen I (MMV396717) und II (MMV006962).
nach Lipinski

		I (MMV396717)	II (MMV006962)
Donoratome	< 5	2	3
Akzeptoratome	< 10	6	6
AlogP ^a	≤ 5	6.29	6.17
Molekulargewicht	≤ 500	491.94	501.36

^aberechnet mit Vega-QSAR, Version 1.1.2.^{48,†††}

^{***} AlogP- (atomic contribution) und ClogP-Werte (group contribution) sind die häufigsten Methoden, um die Hydrophilie einer Substanz vorherzusagen. Die ClogP-Methode ist für kleine Moleküle (1-20 Atome) die geeignetste, die AlogP-Methode hingegen für große Moleküle (>45 Atome). Für mittelgroße Moleküle (21-45 Atome) liefern die genannten Methoden vergleichbare Ergebnisse.

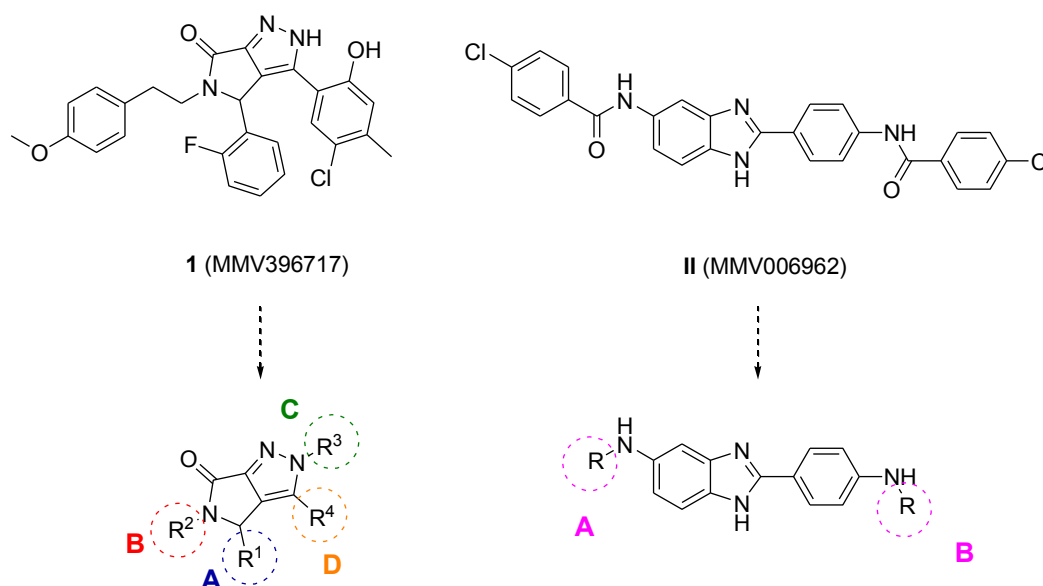
^{†††} <http://www.vega-qsar.eu/>

3.3. Aufgabenstellung

Mithilfe eines Screenings der 400 Substanzen aus der Malaria Box gegen *Pf*Dxr konnten im Vorfeld dieser Arbeit die Leitstrukturen **1** (MMV396717) und **II** (MMV006962) identifiziert werden (Schema 2).

Aufgrund ihrer guten antiplasmodialen *in vitro*-Aktivität stellen diese Leitstrukturen unabhängig vom Target einen interessanten Ausgangspunkt für die antiplasmodiale Wirkstoffforschung dar. Nach Resynthese der Leitstrukturen **1** (MMV396717) und **II** (MMV006962) sollte durch Derivatisierungen eine Aufklärung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen ermöglicht sowie antiplasmodiale und physikochemische Eigenschaften der Leitstrukturen verbessert werden.

Hierzu wurden durch Austausch von Substituenten oder ganzen Molekülregionen Derivate der gezeigten Leitstrukturen synthetisiert (Schema 2).



Schema 2: Strukturen und geplante Modifikationen der Leitstrukturen **1** (MMV396717) und **II** (MMV006962).

Mithilfe einer Untersuchung zur *Pf*Dxr-Enzymhemmung der erstellten, kleinen Substanzbibliothek sollte außerdem aufgeklärt werden, welchen Anteil die *Pf*Dxr-Inhibition der Substanzen zu der antiplasmodialen Wirkung beiträgt.

Die Leitstruktur **II** (MMV006962) weist sowohl Aktivität gegen asexuelle Blutstadien als auch gegen Leberstadien auf. Ziel war es daher, die Aktivitäten unter Erhalt der Dualität zu verbessern und die *in vitro*-Zytotoxizität zu verringern.

3.4. Synthese und Eigenschaften von Pyrrolopyrazolen als neuartige Antimalariawirkstoffe

3.4.1. Strukturelle Variationen der Leitstruktur 1 (MMV396717)

Die Leitstrukturoptimierung des Pyrrolopyrazols **1** (MMV396717) sollte erste Einblicke in die Struktur-Wirkungs-Beziehungen ermöglichen, um antiplasmodiale Aktivität dieser Substanzklasse zu verbessern. Hierzu wurden insgesamt vier Molekülregionen strukturell modifiziert (Abb. 13).

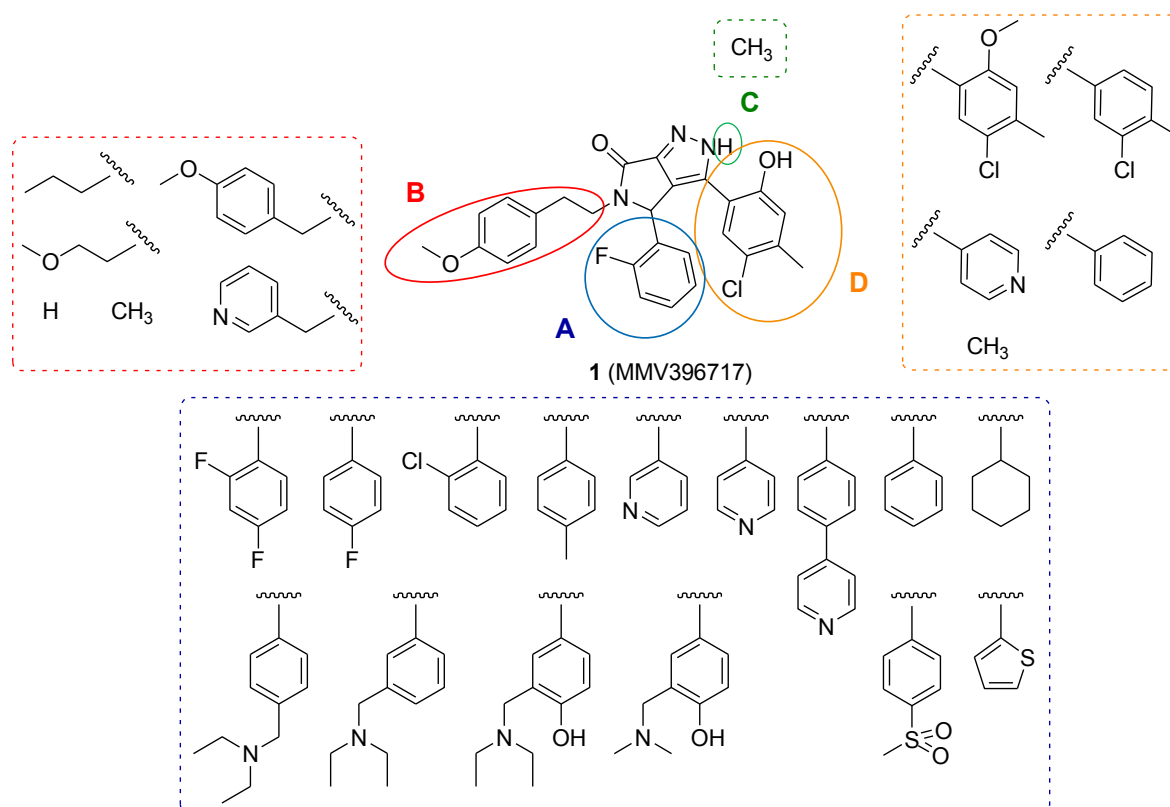


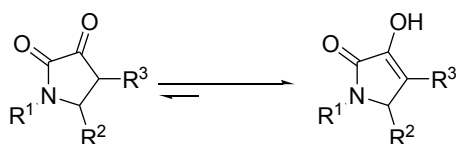
Abbildung 13: Strukturelle Modifikationen der Leitstruktur **1** (MMV396717).

In den Molekülregionen A-D wurden Atome oder ganze Molekülgruppen ausgetauscht, um Änderungen der Lipophilie, der elektronischen und der sterischen Eigenschaften herbeizuführen.

Der Einfluss der hier gezeigten Leitstrukturmodifikationen auf die antiplasmodialen Eigenschaften und die daraus resultierenden Struktur-Wirkungs-Beziehungen dieser Verbindungsklasse werden in Abschnitt 3.4.10 näher erläutert.

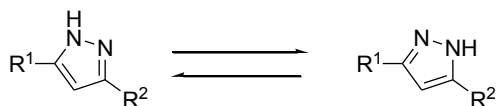
3.4.2. Literaturübersicht zur Synthese von Pyrrolopyrazol-Derivaten

Der folgende Abschnitt soll einen Überblick über die wichtigsten Wege zur Synthese von Pyrrolinonen und Pyrrolopyrazolen geben. Bei Pyrrolinonen handelt es sich um die Vorstufen der zu synthetisierenden Pyrrolopyrazole. Sie befinden sich in Lösung in einem tautomeren Keto-Enol-Gleichgewicht mit den entsprechenden Pyrrolidionen, wobei das Gleichgewicht meist deutlich auf der Seite der Enolform liegt (Schema 3).⁴⁹⁻⁵¹



Schema 3: Keto-Enol-Tautomerie von Pyrrolidionen und Pyrrolinonen.⁴⁹⁻⁵¹

Von 1*H*-Pyrazol ($R_1 = R_2 = H$) ist eine annuläre Tautomerie zwischen zwei identischen Molekülen bekannt.⁵²⁻⁵³ Bei Pyrazolen mit unterschiedlichen Substituenten ($R_1 \neq R_2$) in 3- und 5-Position liegen beide tautomere Formen im Gleichgewicht vor.⁵⁴⁻⁵⁷

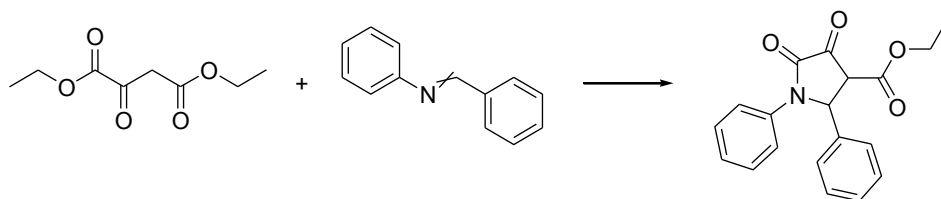


Schema 4: Prototropie-Gleichgewicht zwischen den gezeigten tautomeren Formen der Pyrazole.⁵²

Welche der beiden jeweiligen Gleichgewichtsformen im folgenden Abschnitt dargestellt wird, richtet sich ausschließlich nach der Originalliteratur.

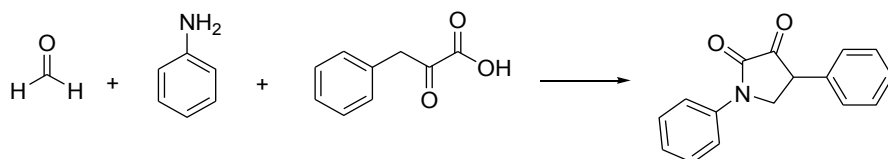
Methoden zur Darstellung von Pyrrolinonen

Schiff und *Bertini* synthetisierten erstmals 1897 4,5-Dioxo-1,2-diphenyl-pyrrolidin-3-carbonsäureethylester aus Oxalessigsäurediethylester und Benzylidenanilin ohne Zusatz eines Lösungsmittels (Schema 5).⁵⁸ Laut *Schiff* und *Bertini* verhält sich das Produkt gegen warme, konzentrierte Säuren und Basen beständig. Lediglich durch warme, konzentrierte Salpetersäure wird es zerstört.



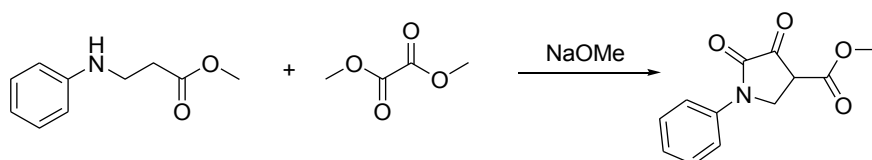
Schema 5: Darstellung von 4,5-Dioxo-1,2-diphenyl-pyrrolidin-3-carbonsäureethylester nach *Schiff* und *Bertini*.⁵⁸

1909 gelang *Borsche* die Darstellung eines in 5-Position unsubstituierten 2,3-Diketopyrrolidins durch Erhitzen von Formaldehyd, Anilin und Phenylbrenztraubensäure in ethanolischer Lösung (Schema 6).⁵⁹



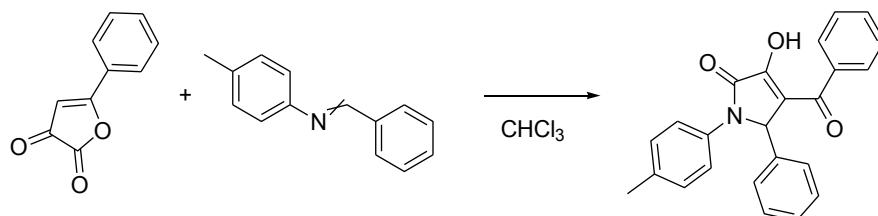
Schema 6: Darstellung von 1,4-Diphenylpyrrolidin-2,3-dion nach *Borsche*.⁵⁹

Southwick stellte 1949 eine weitere Synthesemethode für ein in 5-Position unsubstituiertes 2,3-Diketopyrrolidin vor.⁶⁰ Die von *Borsche* 1909 publizierte Synthesemöglichkeit konnte *Southwick* nicht auf die von zuvor synthetisierten Derivate übertragen (Schema 7).⁴⁹



Schema 7: Darstellung von 4,5-Dioxo-1-phenylpyrrolidin-3-carbonsäuremethylester nach *Southwick*.⁶⁰

1986 erhielt *Andreichikov* 4-Benzoyl-3-hydroxy-5-phenyl-1-*p*-tolyl-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on durch Umsetzung von 5-Phenylfuran-2,3-dion mit *N*-Benzyliden-4-methylphenylamin in Chloroform (Schema 8).

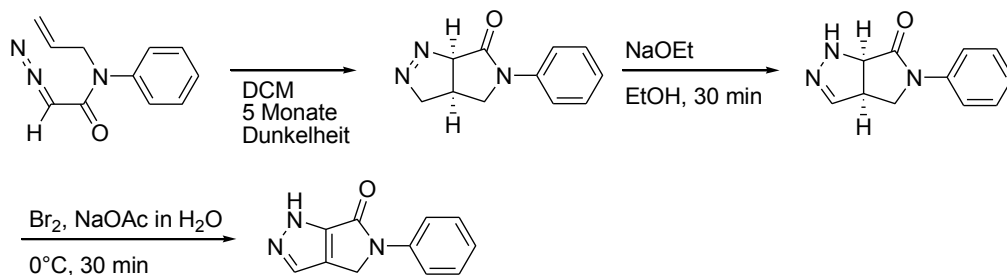


Schema 8: Darstellung von 4-Benzoyl-3-hydroxy-5-phenyl-1-*p*-tolyl-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on nach *Andreichikov*.⁶¹

Seit der Entwicklung der Methode zur Darstellung von Pyrrolinonen von *Schiff* und *Bertini* wurde diese vielfach variiert und optimiert. Beispielsweise hat sich die Verwendung von Lösungsmitteln, wie 1,4-Dioxan, Methanol, Ethanol, Dichlormethan oder Tetrahydrofuran etabliert.⁶¹⁻⁶⁸ Durch Einsatz katalytischer Mengen von Essigsäure oder Pyridinium-4-methylbenzolsulfonat (PPTS) konnte die Synthese ebenfalls optimiert werden.^{63, 65}

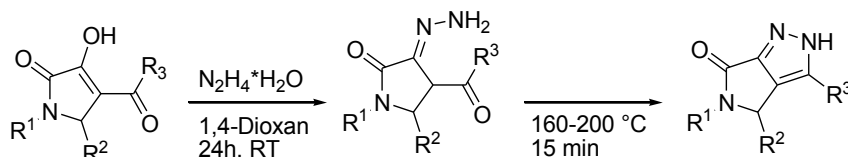
Methoden zur Darstellung von Pyrrolopyrazolen

1981 gelang *Sturm* die Synthese von 5-Phenyl-4,5-dihydropyrrolo[3,4-*c*]pyrazol-6(1*H*)on (Schema 9). Vermutlich aufgrund der langen Reaktionszeit von fünf Monaten konnte sich diese Methode nicht durchsetzen.



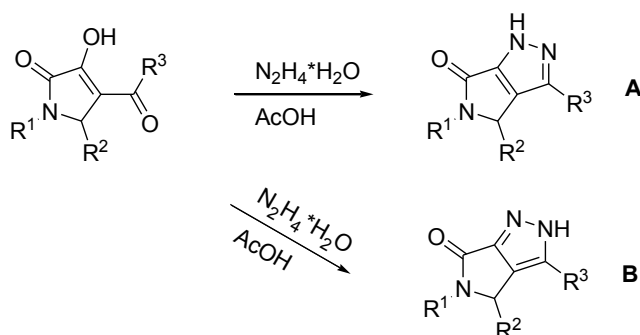
Schema 9: Darstellung von 5-Phenyl-4,5-dihydropyrrolo[3,4-*c*]pyrazol-6(1*H*)on nach *Sturm*.⁶⁹

Andreichikov synthetisierte 1986 Pyrrolopyrazole ausgehend von Pyrrolinonen. Durch Zugabe von Hydrazin-Hydrat erhielt er bei Raumtemperatur zunächst die entsprechenden Hydrazone, welche anschließend durch Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 160-200 °C zu Pyrrolopyrazolen zyklisierten (Schema 10).



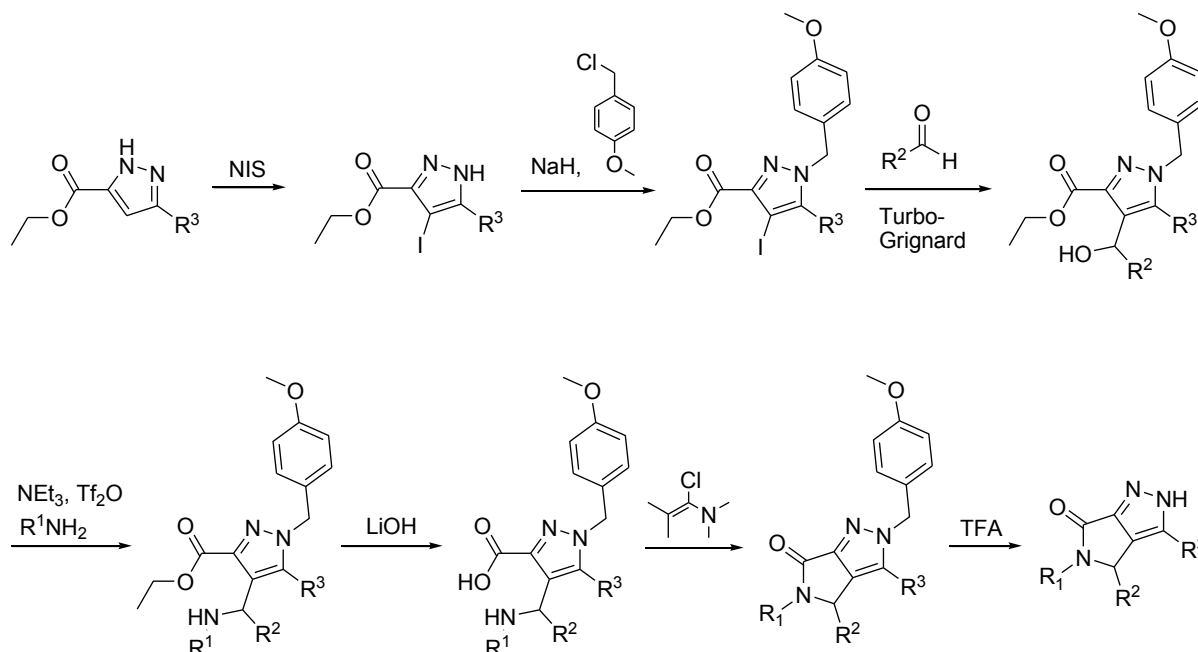
Schema 10: Darstellung von Pyrrolopyrazolen nach *Andreichikov*.⁷⁰

Die beiden dargestellten Isomere A und B der Pyrrolopyrazole (Schema 11) sind durch identische Synthesewege synthetisiert worden. *Gein* stellte 2005 erstmals die Synthese von 1*H*-Pyrrolopyrazolen (**A**) mittels Hydrazin-Hydrat in Essigsäure vor.⁷¹ Seit der Entwicklung der Methode wurde diese mehrfach in der Literatur beschrieben und kann heute als Standardmethode zur Darstellung von Pyrrolopyrazolen angesehen werden.⁷²⁻⁸² In einem Patent der *Novartis Pharma AG* von 2013 wurden nach identischer Methode die Produkte als 2*H*-Pyrrolopyrazole (**B**) dargestellt.⁸³



Schema 11: Konstitutionsisomere A⁷¹⁻⁸² und B⁸³ von Pyrrolopyrazolen.

In einem von der *Novartis Pharma AG* 2014 veröffentlichtem Patent wurde ein neuartiger Syntheseweg zur Darstellung von Pyrrolopyrazolen beschrieben. Als Substrat wurde bei dieser Methode ein 5-Alkyl-1*H*-pyrazol-3-carbonsäureethylester eingesetzt, welches nach sieben Synthesestufen das gewünschte Produkt lieferte (Schema 12).⁸²



Schema 12: Synthese von Pyrrolopyrazolen nach *Blank (Novartis Pharma AG)*.⁸²

Ausgewählte biologische Eigenschaften

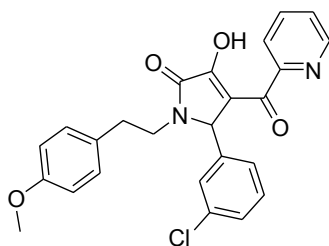
Pyrrolinone sind in der Literatur als antiviral wirkende und Protein-Protein-Interaktion-inhibierende Substanzen beschrieben. Pyrrolopyrazole sind ebenfalls als Inhibitoren von Protein-Protein-Interaktionen und als Enzyminhibitoren bekannt.

Das in Abbildung 14 oben links gezeigte 5-(3-Chlorphenyl)-3-hydroxy-1-(4-methoxyphenethyl)-4-picolinoyl-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on weist eine inhibitorische Aktivität gegenüber HIV-1 Integrase auf. Es inhibiert sowohl die 3'-Prozessierung als auch den Strangtransfer der Integration viraler DNA im zweistellig mikromolaren Bereich (Abb. 14).⁶⁷

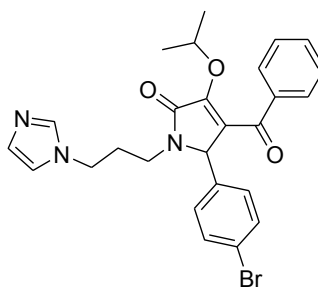
1-(3-(1*H*-Imidazol-1-yl)propyl)-4-benzoyl-5-(4-bromphenyl-3-isopropoxy-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on und 5-(3-(1*H*-Imidazol-1-yl)propyl)-4-(4-bromphenyl)-1-(4-fluorbenzyl)-3-phenyl-4,5-dihydropyrrolo[3,4-*c*]pyrazol-6(1*H*)-on wirken als Inhibitoren der Interaktionen zwischen dem Tumorsuppressionsprotein p53 und seinem Regulator MDM2 (murine double minute 2).^{77, 84}

Auf diese Weise wird p53 aktiviert, wodurch das Wachstum von Tumoren gehemmt wird. Das zuletzt genannte Pyrrolopyrazol inhibiert gleichzeitig die MDM2-p53 Interaktion und den Transkriptionsfaktor NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells).⁷⁷

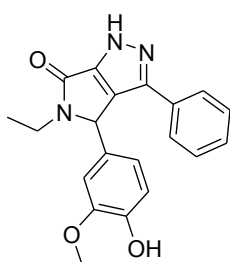
Bei dem gezeigten 5-Ethyl-4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-phenyl-4,5-dihydropyrrolo[3,4-*c*]pyrazol-6(1*H*)-on handelt es sich um einen Phosphodiesterase-Inhibitor mit einem IC₅₀-Wert im submikromolaren Bereich.⁷⁹



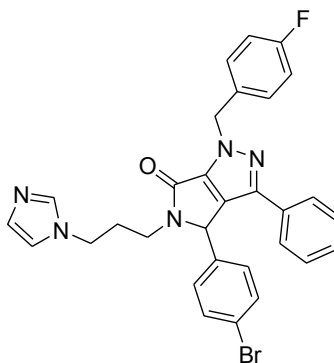
HIV-1 Integrase-Inhibitor
3'-Processing $IC_{50} = 77 \mu M$
Strand transfer $IC_{50} = 40 \mu M$



Inhibitor der MDM2-p53 Interaktion
 $MDM2-K_i = 0.26 \mu M$



Phosphodiesterase-Inhibitor
 $IC_{50} = 0.26 \mu M$



Inhibitor der MDM2-p53 Interaktion
 $MDM2-K_i = 0.083 \pm 0.003 \mu M$

Abbildung 14: Biologische Aktivitäten von Pyrrolinon- und Pyrrolopyrazol-Derivaten. ^{67, 77, 79, 84}

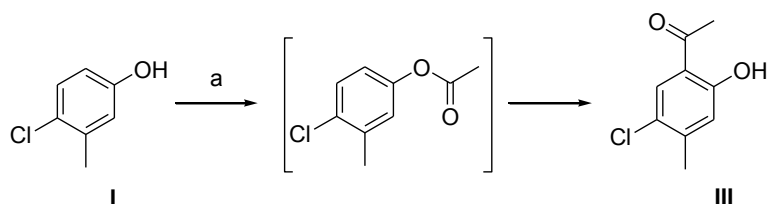
3.4.3. Resynthese der Leitstruktur 1 (MMV396717)

Der Aufbau von Pyrrolinon- und Pyrrolopyrazol-Grundkörpern ist in der Literatur häufig beschrieben worden (siehe Kapitel 3.4.2.). Für die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen wurden die effizientesten, in der Literatur am häufigsten beschriebenen Methoden ausgewählt. ^{62-66, 70-82}

Pyrrolopyrazole, welche wie die Leitstruktur 1 (MMV396717) in Molekülregion D einen *ortho*-Hydroxy-substituierten Phenylring tragen, sind jedoch bisher nicht literaturbekannt. Trotz kommerzieller Verfügbarkeit soll der Syntheseweg am Beispiel der Leitstruktur 1 (MMV396717) im folgenden Abschnitt entwickelt und diskutiert werden, um ausreichende Substanzmengen für biologische Evaluation und Untersuchung der strukturellen Eigenschaften zu erhalten.

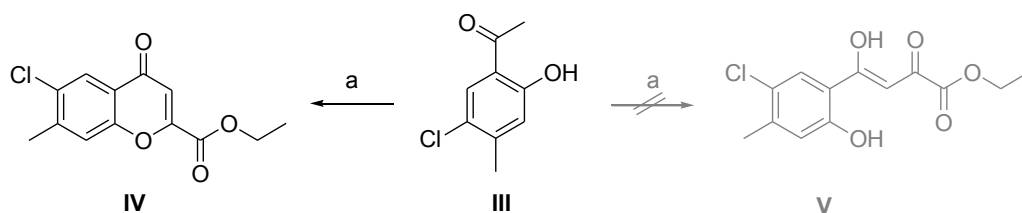
Die Literaturrecherche hat gezeigt, dass für die Resynthese der Leitstruktur 1 (MMV396717) 4-Chlor-3-methylphenol (I) ein geeignetes Edukt darstellen könnte. Das substituierte Acetophenon-Derivat III wurde aus 4-Chlor-3-methylphenol (I) und Acetylchlorid durch eine O-Acetylierung mit anschließender Fries-Umlagerung entsprechend bekannter Literaturvorschrift hergestellt (Schema 13).⁸⁵ Das entstandene Hydroxy-substituierte

Acylierungsprodukt **III** konnte anhand des Schmelzpunktes, IR- und ^1H -NMR-Spektrums identifiziert werden.⁸⁶



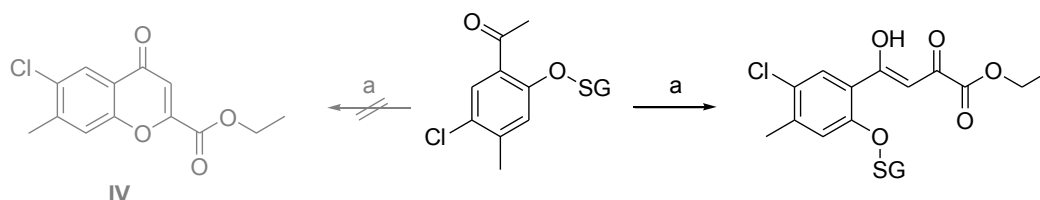
Schema 13: Darstellung von Acetophenon **III** ausgehend von 4-Chlor-3-methylphenol **I**; Reagenzien und Bedingungen: (a) Acetylchlorid, AlCl_3 , 180°C , 1 h $\rightarrow$ $\text{HCl}/\text{H}_2\text{O}$ (1:4), RT, 3 h, 79 %.

Im darauffolgenden Schritt sollte das Acetophenon-Derivat **III** mit Diethyloxalat in einer Kondensationsreaktion zum entsprechenden 2,4-Diketoester **V** umgesetzt werden. Diese Reaktion konnte jedoch, obwohl in der Literatur für *ortho*-Hydroxyphenyl-substituierte Diketoester-Derivate beschrieben, nicht übertragen werden.⁸⁷⁻⁸⁸ Stattdessen wurde ein Ringschluss zu dem Cumarin-Derivat **IV** beobachtet (Schema 14).⁸⁹



Schema 14: Syntheseversuch des Diketoesters **V**: Reagenzien und Bedingungen: (a) NaH 60 % in Mineralöl, abs. Toluol, 70°C , 10 min $\rightarrow$ Diethyloxalat, reflux, 30 min.

Um diesen unerwünschten, intramolekularen Ringschluss zu vermeiden (Schema 14), war es notwendig für die phenolische Funktionalität des Acylierungsprodukts **III** eine geeignete Schutzgruppe auszuwählen. Die Schützung der Hydroxygruppe des Acetophenons **III** sollte anschließend die Umsetzung mit Diethyloxalat zum gewünschten 2,4-Diketoester ermöglichen (Schema 15).⁶⁷



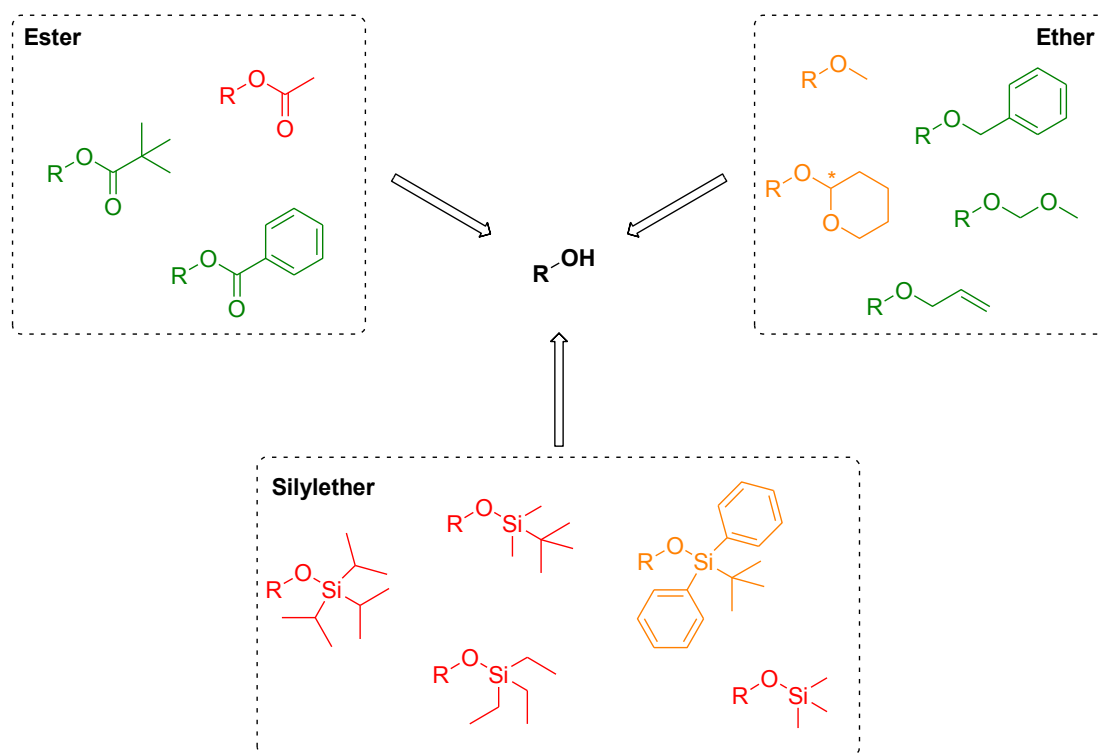
Schema 15: Reagenzien und Bedingungen: (a) NaH 60 % in Mineralöl, abs. Toluol, 70°C , 10 min $\rightarrow$ Diethyloxalat, reflux, 30 min.

Auswahl der Schutzgruppe

Für eine erfolgreiche Synthese ist die Auswahl einer geeigneten Schutzgruppe oftmals von entscheidender Bedeutung. Grundvoraussetzung ist die Stabilität der Schutzgruppe gegenüber den gegebenen Reaktionsbedingungen der Synthese. Sie sollte in sehr guten

Ausbeuten selektiv in das Molekül einführbar und ebenso wieder abzuspalten sein. Entstehende Reaktions- bzw. Nebenprodukte sollten zudem leicht, mithilfe üblicher Aufreinigungsmethoden, abtrennbar sein. Außerdem sollten entsprechende Reagenzien günstig und kommerziell erhältlich oder leicht herstellbar sein.

Die Deprotonierung des CH-aciden Kohlenstoffatoms des Acetophenons **III** vor der Umsetzung mit Diethyloxalat zum 2,4-Diketoester sollte mit Hilfe von Natriumhydrid bei einer Reaktionstemperatur von 70 °C stattfinden. Beim anschließenden Ringschluss zum Pyrrolinon sowie bei der Folgereaktion zum Pyrrolopyrazol sollte laut Literaturrecherche konzentrierte Essigsäure in katalytischen Mengen oder als Reaktionsmedium zum Einsatz kommen. Die verwendete Schutzgruppe sollte gegenüber den genannten sauren und basischen Reaktionsbedingungen, auch bei hohen Temperaturen, stabil sein. In Schema 16 ist eine Auswahl gängiger Schutzgruppen für Alkohole und Phenole dargestellt.



Schema 16: Gängige Schutzgruppen für Alkohole und Phenole in der organischen Synthese.

Die dargestellten Ester werden in der Regel von Alkalihydroxiden, -alkoholaten oder -(hydrogen)carbonaten gespalten.⁹⁰⁻⁹⁷ Essigsäureester verhalten sich zudem labil gegenüber Hydrazin.⁹⁸⁻⁹⁹ Da Hydrazin laut Literaturrecherche für Ringschlussreaktionen zum Pyrrolopyrazol-Derivaten verwendet wird, kann die Hydroxygruppe des Acetophenons **III** nicht als Essigsäureester geschützt werden. Die Schützung als Pivalinsäureester oder Benzoessäureester wäre hingegen möglich.

Die Stabilität von Silyl-Schutzgruppen gegenüber saurer und basischer Hydrolyse steigt mit der sterischen Hinderung am Silizium-Atom. Trimethylsilyl-Gruppen (TMS-Gruppen) können bereits während einer Reinigung eines Produkts mittels Säulenchromatographie an Kieselgel

abgespalten werden. Mittels Kaliumcarbonat in Methanol wird es schon nach 15 Minuten bei Raumtemperatur abgespalten.¹⁰⁰ Die Abspaltung von Triethylsilyl- (TES), *tert*-Butyldimethylsilyl- (TBS) und Triisopropylsilyl-Schutzgruppen (TIPS) kann mittels Essigsäure oder Trifluoressigsäure in Wasser, Tetrahydrofuran oder Acetonitril bei 0 bis 20 °C erfolgen.¹⁰¹⁻¹⁰⁶ Basisch werden TES- und TIPS-Ether mithilfe von Natriumhydrid in Tetrahydrofuran innerhalb von maximal drei Stunden bei Raumtemperatur abgespalten.¹⁰⁷⁻¹⁰⁸ Daher sind TMS-, TES-, TBS- und TIPS-Schutzgruppen für die geplante Synthese nicht geeignet. Am stabilsten gegenüber Säuren und Basen ist der *tert*-Butyldiphenyl-substituierte Silylether (TBDPS). Saure Abspaltung erfolgt gewöhnlich mittels Tetrabutylammoniumfluorid in Essigsäure oder Tetrahydrofuran.¹⁰⁹ Eine TBDPS-Gruppe könnte somit zur Schützung der Hydroxygruppe des Acetophenons **III** eingesetzt werden. Die sterische Hinderung der *tert*-Butyldiphenylsilyl-Schutzgruppe könnte jedoch möglicherweise die Folgereaktionen der Synthese beeinflussen.

Betrachtet man die gezeigten Ether, verhalten sich diese prinzipiell unter den genannten Reaktionsbedingungen stabil. Eine Methylierung zur Schützung der phenolischen OH-Gruppe wäre demnach zwar hinsichtlich ihrer Stabilität möglich, jedoch wäre eine selektive Entschützung wegen einer weiteren Methoxygruppe im Zielmolekül problematisch.

Ebenfalls möglich wäre eine Schützung durch eine Methoxymethylgruppe (MOM), welche sich durch eine hohe Stabilität gegenüber Basen auszeichnet. Die Entschützung findet üblicherweise mittels Trifluoressigsäure oder einem Gemisch aus Eisessig und konzentrierter Schwefelsäure oder Tetrabutylammoniumfluorid statt.¹¹⁰⁻¹¹¹ Von reinem Eisessig ohne katalytische Zusätze hingegen werden MOM-Ether bei hohen Temperaturen erst nach ca. acht Stunden gespalten.¹¹² Ein Nachteil dieser Schutzgruppe ist jedoch die Kanzerogenität des Einführungsreagenzes.¹¹³

Aufgrund der sowohl stark sauren als auch stark basischen Reaktionsbedingungen während der Synthese sollten Schutzgruppen, welche unter diesen Bedingungen stabil und im Idealfall unter anderen Bedingungen gespalten werden, z.B. mittels Metallkatalyse, Oxidation oder Hydrogenolyse, von besonderem Interesse sein.

Zur Gruppe der metallkatalysiert spaltbaren Schutzgruppen gehören z.B. allylgeschützte Phenole. Ein Nachteil bei der Wahl dieser Schutzgruppe sind die oftmals hohen Kosten für die notwendigen Entschützungsreagenzien.

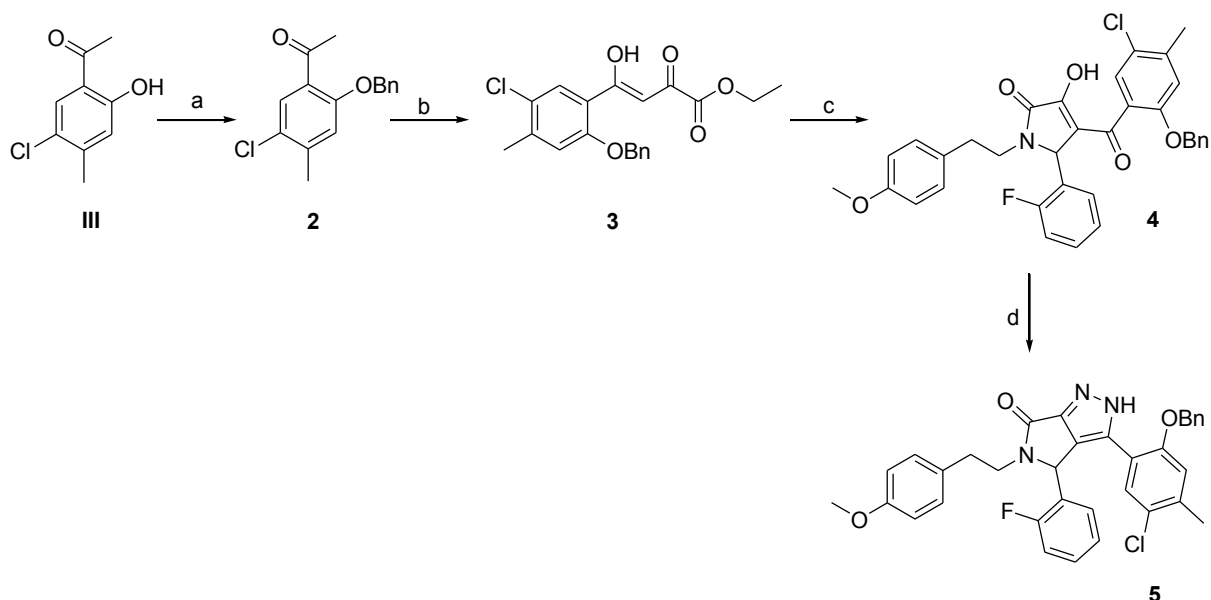
Bei Tetrahydropyran-2-yl (THP) handelt es sich um eine Schutzgruppe, welche oxidativ, z.B. mittels 2,3-Dichlor-5,6-dicyano-*p*-benzochinon (DDQ), gespalten werden kann. Jedoch verhalten sich THP-Ether instabil gegenüber Säuren (z.B. AcOH-H₂O 4:1, TsOH, PPTS), wodurch sie in der hier geplanten Synthese als Schutzgruppe nicht eingesetzt werden können. Ein Nachteil bei der Verwendung dieser Schutzgruppe liegt außerdem in der Generierung eines neuen Stereozentrums, was im Falle von chiralen Verbindung zu einem

Gemisch aus Diastereomeren führt. Dies hätte einen doppelten Signalsatz in NMR-Spektren zufolge.

Eine sehr häufig eingesetzte, hydrogenolytisch spaltbare Schutzgruppe ist die Benzylgruppe. Diese zeichnet sich durch ihre hohe Stabilität gegenüber sauren und basischen Reaktionsbedingungen aus. Zur Einführung einer Benzylgruppe wird üblicherweise ein Benzylhalogenid verwendet, welches preiswert und kommerziell erhältlich ist.¹¹⁴⁻¹¹⁶ Weitere Einführungsreagenzien sind das ebenfalls kommerziell erhältliche Benzyl-2,2,2-trichloracetimidat (BTCAI) sowie die leicht aus preiswerten Edukten zu synthetisierenden Reagenzien 2,4,6-Tris(benzyloxy)-1,3,5-triazin (TriBAT) und 2-(Benzyloxy)-1-methylpyridiniumtrifluormethansulfonat.¹¹⁷⁻¹¹⁹ Ein weiterer Vorteil dieser Schutzgruppe ist die mit quantitativer Ausbeute verlaufende, hydrogenolytische Entschützung. Als einziges Nebenprodukt entsteht zudem das flüchtige Toluol, sodass zur Reinigung des entschützten Produkts in den meisten Fällen eine Kristallisation ausreicht.

Syntheseweg 1 der Leitstruktur 1 (MMV396717) über Benzyl-geschützte Vorstufen

Aus den oben genannten Gründen und Vorteilen wurde sich zur Resynthese der Leitstruktur 1 (MMV396717) zunächst für eine Benzylschutzgruppe entschieden. Die Schützung der phenolischen OH-Gruppe der Vorstufe III wurde in Anlehnung an eine Literaturvorschrift durchgeführt verlief mit einer sehr guten Ausbeute von 94 % (Schema 17).¹¹⁴

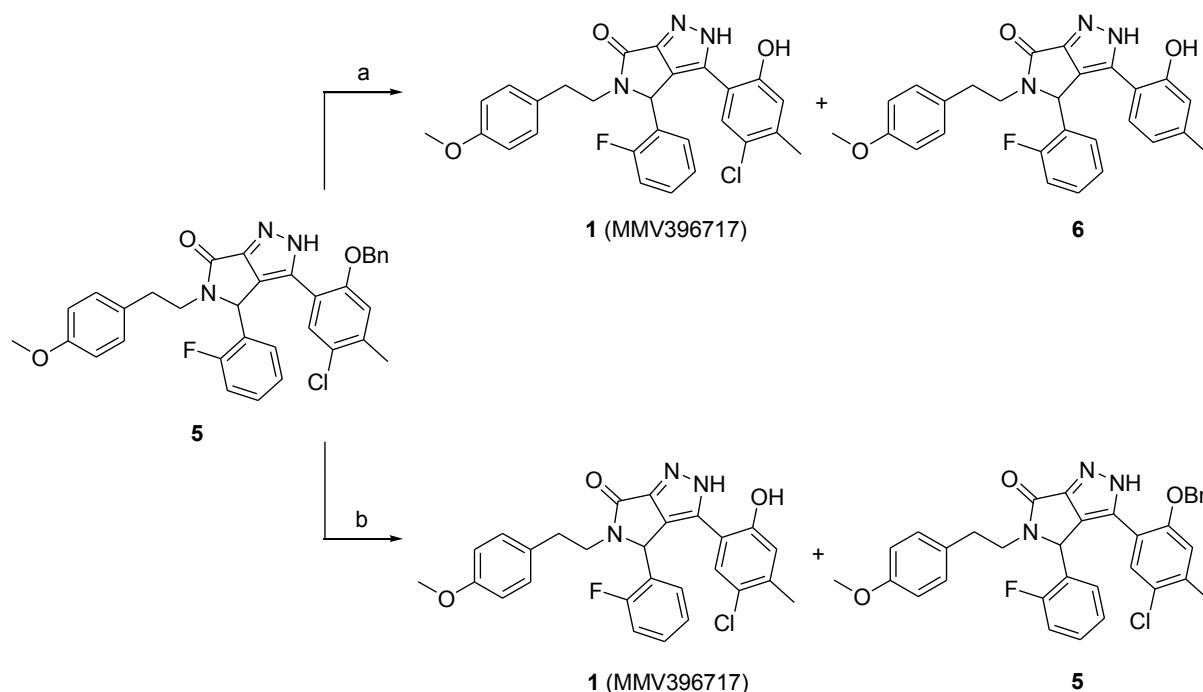


Schema 17: Synthese der Leitstruktur 1 (MMV396717) über Benzyl-geschützte Vorstufen; Reagenzien und Bedingungen: (a) Benzylbromid, K_2CO_3 , KI, Aceton, 94 %; (b) NaH 60 % in Mineralöl, abs. Toluol, 70 °C, 10 min $\rightarrow$ Diethyloxalat, reflux, 30 min, 76 %; (c) 2-Fluorbenzaldehyd, 2-(4-Methoxyphenyl)ethylamin, EtOH, kat. AcOH, RT, 12 h, 45 %; (d) $N_2H_4 \cdot H_2O$, konz. AcOH, reflux, 1 h, 68 %.

Das Benzyl-geschützte Intermediat 2 wurde anschließend nach Deprotonierung mittels Natriumhydrid mit Diethyloxalat zum gewünschten Diketoester 3 umgesetzt.⁶⁷ Diese

Reaktion verlief ebenfalls mit einer guten Ausbeute von 76 %. Die Ringschlussreaktionen zum Pyrrolinon **4** und anschließend zum Pyrrolopyrazol **5** ergaben die gewünschten Reaktionsprodukte in hoher Reinheit.^{68, 79}

Im letzten Syntheseschritt sollte die hydrogenolytische Abspaltung der Benzyl-Schutzgruppe durchgeführt werden. Hierzu wurde die geschützte Verbindung in Methanol gelöst, mit Palladium auf Aktivkohle versetzt und unter Wasserstoffatmosphäre geschüttelt, bis mittels Dünnschichtchromatographie kein Edukt mehr nachzuweisen war. Nach vollständiger Analytik des Endproduktes konnte festgestellt werden, dass es sich um ein Produktgemisch handelte. Während der hydrogenolytischen Spaltung des Benzylethers zum gewünschten Endprodukt **1** (MMV396717) war außerdem der Chlor-Substituent in *para*-Position reaktiv abgespalten worden (**6**). Dieses Produktgemisch konnte nicht mittels chromatographischer Verfahren getrennt werden (Schema 18).



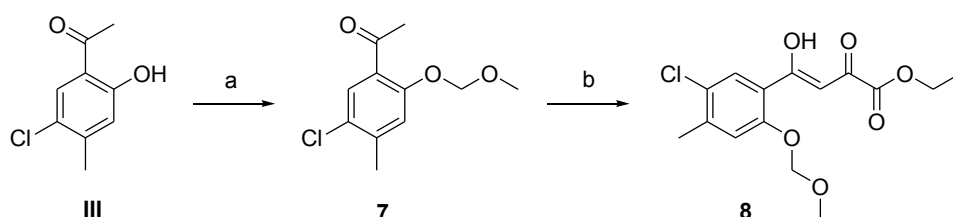
Schema 18: Synthese der Leitstruktur **1** (MMV396717) über Benzyl-geschützte Vorstufen; Reagenzien und Bedingungen: (a) H₂, Pd-C, MeOH, RT, 1 h, Produktgemisch **1** (MMV396717) und **6**; (b) HBr (47 %ig, wässrig), TBAB, DCM, reflux, 48 h, Produktgemisch **1** (MMV396717) und **5**.

Eine weitere Methode zur Spaltung von Benzylethern ist die Reaktion mit wässriger HBr (47 %ig) in Gegenwart von Tetrabutylammoniumbromid (TBAB).¹²⁰ Nach 48-stündigem Erhitzen zum Rückfluss war mittels Dünnschichtchromatographie ein Produktgemisch erkennbar, welches vermuten ließ, dass es sich um ein Gemisch aus größtenteils Edukt und einem geringen Teil des gewünschten Produkts **1** (MMV396717) handelte. Die Analytik des Rohproduktes bestätigte diese Vermutung. Durch längere Reaktionszeiten konnte keine verstärkte Umsetzung zum Produkt erzielt werden. Aufgrund sehr ähnlicher R_F-Werte konnten die Bestandteile der Reaktionsmischung nur mithilfe einer sehr zeitaufwändigen Säulenchromatographie getrennt und isoliert werden. Aufgrund der zudem sehr geringen

Ausbeute von 7 % war die Schützung der phenolischen Gruppe als Benzylether für die Resynthese der Leitstruktur **1** (MMV396717) nicht ideal, sodass die Schützung mithilfe einer alternativen Methode erfolgen sollte.

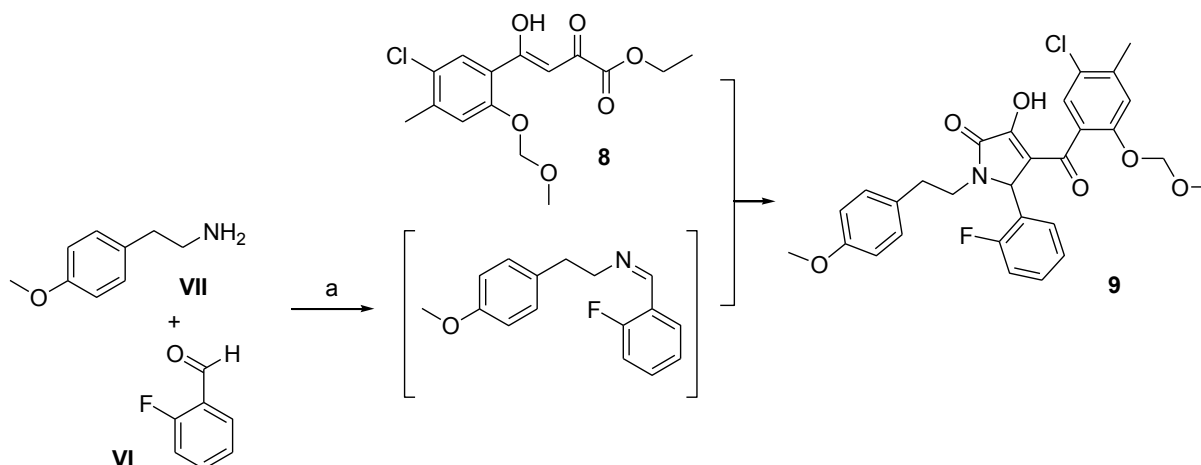
Syntheseweg 2 der Leitstruktur **1** (MMV396717) über Methoxymethyl-geschützte Vorstufen

Eine weitere Möglichkeit zur Schützung der phenolischen Funktionalität der Vorstufe **III** war die Einführung einer Methoxymethyl-Gruppe. Diese wurde nach Deprotonierung der OH-Gruppe mittels Natriumhydrid durch Zusatz von Methoxymethylchlorid eingeführt.¹¹³ Die Methoxymethyl-geschützte Zwischenstufe **7** wurde anschließend in Anlehnung an eine Literaturvorschrift durch Umsetzung mit Diethyloxalat in einer Kondensationsreaktion zum gewünschten 2,4-Diketoester **8** umgesetzt (Schema 19).⁶⁷



Schema 19: Darstellung des 2,4-Diketoester-Derivats **8**, ausgehend von 5'-Chlor-2'-hydroxy-4'-methylacetophenon **III**; Reagenzien und Bedingungen: (a) NaH 60 % in Mineralöl, abs. DMF, 0 °C → RT, 30 min; MOMCl, 0 °C → RT, 1h, 85 %; (b) NaH 60 % in Mineralöl, abs. Toluol, 70 °C, 10 min → Diethyloxalat, reflux, 30 min, 73 %.

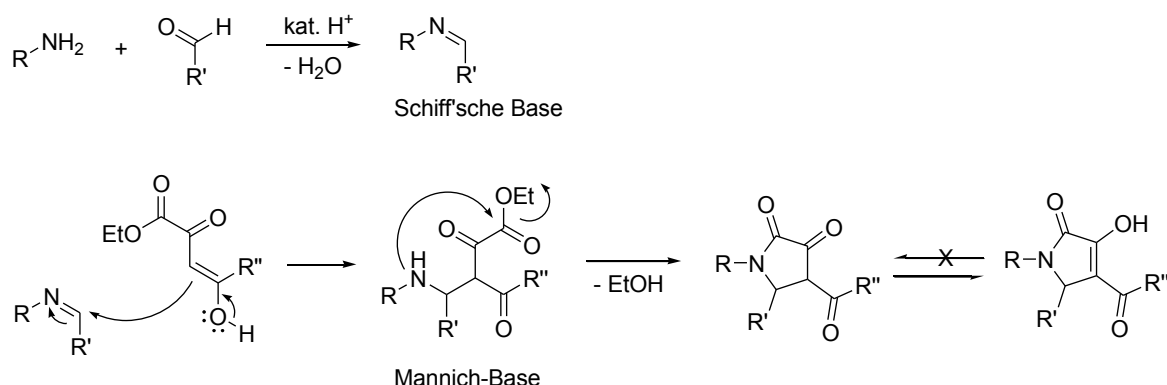
Für die Ringschlussreaktion zum Pyrrolinon wurden in äquivalenten Mengen der zuvor synthetisierten 2,4-Diketoester **8**, 2-Fluorbenzaldehyd (**VI**) und 2-(4-Methoxyphenyl)ethylamin (**VII**) eingesetzt. Unter Säurekatalyse bildete sich zunächst *in situ* die Schiff'sche Base, welche anschließend unter Zugabe des 2,4-Diketoesters **8** zum Pyrrolinon **9** cyclisierte (Schema 20).⁶⁸



Schema 20: Ringschlussreaktion zum Pyrrolinon **9**; Reagenzien und Bedingungen: (a) EtOH, kat. AcOH, RT, 12 h, 75 %.

Der allgemeine Mechanismus dieser Ringschlussreaktion ist in Schema 21 gezeigt.^{67, 71, 121} Ein Amin, ein Aldehyd und ein 2,4-Diketoester reagieren zunächst in einer Mannich-Reaktion nach zu einer β -Aminocarbonylverbindung (Mannich-Base).⁶⁷

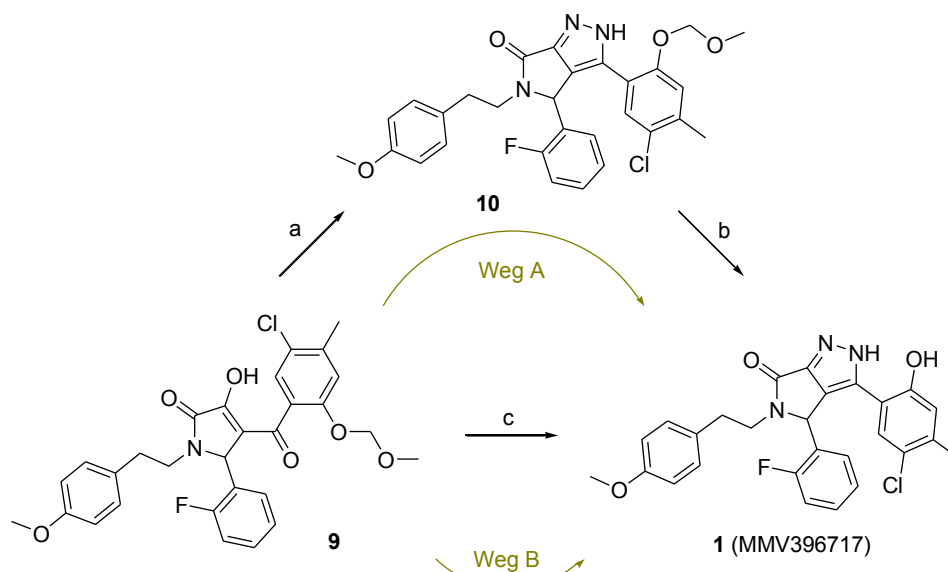
Diese reagiert anschließend in einer intramolekularen Ringschlussreaktion unter Abspaltung von Ethanol und anschließender Deprotonierung zu einem Pyrrolidin-2,3-dion, welches sich in einem tautomeren Gleichgewicht mit einem 2-Pyrrolinon befindet. Aufgrund der Ausbildung eines konjugierten Systems liegt das Gleichgewicht dieser Keto-Enol-Tautomerie vollständig auf Seite des Enols.⁶⁰



Schema 21: Vorgeschlagener Mechanismus der Ringschlussreaktion zu einem Pyrrolinon-Derivat.

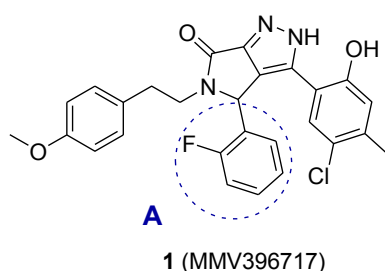
Die möglichen Synthesewege A und B, um die gewünschte Leitstruktur **1** (MMV396717) zu erhalten, sind in Schema 22 dargestellt. Die Ringschlussreaktion zum gewünschten Pyrrolopyrazol und die Entschützung der phenolischen OH-Gruppe erfolgten auf diesen zwei gezeigten, unterschiedlichen Synthesewegen. Weg A führt in zwei Syntheseschritten zum gewünschten Endprodukt **1** (MMV396717). Zunächst findet die Ringschlussreaktion zum Pyrrolopyrazol-Derivat **10** statt, welche mittels Hydrazin-Monohydrat in konz. Essigsäure durchgeführt wurde.⁷⁹ Nach Isolierung und vollständiger Charakterisierung des Zwischenprodukts erfolgte in einem weiteren Schritt die Entschützung der phenolischen OH-Gruppe mithilfe von Trifluoressigsäure, wodurch die Leitstruktur **1** (MMV396717) erhalten werden konnte.¹¹⁰ Für diese beiden Reaktionsschritte ergab sich eine Gesamtausbeute von 49 %.

Weg B fasst diese beiden besprochenen Reaktionen in nur einem Syntheseschritt zusammen, ohne dass eine Isolierung des Zwischenprodukts **10** erfolgt. Das aus Pyrrolinon-Derivat **9** und Hydrazin-Monohydrat in konz. Essigsäure *in situ* gebildete Pyrrolopyrazol-Derivat konnte durch Zugabe katalytischer Mengen konz. Schwefelsäure von der Methoxymethyl-Schutzgruppe befreit werden, sodass die Leitstruktur **1** (MMV396717) hier in einer deutlich besseren Ausbeute von 81 % erhalten wurde (Schema 22).



Schema 22: Zwei Methoden zur Synthese der Leitstruktur **1** (MMV396717) über Methoxymethylgeschützte Vorstufen; Reagenzien und Bedingungen: (a) $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, konz. AcOH, reflux, 1 h, 55 %; (b) TFA, DCM, RT, 12 h, 89 %; (c) $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, konz. AcOH, reflux, 1 h $\rightarrow$ kat. konz. H_2SO_4 , reflux, 30 min, 81 %.

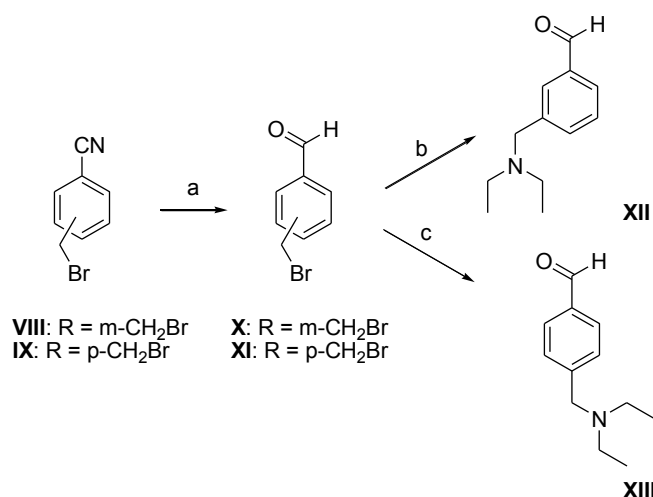
3.4.4. Synthese von Pyrrolopyrazol-Derivaten mit variiertem Molekülregion A



Synthese der Edukte

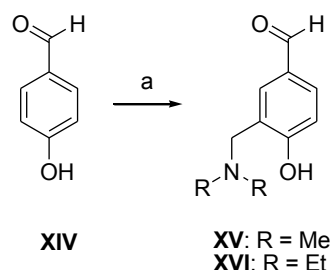
Die ausgewählten, literaturbekannten Aldehyde zur Variation der Molekülregion A waren kommerziell erhältlich oder wurden nach bekannten Vorschriften hergestellt.

Aldehyde **XII** und **XIII** wurden ausgehend von Brommethylbenzonitrilen **VIII** und **IX** nach literaturbekannten Versuchsvorschriften synthetisiert (Schema 23). Nach Reduktion der Nitrilfunktionalität von **VIII** und **IX** mittels DIBAL-H wurden die Benzaldehyde **X** und **XI** in einer $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion mit Diethylamin umgesetzt.¹²²⁻¹²⁵ Die Substitutionsprodukte **XII** und **XIII** wurden anhand ihrer literaturbekannten, analytischen Daten identifiziert.^{122-124, 126}



Schema 23: Synthese von Diethylaminomethylbenzaldehyden **XII** und **XIII**; Reagenzien und Bedingungen: (a) DIBAL-H (1M in Toluol), abs. Toluol, 0 °C, 1 h, 94 % (**X**), 94 % (**XI**); (b) K₂CO₃, HNEt₂, Dioxan, 110 °C, 5 h; (c) HNEt₂, THF, reflux, 2 h, 95 %.

Die Synthese der 4-Hydroxy-3-dialkylaminomethylbenzaldehyden **XV** und **XVI** erfolgte gemäß literaturbekannter Vorschrift ausgehend von 4-Hydroxybenzaldehyd **XIV** durch eine Mannich-Reaktion mit Formaldehyd und Dimethylamin bzw. Diethylamin (Schema 24).¹²⁷⁻¹²⁸

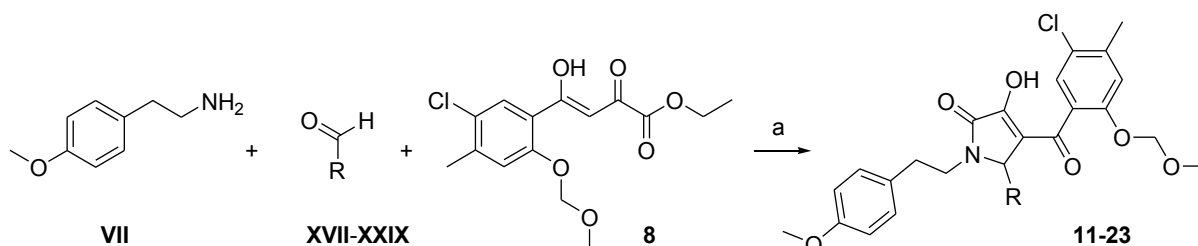


Schema 24: Synthese von 4-Hydroxy-3-dialkylaminomethylbenzaldehyden **XV** und **XVI**; Reagenzien und Bedingungen: (a) CH₂O, HNEt₂, abs. MeOH, 50 °C, 12 h, 39 % (**XV**); CH₂O, HNMe₂, abs. EtOH, 50 °C, 4 h, 41 % (**XVI**).

Synthese der Zielverbindungen

Neben den in Schema 23 und 24 gezeigten, basischen Benzaldehyden **XII-XIII** und **XV-XVI** wurden zur Synthese der Zielverbindungen unter anderem auch heteroaromatische Aldehyde (**XXI**, **XXII**, **XIX**), ein sterisch anspruchsvoller sowie ein aliphatischer Aldehyd (**XX** und **XXVII**) eingesetzt.

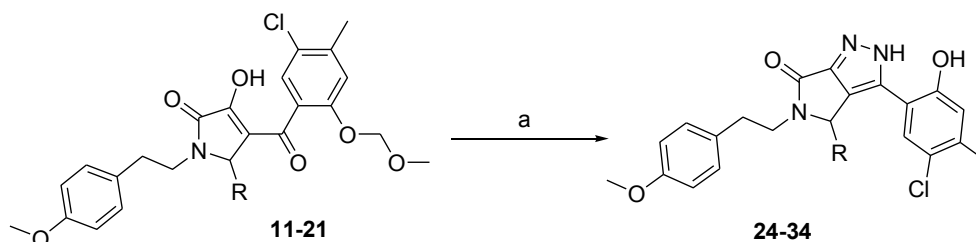
Die Pyrrolinon-Derivate **12-24** wurden aus den entsprechenden Aldehyden **XVII-XXIX**, 2-(4-Methoxyphenyl)ethylamin (**VII**) und 2,4-Diketoester **8** synthetisiert.⁶⁸ Die Ringschlussreaktionen verliefen in Ausbeuten von 26 % bis 87 % zu den gewünschten Produkten **12-24** (Schema 25).



XVII, 11: R = 4-F-Ph
XVIII, 12: R = 4-CH₃-Ph
XIX, 13: R = 4-(S(=O)₂Me)-Ph
XX, 14: R = 4-(2-Pyridyl)-Ph
XXI, 15: R = 2-Thienyl
XXII, 16: R = 4-Pyridyl
XXIII, 17: R = 4-(CH₂N(CH₂CH₃)₂)-Ph
XXIV, 18: R = 3-(CH₂N(CH₂CH₃)₂)-Ph
XXV, 19: R = 3-CH₂N(CH₃)₂-4-OH-Ph
XXVI, 20: R = 3-CH₂N(CH₂CH₃)₂-4-OH-Ph
XXVII, 21: R = Cyclohexyl
XXVIII, 22: R = 2,4-F-Ph
XXIX, 23: R = 3-Pyridyl

Schema 25: Ringschlussreaktion zu den Pyrrolinon-Derivaten **11-23**; Reagenzien und Bedingungen: (a) EtOH, kat. AcOH, RT, 12 h, 64 % (**11**), 47 % (**12**), 53 % (**13**), 68 % (**14**), 38 % (**15**), 36 % (**16**), 69 % (**17**), 26 % (**18**), 76 % (**19**), 43 % (**20**), 49 % (**21**), 58 % (**22**), 87 % (**23**).

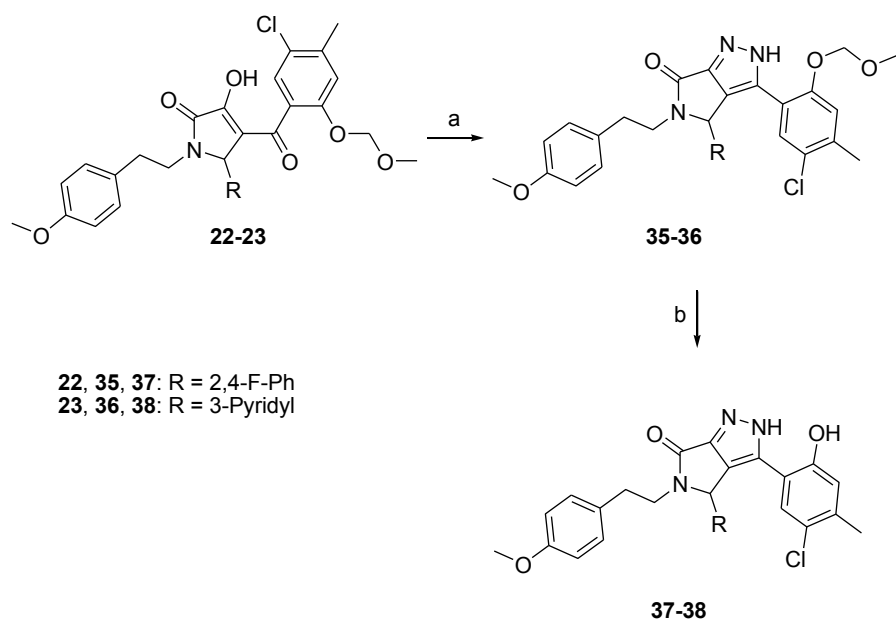
Die Pyrrolopyrazol-Derivate **24-34** wurden aus den entsprechenden Pyrrolinonen **11-21** mit Hydrazin-Monohydrat und anschließender H₂SO₄-vermittelter Entschützung der phenolischen Gruppe in Ausbeuten von 37 bis 86 % synthetisiert (Schema 26).



11, 24: R = 4-F-Ph
12, 25: R = 4-CH₃-Ph
13, 26: R = 4-(S(=O)₂Me)-Ph
14, 27: R = 4-(2-Pyridyl)-Ph
15, 28: R = 2-Thienyl
16, 29: R = 4-Pyridyl
17, 30: R = 4-(CH₂N(CH₂CH₃)₂)-Ph
18, 31: R = 3-(CH₂N(CH₂CH₃)₂)-Ph
19, 32: R = 3-(CH₂N(CH₃)₂)-4-OH-Ph
20, 33: R = 3-(CH₂N(CH₂CH₃)₂)-4-OH-Ph
21, 34: R = Cyclohexyl

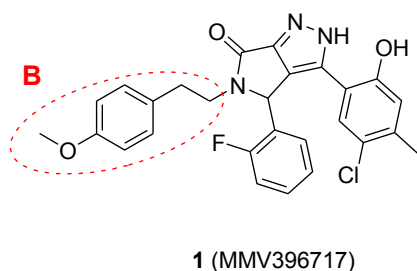
Schema 26: Synthese der Pyrrolopyrazol-Derivate **24-34** via Weg **B**; Reagenzien und Bedingungen: (a) N₂H₄·H₂O, konz. AcOH, reflux, 1 h → kat. konz. H₂SO₄, reflux, 30 min, 74 % (**24**), 54 % (**25**), 37 % (**26**), 58 % (**27**), 58 % (**28**), 66 % (**29**), 73 % (**30**), 57 % (**31**), 72 % (**32**), 86 % (**33**), 46 % (**34**).

Die Pyrrolinon-Derivate **22-23** hingegen wurden nach der Ringschlussreaktion mit Hydrazin-Monohydrat zunächst isoliert (**35-36**), um sie anschließend mithilfe von Trifluoressigsäure von der Methoxymethyl-Schutzgruppe zu befreien und die gewünschten Produkte **37-38** zu erhalten (Schema 27).^{79, 110}

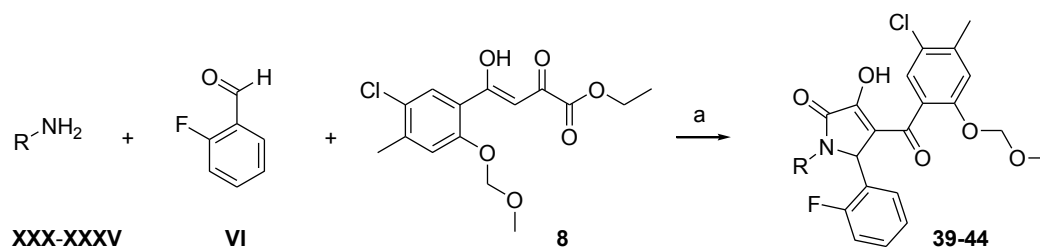


Schema 27: Synthese von Pyrrolopyrazol-Derivaten **37-38** via Weg **A**; Reagenzien und Bedingungen: (a) $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, konz. AcOH, reflux, 1 h, 55 % (**35**), 45 % (**36**); (b) TFA, DCM, RT, 12 h, 85 % (**37**), 43 % (**38**).

3.4.5. Synthese von Pyrrolopyrazol-Derivaten mit variiertem Molekülregion B



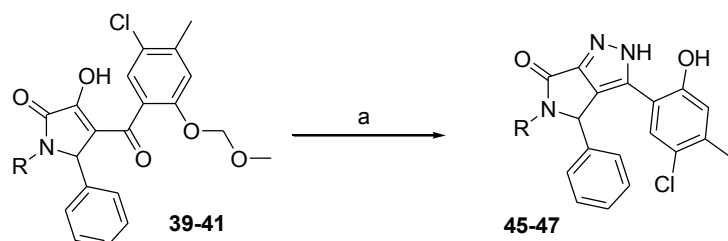
Um die Zielverbindungen **45-47** und **51-53** mit variiertem Molekülregion B zu synthetisieren, wurden zunächst 2-Fluorbenzaldehyd (**V**), 2,4-Diketoester **8** und entsprechende Amin-Derivate **XXX-XXXV** miteinander zu 2-Pyrrolinon-Derivaten **39-44** umgesetzt (Schema 28).⁶⁸



XXX, 39: R = CH₂-(3-Pyridyl)
XXXI, 40: R = CH₃
XXXII, 41: R = (CH₂)₂-OMe
XXXIII, 42: R = CH₂-(4-OCH₃)-Ph
XXXIV, 43: R = CH₂-(2,4-OCH₃)-Ph
XXXV, 44: R = *n*-Pr

Schema 28: Ringschlussreaktion zu den Pyrrolinon-Derivaten **39-44**; Reagenzien und Bedingungen: (a) EtOH, kat. AcOH, RT, 12 h, 76 % (**39**), 68 % (**40**), 82 % (**41**), 80 % (**42**), 74 % (**43**), 36 % (**44**).

Während die 2-Pyrrolinon-Derivate **39-41** nach *in situ* durchgeführter Ringschlussreaktion direkt von der Methoxymethyl-Schutzgruppe befreit wurden und die Zielverbindungen **45-47** lieferten (Schema 29), wurden **42-44** erst nach Isolierung der Produkte der Ringschlussreaktion (**48-50**) zu den freien Endprodukten **51-53** weiter umgesetzt (Schema 30).

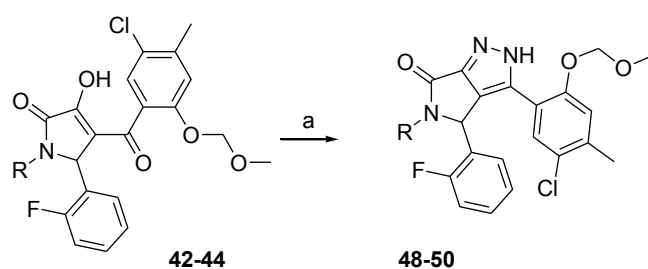


39, 45: R = CH₂-(3-Pyridyl)

40, 46: R = CH₃

41, 47: R = (CH₂)₂-OCH₃

Schema 29: Synthese der Pyrrolopyrazol-Derivate **45-47** via Weg **B**; Reagenzien und Bedingungen: (a) N₂H₄·H₂O, konz. AcOH, reflux, 1 h → kat. konz. H₂SO₄, reflux, 30 min, 36 % (**45**), 78 % (**46**), 85 % (**47**).



42, 48, 51: R = CH₂-(4-OCH₃)-Ph

43, 49: R = CH₂-(2,4-OCH₃)-Ph

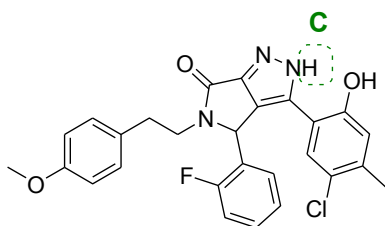
44, 50, 53: R = *n*-Pr

52: R = H

51-53

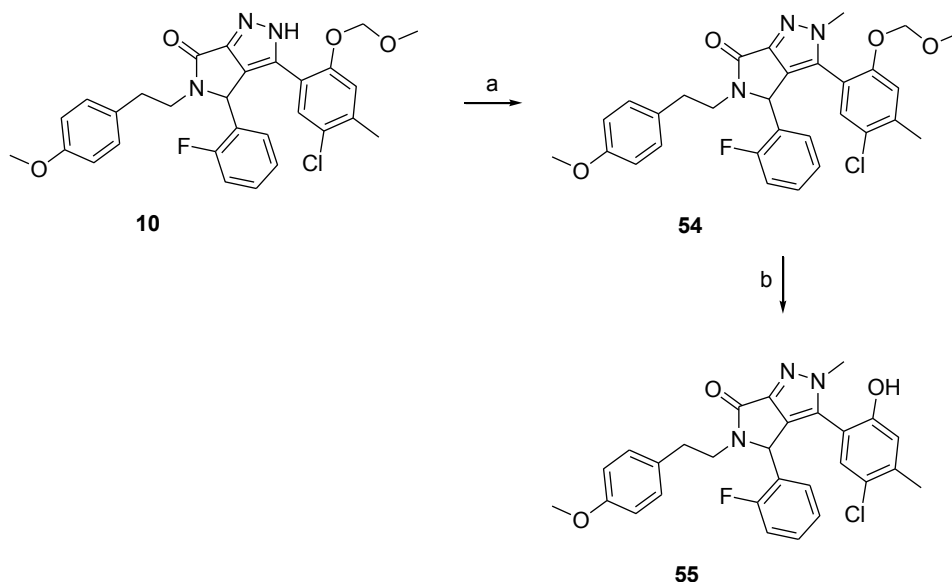
Schema 30: Synthese der Pyrrolopyrazol-Derivate **51-53** via Weg **A**; Reagenzien und Bedingungen: (a) N₂H₄·H₂O, konz. AcOH, reflux, 1 h, 29 % (**48**), 46 % (**49**), 53 % (**50**); (b) TFA, DCM, RT, 12 h, 72 % (**51**), 73 % (**52**), 40 % (**53**).

3.4.6. Synthese von Pyrrolopyrazol-Derivat **55** mit variiertem Molekülregion C



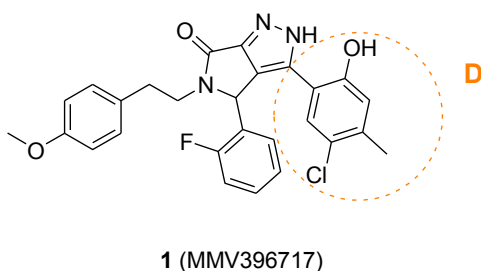
1 (MMV396717)

Die Synthese eines *N*-methylierten Pyrrolopyrazol-Derivats (**55**) gelang ausgehend von der Verbindung **10**, welche zuvor wie in Schema 22 gezeigt synthetisiert wurde. Die Methylierung des NH-unsubstituierten Pyrazolfunktionalität erfolgte in Anlehnung an eine Literaturvorschrift mit Methyljodid in 75%iger Ausbeute.⁷⁷ Die anschließende Abspaltung der Schutzgruppe mittels TFA lieferte die gewünschte Zielverbindung **55** (Schema 31).¹¹⁰



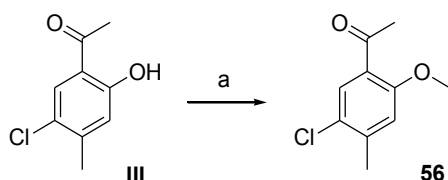
Schema 31: Synthese von Pyrrolopyrazol-Derivat **55** via Weg **A**; Reagenzien und Bedingungen: (a) K_2CO_3 , MeI, DMF, reflux, 12 h, 75 % (**54**); (b) TFA, DCM, RT, 12 h, 82 % (**55**).

3.4.7. Synthese von Pyrrolopyrazol-Derivaten mit variierter Molekülregion D



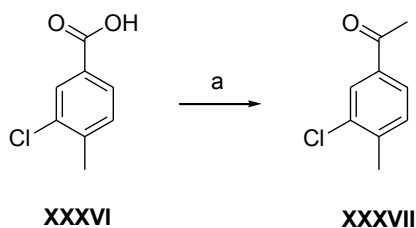
Synthese der Edukte

Die Synthese des Acetophenon-Derivats **56** erfolgte ausgehend von 5'-Chlor-2'-hydroxy-4'-methyl-acetophenon (**III**) (Schema 32).¹²⁹



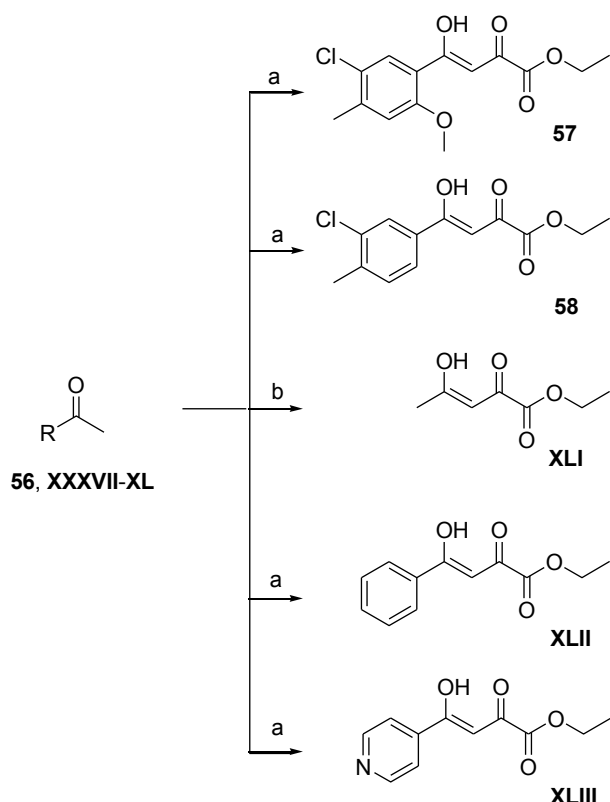
Schema 32: Synthese von 5'-Chlor-2'-methoxy-4'-methyl-acetophenon (**56**); Reagenzien und Bedingungen: (a) K_2CO_3 , MeI, Aceton, reflux, 12 h, 82 %.

5'-Chlor-4'-methyl-acetophenon (**XXXVII**) wurde durch eine Reduktion der entsprechenden Benzoesäure **XXXVI** mit MeLi erhalten (Schema 33).¹³⁰ Um eine Reduktion bis zum entsprechenden tertiären Alkohol zu vermeiden, durfte die Reaktionstemperatur 0 °C nicht übersteigen.



Schema 33: Synthese von 5'-Chlor-4'-methyl-acetophenon (**XXXVII**) ausgehend von **XXXVI**; Reagenzien und Bedingungen: MeLi (1.6 M in Et_2O), abs. THF, 0 °C, 2 h (62 %).

Die zuvor synthetisierten Acetophenone **56**, **XXXVII** und drei weitere, kommerziell erhältliche, aromatische und aliphatische Ketone (**XXXVIII-XL**) reagierten anschließend unter Zugabe einer Base mit Diethylloxalat zu den Kondensationsprodukten **57**, **58** und **XLI-XLIII** (Schema 34).^{63, 67, 131} **XLI-XLIII** wurden anhand literaturbekannter Schmelzpunkte und ^1H -NMR-Daten identifiziert.^{63, 67, 131}

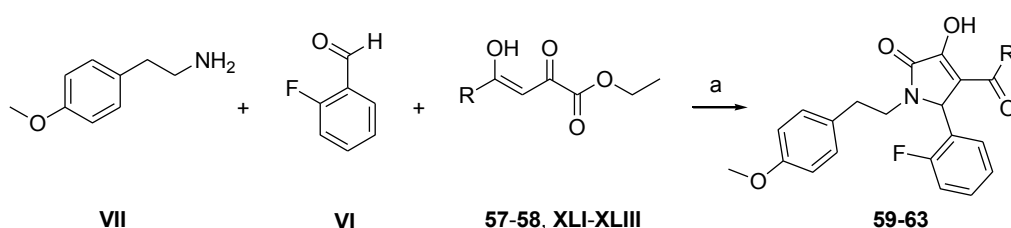


56, 57: R = 5-Cl-2-OCH₃-4-CH₃-Ph
XXXVII, 58: R = 5-Cl-4-CH₃-Ph
XXXVIII, XLI: R = CH₃
XXXIX, XLII: R = Ph
XL, XLIII: R = 4-Py

Schema 34: Synthese der 2,4-Diketoester-Derivate **57**, **58**, **XLI-XLIII**; Reagenzien und Bedingungen: (a) NaH 60 % in Mineralöl, abs. Toluol, 70 °C, 10 min → Diethyloxalat, reflux, 30 min, 54 % (**57**), 70 % (**58**), 80 % (**XLII**), 88 % (**XLIII**); (b) NaOMe, Diethyloxalat, abs. EtOH, RT, 2 h, 89 % (**XLI**).

Synthese der Zielverbindungen

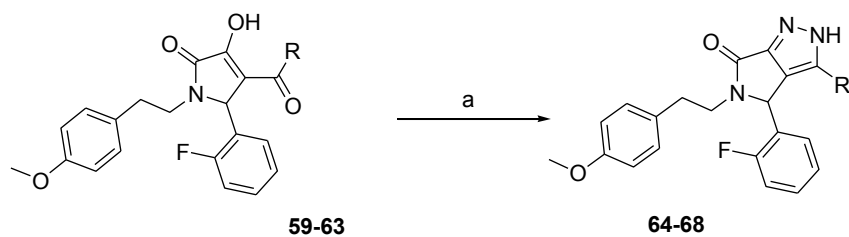
Unter Zugabe katalytischer Mengen AcOH wurden die Pyrrolinon-Derivate **59-63** in guten Ausbeuten von 62 % bis 86 % hergestellt (Schema 35).⁶⁸



57, 59: R = (5-Cl-2-OCH₃-4-CH₃)-Ph
58, 60: R = (5-Cl-4-CH₃)-Ph
XLI, 61: R = CH₃
XLII, 62: R = Ph
XLIII, 63: R = 4-Pyridyl

Schema 35: Ringschlussreaktion zu den Pyrrolinon-Derivaten **59-63**; Reagenzien und Bedingungen: (a) EtOH, kat. AcOH, RT, 12 h, 78 % (**59**), 86 % (**60**), 65 % (**61**), 62 % (**62**), 64 % (**63**).

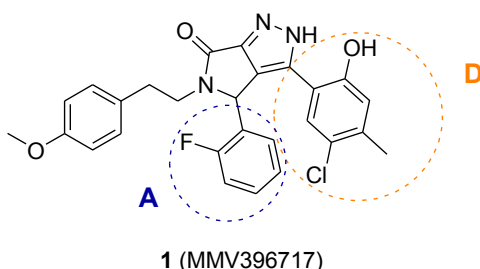
Die Zielverbindungen **64-68** wurden ausgehend von den entsprechenden Vorstufen **59-63** unter Zugabe von Hydrazin-Monohydrat in konz. Essigsäure synthetisiert (Schema 36).⁷⁹



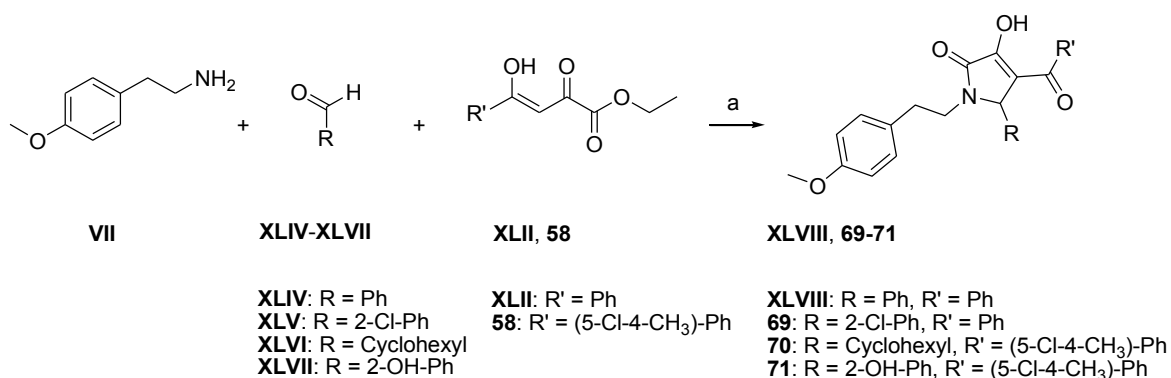
59, 64: R = (5-Cl-2-OCH₃-4-CH₃)-Ph
60, 65: R = (5-Cl-4-CH₃)-Ph
61, 66: R = CH₃
62, 67: R = Ph
63, 68: R = 4-Pyridyl

Schema 36: Synthese der Pyrrolopyrazol-Derivate **64-68** via Weg **B**; Reagenzien und Bedingungen: (a) N₂H₄·H₂O, konz. AcOH, reflux, 1 h; 55 % (**64**), 11 % (**65**), 97 % (**66**), 93 % (**67**), 35 % (**68**).

3.4.8. Synthese von Pyrrolopyrazol-Derivaten mit zwei variierten Molekülregionen

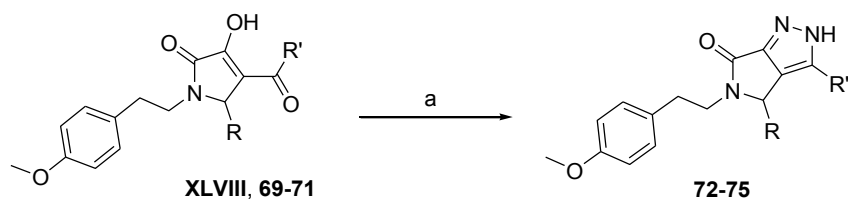


Zur Synthese der Zielverbindungen **72-75** mit zwei variierten Molekülregionen wurden zunächst die Vorstufen **XLVIII** und **69-71** aus den entsprechenden Edukten hergestellt (Schema 37).⁶⁸



Schema 37: Ringschlussreaktion zu den Pyrrolinon-Derivaten **XLVIII**, **69-71**; Reagenzien und Bedingungen: (a) EtOH, kat. AcOH, RT, 12 h, 54 % (**XLVIII**), 45 % (**69**), 35 % (**70**), 40 % (**71**).

Der Aufbau des Pyrazolrings erfolgte wiederum mittels Zugabe von Hydrazin-Monohydrat in konz. Essigsäure und lieferte die Zielverbindungen **72-75** in Ausbeuten von 30 % bis 76 %. (Schema 38).⁷⁹



XLVIII, 72: R = Ph, R' = Ph

69, 73: R = 2-Cl-Ph, R' = Ph

70, 74: R = Cyclohexyl, R' = (5-Cl-4-CH₃)-Ph

71, 75: R = 2-OH-Ph, R' = (5-Cl-4-CH₃)-Ph

Schema 38: Synthese der Pyrrolopyrazol-Derivate **72-75** via Weg **B**; Reagenzien und Bedingungen: (a) N₂H₄·H₂O, konz. AcOH, reflux, 1 h; 76 % (**72**), 76 % (**73**), 30 % (**74**), 62 % (**75**).

3.4.9. Strukturelle Eigenschaften

NMR-spektroskopische Eigenschaften der Leitstruktur 1 (MMV396717)

Die NMR-spektroskopischen Eigenschaften sollen beispielhaft an der Leitstruktur **1** (MMV396717) erläutert werden. In Abbildung 15 ist das ¹H-NMR der genannten Substanz in DMSO-d₆ gezeigt.

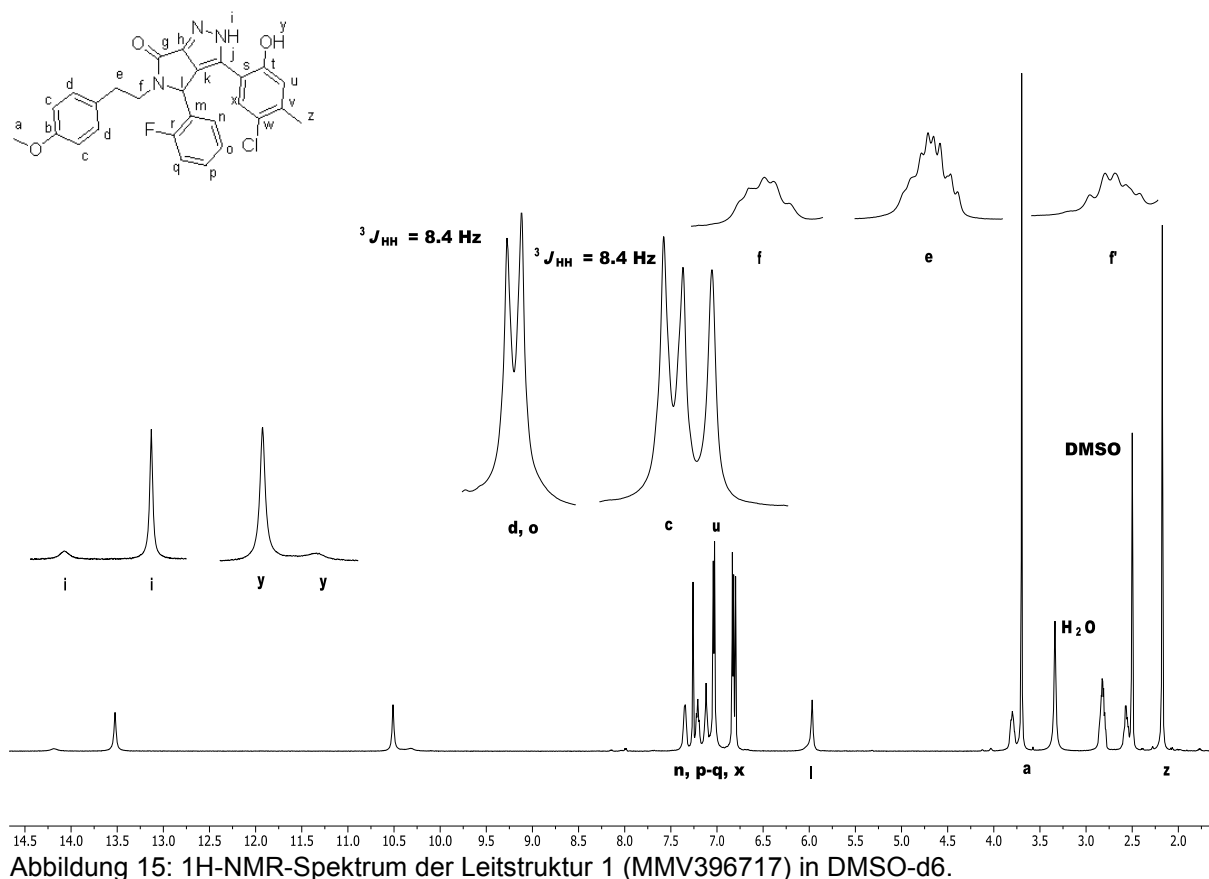


Abbildung 15: ¹H-NMR-Spektrum der Leitstruktur 1 (MMV396717) in DMSO-d₆.

Die diastereotopen Protonen der CH₂-Gruppe f und f' erzeugen durch das nahegelegene Stereozentrum zwei Multipletts, die sich in der chemischen Verschiebung deutlich unterscheiden. Die CH₂-Gruppe e hingegen erzeugt ein Multiplett. Grund hierfür ist der zu

geringe Unterschied der chemischen Verschiebungen der beiden diastereotopen Protonen, sodass keine Aufspaltung erkennbar ist. Das Methinproton des Stereozentrums I erzeugt bei einer chemischen Verschiebung von 5.97 ppm ein Singulett. Im Vergleich mit allen anderen aliphatischen Protonen ist es deutlich tieffeldverschobener. Das Proton u ist durch die mesomeren und induktiven Effekte der OH- (+M-Effekt) und CH₃-Substituenten (+I-Effekt) das am weitesten ins Hochfeld verschobene aromatische Proton. Die aromatischen Protonen c und c' in *ortho*-Position zu dem OCH₃-Substituenten (+M-Effekt) sind weiter hochfeldverschoben, als die anderen beiden Protonen d und d' des 4-Methoxyphenylrings. Aufgrund der chemischen, aber nicht magnetischen Äquivalenz dieser Protonen sind zwei Dubletts mit identischen Kopplungskonstanten zu erkennen, es handelt sich um ein AA'BB'-Spinsystem. Anhand der Intensitätsverteilungen der beiden Signale ist außerdem ein *Dacheffekt* erkennbar. Das Signal der aromatischen Protonen d und d' erscheint formal betrachtet als ein Dublett. Tatsächlich überlagert es jedoch ein aromatisches Proton des 2-Fluorphenylrings, daher handelt es sich korrekterweise um ein Multiplett. Die drei weiteren Protonen des 2-Fluorphenylrings ergeben aufgrund zahlreicher HH- und HF-Kopplungen Multipletts.

Die Signale der NH- und OH-Gruppen sind anhand ihrer chemischen Verschiebung und des ¹H-NMR-Spektrums der OH-geschützten Vorstufe zu unterscheiden. Das NH-Signal ist durch den -I-Effekt des benachbarten Stickstoffatoms im Pyrazolring deutlich tieffeldverschobener, als das Signal der phenolischen OH-Gruppe. Sowohl die NH- als auch die OH-Gruppe zeigen jeweils zwei verbreiterte Singuletts mit einem Integralverhältnis von 0.85:0.15. Diese Aufspaltung der NH- und OH-Gruppen ist nicht bei allen synthetisierten Endverbindungen zu beobachten. Ein Zusammenhang zwischen Molekülstruktur und Signalaufspaltung ist nicht zu erkennen.

Wie anhand des ¹H-NMR-Spektrums der Leitstruktur **1** (MMV396717) in Abbildung 16 erkennen kann, ist die Aufspaltung der NH- und OH-Signale in CDCl₃ nicht erkennbar.

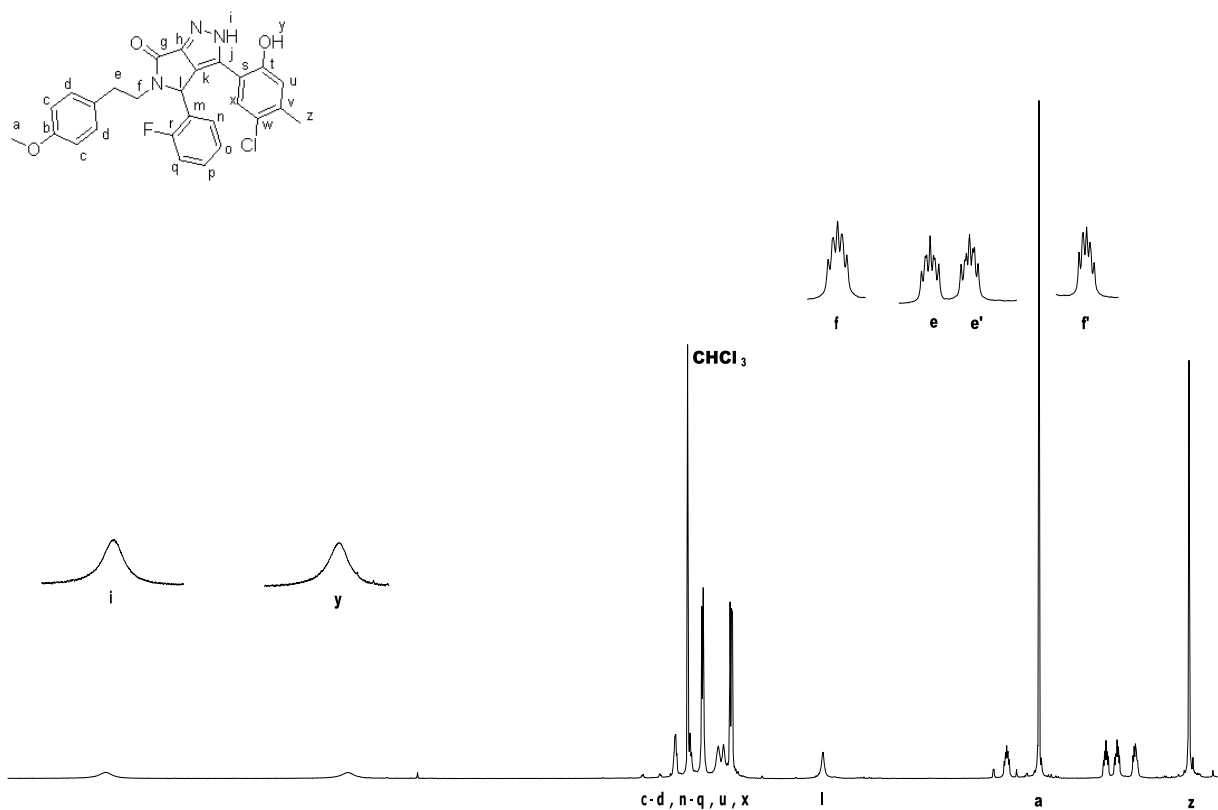


Abbildung 16: ^1H -NMR-Spektrum der Leitstruktur **1** (MMV396717) in CDCl_3 .

Diese Signalaufspaltung könnte aufgrund eines prototropen Gleichgewichts zwischen $1H$ -Pyrrolopyrazolen und $2H$ -Pyrrolopyrazolen, wie es von $1H$ - und $2H$ -Pyrazolen in der Literatur beschrieben ist, zustandekommen. Bei dieser Art der Tautomerie wechselt ein Proton, hier das Proton des Pyrazolrings, zwischen zwei benachbarten Atomen in einem Molekül seinen Platz (dyadische Tautomerie).

Abbildung 17 zeigt das ^{13}C -NMR-Spektrum der Leitstruktur **1** (MMV396717) in DMSO-d_6 .

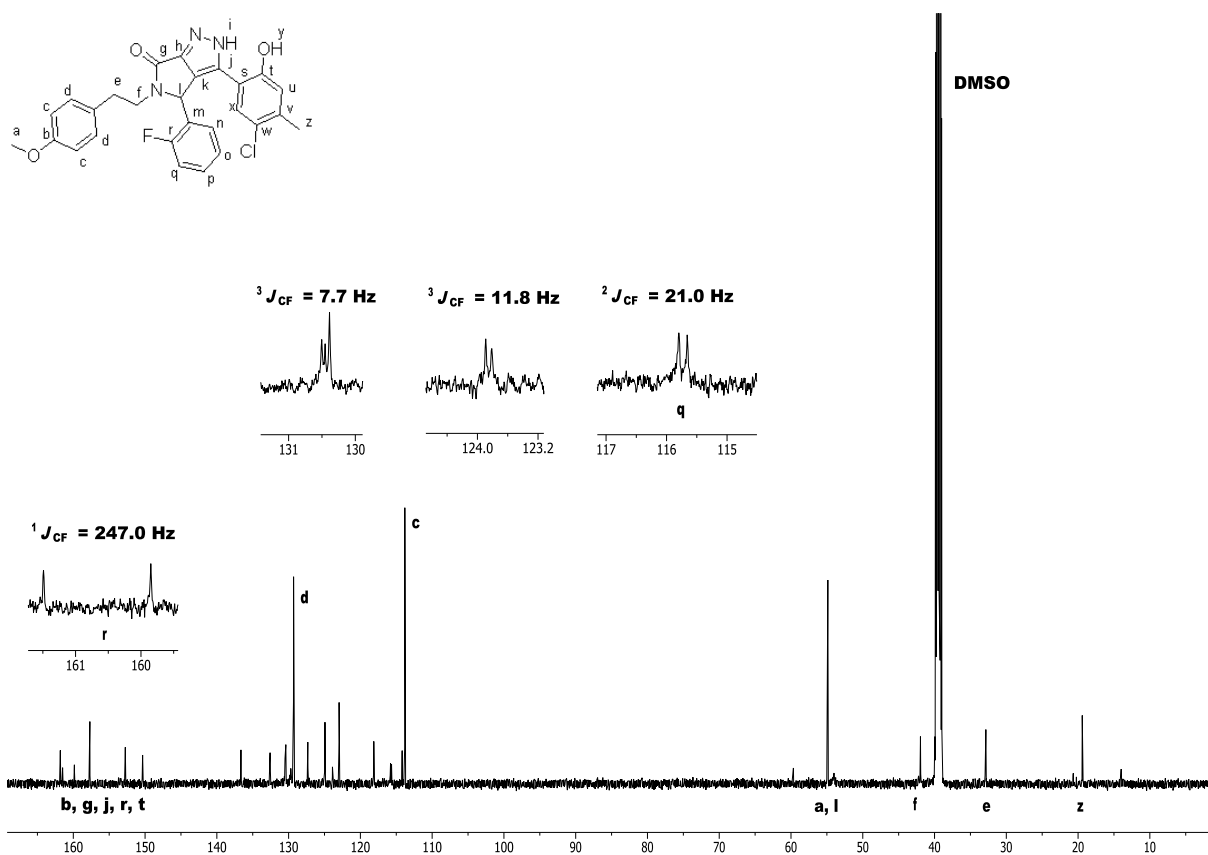


Abbildung 17: ^{13}C NMR-Spektrum der Leitstruktur **1** (MMV396717) in DMSO- d_6 .

Im Alkylbereich des ^{13}C -Spektrums konnten alle Signale eindeutig zugeordnet werden. Die aromatischen Kohlenstoffatome c, welche sich in *ortho*-Position zu dem Methoxy-Substituenten befinden, erzeugen die am weitesten ins Hochfeld verschobenen aromatischen Signale. Einige der Signale der Kohlenstoffatome des 2-Fluorphenylrings erzeugen Dubletts, welche durch heteronukleare Kopplungen mit ^{19}F -Kernen zustandekommen. Das Kohlenstoffatom r, welches sich in direkter Nachbarschaft zum Fluor befindet weist die größte Kopplungskonstante ($^1J_{\text{CF}} = 247.0 \text{ Hz}$) auf. Mit zunehmendem Abstand zwischen Kohlenstoff- und Fluoratom nimmt die Größe der J_{CF} -Kopplungskonstanten ab.

Die Entschirmung durch das elektronegative Fluoratom führt zu einer Verschiebung von 160.7 ppm. Im ähnlichen Bereich des Tieffelds resonieren der Carbonylkohlenstoff g sowie die quartären Kohlenstoffe b und t.

Kristallstrukturanalyse

Wie in Kapitel 3.4.2. gezeigt wurde, sind in der Literatur sowohl 1*H*- als auch 2*H*-Pyrrolopyrazole durch identische Synthesewege beschrieben worden. Die NMR-spektroskopische Analyse der Leitstruktur **1** (MMV396717) in diesem Kapitel lässt zudem vermuten, dass die Verbindung in DMSO-*d*₆ in einem tautomeren Gleichgewicht vorliegt. Um die tatsächliche Struktur der in dieser Arbeit synthetisierten Pyrrolopyrazol-Derivate im kristallinen Zustand aufzuklären, wurden mit den Endverbindungen **1** (MMV396717) und **33** Röntgenstrukturanalysen durchgeführt.

Die dafür benötigten Einkristalle der für die Untersuchung ausgewählten Endverbindungen **1** (MMV396717) und **33** wurden durch Kristallisation aus einem DMF/H₂O-Gemisch mithilfe des „vapor diffusion“-Verfahren erhalten¹³² und im Arbeitskreis von *Prof. Dr. Walter Frank* (Lehrstuhl für Material- und Strukturforschung, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) röntgendiffraktometrisch analysiert.

Das Ergebnis der Analyse zeigt, dass im kristallinen Zustand der Grundkörper als 2*H*-Pyrrolopyrazol vorliegt. Dies trifft sowohl bei der Leitstruktur **1** (MMV396717), als auch bei Derivat **33** zu (Abbildung 18).

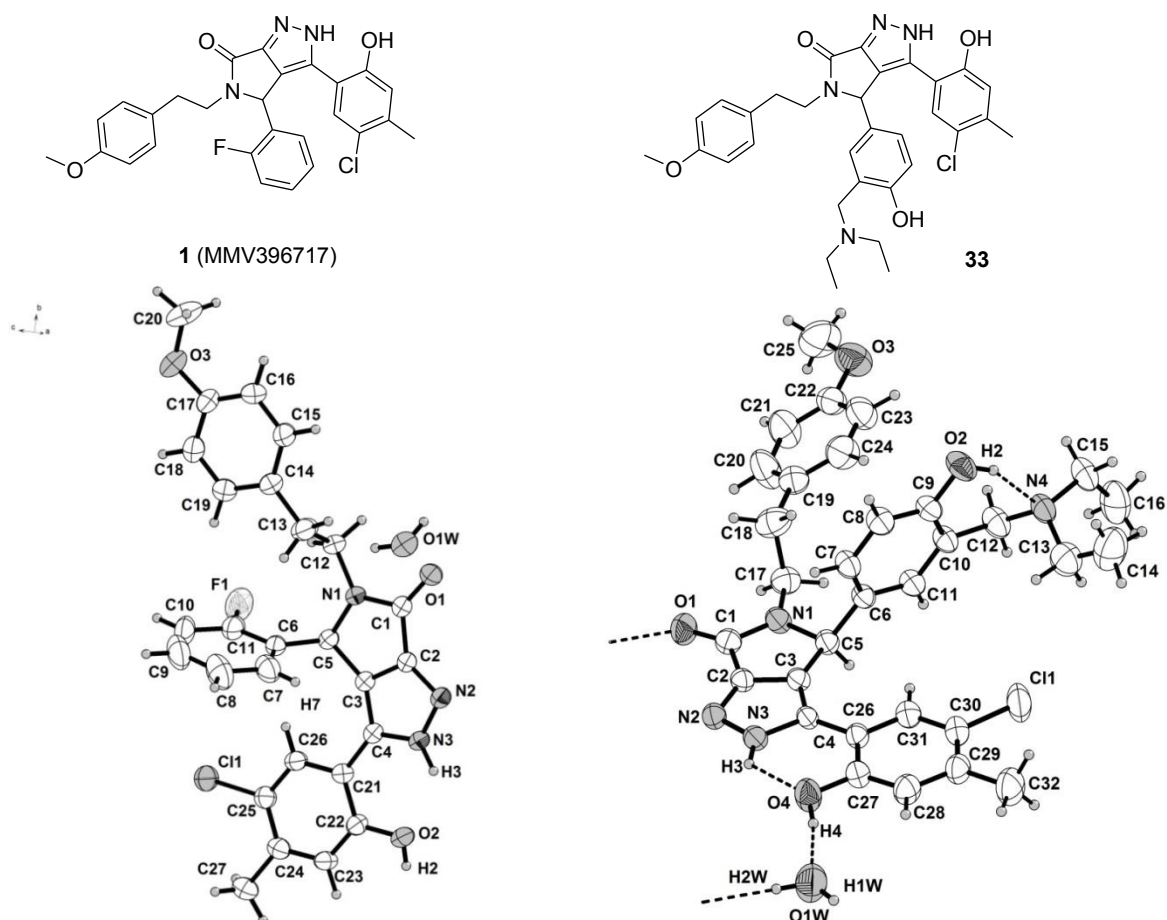


Abbildung 18: Röntgendiffraktometrische Strukturanalyse, asymmetrische Einheit; *links*: Leitstruktur **1** (MMV396717), *rechts*: Verbindung **33**.

Aufgrund des wässrigen Kristallisationsmediums enthalten die Derivate pro Formeleinheit ein H_2O -Molekül. Die durch Wasserstoffbrücken verknüpften Dimere sind in Abbildung 19 zu sehen.

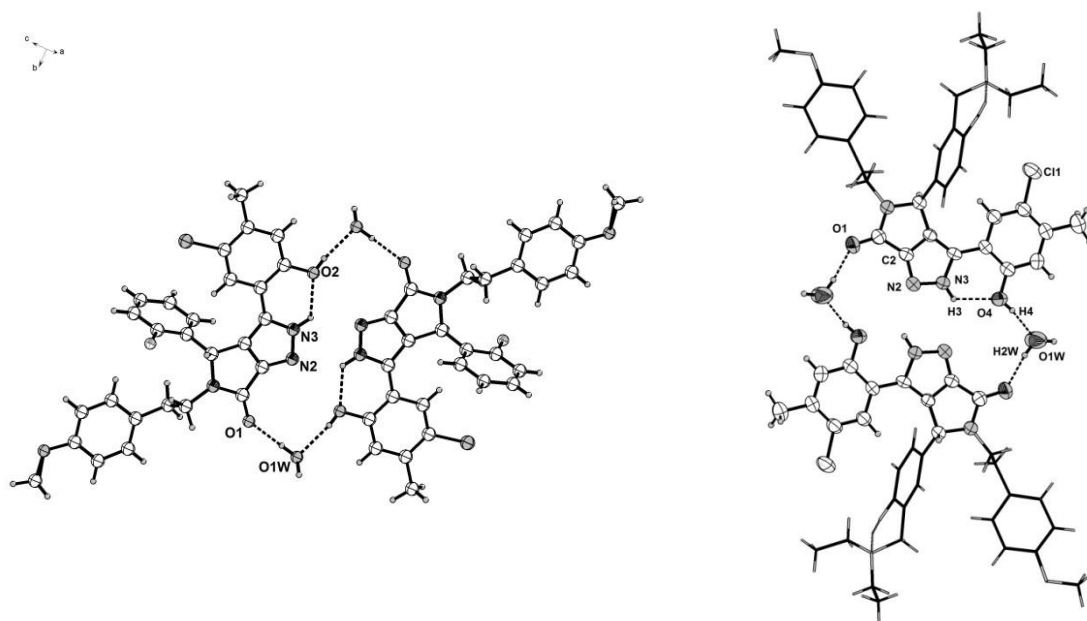


Abbildung 19: Röntgendiffraktometrische Strukturanalyse, Wasserstoffbrücken-verknüpfte Dimere; *links*: Leitstruktur **1** (MMV396717), *rechts*: Verbindung **33**.

3.4.10. Biologische Evaluation der Pyrrolopyrazol-Derivate

Die im Rahmen der antiplasmodialen Evaluation vorgestellten und diskutierten, biologischen Daten wurden durch MMV, sowie durch Kooperationspartner aus Tübingen, Hamburg, San Diego, Brisbane und Basel zur Verfügung gestellt (Abb. 20).

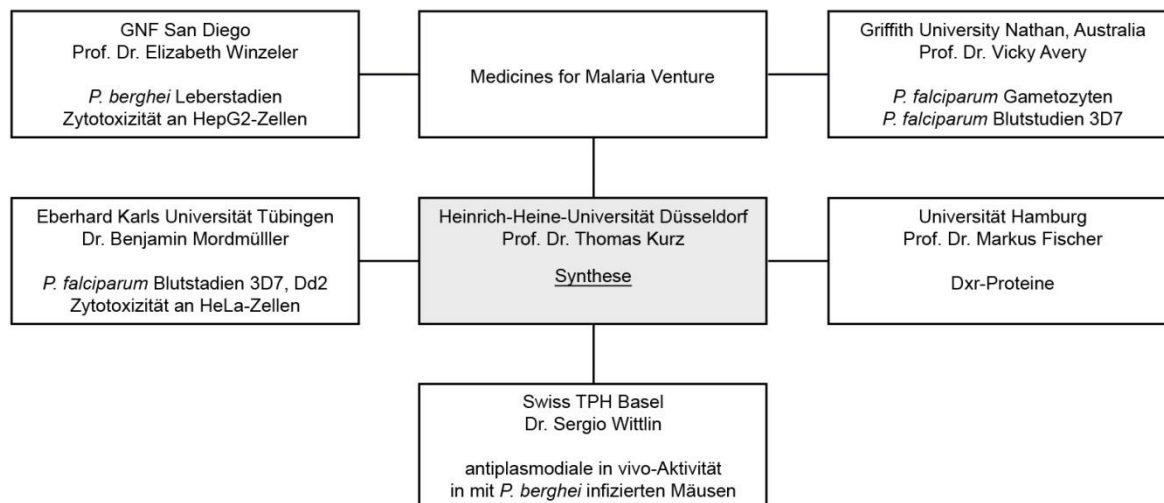
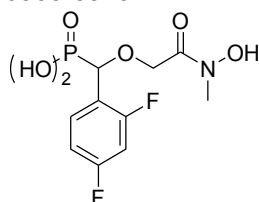


Abbildung 20: Kooperationspartner zur biologischen Evaluation der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Endverbindungen; GNF = Genomics Institute of the Novartis Research Foundation.

Zunächst sollen die Ergebnisse von Phänotyp- und Target-basierten Assays, in denen die Verbindungen **24-34**, **37-38**, **45-47**, **51-53**, **55**, **64-68** und **72-75** untersucht wurden, vorgestellt und diskutiert werden. Mit Hilfe des Phänotyp-basierten Assays wurde die inhibitorische Wirkung der Testsubstanzen auf das Wachstum des Chloroquin-sensitiven *P.falciparum*-Stammes 3D7 und des multiresistenten Stammes Dd2 untersucht, wobei Chloroquin als Referenzsubstanz diente. In einem Target-basierten Assay wurde die Hemmwirkungen der Substanzen gegenüber dem Enzym PfDxr bestimmt (Referenzsubstanz: KBK80^{†††}). Außerdem erfolgte eine Bestimmung der Zytotoxizität ausgewählter Verbindungen gegenüber HeLa-Zellen. Ein Derivat wurde aufgrund sehr guter antiplasmodialer *in vitro*-Aktivität und Selektivität zusätzlich einem *in vivo*-Experiment unterzogen.

^{†††} KBK80 ist ein im AK Kurz von Brücher synthetisiertes Fosmidomycin-Analogon.

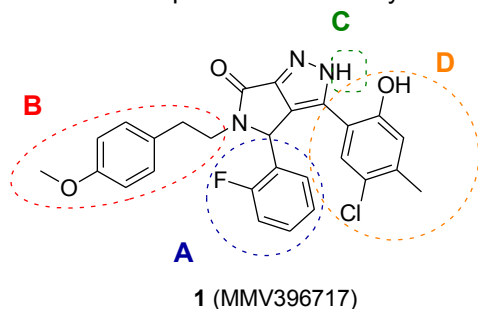
133. Brücher, K.; Illarionov, B.; Held, J.; Tschan, S.; Kunfermann, A.; Pein, M. K.; Bacher, A.; Gräwert, T.; Maes, L.; Mordmüller, B.; Fischer, M.; Kurz, T., α -Substituted β -Oxa Isosteres of Fosmidomycin: Synthesis and Biological Evaluation. *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, 55 (14), 6566-6575.



Die Testergebnisse der in Molekülregion A bis D variierten Verbindungen sollen im Vergleich zu denen der Leitstruktur **1** (MMV396717) betrachtet und diskutiert werden. Die ermittelten *in vitro*-Aktivitäten der Leitstruktur **1** (MMV396717) sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Mit Hilfe des Target-basierten Assays wurde die inhibitorische Wirkung der Testsubstanzen gegenüber dem Enzym *PfDxr* bestimmt.

Tabelle 5: antiplasmodiale und zytotoxische Eigenschaften der Leitstruktur **1** (MMV396717).



1 (MMV396717)	
<i>Pf</i> 3D7 EC ₅₀ [μM] ^a	0.92
<i>Pf</i> 3D7 IC ₅₀ [μM] ^{b,f}	2.6
<i>Pf</i> Dd2 IC ₅₀ [μM] ^{b,f}	2.0
<i>Pf</i> Dxr IC ₅₀ [μM] ^{c,g}	23 ± 4.0
<i>Pb</i> EEF IC ₅₀ [μM] ^d	14
HepG2 IC ₅₀ [μM] ^d	16
MRC-5 IC ₅₀ [μM] ^a	> 32
HeLa IC ₅₀ [μM] ^b	30
<i>Pf</i> LSG IC ₅₀ [μM] ^e	100% bei 40 μM

^aVon MMV im Vorfeld dieser Arbeit zur Verfügung gestellte Daten; ^bIn Arbeitsgruppe von Benjamin Mordmüller (Eberhard Karls Universität Tübingen) im Rahmen dieser Arbeit evaluierte Daten; ^cIn der Arbeitsgruppe von Markus Fischer (Universität Hamburg) im Vorfeld dieser Arbeit bestimmte IC₅₀-Wert der Originalsubstanz aus der Malaria Box; ^dIn der Arbeitsgruppe von Elizabeth Winzeler (Genomics Institute of the Novartis Research Foundation) im Rahmen dieser Arbeit evaluierte Daten; ^eIn der Arbeitsgruppe von Vicky Avery (Griffith University Nathan) im Rahmen dieser Arbeit evaluierte Daten; ^fMittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Doppelbestimmungen; ^gMittelwerte +/- Standardabweichung aus nichtlinearer Regression aus 3-9 Messpunkten.⁴⁵⁻⁴⁶

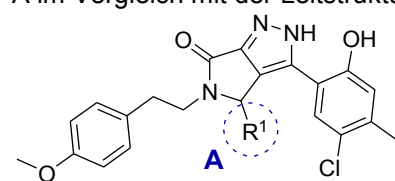
Analoga der Leitstruktur **1** (MMV396717) mit variierten Molekülregionen A bis D

In Tabelle 6 sind die Ergebnisse des Zellkultur- und des Enzymassays von den Substanzen, welche in Molekülregion A variiert wurden, dargestellt. Die stärksten Inhibitoren **31-33** zeigen im Zellkulturassay Hemmwirkungen gegenüber beiden *P. falciparum*-Stämmen im zweistellig nanomolaren Bereich (0.012-0.035 μM). Gemeinsames Strukturmerkmal der genannten

Inhibitoren ist ein basisch substituierter Arylring in Region A. Verglichen mit der antiplasmodialen Aktivität gegenüber *Pf3D7* der Leitstruktur **1** (MMV396717) zeigt der stärkste Inhibitor **33** eine mehr als 200-fach erhöhte Hemmwirkung. Die antiplasmodiale *in vitro*-Aktivität der Inhibitoren **24-27** und **37** liegen in einem ähnlichen Bereich wie die der Leitstruktur **1** (MMV396717). Die Einführung von Heterozyklen (**28-29**) führt, verglichen mit der Leitstruktur **1** (MMV396717), zu einer Verringerung der *P. falciparum*-Wachstumshemmung.

Vergleicht man die Ergebnisse des Zellkulturassays mit denen des Enzymassays lässt sich keine Korrelation zwischen den IC₅₀-Werten erkennen. Die IC₅₀-Werte der *PfDxr*-Inhibition sind zudem ein bis vier Zehnerpotenzen höher, als die der *P. falciparum*-Wachstumshemmung.

Tabelle 6: *In vitro*-Aktivitäten der Pyrrolopyrazol-Derivate **24-34** und **37-39** mit variierter Molekülregion A im Vergleich mit der Leitstruktur **1** (MMV396717).



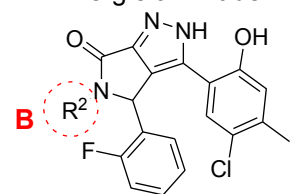
	R ¹	<i>Pf3D7</i> IC ₅₀ [μM] ^a	<i>PfDd2</i> IC ₅₀ [μM] ^a	<i>PfDxr</i> IC ₅₀ [μM] ^b
1 (MMV396717)		2.6	2.0	23 ± 4
24	4-F-Ph	1.9	1.7	40 ± 7.0
25	4-CH ₃ -Ph	1.2	0.65	18 ± 2.0
26	4-(S(=O) ₂ CH ₃)-Ph	2.3	3.0	26 ± 3.0
27	4-(2-Pyridyl)-Ph	2.1	1.2	19 ± 3.0
28	2-Thienyl	8.9	4.1	20 ± 2.0
29	4-Pyridyl	> 13	n.b.	41 ± 13
30	4-(CH ₂ N(CH ₂ CH ₃) ₂)-Ph	0.087	0.045	82 ± 14
31	3-(CH ₂ N(CH ₂ CH ₃) ₂)-Ph	0.024	0.018	> 500
32	3-(CH ₂ N(CH ₃) ₂)-4-OH-Ph	0.014	0.035	109 ± 28
33	3-(CH ₂ N(CH ₂ CH ₃) ₂)-4-OH-Ph	0.012	0.023	20 ± 3.0
34	Cyclohexyl	0.64	0.74	13 ± 3.0
37	2,4-F-Ph	2.2	2.0	31 ± 4.0
39	3-Pyridyl	2.9	2.4	21 ± 5.0

^aMittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Doppelbestimmungen; ^bMittelwerte +/- Standardabweichung aus nichtlinearer Regression aus 3-9 Messpunkten;⁴⁵⁻⁴⁶ n.b. = nicht bestimmt.

Die *in vitro*-Aktivitäten der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Pyrrolopyrazole **45-47** und **51-53** mit variiertem Molekülregion B, sind in Tabelle 7 zusammengefasst. In dieser Region haben Substituenten, wie z.B. unsubstituierte Alkylketten oder heteroaromatische Ringe, verglichen mit der Leitstruktur **1** (MMV396717), zu einer Verringerung der antiplasmodialen Aktivität geführt. Die Einführung eines 4-Methoxybenzyl-Substituenten (**51**) hingegen hat gegenüber *Pf*3D7 zu einem IC₅₀-Wert von 1.5 µM und gegenüber *Pf*Dxr zu einem IC₅₀-Wert von 18 ± 2.0 µM geführt. Die Verbindung **51** zeigt somit sowohl im Zellkultur- als auch im Enzymassay Aktivitäten, die mit denen der **1** (MMV396717) vergleichbar sind. Gleichzeitig handelt es sich bei Verbindung **51** um den stärksten Inhibitor unter den in Molekülregion B variierten Verbindungen.

Anhand dieser Ergebnisse lässt sich zunächst vermuten, dass der 4-Methoxyaryl-Substituent wichtig für die *in vitro*-Aktivität gegenüber asexueller Blutstadien dieser Substanzklasse ist. Die (CH₂)_n-Kette kann hingegen in ihrer Länge von n=2 auf n=1 unter Aktivitätserhalt gekürzt werden (**51**). Durch Vergleich der IC₅₀-Werte der Verbindungen **47**, **51** und **52** gegenüber *Pf*3D7 wird jedoch deutlich, dass eine größere Anzahl an Verbindungen nötig wäre, um eine detaillierte Aussage über Struktur-Wirkungs-Beziehungen zu ermöglichen.

Tabelle 7: *In vitro*-Aktivitäten der Pyrrolopyrazol-Derivate **45-47** und **51-53** mit variiertem Molekülregion B im Vergleich mit der Leitstruktur **1** (MMV396717).

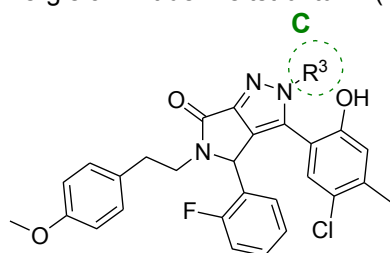


	R ²	<i>Pf</i> 3D7 IC ₅₀ [µM] ^a	<i>Pf</i> Dd2 IC ₅₀ [µM] ^a	<i>Pf</i> Dxr IC ₅₀ [µM] ^b
1 (MMV396717)		2.6	2.0	23 ± 4
45	CH ₂ -(3-Pyridyl)	19	n.b.	174 ± 37
46	CH ₃	> 13	n.b.	40 ± 7.0
47	(CH ₂) ₂ -OCH ₃	18	6.5	53 ± 11
51	CH ₂ -(4-OCH ₃)-Ph	1.5	n.b.	18 ± 2.0
52	H	> 13	n.b.	415 ± 166
53	<i>n</i> -Pr	4.1	n.b.	33 ± 2.0

^aMittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Doppelbestimmungen; ^bMittelwerte +/- Standardabweichung aus nichtlinearer Regression aus 3-9 Messpunkten; ⁴⁵⁻⁴⁶ n.b. = nicht bestimmt.

Der Einfluss einer Substitution des Pyrazol-Stickstoffs wurde anhand der *N*-methylierten Verbindung **55** untersucht. Diese weist eine etwas geringere *in vitro*-Aktivität gegenüber *Pf*3D7 auf, als die Leitstruktur **1** (MMV396717). Mit einem IC₅₀-Wert > 500 µM kann diese Substanz als inaktiv gegenüber *Pf*Dxr angesehen werden (Tab. 8).

Tabelle 8: *In vitro*-Aktivitäten des Pyrrolopyrazol-Derivate **55** mit variiertem Molekülregion C im Vergleich mit der Leitstruktur **1** (MMV396717).



	R ³	<i>Pf</i> 3D7 IC ₅₀ [μM] ^a	<i>Pf</i> Dd2 IC ₅₀ [μM] ^a	<i>Pf</i> Dxr IC ₅₀ [μM] ^b
1 (MMV396717)	H	2.6	2.0	23 ± 4.0
55	CH ₃	4.5	n.b.	> 500

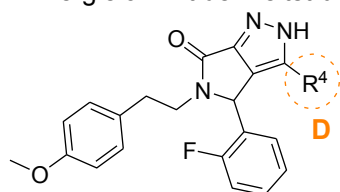
^aMittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Doppelbestimmungen; ^bMittelwerte +/- Standardabweichung aus nichtlinearer Regression aus 3-9 Messpunkten;⁴⁵⁻⁴⁶ n.b. = nicht bestimmt.

Um den Einfluss des 5-Chlor-2-hydroxy-4-methylphenyl-Rings der Leitstruktur **1** (MMV396717) in Molekülregion D aufzuklären, wurde dieser Substituent gegen andere Gruppen ausgetauscht und die resultierenden Derivate **10** und **64-68** auf ihre antiplasmodiale *in vitro*-Aktivität untersucht (Tab. 9). Keiner der eingeführten Substituenten führte zu einer Verstärkung der Inhibition von *Pf*3D7 oder *Pf*Dxr. Die Einführung eines 5-Chlor-4-methylphenylrings (**65**) führte zu einem starken Aktivitätsverlust (*Pf*3D7 IC₅₀ > 20 μM; *Pf*Dxr IC₅₀ = 228 ± 11 μM). Das Derivat **67**, welches einen unsubstituierten Phenylring trägt, weist ebenfalls keine antiplasmodiale Aktivität gegen *Pf*3D7. Aufgrund von mangelnder Löslichkeit konnte der IC₅₀-Wert gegenüber *Pf*3D7 nicht bei höheren Konzentrationen als 6.5 μM ermittelt werden (*Pf*3D7 IC₅₀ > 6.5 μM; *Pf*Dxr IC₅₀ > 500 μM). Vergleicht man die IC₅₀-Werte der Verbindungen **65** und **67** mit dem IC₅₀-Wert der Leitstruktur **1** (MMV396717), wird deutlich, dass in Molekülregion D die Hydroxygruppe des Phenylrings in *ortho*-Position für die antiplasmodiale Aktivität von Bedeutung ist.

Die Einführung einer Methylgruppe in besagter Region ergab das Derivat **66**, welches als inaktiv angesehen werden kann (*Pf*3D7 IC₅₀ > 20 μM; *Pf*Dxr IC₅₀ > 500 μM). Der Austausch des 5-Chlor-2-hydroxy-4-methylphenyl-Rings der Leitstruktur **1** (MMV396717) gegen einen aliphatischen Substituenten führt demnach ebenso zu vollständigem Aktivitätsverlust.

Die IC₅₀-Werte der *Pf*Dxr-Inhibition liegen im drei- bis vierstelligen mikromolaren Bereich. Bei Vergleich der *Pf*Dxr-Inhibition mit der Wachstumshemmung gegenüber *Pf*3D7 der Verbindungen lässt sich außerdem, wie bereits für die in den Bereichen A-C variierten Verbindungen festgestellt, keine Korrelation zwischen den IC₅₀-Werten erkennen (Tab. 9).

Tabelle 9: *In vitro*-Aktivitäten der Pyrrolopyrazol-Derivate **10** und **64-68** mit variiertem Molekülregion B im Vergleich mit der Leitstruktur **1** (MMV396717).

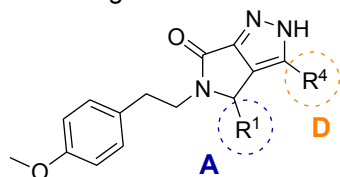


R ⁴		<i>Pf</i> 3D7 IC ₅₀ [μM] ^a	<i>Pf</i> Dd2 IC ₅₀ [μM] ^a	<i>Pf</i> Dxr IC ₅₀ [μM] ^b
1 (MMV396717)		2.6	2.0	23 ± 4
10	(5-Cl-2-(OCH ₂ OCH ₃)-4-CH ₃)-Ph	5.3	n.b.	466 ± 238
64	(5-Cl-2-OCH ₃ -4-CH ₃)-Ph	12	n.b.	112 ± 17
65	(5-Cl-4-CH ₃)-Ph	> 20	n.b.	228 ± 11
66	CH ₃	> 20	n.b.	> 500
67	Ph	> 6.5	> 8.0	> 500
68	4-Pyridyl	> 13	n.b.	> 1000

^aMittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Doppelbestimmungen; ^bMittelwerte +/- Standardabweichung aus nichtlinearer Regression aus 3-9 Messpunkten;⁴⁵⁻⁴⁶ n.b. = nicht bestimmt.

In Tabelle 10 sind die Ergebnisse des Zellkultur- und des Enzymassays von den Verbindungen (**72-75**), welche in zwei Molekülgruppen (A & D) variiert wurden, dargestellt. Alle vier Substanzen weisen nur schwache oder keine inhibitorischen Eigenschaften auf.

Tabelle 10: *In vitro*-Aktivitäten der Pyrrolopyrazol-Derivate **72-75** mit variierten Molekülregionen A und D im Vergleich mit der Leitstruktur **1** (MMV396717).



	R ¹	R ⁴	<i>Pf</i> 3D7 IC ₅₀ [μM] ^a	<i>Pf</i> Dd2 IC ₅₀ [μM] ^a	<i>Pf</i> Dxr IC ₅₀ [μM] ^b
1 (MMV396717)			2.6	2.0	23 ± 4
72	Ph	Ph	> 13	n.b.	> 500
73	2-Cl-Ph	Ph	> 13	n.b.	665 ± 164
74	Cyclohexyl	(5-Cl-4-CH ₃)-Ph	13	13	186 ± 10
75	2-OH-Ph	(5-Cl-4-CH ₃)-Ph	13	13	28 ± 4.0

^aMittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Doppelbestimmungen; ^bMittelwerte +/- Standardabweichung aus nichtlinearer Regression aus 3-9 Messpunkten;⁴⁵⁻⁴⁶ n.b. = nicht bestimmt.

Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit 30 neue Pyrrolopyrazol-Derivate mit unterschiedlich substituierten Molekülregionen A bis D synthetisiert, um ihre antiplasmodiale *in vitro*-Aktivität sowie ihre Enzymhemmung gegenüber *PfDxr* zu untersuchen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass durch Variation der Molekülregion A eine deutliche Steigerung der antiplasmodialen Aktivität erreicht werden konnte. Hierbei führte die Einführung basisch substituierter Phenylringe zu Verbindungen mit einer verbesserten Löslichkeit mit IC_{50} -Werten im niedrigen nanomolaren Bereich, sowohl gegen den Chloroquin-sensitiven *P. falciparum*-Stamm 3D7, als auch gegen den multiresistenten Stamm Dd2. Variationen in Molekülregion B führten zu keiner Verstärkung der *in vitro*-Aktivitäten gegenüber asexueller Blutstadien. Das in dieser Molekülregion kettenverkürzte Derivat **51** zeigte jedoch eine antiplasmodiale Aktivität im ähnlichen Bereich, wie die der Leitstruktur **1** (MMV396717). Sowohl die Methylierung des Pyrazol-Stickstoffs in Molekülregion C, als auch der Austausch des 5-Chlor-2-hydroxy-4-methylphenylrings in Region D gegen andere aromatische oder aliphatische Substituenten führte zu keiner Steigerung der antiplasmodialen *in vitro*-Aktivität.

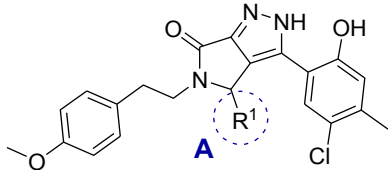
Sowohl bei der Leitstruktur **1** (MMV396717) (*Pf*3D7 IC_{50} = 2.6 μ M, *Pf*Dd2 IC_{50} = 2.0 μ M, *PfDxr* IC_{50} = 23 ± 4 μ M), als auch bei allen in Molekülregion A bis D variierten Verbindungen sind die IC_{50} -Werte der *PfDxr*-Inhibition deutlich höher, als die der *P. falciparum*-Wachstumshemmung. Diesen Daten kann man entnehmen, dass es sich bei der untersuchten Substanzklasse nicht ausschließlich um *PfDxr*-Inhibitoren handeln kann bzw. *PfDxr* nicht das alleinige Target dieser Inhibitoren sein kann. Bei der Bestimmung der *PfDxr*-Inhibition der Pyrrolopyrazol-Derivate wurde zudem beobachtet, dass nach Zugabe der in DMSO gelösten Inhibitoren ab Substanzkonzentrationen von 120 μ M zu der Assay-Pufferlösung^{§§§} fast ausnahmslos Bildung von Niederschlägen beobachtet wurde. Eine Erklärung hierfür könnte die schlechte Wasserlöslichkeit der getesteten Verbindungen sein, welche aus Zeitgründen im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr optimiert werden konnte.

Für eine Beurteilung und einen Vergleich von Selektivitäten der Leitstruktur **1** (MMV396717) und der Pyrrolopyrazol-Analoga wurden von beispielhaft ausgewählten Derivaten Zytotoxizitätsbestimmungen gegenüber HeLa-Zellen durchgeführt. Die entsprechenden Ergebnisse sowie die errechneten Selektivitätsindizes bezogen auf die *P. falciparum*-Stämme 3D7 wurden in Tabelle 11 zusammengefasst.

^{§§§} Die Assay-Pufferlösungen mit einem Gesamtvolumen von 200 μ L enthielten 100 mM Tris-Hydrochlorid (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Hydrochlorid, pH = 7.6), 5 mM $MnCl_2$, 5 mM Dithiothreitol, 0.5 mM NADPH und 10-50 nM rekombinantes *PfDxr*-Protein.

45. Kuzmič, P., Program DYNAFIT for the analysis of enzyme kinetic data: application to HIV proteinase. *Analytical biochemistry* **1996**, 237 (2), 260-273, 46. Press, W. H., *Numerical recipes 3rd edition: The art of scientific computing*. Cambridge university press: 2007.

Tabelle 11: Zytotoxizitäts- und Selektivitätsdaten der Pyrrolopyrazol-Derivate **30** und **33** im Vergleich mit Leitstruktur **1** (MMV396717).



	R ¹	HeLa IC ₅₀ [μM]	<i>Pf</i> 3D7 IC ₅₀ [μM] ^a	HeLa IC ₅₀ / <i>Pf</i> 3D7 IC ₅₀ ^b
1 (MMV396717)	2-F-Ph	30	2.6	11
30	4-(CH ₂ N(CH ₂ CH ₃) ₂)-Ph	15	0.087	98
33	3-(CH ₂ N(CH ₂ CH ₃) ₂)-4-OH-Ph	> 125	0.012	> 9 960

^aMittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Doppelbestimmungen; ^bSelektivitätsindizes wurden unter Verwendung ungerundeter IC₅₀-Werte berechnet.

Das Derivat **33** weist mit einem IC₅₀-Wert von > 125 μM eine äußerst geringe Zytotoxizität auf. Verglichen mit dem Wert der Leitstruktur **1** (MMV396717) (HeLa IC₅₀ = 30 μM) liegt eine mehr als vierfach verminderte Zytotoxizität vor. Aufgrund der zusätzlich sehr starken *in vitro*-Aktivität gegen beide *P. falciparum*-Stämme (*Pf*3D7 IC₅₀ = 0.012 μM; *Pf*Dd2 IC₅₀ = 0.023 μM) wurde dieser Inhibitor für ein *in vivo*-Experiment ausgewählt (Tab. 12).

Tabelle 12: *In vivo*-Aktivität des Pyrrolopyrazol-Derivats **33**.

	Parasitierte Erythrozyten [%]	Aktivität [%]	Überlebenszeit [Tage]
Kontrolle	58	0	4
33 (p. o.)	55	4.16	4
33 (i. p.)	59	-1.89	4

Die Untersuchung der antiplasmodialen *in vivo*-Aktivität erfolgte mittels viertägigem Suppressionstest nach Peters durch die Arbeitsgruppe von Sergio Wittlin am Swiss Tropical and Public Health Institute.¹³⁴ Mit *Plasmodium berghei* infizierte Mäuse wurden an vier aufeinander folgenden Tagen mit jeweils 50 mg pro kg Körpergewicht des potentiellen Wirkstoffs behandelt. Die Applikation erfolgte in einer Behandlungsgruppe *per oral* (p. o.), in der anderen *intraperitoneal* (i. p.).

Trotz vielversprechender, antiplasmodialer *in vitro*-Aktivität der Verbindung **33** konnte in dem *in vivo*-Experiment, unabhängig von der Art der Verabreichung, keine Reduktion der Parasitämie beobachtet werden. Daher wurden die mit dem potentiellen Wirkstoff **33** behandelten Mäuse nach der Bestimmung der Parasitämie am vierten Tag, ebenso wie die Mäuse der Kontrollgruppe, euthanasiert.

Um an den Wirkungsort zu gelangen, muss der potentielle Wirkstoff geeignete physikochemische Eigenschaften aufweisen, um resorbiert werden zu können. Abhängig von der Applikationsart, muss der Wirkstoff durch unterschiedlich viele Membrane permeieren.

Nach *peroraler* Applikation muss ein Malariamittel z. B. die Darm-Blutsschranke, die Erythrozytenmembran und die Membran des Parasiten passieren.¹³⁵

Löslichkeitsexperimente haben ergeben, dass die Verbindung **33** in Wasser schwerlöslich ist. Diese Beobachtung ist im Einklang mit dem berechneten AlogP-Wert der Verbindung **33** von 6.57. Dies könnte ein möglicher Grund für die Inaktivität der Verbindung **33** im *in vivo*-Experiment sein, da die Schwerlöslichkeit in Wasser eine Resorption erschwert oder sogar verhindert. Das zusätzlich hohe Molekulargewicht von 575.10 g/mol könnte zusätzlich eine geringe Membranpermeabilität begründen. Die Wasserlöslichkeit der Pyrrolopyrazol-Derivate konnte im Rahmen dieser Arbeit aus Zeitgründen nicht mehr optimiert werden.

3.5. Synthese und Eigenschaften von Benzimidazolen als neuartige Antimalariawirkstoffe

3.5.1. Strukturelle Variationen/Optimierung der Leitstruktur II (MMV006962)

Für die Darstellung verschiedener Benzimidazol-Derivate der Leitstruktur II (MMV006962) mit unterschiedlichen Aryl-Substituenten wurden entsprechend substituierte Benzoylchloride oder Benzolsulfonylchloride verwendet (Abb. 21).

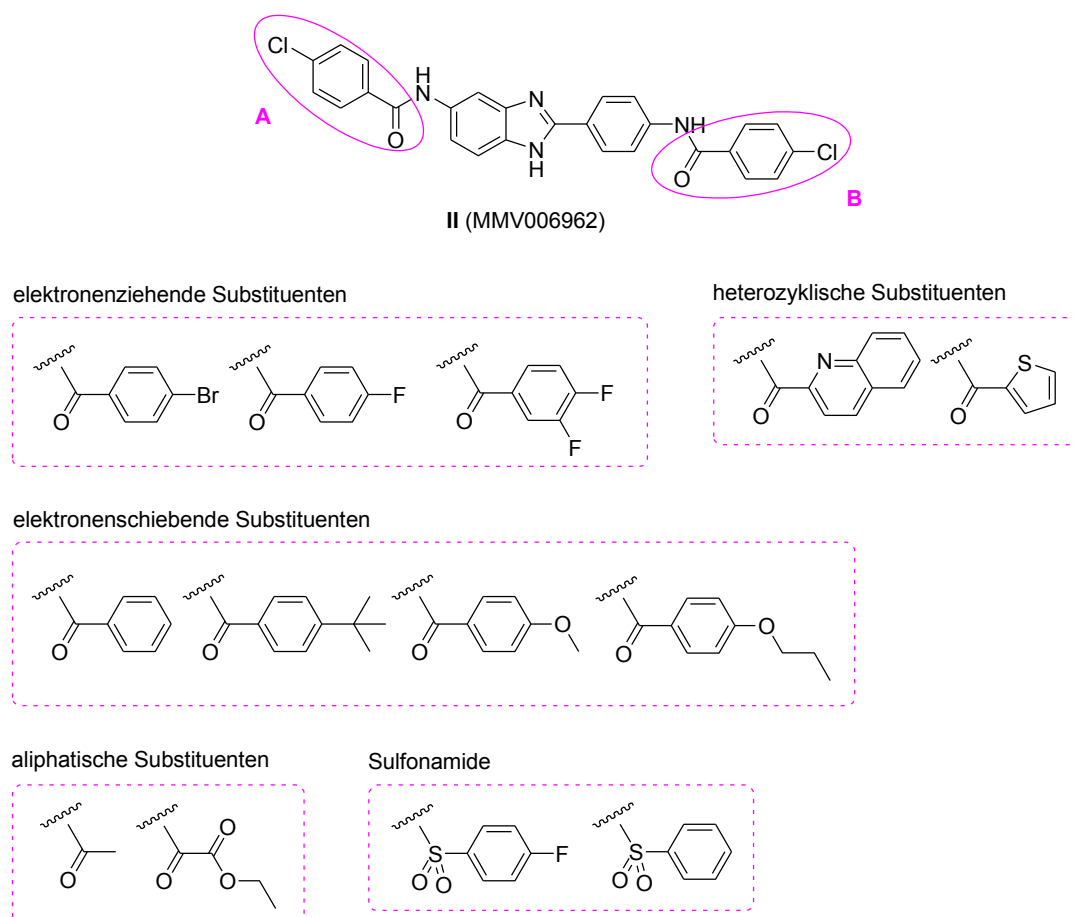


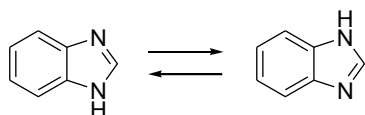
Abbildung 21: Strukturelle Modifikationen der Leitstruktur II (MMV006962).

Durch isosteren Ersatz des Chloratoms gegen andere Halogenatome wurde eine Veränderung der elektronischen Eigenschaften der Aryl-Substituenten herbeigeführt. Außerdem wurden sterische Eigenschaften durch Einführung von sterisch anspruchsvolleren Gruppen, wie z. B. 4-*t*-Butylphenyl-, 4-Propoxyphenyl- oder Chinolin-Substituenten, beeinflusst.

Die gezielten Änderungen der sterischen und elektronischen Eigenschaften der Aryl-Substituenten sollten Aufschluss über Struktur-Wirkungs-Beziehungen geben, welche in Abschnitt 3.5.5. diskutiert werden.

3.5.2. Literaturübersicht zur Synthese von Benzimidazol-Derivaten

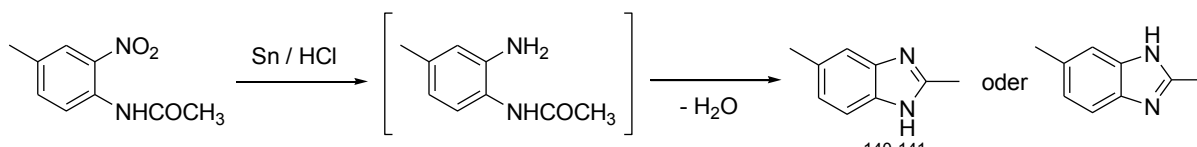
In der Literatur ist eine Tautomerie zwischen *1H*- und *3H*-Benzimidazolen beschrieben, was bei substituierten *1H*-Benzimidazolen zur Bildung von Regioisomere führen kann (Schema 39).¹³⁶⁻¹³⁹



Schema 39: Tautomeres Gleichgewicht zwischen *1H*- und *3H*-Benzimidazolen.¹³⁶⁻¹³⁹

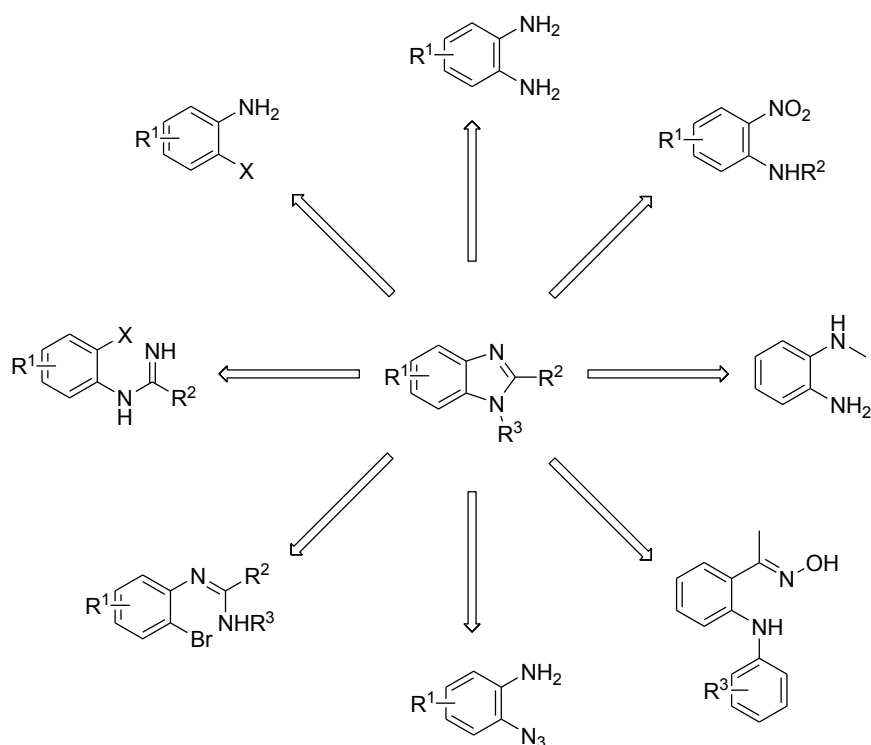
Welche der beiden jeweiligen Gleichgewichtsformen im folgenden Abschnitt dargestellt wird, richtet sich ausschließlich nach der Originalliteratur.

Die erste Synthese eines Benzimidazols wurde 1872 von *Hobrecker* veröffentlicht. Nach Reduktion der Nitrogruppe des Edukts 4-Methyl-2-nitroacetanilid bildete sich in einer Kondensationsreaktion das in Schema 40 gezeigte Benzimidazol.¹⁴⁰⁻¹⁴¹



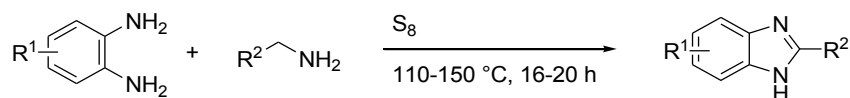
Schema 40: Darstellung von *1H*- oder *3H*-Benzimidazol nach Hobrecker.¹⁴⁰⁻¹⁴¹

Das folgende Schema stellt eine Auswahl an Synthesemethoden von Benzimidazolen dar, welche in den letzten zehn Jahren entwickelt wurden (Schema 41).



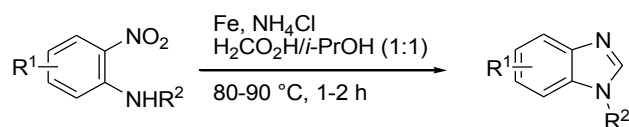
Schema 41: Möglichkeiten zur Darstellung von Benzimidazolen.¹⁴¹⁻¹⁵¹

2012 stellte *Nguyen* eine Schwefel-vermittelte Kreuzkupplungs-Reaktion von *ortho*-Phenylendiaminen mit aliphatischen Aminen vor, wodurch er ohne Zusatz eines Lösungsmittel nach 16-20 Stunden Erhitzen auf 110-150 °C Benzimidazol-Derivate erhielt (Schema 42).¹⁴³



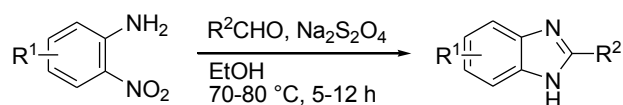
Schema 42: Darstellung von Benzimidazol-Derivaten in Ausbeuten von 71-92 % nach *Nguyen*.¹⁴³

Hanan gelang 2010 in einer Eintopf-Reaktion die Umwandlung von substituierten *ortho*-Nitroanilinen (Schema 43). Um nach einer Reaktionszeit von bereits ein bis zwei Stunden *N*-substituierte Benzimidazol-Derivate zu erhalten, war ein zehnfacher Überschuss an Eisen und Ammoniumchlorid und eine Reaktionstemperatur von 80-90 °C nötig. Durch einen geringeren Überschuss an Eisen und Ammoniumchlorid oder niedrigere Temperaturen erhöhte sich die Reaktionszeit um ein Vielfaches.¹⁴⁴



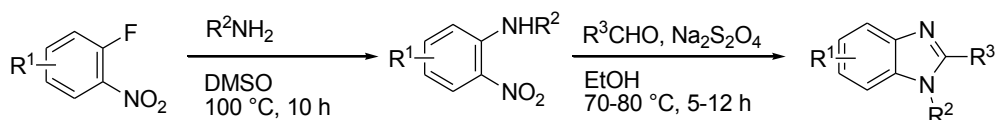
Schema 43: Darstellung von *N*-substituierten Benzimidazol-Derivaten in Ausbeuten von 52-99 % nach *Hanan*.¹⁴⁴

Yang synthetisierte 2005 *N*-unsubstituierte Benzimidazole ausgehend von *ortho*-Nitroanilin-Derivaten in Gegenwart von Aldehyden und Natriumsulfat nach 10 Stunden Erhitzen auf 100 °C (Schema 44).¹⁴⁵



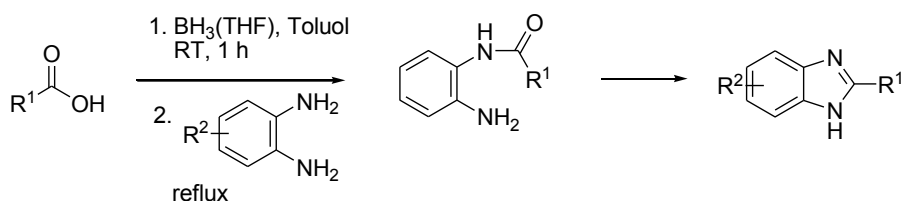
Schema 44: Darstellung von *N*-unsubstituierten Benzimidazol-Derivaten in Ausbeuten von 74-96 % nach *Yang*.¹⁴⁵

N-Alkyl- und *N*-Aryl-substituierte Benzimidazole erhielt er nach analoger Vorschrift durch Einsatz eines *N*-substituierten *ortho*-Nitroanilin-Derivats, welches zuvor durch Umsetzung eines 1-Fluor-2-nitroaryl-Derivats mit einem aromatischen oder aliphatischen, primären Amin erhalten werden konnte (Schema 45).¹⁴⁵



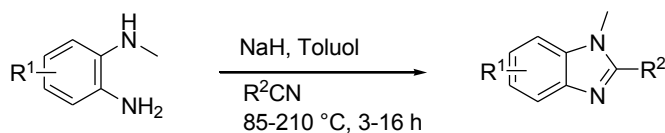
Schema 45: Darstellung von *N*-substituierten Benzimidazol-Derivaten in Ausbeuten von 83-91 % nach Yang.¹⁴⁵

2011 stellte Cui eine Eintopfsynthese von 2-substituierten Benzimidazolen ausgehend von Carbonsäure-Derivaten vor. Über eine Triacyloxyboran-Zwischenstufe wurde nach Umsetzung mit einem *ortho*-Phenylendiamin das Produkt nach insgesamt 12 Stunden Reaktionszeit erhalten (Schema 46).¹⁴⁶



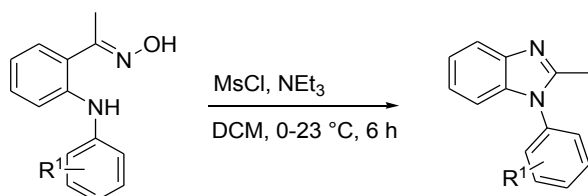
Schema 46: Eintopfsynthese zur Darstellung von Benzimidazol-Derivaten in Ausbeuten von 15-95 % nach Cui.¹⁴⁶

N-Methyl-substituierte Benzimidazole synthetisierte Sluiter 2008 ausgehend von *N*-Methyl-*ortho*-phenylendiamin und Carbonsäurenitrilen (Schema 47).¹⁴⁷



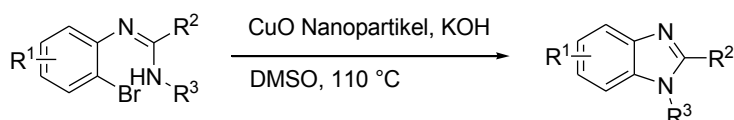
Schema 47: Darstellung von *N*-Methyl-substituierten Benzimidazol-Derivaten in Ausbeuten von 4-93 % nach Sluiter.¹⁴⁷

2010 gelang Wray die Darstellung von *N*-Aryl-substituierten Benzimidazolen aus *ortho*-Aminophenyl-substituierten Ketoximen (Schema 49). Nach Mesylierung der OH-Gruppe und einer Beckmann-Umlagerung zu einem Nitrilium-Ion fand ein intramolekularer Ringschlussreaktion zu einem *N*-Aryl-substituierten Benzimidazol statt.¹⁴⁸



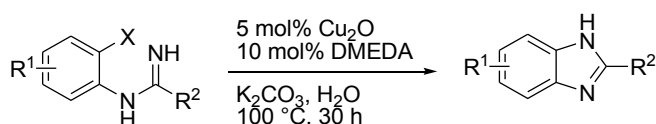
Schema 48: Darstellung von *N*-Aryl-substituierten Benzimidazol-Derivaten in Ausbeuten von 36-86 % nach Wray.¹⁴⁸

Durch Einsatz von *ortho*-Bromarylamidinen gelang *Saha* 2009 mithilfe katalytisch wirkender Kupfer(II)oxid-Nanopartikeln die Synthese von *N*-substituierten Benzimidazolen (Schema 49).¹⁴⁹



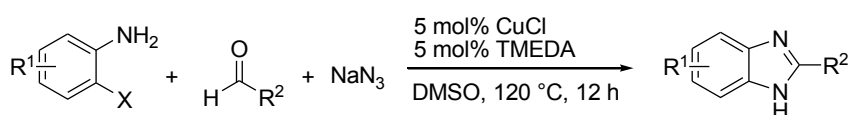
Schema 49: Darstellung *N*-substituierter Benzimidazol-Derivate in Ausbeuten von 82-97 % nach *Saha*.¹⁴⁹

Eine Kupfer(I)-katalysierte, intramolekulare C-N-Kreuzkupplung von Benzamidin-Derivaten wurde 2011 von *Peng* vorgestellt. DMEDA wurde als chelatisierender Ligand eingesetzt, als Reaktionsmedium diente ausschließlich Wasser (Schema 50).¹⁵⁰



Schema 50: Kupfer(I)-katalysierte, intramolekulare C-N-Kreuzkupplung zur Darstellung von Benzimidazol-Derivaten in Ausbeuten von 20-99 % nach *Peng*.¹⁵⁰

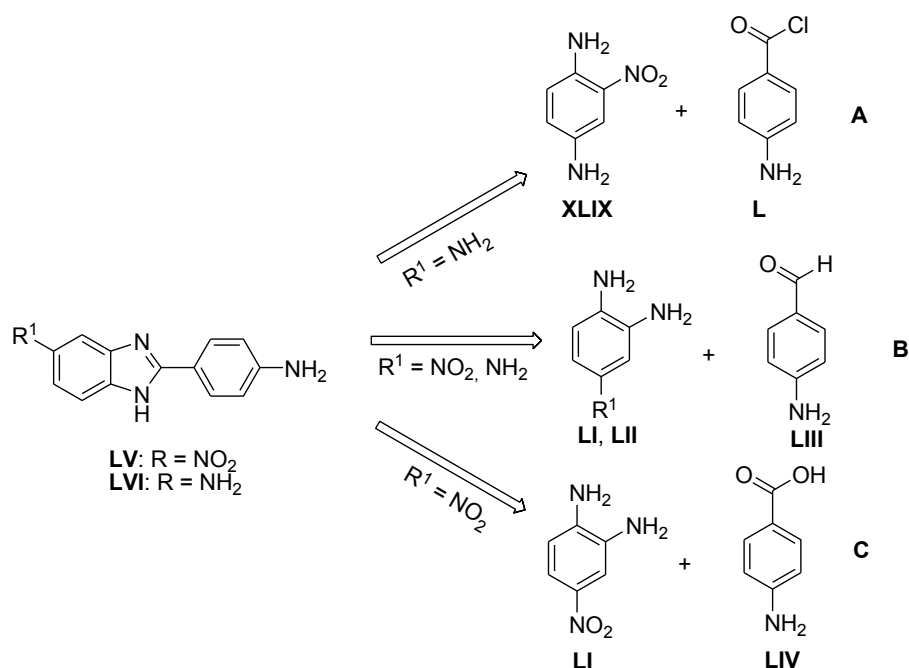
Ebenfalls 2011 veröffentlichte *Kim* eine Kupfer(I)-katalysierte Eintopfsynthese von Benzimidazolen ausgehend von einem 2-Iod- oder 2-Bromanilin-Derivat, einem aliphatischen, aromatischen oder heteroaromatischen Aldehyd und Natriumazid (Schema 51).



Schema 51: Kupfer(I)-katalysierte Eintopfsynthese zur Darstellung von Benzimidazol-Derivaten in Ausbeuten von 40-98 % nach *Kim*.¹⁵¹

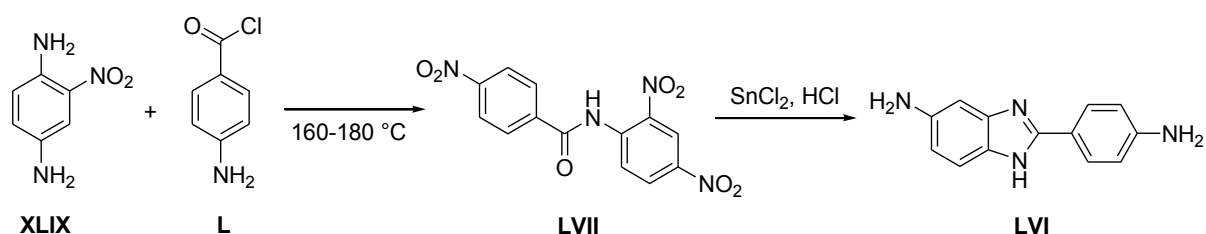
Verwendete Edukte

Die für die im Rahmen dieser Arbeit substituierten Benzimidazol-Derivate benötigten Edukte 4-(5-Nitro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)benzenamin (**LV**) oder 2-(4-Aminophenyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-amin (**LVI**), können auf den in Schema 52 gezeigten Synthesewegen erhalten werden. Die Zyklisierung zum Benzimidazol findet bei allen drei Methoden in einer Kondensationsreaktion zwischen einem *o*-Phenylendiamin und einer Carbonylverbindung statt.



Schema 52: Möglichkeiten zur Synthese der Vorstufen **LV** oder **LVI**.^{44, 152-155}

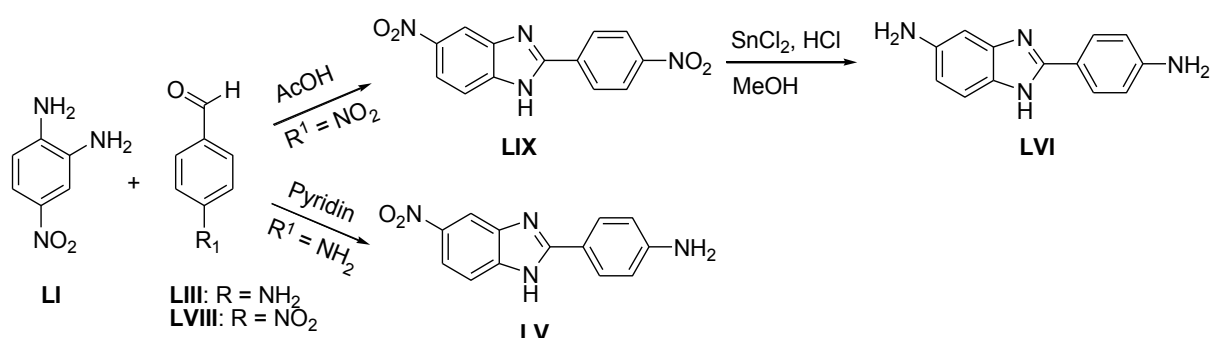
1899 berichtete *Kym* die erste Methode zur Herstellung von **LVI**. Durch Erhitzen von 2-Nitro-1,4-phenyldiamin (**XLIX**) und 4-Aminobenzoylchlorid (**L**) auf 160-180 °C wurde zunächst das Zwischenprodukt **LVII** erhalten, welches nach Reduktion der Nitrogruppen mit Zinn(II)chlorid und HCl zum gewünschten Benzimidazol-Derivat **LVI** zyklisierte (Schema 53).¹⁵²



Schema 53: Darstellung von **LVI** nach *Kym* 1899.¹⁵²

Feitelson gelang 1952 die Darstellung von **LVI**, indem er zunächst den Benzimidazolgrundkörper **LIX** aus 4-Nitro-*o*-phenyldiamin (**LI**) und 4-Nitrobenzaldehyd (**LVIII**) unter Zusatz von Essigsäure aufbaute und anschließend mittels Zinn(II)chlorid und HCl die Nitrogruppen reduzierte (Schema 54, oben).¹⁵³

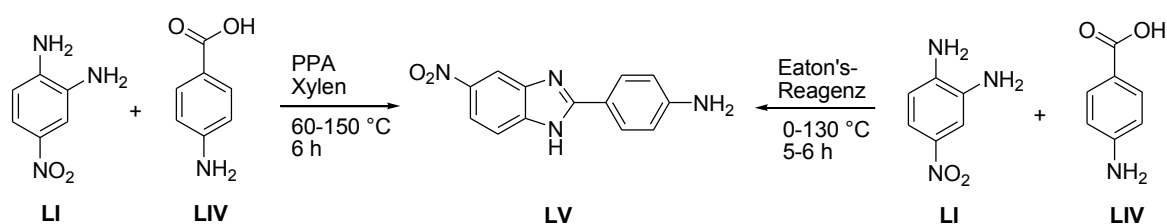
2006 berichtete *Wolkenberg* eine Methode, welche der von *Feitelson* entwickelten Methode ähnelt. Anstelle von 4-Nitrobenzaldehyd (**LVIII**) setzte *Wolkenberg* 4-Aminobenzaldehyd (**LIII**) in Gegenwart von Pyridin ein und erhielt somit das Benzimidazol **LV** (Schema 54, unten).¹⁵⁴



Schema 54: Darstellung von **LVI** nach *Feitelson* (oben); Darstellung von **LV** nach *Wolkenberg* (unten).
153-154

Richards erhitzte 2006 4-Nitro-*o*-phenyldiamin (**LI**) mit 4-Aminobenzoesäure (**LIV**) in Gegenwart von Polyphosphorsäure und Xylen, um nach sechs Stunden ebenfalls **LV** in einer Ausbeute von 47 % zu erhalten (Schema 55, links).⁴⁴

2014 gelang es *Janupally* aus identischen Edukten mittels Eaton's Reagenz das gewünschte Produkt in 72%iger Ausbeute synthetisieren (Schema 55, rechts).¹⁵⁵



Schema 55: Darstellung von **LV** nach *Richards* (links) und *Janupally* (rechts).^{44, 155}

Ausgewählte biologische Eigenschaften

Benzimidazole sind in Form von *N*-Ribosyl-dimethylbenzimidazol als Ligand von Cobalt ein Bestandteil von Vitamin B₁₂, wodurch dem Heterozyklus seit den 1960er Jahren zunehmend Bedeutung in der Entwicklung neuer Wirk- und Arzneistoffe zugeteilt wurde.

Klinisch zugelassene Arzneistoffe mit Benzimidazol-Teilstrukturen finden beispielsweise als Anthelminthika (z. B. Mebendazol), Antiemetika (z. B. Domperidon), Antihypertonika (z. B. Candesartan) und Protonenpumpeninhibitoren (z. B. Omeprazol) Anwendung (Abb. 22).

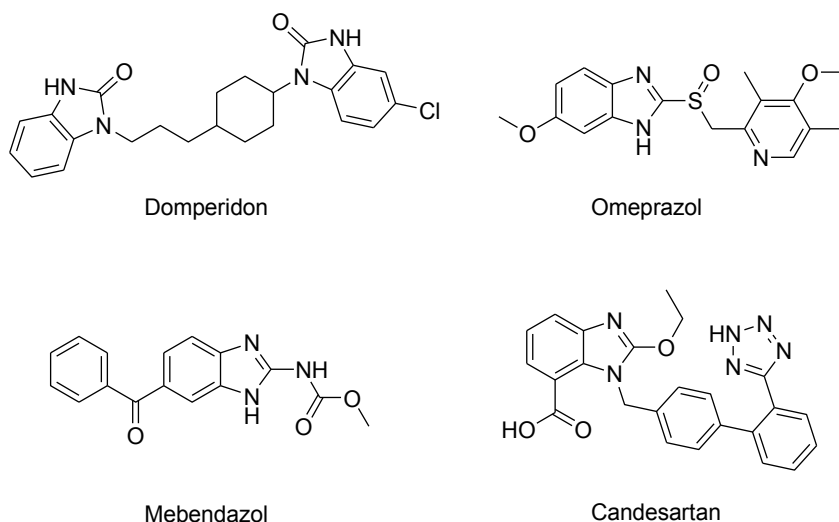
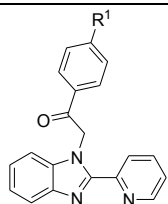


Abbildung 22: Klinisch zugelassene Arzneistoffe mit Benzimidazol-Teilstrukturen.

Aufgrund der Bandbreite an therapeutischen Anwendungen, sind Benzimidazole bis heute vielversprechende Ansatzpunkte in der Arzneistoffentwicklung. In der Literatur sind Wirkstoffe mit Benzimidazol-Teilstruktur zu finden, welche antibakterielle¹⁵⁶⁻¹⁶², antimycobakteriell¹⁶³⁻¹⁶⁴, antivirale¹⁶⁵⁻¹⁶⁷ und tumorhemmende¹⁶⁸⁻¹⁷³ Eigenschaften aufweisen. Es sind außerdem Benzimidazol-Derivate bekannt, die entzündungshemmende¹⁷⁴⁻¹⁷⁵, antidiabetische¹⁷⁶⁻¹⁷⁷, analgetische¹⁷⁵, antiallergische¹⁷⁸ und antioxidantische¹⁷⁹ Eigenschaften aufweisen.

2012 stellte Saify Benzimidazol-Derivate vor, die *in vitro*-Aktivitäten gegenüber asexuellen Blutstadien von *P. falciparum* aufweisen. Vier der Verbindungen inhibieren das Zellwachstum des Parasiten bei einem IC₅₀-Wert $\leq 3 \mu\text{M}$. Die aktivste Verbindung weist einen IC₅₀-Wert von $0.16 \mu\text{M}$ auf (Tab. 13).¹⁸⁰

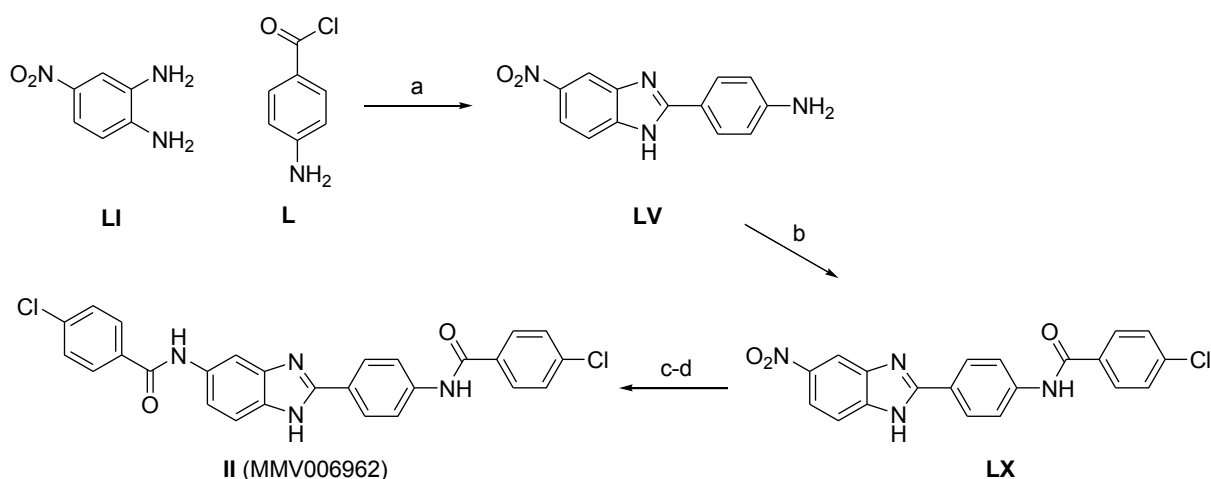
Tabelle 13: Benzimidazole mit *in vitro*-Aktivität gegenüber asexuellen Blutstadien von *P. falciparum*.¹⁸⁰

Struktur	Rest R ¹	IC ₅₀ [μM]
	Cl	0.7
	NO ₂	2.1
	F	3.0
	Ph	0.16 ± 0.4

Zudem sind Benzimidazol-Derivate mit Hemmwirkung weiterer Protozoen bekannt, darunter *Giardia intestinalis*, *Trichomonas vaginalis* und *Entamoeba histolytica*.¹⁸¹⁻¹⁸³

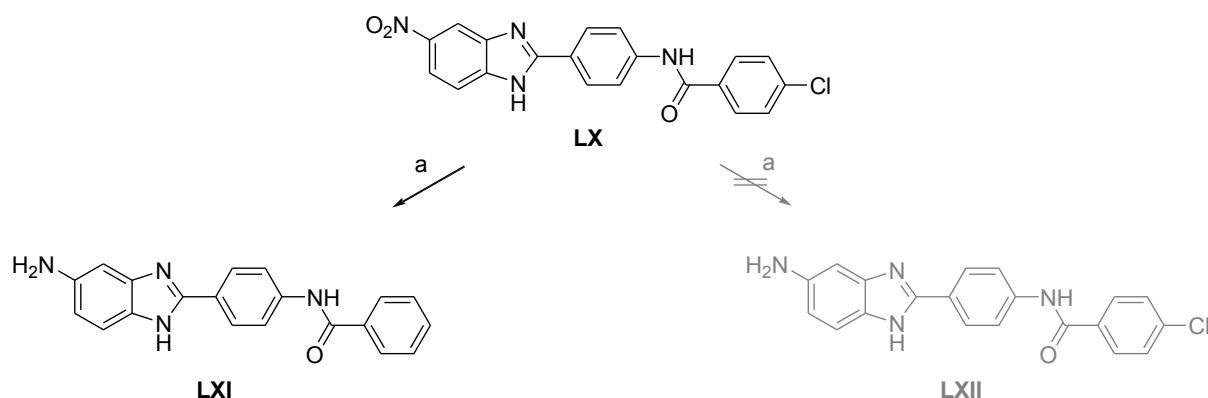
3.5.3. Resynthese der Leitstruktur II (MV006962) und Synthese weiterer Benzimidazol-Derivate

Die Leitstruktur II (MMV006962) wurde 2006 von *Mark L. Richards* et al. synthetisiert und ist somit literaturbekannt (Schema 56).⁴⁴ Sowohl in der Publikation von *Mark L. Richards* als auch in der Malaria Box von MMV wird die Leitstruktur II (MMV006962) als 1*H*-Tautomer dargestellt. Die Darstellung der Leitstruktur II (MMV006962) und der zu synthetisierenden Anaolga in dieser Arbeit richtet sich nach der Originalliteratur⁴⁴ bzw. nach dem in der Malaria Box von MMV zu findenden Original.



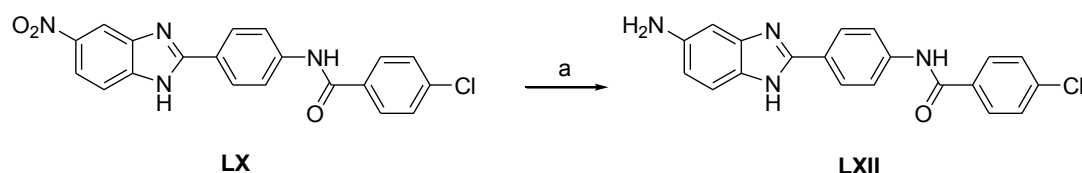
Schema 56: Synthese der Leitstruktur II (MMV006962) nach *Richards* et al.; Reagenzien und Bedingungen: (a) Polyphosphorsäure, Xylen, 150°C, 6 h, 47 %; (b) 4-Chlorbenzoylchlorid, Pyridin, RT, 3 h, 73 %; (c) H₂, 10 % Pd-C, MeOH/THF (8:2), 50°C, 16 h, 95 %; (d) 4-Chlorbenzoylchlorid, THF, Pyridin, RT, 16 h.⁴⁴

Der Aufbau des Benzimidazol-Grundkörpers wurde wie in Schema 56 gezeigt durch eine Kondensationsreaktion von 4-Nitro-1,2-phenyldiamin (**LI**) mit 4-Aminobenzoylchlorid (**L**) durchgeführt. Die Umsetzung des entstandenen Zwischenprodukts **LV** mit 4-Chlorbenzoylchlorid konnte ebenfalls wie dargestellt durchgeführt werden. Bei der anschließenden Hydrierung der Verbindung **LX**, um die Nitrogruppe zu reduzieren, konnte allerdings nicht, wie von *Richards* et al. beschrieben, das erwartete Produkt **LXI** isoliert werden. Stattdessen wurde das Chloratom in para-Position reaktiv abgespalten, sodass *N*-(4-(5-Amino-1*H*-benz[*d*]imidazol-2-yl)phenyl)banzamid (**LXII**) anstelle des gewünschten Produkts **LXI** erhalten wurde (Schema 57).



Schema 57: Syntheseversuch von **LXII**; Reagenzien und Bedingungen: (a) H₂, 5 % Pd-C, MeOH/THF (8:2), RT, 13 h.

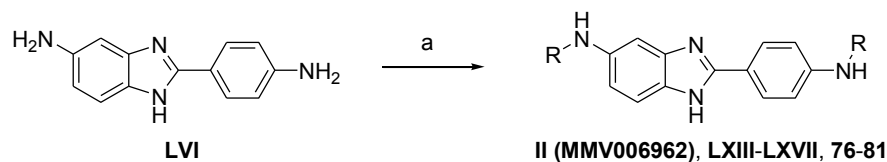
Daher wurde die Nitrogruppe mittels Zinn(II)-chlorid reduziert (Schema 58).¹⁸⁴



Schema 58: Synthese der Zwischenstufe **LXII**; Reagenzien und Bedingungen: (a) SnCl₂·2 H₂O, EtOH, reflux, 4 h, 34 %.¹⁸⁴

Die Umsetzung zum gewünschten Endprodukt **II** (MMV006962) erfolgte wiederum wie in Schema 57 dargestellt nach der Literaturvorschrift von *Richards et al.*

Da die Leitstruktur zwei identische Reste in den Molekülgruppen A und B trägt, sollte die Synthese verkürzt werden. Deshalb wurde nach bekannten Literaturvorschriften das Edukt **LVI** synthetisiert und anschließend mit zwei Äquivalenten 4-Chlorbenzoylchlorid und Pyridin als Hilfsbase zur gewünschten Leitstruktur **II** (MMV006962) umgesetzt (Schema 59). Die Zielverbindungen **LXIII-LXVII** und **76-81** wurden auf identischen Reaktionsweg durch Einsatz entsprechender Benzoylchloride hergestellt (Schema 59).

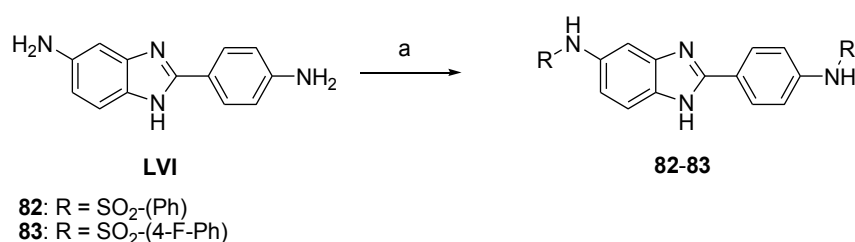


II: R = CO-(4-Cl-Ph)	76: R = CO-(3,4-F-Ph)
LXIII: R = CO-(4-Br-Ph)	77: R = CO-(Chonolin-2-yl)
LXIV: R = CO-(4-F-Ph)	78: R = CO-(Thiophen-2-yl)
LXV: R = CO-(Ph)	79: R = CO-(4- <i>t</i> Bu-Ph)
LXVI: R = CO-(4-OCH ₃ -Ph)	80: R = CO-(4-(O- <i>n</i> Pr)-Ph)
LXVII: R = CO-(CH ₃)	81: R = CO-(COOCH ₂ CH ₃)

Schema 59: Synthese der Leitstruktur **II** (MMV006962) und der Derivate **LXIII-LXVII** und **76-81** mit Carbonsäureamid-Partialstruktur. Reagenzien und Bedingungen: (a) 2.5 eq R(O)Cl, abs. Pyridin, abs. THF, 70 °C, 5 h; 83 % (**II** (MMV006962)), 81 % (**LXIII**), 59 % (**LXIV**), 74 % (**LXV**), 66 % (**LXVI**), 81 % (**LXVII**), 65 % (**76**), 53 % (**77**), 76 % (**78**), 64 % (**79**), 58 % (**80**), 62 % (**81**).

Aufgrund der schlechten Löslichkeit der synthetisierten Endverbindungen in zur chromatographischen Reinigung an Kieselgel verwendeten organischer Lösungsmittel, konnten diese nicht wie beschrieben gereinigt werden. Lösliche Verunreinigungen konnten in den meisten Fällen durch Waschen mit Wasser und Methanol angetrennt oder unter erheblichem Ausbeuteverlust durch Ausfällung der reinen Endverbindung aus einem DMF/Wasser-Gemisch abgetrennt werden.

Neben den gezeigten Zielverbindungen **LXIII-LXVII** und **76-81** mit Carbonsäureamid-Partialstruktur wurden zudem die Derivate **82-83** mit Sulfonamid-Partialstruktur synthetisiert. Dazu wurde **LVI** mit zwei Äquivalenten der entsprechenden Sulfonsäurechlorid umgesetzt (Schema 60).



Schema 60: Synthese der Derivate **82-83** mit Sulfonamid-Partialstruktur. Reagenzien und Bedingungen: (a) 2.5 eq R(SO₂)Cl, abs. Pyridin, abs. THF, 70 °C, 5 h, 34 % (**82**), 38 % (**83**).

3.5.4. Strukturelle Eigenschaften

NMR-spektroskopische Eigenschaften der Leitstruktur II (MMV006962)

Die NMR-spektroskopischen Eigenschaften der Benzimidazole sollen beispielhaft an der Leitstruktur II (MMV006962) erläutert werden. Abbildung 23 zeigt das ^1H -NMR-Spektrum der genannten Substanz in DMSO- d_6 .

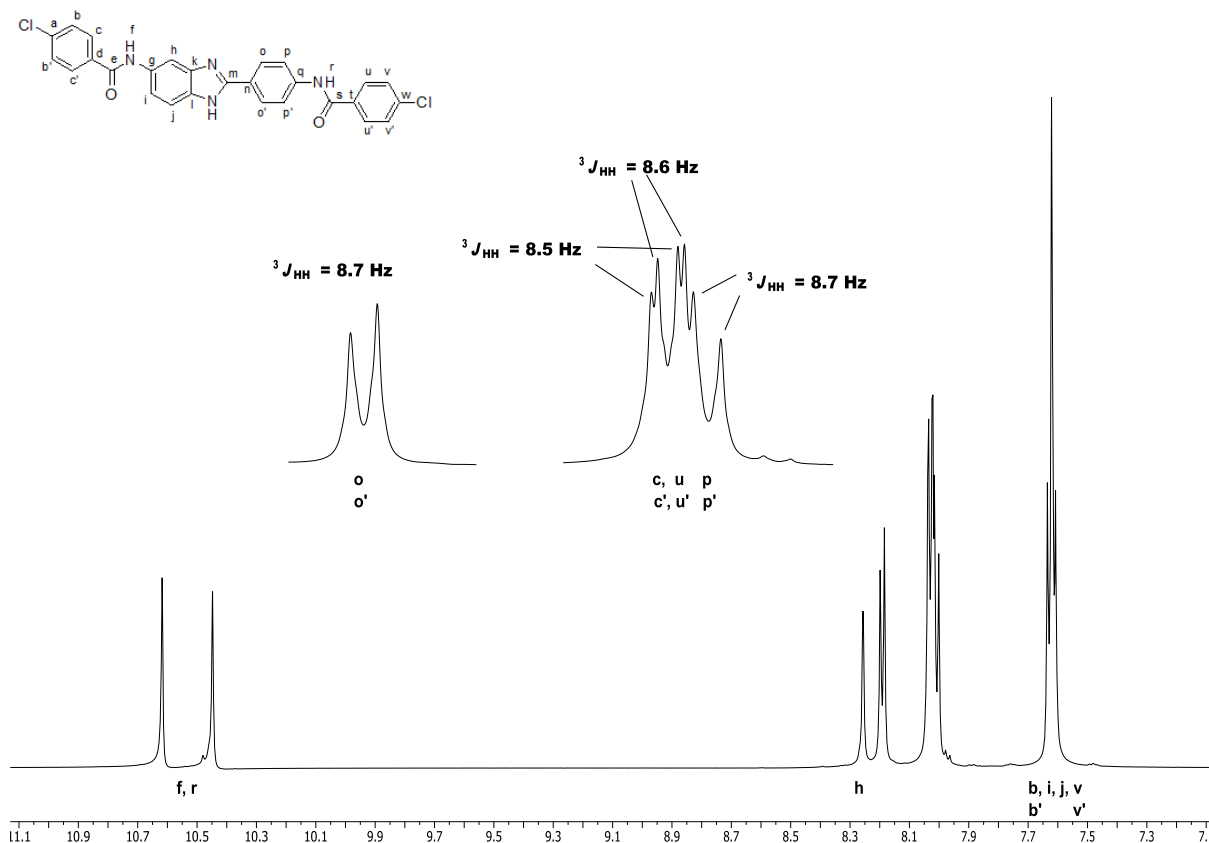


Abbildung 23: ^1H -NMR-Spektrum der Leitstruktur II (MMV006962) in DMSO- d_6 .

Die Leitstruktur II (MMV006962) zeigt, abgesehen von zwei amidischen Protonen, ausschließlich aromatische Protonen auf. Die Signale der Protonen b, b', v und v' in *ortho*-Position zum Chloratom, sowie die zwei Protonen i und j des Benzimidazolgrundgerüsts sind am weitesten ins Hochfeld verschoben, sie weisen ein gemeinsames Multiplett auf. Die Protonen c, p und u weisen drei übereinander liegenden/sich überlagernden Dubletts mit Kopplungskonstanten zwischen 8.5 Hz und 8.7 Hz auf. In dem daraus resultierenden Multiplett am weitesten im Hochfeld liegende Dublett lässt sich anhand der Signalform und –intensität den aromatischen Protonen p und p' zuordnen. Diese weisen eine $^3J_{\text{HH}}$ -Kopplung mit den Protonen o und o' auf. Diese chemisch, aber nicht magnetisch äquivalenten Protonen zeigen somit zwei Dubletts mit identischen Kopplungskonstanten auf, welche zudem einen Dacheffekt aufweisen. Das Proton h des Benzimidazolgrundkörpers resoniert

bei einer chemischen Verschiebung von 8.26 ppm als Singulett. Weiter ins Tieffeld verschoben sind nur die Signale der amidischen Protonen f und r.

In Abbildung 24 ist das ^{13}C -NMR-Spektrum der Leitstruktur II (MMV006962) in DMSO-d6 gezeigt.

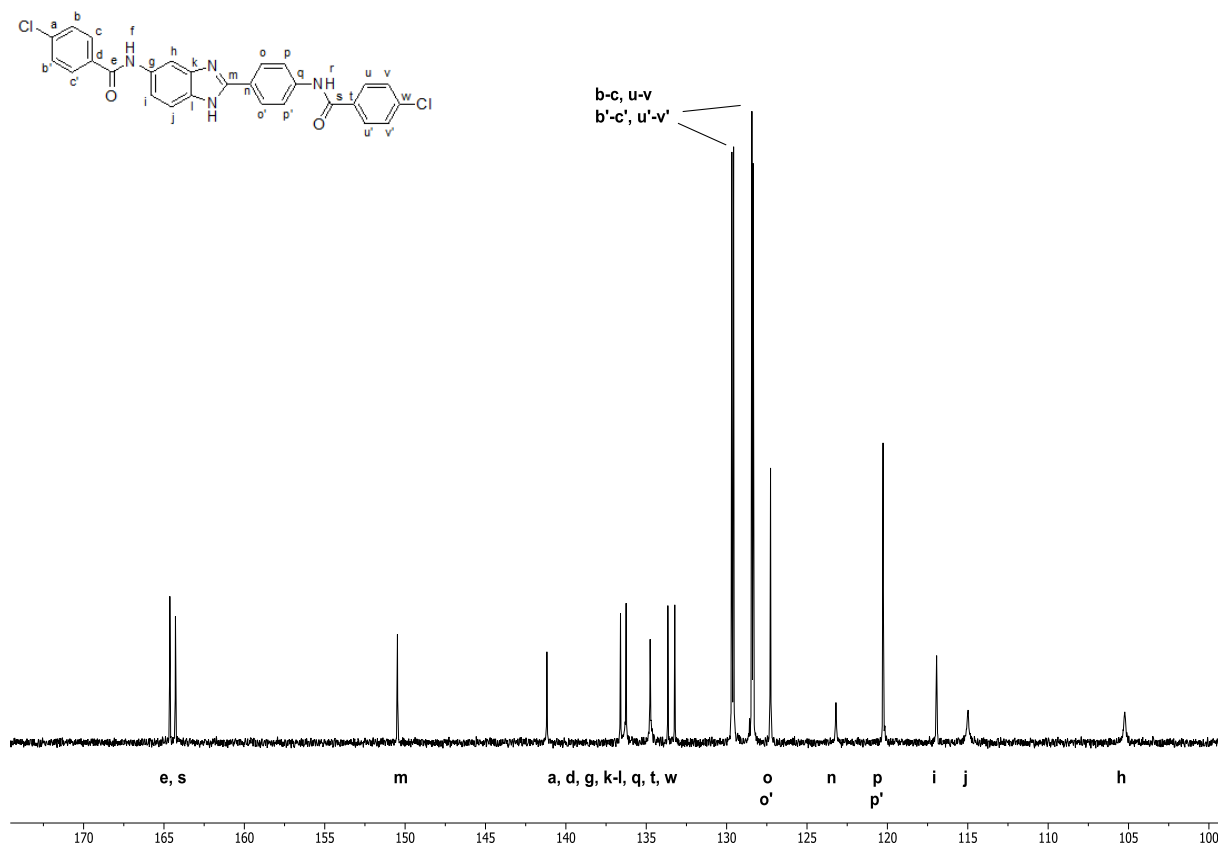


Abbildung 24: ^{13}C NMR-Spektrum der Leitstruktur II (MMV006962) in DMSO-d6.

Die tertiären Kohlenstoffatome h, i und j des Benzimidazolgrundgerüsts weisen die am weitesten ins Hochfeld verschobenen Signale auf. Das quartäre, zu den zwei Stickstoffatomen des Benzimidazolgrundgerüsts direkt benachbarte Kohlenstoffatom ist im Vergleich zu den Signalen der übrigen aromatischen Kohlenstoffe am weitesten ins Tieffeld verschoben.

Eine eindeutige Zuordnung der Signale im Bereich zwischen 128.3 ppm und 141.1 ppm ist mittels dieses ^{13}C -Spektrums nicht möglich.

Um die Signale in diesem Bereich genauer zuordnen zu können und eine detailliertere Strukturaufklärung zu ermöglichen, wurde ein HMBC-Spektrum aufgenommen und ausgewertet. Des Weiteren sollte anhand dieses 2D-Spektrums die bisherige Zuordnung der Signale anhand der 1D-Spektren bestätigt/verifiziert werden.

Im folgenden Spektrenausschnitt sind alle Signale des Spektrums, ausgenommen die amidischen Protonen f und r, zu sehen (Abb. 25). Diese werden, für eine übersichtlichere Darstellung, in Abbildung 26 gezeigt. Das HMBC-Spektrum (Abb. 25) zeigt, dass alle

bisherigen Zuordnungen der Signale mithilfe der 1D-Spektren (Abb. 23, 24) korrekt waren. Die Signale der Kohlenstoffe c, u b, b', v und v' (128.3 bis 129.7 ppm) konnten mittels 1D-Spektroskopie jedoch nicht eindeutig differenziert werden. Die im HMBC-Spektrum erkennbaren C-H-Kopplungen von C(c/c') mit H(b/b'), C(u/u') mit H(v/v'), C(v/v') mit H(u/u') und C(b/b') mit H(c/c') über jeweils zwei Bindungen bestätigt die gezeigte Zuordnung.

Das Kohlenstoffatom mit einer Verschiebung von 134.7 ppm konnte auch mithilfe des HMBC-Spektrums nicht eindeutig zugeordnet werden. Das grau umrandete Kreuzsignal zeigt eine Kopplung mit dem Proton h. Demnach kann es sich um die bisher nicht zugeordneten Kohlenstoffe g, k oder l handeln.

Hingegen konnte gezeigt werden, dass das Kohlenstoffatom q bei einer Verschiebung von 141.1 ppm resoniert. Dies wird durch die Kopplung mit den Protonen p und p' über zwei Bindungen deutlich.

Demnach sind zwei quartäre Kohlenstoffatome von anderen Signalen überlagert oder verschwinden aufgrund zu geringer Konzentration der NMR-Probe im Grundrauschen.

Bei den blau umrandeten Signalen handelt es sich um Kreuzsignale, welche ins Dubletts aufgespalten wurden. Diese zeigen ^1J -Kopplungen zwischen C- und H-Atomen. Im jeweiligen Mittelpunkt der Dubletts kann abgelesen werden, welcher Kohlenstoff und welches Proton an der $^1J_{CH}$ -Kopplung beteiligt sind.

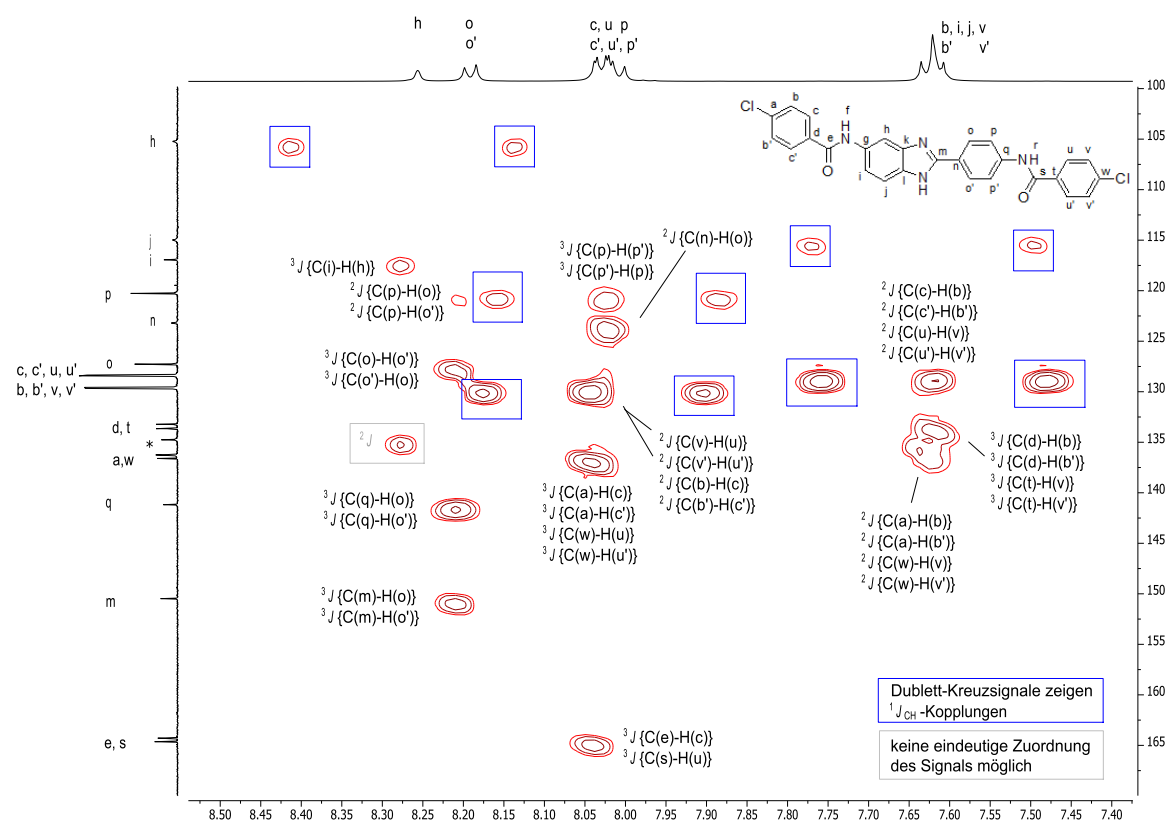


Abbildung 25: Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum der Leitstruktur II (MMV006962) in DMSO-d₆.

Die zwei amidischen Protonen f und r können durch ihre unterschiedliche Anzahl an Kopplungspartnern differenziert werden. Das Proton mit einer chemischen Verschiebung von 10.45 ppm weist $^3J_{\text{CH}}$ -Kopplungen mit C(h) und C(i) sowie $^2J_{\text{CH}}$ -Kopplungen mit C(e) und kann somit eindeutig dem Proton f zugeordnet werden. Das Proton r hingegen koppelt mit den Kohlenstoffatomen p, p' und s über drei bzw. zwei Bindungen.

Anhand der 1D und 2D-NMR-Spektren konnte nicht gezeigt werden, ob die Leitstruktur **II** (MMV006962) in DMSO-d₆ als 1*H*- oder 3*H*-Benzimidazol vorliegt. Daher richtet sich die Darstellung der Benzimidazole in dieser Arbeit ausschließlich nach dem Original aus der Malaria Box von MMV.

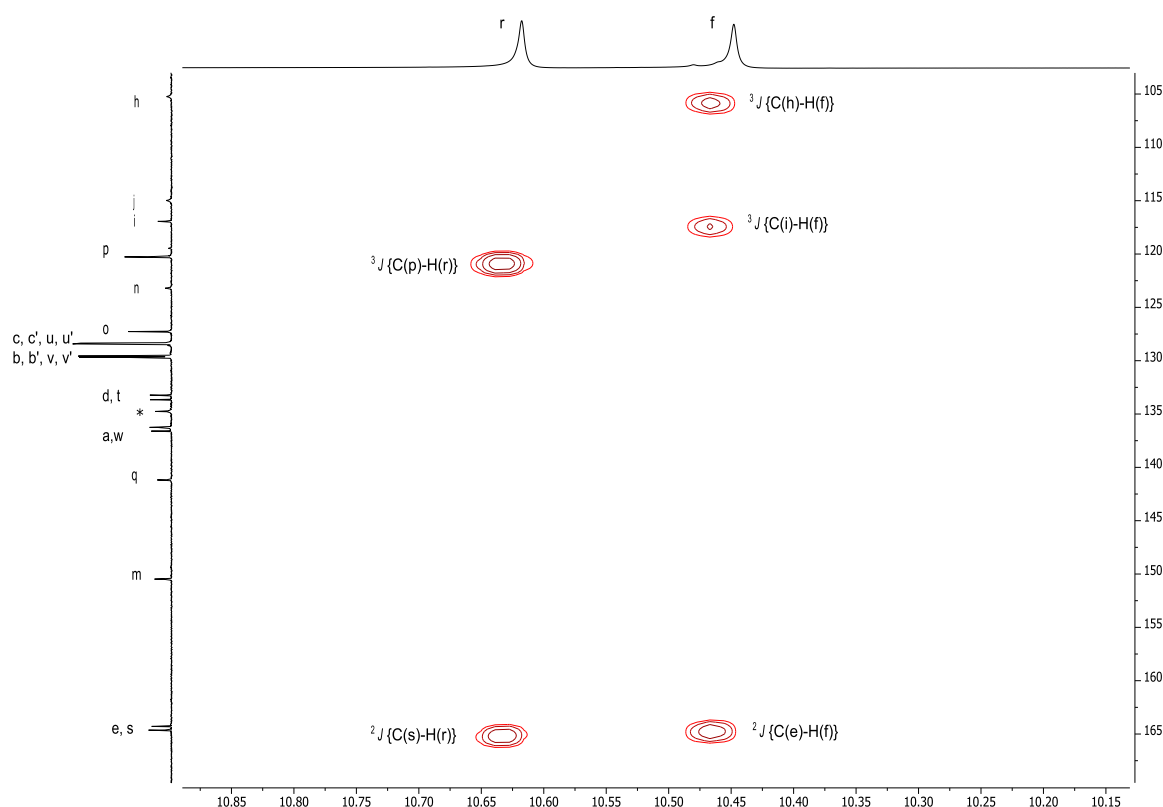


Abbildung 26: Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum der Leitstruktur **II** (MMV006962) in DMSO-d₆.

3.5.5. Biologische Evaluation der Benzimidazol-Derivate

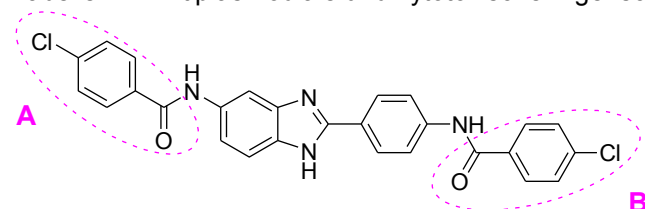
In diesem Kapitel werden die Ergebnisse von phänotyp- und target-basierten Assays, in denen die Benzimidazol-Derivate **LXIII-LXVII** und **76-83** durch die in Kapitel 3.4.10. genannten Kooperationspartner untersucht wurden, vorgestellt und diskutiert (siehe Abb.20 in Kapitel 3.4.10.).

Neben den Evaluation der *in vitro*-Aktivitäten gegenüber asexuellen Blutstadien von *P. falciparum* wurde die *in vitro*-Aktivität gegenüber Leberstadien von *P. berghei* (Referenzsubstanz: Atovaquon) untersucht.

Nach erfolgter Zytotoxizitätsbestimmung ausgewählter Verbindungen gegen HeLa-Zellen wurde zudem ein antiplasmodial aktives und nicht zytotoxisches Derivat einem *in vivo*-Experiment unterzogen.

Die evaluierten *in vitro*-Aktivitäten der Leitstruktur II (MMV006962) sind in Tabelle 14 zusammengefasst. Die Leitstruktur II (MMV006962) weist sowohl eine Aktivität gegenüber asexueller Blutstadien, Leberstadien als auch Gametozyten auf. In dieser Arbeit hat sich die antiplasmodiale Evaluation jedoch auf Aktivitäten der in Molekülregion A und B variierten Verbindungen gegenüber Blut- und Leberstadien beschränkt, welche im Vergleich zu denen der Leitstruktur II (MMV006962) betrachtet und diskutiert werden sollten. Die gametozytozide Aktivität wurde nicht genauer untersucht.

Tabelle 14: Antiplasmodiale und zytotoxische Eigenschaften der Leitstruktur II (MMV006962).



II (MMV006962)	
<i>Pf</i> 3D7 EC ₅₀ [μM] ^a	0.99
<i>Pf</i> 3D7 IC ₅₀ [μM] ^{b,f}	0.24
<i>Pf</i> Dd2 IC ₅₀ [μM] ^{b,f}	0.091
<i>Pf</i> Dxr IC ₅₀ [μM] ^{c,g}	66 ± 6.0
<i>Pb</i> EEF IC ₅₀ [μM] ^d	0.093
HepG2 IC ₅₀ [μM] ^d	1.6
MRC-5 IC ₅₀ [μM] ^a	> 32
HeLa IC ₅₀ [μM] ^b	19
<i>Pf</i> LSG IC ₅₀ [μM] ^e	3.0

^aVon MMV im Vorfeld dieser Arbeit zur Verfügung gestellte Daten; ^bIn Arbeitsgruppe von Benjamin Mordmüller (Eberhard Karls Universität Tübingen) im Rahmen dieser Arbeit evaluierte Daten; ^cIn der Arbeitsgruppe von Markus Fischer (Universität Hamburg) im Rahmen dieser Arbeit evaluierte Daten; ^dIn der Arbeitsgruppe von Elizabeth Winzeler (Genomics Institute of the Novartis Research Foundation) im Rahmen dieser Arbeit evaluierte Daten; ^eIn der Arbeitsgruppe von Vicky Avery (Griffith University Nathan) im Rahmen dieser Arbeit evaluierte Daten; ^fMittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Doppelbestimmungen; ^gMittelwerte ± Standardabweichung aus nichtlinearer Regression aus 3-9 Messpunkten.⁴⁵⁻⁴⁶

Analoge der Leitstruktur II (MMV006962) mit variierten Molekülregionen A und B

Die Ergebnisse des Zellkultur- und des Enzym-Assays von den im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Benzimidazolen, sind in Tabelle 15 zusammengefasst. Es wurden

ausschließlich Benzimidazole mit identischen Resten R in Molekülregion A und B synthetisiert. Hierbei handelte es sich um Carbonsäure- (**LXIII-LXVII**, **76-81**) oder Sulfonamide (**82-83**).

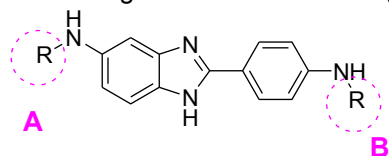
Im folgenden Abschnitt sollen zunächst die Ergebnisse der biologischen Evaluation von den Carbonsäureamid-Derivaten betrachtet werden, angefangen mit elektronenziehenden Substituenten. Durch Austausch der 4-Chlorphenyl-Substituenten der Leitstruktur **II** (MMV006962) gegen 4-Fluorphenyl-Substituenten wurde die Hemmwirkung gegenüber dem *P. falciparum* 3D7-Stamm geringer (**LXIV**, *Pf*3D7 IC_{50} = 0.62 μ M). Ein 4- Bromphenyl-Substituent an genannter Position hingegen konnte eine deutliche Steigerung der Hemmwirkung gegenüber *Pf*3D7 erzielen (**LXIII**, *Pf*3D7 IC_{50} = 0.063 μ M). Die antiplasmodiale Aktivität steigt demnach mit wachsender Größe der Halogenatome in *para*-Position der Phenylringe (F<Cl<Br). Eine 3,4-Difluorphenyl-Substitution (**76**) hingegen führte zu einer Verringerung der Aktivität.

Durch Einführung von elektronenschiebenden Substituenten konnte die stärkste antiplasmodiale Hemmwirkung erzielt werden. Der Inhibitor **80** zeigt im Zellkulturassay eine Hemmwirkung gegenüber dem *P. falciparum* 3D7-Stamm im niedrigen, zweistellig nanomolaren Bereich (*Pf*3D7 IC_{50} = 0.019 μ M) und trägt sowohl in Region A, als auch in Region B einen 4-(*n*-Propoxy)phenyl-Substituenten. Verglichen mit der Leitstruktur **II** (MMV006962) konnte somit der IC_{50} -Wert gegenüber *P. falciparum* 3D7 um den Faktor 13 verringert werden. 4-*Tert*butylphenyl-Substitution in Molekülregion A und B zeigt ebenfalls Aktivität gegenüber *P. falciparum* 3D7 im zweistelligen nanomolaren Bereich auf (*Pf*3D7 IC_{50} = 0.09 μ M). Weitere elektronenschiebende Gruppen {Phenyl- (**LXV**), 4-Methoxyphenyl-Substituenten (**LXVI**)} zeigen, verglichen mit der Leitstruktur **II** (MMV006962), keine Steigerung der Aktivität gegenüber *P. falciparum* 3D7 {*Pf*3D7 IC_{50} = 0.47 μ M (**LXV**); *Pf*3D7 IC_{50} = 0.65 μ M (**LXVI**)}.

Die Einführung heteroaromatischer Substituenten hatte ebenfalls unterschiedliche Einflüsse auf die antiplasmodiale Hemmwirkung. Im Vergleich mit der Leitstruktur **II** (MMV006962) führte ein Chinolin-2-yl-Substituent zu einer Aktivitätssteigerung gegenüber den *P. falciparum* Stämmen 3D7 und Dd2 {*Pf*3D7 IC_{50} = 0.11 μ M; *Pf*Dd2 IC_{50} = 0.065 μ M (**77**)}, ein Thien-2-yl-Substituent hingegen zu einer Aktivitätsminderung gegenüber *P. falciparum* 3D7 {*Pf*3D7 IC_{50} = 0.66 μ M (**74**)}.

Die Einführung aliphatischer Strukturelemente (**LXVII**, **81**) führte zu Aktivitätsverlust sowohl gegenüber *P. falciparum* 3D7 als auch *P. falciparum* Dd2. Ebenso ergibt sich durch Austausch der Carbonsäureamid- gegen eine Sulfonamid-Partialstruktur (**82**, **83**) ein Aktivitätsverlust (Tab. 15).

Tabelle 15.: *In vitro*-Aktivitäten der Benzimidazol-Derivate **LXIII-LXVII** und **76-83** mit variierten Molekülregionen A und B im Vergleich mit der Leitstruktur **II** (MMV006962).



	R	<i>Pf</i> 3D7 IC ₅₀ [μM] ^a	<i>Pf</i> Dd2 IC ₅₀ [μM] ^a	<i>Pf</i> Dxr IC ₅₀ [μM] ^b
II (MMV006962)	CO-(4-Cl-Ph)	0.24	0.091	66 ± 6
LXIII	CO-(4-Br-Ph)	0.063	n.b.	83 ± 14
LXIV	CO-(4-F-Ph)	2.4	n.b.	34 ± 4.0
76	CO-(3,4-F-Ph)	0.62	n.b.	181 ± 4.0
77	CO-(Chinolin-2-yl)	0.11	0.065	213 ± 1.0
78	CO-(Thien-2-yl)	0.66	n.b.	> 500
LXV	CO-(Ph)	0.47	1.7	> 500
79	CO-(4- <i>t</i> Bu-Ph)	0.09	n.b.	122 ± 18
LXVI	CO-(4-OCH ₃ -Ph)	0.65	n.b.	> 500
80	CO-(4-(O- <i>n</i> Pr)-Ph)	0.019	0.039	> 500
LXVII	CO-(CH ₃)	> 13	> 13	300 ± 70
81	CO-(COOCH ₂ CH ₃)	> 13	> 13	> 500
82	SO ₂ -(Ph)	> 13	> 13	139 ± 60
83	SO ₂ -(4-F-Ph)	> 13	> 13	80 ± 8.0

^aMittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Doppelbestimmungen; ^bMittelwerte +/- Standardabweichung aus nichtlinearer Regression aus 3-9 Messpunkten;⁴⁵⁻⁴⁶ n.b. = nicht bestimmt.

Bei Vergleich der IC₅₀-Werte gegenüber *Pf*Dxr-Inhibition mit denen gegenüber *Pf*3D7 ist keine Korrelation zwischen diesen Werten erkennbar. Zudem kann man durch Betrachtung der einzelnen *Pf*Dxr IC₅₀-Werte der Inhibitoren feststellen, dass eine Aussage über Struktur-Wirkungs-Beziehungen nicht möglich ist.

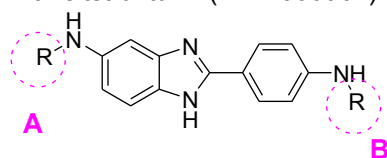
Die IC₅₀-Werte der *Pf*Dxr-Inhibition sind ein bis vier Zehnerpotenzen größer, als die der *P. falciparum*-Wachstumshemmung und liegen im zwei- bis dreistelligen mikromolaren Bereich. Demnach ist die *Pf*Dxr-Inhibition der Leitstruktur **II** (MMV006962), wie auch bei allen synthetisierten Analoga, deutlich geringer als die *Pf*3D7-Wachstumshemmung. Die Inhibitoren **78**, **LXV**, **LXVI** und **81** können mit einem IC₅₀-Werte von > 500 μM als inaktiv gegenüber *Pf*Dxr angesehen werden. Ebenfalls Inhibitor **80** mit der besten Hemmwirkung gegenüber *Pf*3D7 (IC₅₀ = 0.019 μM) weist keine Aktivität gegenüber *Pf*Dxr (IC₅₀ > 500 μM) auf.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass es sich bei der untersuchten Substanzklasse nicht ausschließlich um *Pf*Dxr-Inhibitoren handeln kann bzw. *Pf*Dxr nicht das alleinige Target dieser Inhibitoren sein kann (Tab. 15).

Wie bereits bei der Bestimmung der *Pf*Dxr-Inhibition der Pyrrolopyrazol-Derivate wurde hier ebenso beobachtet, dass nach Zugabe der in DMSO gelösten Inhibitoren ab Substanzkonzentrationen von 120 μM zu der Assay-Pufferlösung sich fast ausnahmslos Niederschläge bildeten. Eine Erklärung hierfür könnte die schlechte Wasserlöslichkeit der getesteten Verbindungen sein, welche aus Zeitgründen in dieser Arbeit nicht mehr optimiert werden konnte.

Von den Inhibitoren **79** und **80** mit der stärksten Wachstumshemmung gegenüber *Pf*3D7 wurde zudem die Zytotoxizität gegenüber HeLa-Zellen bestimmt (Tab. 16). Die Inhibitoren zeigen erst bei hohen Konzentrationen {(HeLa IC_{50} = 39 μM (**79**); HeLa IC_{50} > 125 μM (**80**)} zytotoxische Effekte gegenüber der getesteten Zelllinie HeLa. Die Verbindung **80** weist einen auf den *Plasmodium falciparum*-Stamm 3D7 bezogenen Selektivitätsindex von mehr als 6579 auf. Dies entspricht, verglichen mit der Leitstruktur **II** (MMV006962), einer 84-fach erhöhten Selektivität.

Tabelle 16.: Zytotoxizitäts- und Selektivitätsdaten der Benzimidazol-Derivate **79** und **81** im Vergleich mit Leitstruktur **II** (MMV006962).



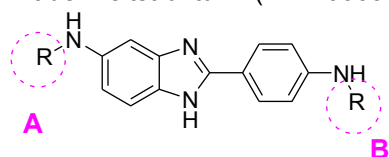
	R	HeLa IC_{50} [μM]	<i>Pf</i> 3D7 IC_{50} [μM] ^a	HeLa IC_{50} / <i>Pf</i> 3D7 IC_{50} ^b
II (MMV006962)	CO-(4-Cl-Ph)	19	0.24	78
79	CO-(4- <i>t</i> Bu-Ph)	39	0.09	442
80	CO-(4-(O- <i>n</i> Pr)-Ph)	> 125	0.019	> 6579

^aMittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Doppelbestimmungen; ^bSelektivitätsindizes wurden unter Verwendung ungerundeter IC_{50} -Werte berechnet.

Da die Leitstruktur **II** (MMV006962) eine duale Aktivität gegenüber asexuellen Blutstadien und Leberstadien aufweist, wurde von einigen ausgewählten Analoga neben ihrer Aktivität gegenüber asexueller Blutstadien von *P. falciparum* ebenso ihre Aktivität gegenüber Leberstadien von *P. berghei* evaluiert. Im Zuge dieser Untersuchung wurde zudem die Zytotoxizität der ausgewählten Benzimidazole gegenüber HepG2-Zellen bestimmt und die auf die *P. berghei*-Leberstadien bezogenen Selektivitätsindizes berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 17 zusammengefasst. Die 3,4-Difluorphenyl- und 4-*tert*-Butylphenyl-substituierten Benzimidazol-Derivate **76** und **79** weisen im Vergleich zur Leitstruktur

II (MMV006962) eine drei- bzw. achtfach gesteigerte Aktivität gegenüber *PbEEF*, wobei bei Verbindung **76** zudem eine mehr als fünffache Verbesserung der Selektivität zu beobachten ist. Hingegen ist Inhibitor **80**, welcher die stärkste Aktivität gegenüber asexueller Blutstadien aufweist, inaktiv gegenüber hepatozytärer Stadien (*PbEEF* IC₅₀ > 50 µM). Ebenso Inhibitoren **77** und **LXVII** sind als inaktiv gegenüber Leberstadien anzusehen, wobei **LXVII** zudem besonders zytotoxisch gegenüber HepG2-Zellen (*PbEEF* IC₅₀ = 0.00036 µM) wirkt. Inhibitor **82** mit Sulfonamid-Partialstruktur weist mit einem IC₅₀-Wert von 16 µM eine nur schwache Aktivität gegenüber *PbEEF* auf.

Tabelle 17: Aktivität der synthetisierten Derivate gegenüber Leberstadien von *P. berghei* im Vergleich mit der Leitstruktur **II** (MMV006962).



	R	<i>PbEEF</i> IC ₅₀ [µM]	HepG2 IC ₅₀ [µM]	HepG2 IC ₅₀ / <i>PbEEF</i> IC ₅₀ ^a
II (MMV006962)	CO-(4-Cl-Ph)	0.093	1.6	17
76	CO-(3,4-F-Ph)	0.011	1.0	94
77	CO-(Chinolin-2-yl)	> 50	> 50	n.b.
78	CO-(Thien-2-yl)	0.54	2.4	4.3
79	CO-(4- <i>t</i> Bu-Ph)	0.028	0.053	1.9
LXVI	CO-(4-OCH ₃ -Ph)	0.17	5.4	32
80	CO-(4-(O- <i>n</i> Pr)-Ph)	> 50	> 50	n.b.
LXVII	CO-(CH ₃)	> 50	0.00036	< 0.0000072
82	SO ₂ -(Ph)	16	27	1.7

^aSelektivitätsindizes wurden unter Verwendung ungerundeter IC₅₀-Werte berechnet; n.b. = nicht bestimmt.

Das Benzimidazol **80**, welches die stärkste Hemmwirkung *in vitro* gegenüber dem *P. falciparum*-Stamm 3D7 (*Pf*3D7 IC₅₀ = 0.019 µM) und die geringste zytotoxische Wirkung gegenüber HeLa-Zellen aufweist (HeLa IC₅₀ > 125 µM), wurde zudem für ein *in vivo*-Experiment ausgewählt (Tab. 18).

An vier aufeinander folgenden Tagen wurde mit *P. berghei* infizierten Mäusen jeweils 50 mg pro kg Körpergewicht des potentiellen Wirkstoffs verabreicht. In einer Behandlungsgruppe erfolgte die Applikation *per oral* (*p. o.*), in der anderen *intraperitoneal* (*i. p.*). Ebenso wie bei dem in Kapitel 3.5.5. vorgestellten *in vivo*-Experiment konnte unabhängig von der Art der Verabreichung durch die Behandlung keine Reduktion der Parasitämie erreicht werden. Die

Mäuse überlebten daher nicht länger als diejenige, die keiner Behandlung unterzogen wurden (Kontrolle).

Tabelle 18.: antiplasmodiale *in vivo*-Aktivität des Benzimidazol-Derivats **80**.

	Parasitierte Erythrozyten [%] ^b	Aktivität [%]	Überlebenszeit [Tage]
Kontrolle	58	0	4
80 (p. o.)	56	3.41	4
80 (i. p.)	68	-17.22	4

Die *in vivo*-untersuchte Verbindung **80** weist einen kalkulierten AlogP-Wert von 6.55 auf. Zudem handelt es sich bei dem Benzimidazol-Derivat **80** um ein großes Molekül mit einem Molekulargewicht von 548.63 g/mol. Löslichkeitsexperimente haben ergeben, dass das Benzimidazol-Derivat **80** in Wasser schwerlöslich ist, wodurch eine Resorption erschwert oder sogar verhindert kann. Durch die hohe Lipophilie der Verbindung **80** ist eine Membranpermeation nur bedingt möglich. Somit kann der potentielle Wirkstoff möglicherweise nicht an den Wirkort gelangen. Die Wasserlöslichkeit der Benzimidazol-Derivate konnte im Rahmen dieser Arbeit aus Zeitgründen nicht mehr optimiert werden.

3.6. Zusammenfassung

Das erste Projekt der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit Modifikationen der Leitstrukturen **1** (MMV396717) und **II** (MMV006962) aus der Malaria Box von Medicines for Malaria Venture (MMV), welche im Vorfeld dieser Arbeit mithilfe eines Target-basierten Screenings gegenüber *PfDxr* als Leitstrukturen ausgewählt wurden.

Aus ca. 20 000 antiplasmodial wirksamen Substanzen, welche durch die Forschungseinrichtungen des Genomics Institute of the Novartis Research Foundation (GNF), GlaxoSmithKline (GSK) und St. Jude Children's Research Hospital veröffentlicht wurden, stellte MMV unter Berücksichtigung weiterer Faktoren wie physikochemischer Eigenschaften, kommerzieller Verfügbarkeit, chemischer Diversität und Zytotoxizität eine Bibliothek aus 400 Substanzen zusammen, die Malaria Box. MMV verfolgt hierbei das Ziel, die Malaria-Wirkstoffforschung voranzutreiben, weshalb die Malaria Box von Forschungsgruppen kostenfrei angefordert werden kann.

Mithilfe eines *PfDxr*-Screenings der 400 Substanzen aus der Malaria Box, welches von der Arbeitsgruppe *Fischer* durchgeführt wurde, konnten zwei moderate *PfDxr*-Inhibitoren mit IC_{50} -Werten unter 100 μ M identifiziert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden diese zwei gezeigten Ausgangsverbindungen **1** (MMV396717) und **II** (MMV006962), ein Pyrrolopyrazol- und ein Benzimidazol-Derivat, durch Strukturoptimierungen in mehreren Molekülregionen weiterentwickelt (Abb. 27). Dadurch konnten erste Einblicke in Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von Pyrrolopyrazolen und Benzimidazolen ermöglicht werden.

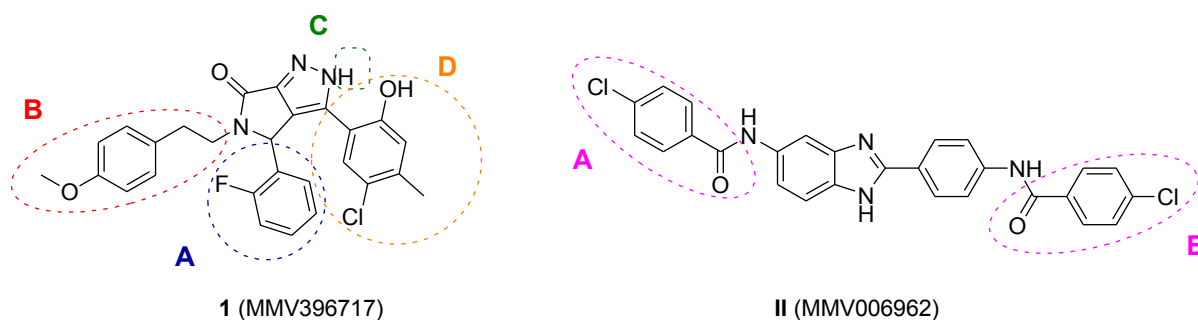
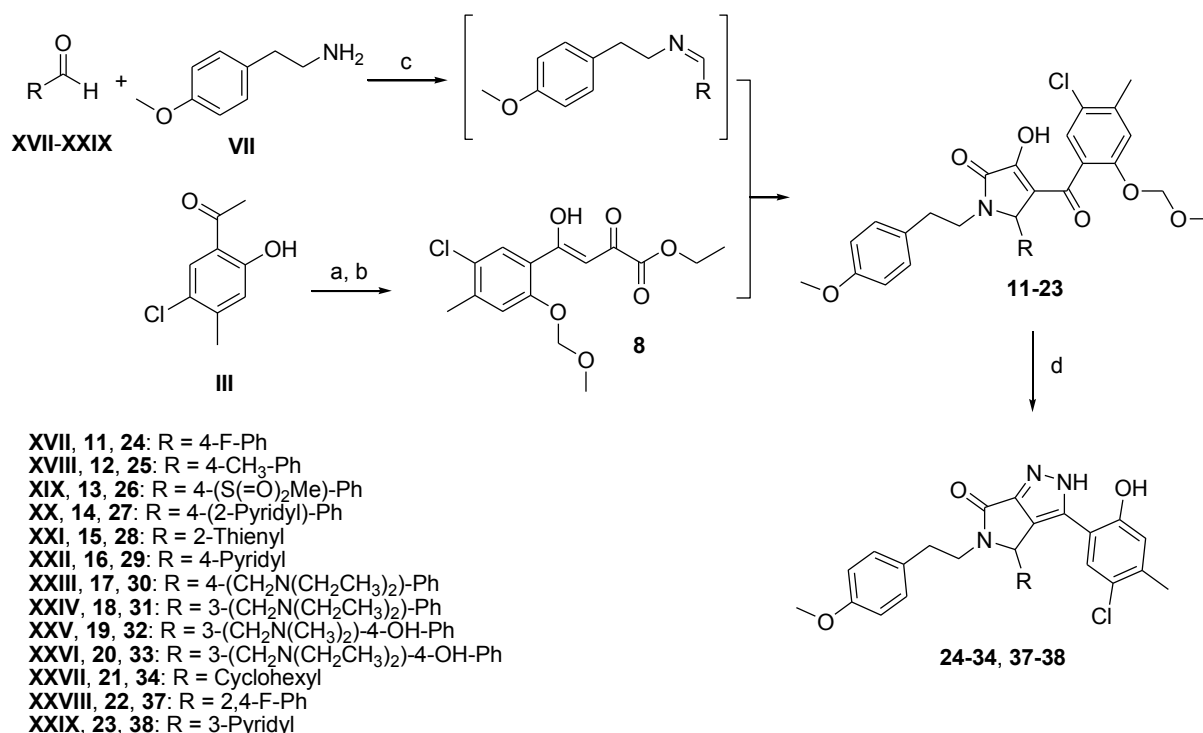


Abbildung 27: Leitstrukturen **1** (MMV396717) und **II** (MMV006962).

Durch Austausch verschiedener Substituenten der Leitstruktur **1** (MMV396717) konnten Änderungen der Lipophilie sowie der elektronischen und sterischen Eigenschaften des Moleküls herbeigeführt werden. Verbindungen mit basisch substituierten Phenyl-Substituenten in Molekülregion A erwiesen sich als die aktivsten *P. falciparum*-Inhibitoren mit IC₅₀-Werten gegenüber dem Chloroquin-sensitiven *P. falciparum*-Stamm 3D7 und dem multiresistenten *P. falciparum*-Stamm Dd2 im niedrigen, zweistellig nanomolaren Bereich. Die Syntheseroute der Pyrrolopyrazole mit modifizierter Molekülregion A ist in Schema 61 gezeigt.



Schema 61: Syntheseroute von Pyrrolopyrazolen mit modifizierter Molekülregion A; Reagenzien und Bedingungen: (a) NaH 60 % in Mineralöl, abs. DMF, 0 °C → RT, 30 min; MOMCl, 0 °C → RT, 1 h; (b) NaH 60 % in Mineralöl, abs. Toluol, 70 °C, 10 min → Diethyloxalat, reflux, 30 min; (c) EtOH, kat. AcOH, RT, 12 h; (d) N₂H₄·H₂O, konz. AcOH, reflux, 1 h → kat. konz. H₂SO₄, reflux, 30 min (**24-34**) oder: 1. N₂H₄·H₂O, konz. AcOH, reflux, 1 h; 2. TFA, DCM, RT, 12 h (**37-38**).

Das optimierte Derivat **33** (Abb. 28) trägt in Molekülregion A einen 3-((Diethylamino)methyl)-4-hydroxyphenyl-Substituenten und zeigt potente Wachstums-Inhibition gegenüber dem Chloroquin-sensitiven *P. falciparum*-Stamm 3D7 und dem multiresistenten *P. falciparum*-Stamm PfDd2 (Pf3D7 IC₅₀ = 0.012 µM; PfDd2 IC₅₀ = 0.023 µM).

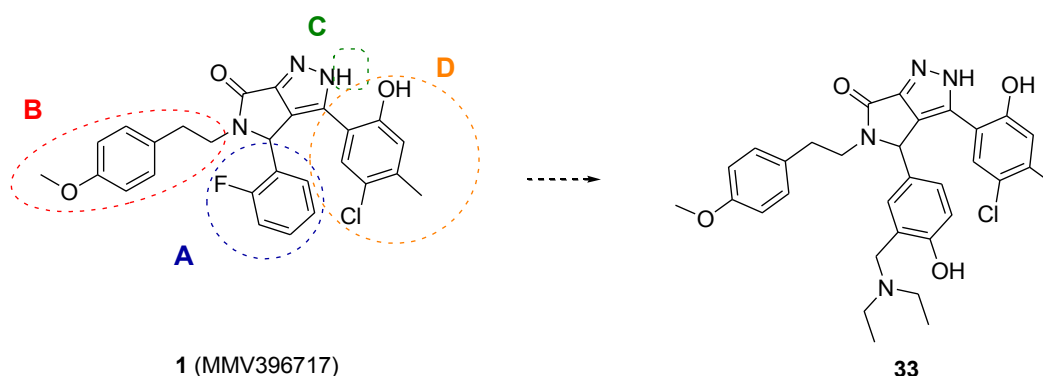


Abbildung 28: Leitstruktur **1** (MMV396717) und Derivat **33** mit variiertem Molekülregion A.

Somit weist **33** eine bis zu zwanzigmal stärkere antiplasmodiale Aktivität auf als die Leitstruktur **1** (MMV396717; Pf3D7 IC₅₀ = 2.6 µM; PfDd2 IC₅₀ = 2.0 µM). Die PfDxr-Inhibition durch **33** ist mit einem IC₅₀-Wert von 20 ± 3.0 µM mit derjenigen der Leitstruktur **1** (MMV396717) vergleichbar. Zudem zeigt **33** im Vergleich mit der Leitstruktur **1** (MMV396717) eine deutlich reduzierte Zytotoxizität gegenüber HeLa-Zellen (Tab. 19). Die

IC₅₀-Werte der *Pf*Dxr-Inhibition von Verbindung **33** und den synthetisierten Analoga zeigen deutlich, dass die *Pf*Dxr-Inhibition nur wenig zur antiplasmodialen Wirkung beiträgt.

Tabelle 19: antiplasmodiale und zytotoxische Eigenschaften der Leitstruktur **1** (MMV396717) und Derivat **33**.

	1 (MMV396717)	33
R ¹	2-F-Ph	3-(CH ₂ N(CH ₂ CH ₃) ₂)-4-OH-Ph
<i>Pf</i> 3D7 IC ₅₀ [μM] ^a	2.6	0.012
<i>Pf</i> Dd2 IC ₅₀ [μM] ^a	2.0	0.023
<i>Pf</i> Dxr IC ₅₀ [μM] ^b	23 ± 4.0	20 ± 3.0
HeLa IC ₅₀ [μM]	30	> 125

^aMittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Doppelbestimmungen. ^bMittelwerte +/- Standardabweichung aus nichtlinearer Regression aus 3-9 Messpunkten.⁴⁵⁻⁴⁶

Mittels Röntgenstrukturanalyse der Leitstruktur **1** (MMV396717) und Derivat **33** konnte belegt werden, dass der Pyrrolopyrazol-Grundkörper dieser Verbindungen im kristallinen Zustand als *2H*-Tautomer vorliegt (Abb. 29).

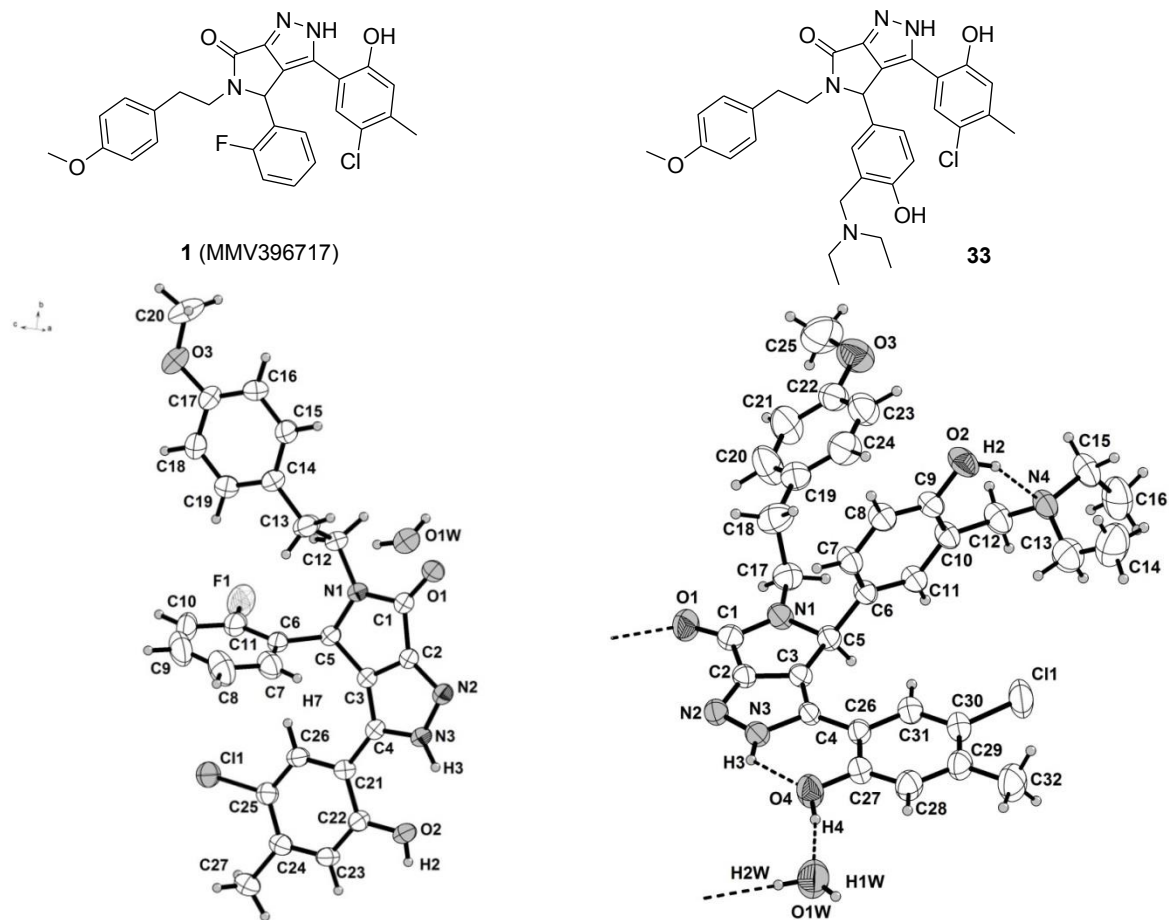


Abbildung 29: Röntgendiffraktometrische Strukturanalyse, asymmetrische Einheit; *links*: Leitstruktur **1** (MMV396717), *rechts*: Verbindung **33**.

Durch Austausch der 4-Chlorphenyl-Substituenten in Molekülregionen A und B der Leitstruktur **II** (MMV006962) konnten Änderungen der sterischen und elektronischen Eigenschaften herbeigeführt werden. Sterisch anspruchsvolle Substituenten führten zu den aktivsten Verbindungen **76** und **80** gegenüber *P. falciparum* (Abb. 30).

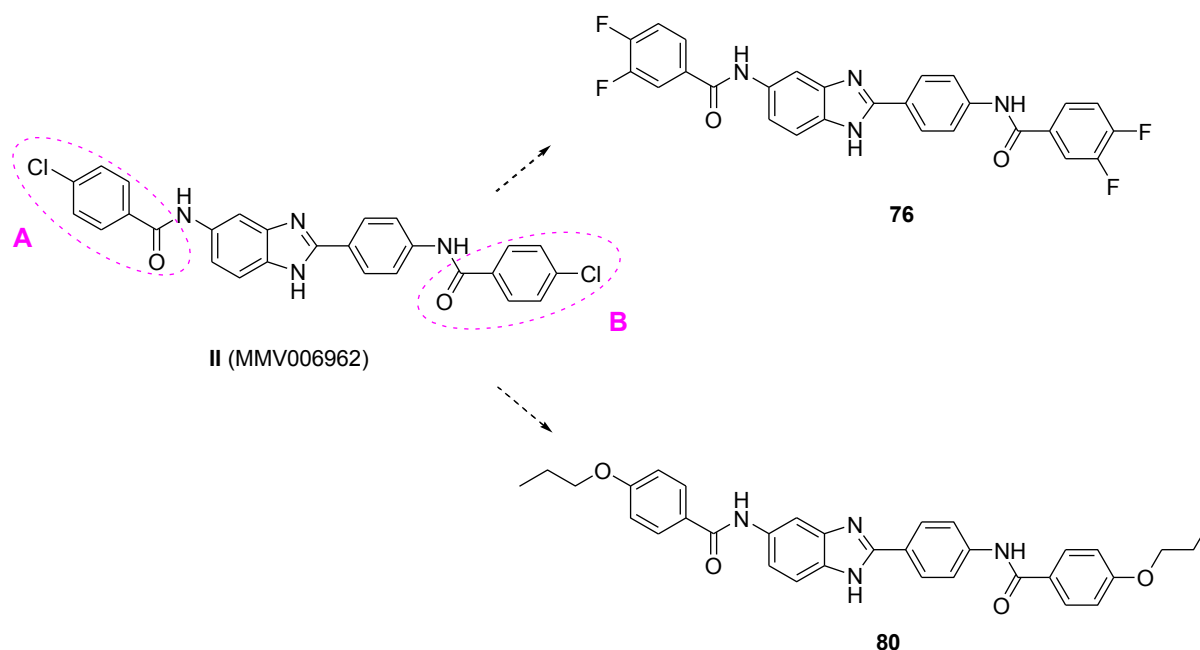


Abbildung 30: Leitstruktur **II** (MMV006962) und die aktivsten Analoga **76** und **80** gegenüber *P. falciparum* mit variierten Molekülregionen A und B.

Derivat **76**, welches 3,4-Difluorphenyl-Substituenten in Molekülregion A und B trägt, weist gegenüber der Leitstruktur **II** (MMV006962) eine leicht verringerte Aktivität gegenüber asexuellen Blutstadien des Chloroquin-sensitiven *P. falciparum*-Stamm 3D7 auf (*Pf*3D7 IC_{50} = 0.62 μ M (**76**); *Pf*3D7 IC_{50} = 0.25 μ M (**II** (MMV006962))) auf. Jedoch konnte die Wirksamkeit gegen *P. berghei*-Leberstadien deutlich verbessert werden (*Pb*EEF IC_{50} = 0.011 μ M (**76**); *Pb*EEF IC_{50} = 0.093 μ M (**II** (MMV006962))).

Die auf die IC_{50} -Werte der Inhibition von *Plasmodium berghei* und HepG2-Zelllinien bezogene Selektivität des Inhibitors **76** ist zudem, verglichen mit der Selektivität der Leitstruktur **II** (MMV006962), um mehr als das Fünffache höher (Tab. 20). Anhand der IC_{50} -Werte wird deutlich, dass Derivat **76** duale Aktivität gegenüber asexueller Blutstadien und Leberstadien aufweist (Tab. 20). Das Derivat **80**, welches 4-(*n*-Propoxy)phenyl-Substituenten trägt, weist die beste Aktivität gegenüber asexuellen Blutstadien auf (Tab. 20). Gegenüber *P. berghei*-Leberstadien ist die Verbindung **80** inaktiv und weist demnach keine duale Aktivität auf. Bei Betrachtung der IC_{50} -Werte gegenüber *Pf*Dxr wird auch hier deutlich, dass es sich bei den Benzimidazol-Derivaten nicht ausschließlich um *Pf*Dxr-Inhibitoren handeln kann.

Tabelle 20: antiplasmodiale und zytotoxische Eigenschaften der Leitstruktur **II** (MMV006962) und Derivate **76** und **80**.

	II (MMV006962)	76	80
<i>Pf</i> 3D7 IC ₅₀ [μM] ^a	0.25	0.62	0.019
<i>Pf</i> Dd2 IC ₅₀ [μM] ^a	0.091	n.b.	0.039
<i>Pf</i> Dxr IC ₅₀ [μM] ^b	66 ± 6.0	181 ± 4.0	> 500
<i>Pb</i> EEF IC ₅₀ [μM]	0.093	0.011	> 50
HepG2 IC ₅₀ [μM]	1.6	1.0	> 50
HepG2 IC ₅₀ / <i>Pb</i> EEF IC ₅₀ ^c	17	94	n.b.
HeLa IC ₅₀ [μM]	19	n.b.	> 125

^aMittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Doppelbestimmungen. ^bMittelwerte +/- Standardabweichung aus nichtlinearer Regression aus 3-9 Messpunkten;⁴⁵⁻⁴⁶ ^cSelektivitätsindizes wurden unter Verwendung ungerundeter IC₅₀-Werte berechnet; n.b. = nicht bestimmt.

Trotz vielversprechender *in vitro*-Aktivität weisen die Verbindungen **33** und **80** keine antiplasmodiale *in vivo*-Aktivität auf. Durch die Schwerlöslichkeit der Verbindungen **33** und **80** in Wasser, die durch hohe AlogP-Werte widerspiegelt wird, kann die Aufnahme der potentiellen Wirkstoffe in den Körper erschwert oder sogar verhindert werden. Eine mögliche Weiterentwicklung dieser Verbindungsklassen sollte demnach eine Reduzierung des Molekulargewichts sowie eine Verbesserung der Wasserlöslichkeit berücksichtigen.

Bislang sind nur wenige, etablierte Wirkstoffklassen mit Aktivität gegenüber antiplasmodialen Leberstadien bekannt. Zudem werden stetig Arzneistoffe mit neuen Wirkungsmechanismen benötigt, die kausalprophylaktische und transmissionsblockierende Eigenschaften besitzen, um die Gefahr der Resistenzentwicklung gering zu halten und dem Ziel der Eradikation von Malaria näher zu kommen. Daher ist die Entwicklung weiterer Benzimidazol-Derivate mit dualer Aktivität gegenüber asexueller Blutstadien und Leberstadien vielversprechend. Für gezielte Derivatisierungen wäre die Aufklärung des Wirkungsmechanismus von großem Vorteil.

4. Inverse α -substituierte Fosmidomycin-Derivate

Alle Verbindungen, welche sowohl in der Publikation als auch in Kapitel 4 dieser Arbeit diskutiert werden, sind analog nummeriert. Die beschriebenen Verbindungen in diesem Kapitel sind zusätzlich mit „*“ gekennzeichnet.

4.1. Stand der Forschung

Fosmidomycin ist ein Antibiotikum, welches Ende der 1970er Jahre erstmals aus *Streptomyces lavendulae* isoliert wurde.¹⁸⁵⁻¹⁸⁶ Der MEP-Weg hingegen wurde erst 1993 Jahren von Rohmer entdeckt. 1998 gelang es Kuzuyama et al. zu beweisen, dass es sich bei Fosmidomycin um einen spezifischen Inhibitor der DOXP-Reduktoisomerase (Dxr) handelt.¹⁸⁷ Die *in vitro*-Aktivität Fosmidomycins gegenüber rekombinanter PfDxr konnte 1999 durch Jomaa et al. demonstriert werden.¹⁸⁸ Dxr katalysiert den zweiten Reaktionsschritt des MEP-Weges und somit die Umwandlung von DOXP zu MEP. Jomaa et al. zeigten, dass die Isoprenoid-Biosynthese in *Plasmodium* spp. über den MEP-Weg stattfindet. Da der menschliche Wirt hierzu den MVA-Weg benutzt, sind der MEP-Weg und somit Inhibitoren der DOXP-Reduktoisomerase vielversprechende Ansatzpunkte zur Entwicklung von Antimalariamitteln.¹⁸⁸

Umfassende klinische Studien der letzten Jahre ergaben, dass Fosmidomycin sehr gute antiplasmodiale Eigenschaften und gute Verträglichkeit aufweist, jedoch als Monotherapeutikum aufgrund ungünstiger pharmakokinetischen Eigenschaften und dadurch auftretender Rezidiven, wie z.B. der kurzen Plasmahalbwertszeit von zwei Stunden, nicht eingesetzt werden kann.¹⁸⁹⁻¹⁹⁰ Aktuell befindet sich Fosmidomycin daher in Kombination mit Piperaquin in klinischer Phase II (siehe Kapitel 1.6, Abb. 6). Piperaquin weist, wie Fosmidomycin, eine Aktivität gegenüber asexuellen Blutstadien von *P. falciparum* auf, besitzt jedoch eine deutlich höhere Halbwertszeit von 22 Tagen.

Aufgrund zahlreicher, bekannter Kristallstrukturen ist der Mechanismus der Inhibition von Dxr durch Fosmidomycin aufgeklärt. Während die Metall-chelatisierende Hydroxamsäure-Gruppe von Fosmidomycin die α -Hydroxyketon-Funktionalität von DOXP imitiert, geht die chemisch und metabolisch stabile Phosphonat-Einheit von Fosmidomycin analoge Substrat-Wechselwirkungen zu der Phosphat-Gruppe des DOXP ein.

Auf Grundlage dieser Kenntnisse haben sich verschiedene Forschungsgruppen intensiv mit der Strukturmodifikation Fosmidomycins beschäftigt, um Analoga des Fosmidomycins mit verbesserten pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften zu erhalten. Es wurden umfangreiche Strukturmodifikationen an der Hydroxamsäure- und der Phosphonsäure-Funktionalität sowie an der CH_2 -Kette von Fosmidomycin vorgenommen, wovon die wichtigsten in Abbildung 31 dargestellt sind. Die Hydroxamsäure-Funktionalität

wurde 2005 erstmals von *Rohmer* et al. durch inverse Hydroxamsäure-Gruppe des Fosmidomycins ersetzt (**LXIIa-b**).¹⁹¹ 2010 variierten *Zinglé* et al. die CH₂-Kettenlänge, welche den Abstand zwischen der Phosphonat- und Hydroxamsäure-Funktionalität bestimmt (**LXIIIa-e**).¹⁹² Die genannten strukturellen Veränderungen (**LXIIa-b**, **LXIIIa-e**) führten zum Verlust der inhibitorischen Aktivität. Durch die von *Van Calenbergh* vorgenommene α -Fluor-Substitution (**LXIV**) sowie durch Ersatz des zweiten Kohlenstoff-Atoms in der C₃-Kette gegen ein Sauerstoff-Atom (**LXVa-b**) hingegen konnte eine gesteigerte Aktivität erzielt werden.¹⁹³⁻¹⁹⁴ Die Arbeitsgruppe *Kurz* beschäftigte sich intensiv mit der Synthese von α -Aryl-substituierten, inversen Hydromsäure-Analoga (**LXVIIIa-f**, **LXIa-b**).¹⁹⁵⁻¹⁹⁶ Zudem wurden in β -Position zu der Phosphonsäure-Funktionalität ein Kohlenstoffatom durch ein Sauerstoff- oder Schwefelatom ersetzt (**LIXa-j**, **LXa-h**), wobei ein Großteil dieser strukturellen Änderungen zu einer Aktivitätssteigerung führte.^{133, 197}

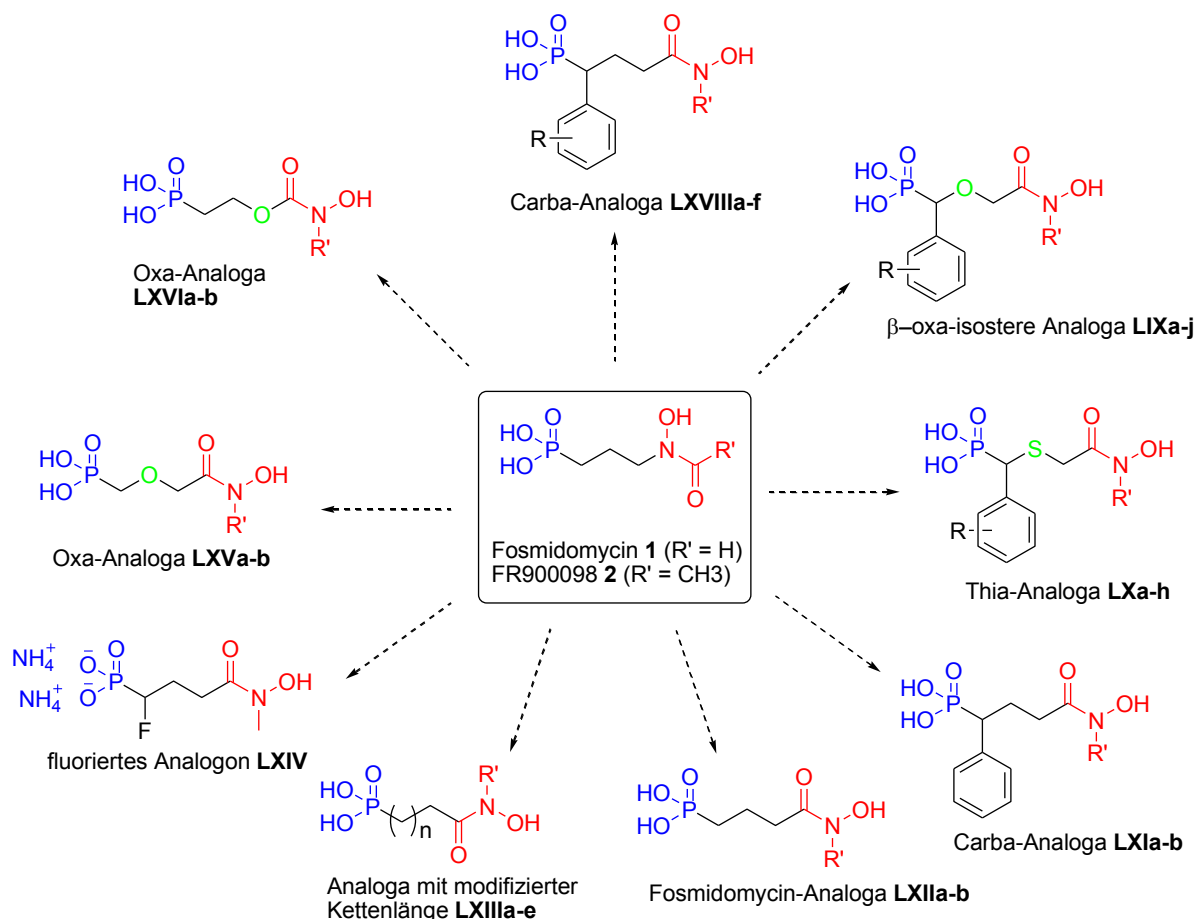
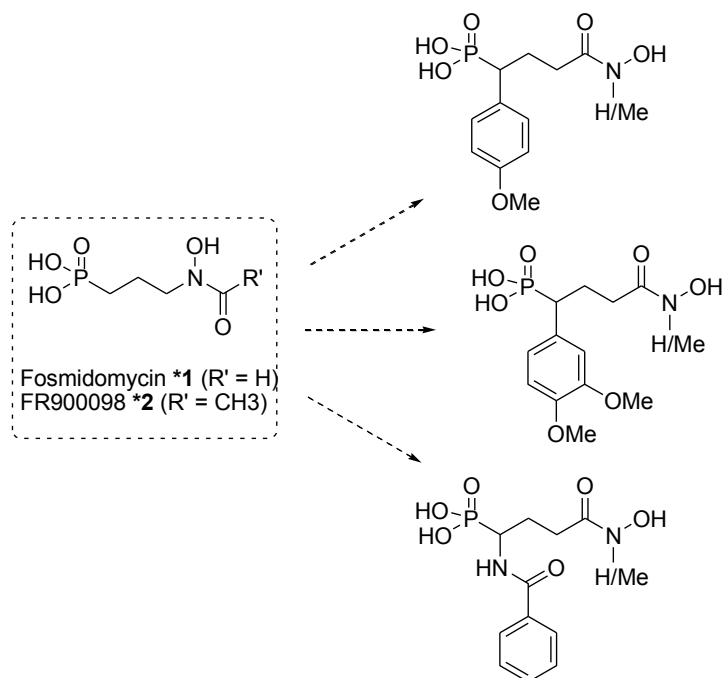


Abbildung 31: Im Vorfeld dieser Arbeit bekannte, inverse Analoga ausgehend von Fosmidomycin (**1**) als Leitstruktur (modifiziert nach *Konzuch* et al.¹⁹⁸); **LXVIIIa**, **LIXa**, **LXa**: R = H, R' = CH₃; **LXVIIIb**, **LIXb**, **LXb**: R = H, R' = H; **LXVIIIc**, **LIXc**, **LXc**: R = 3,4-F, R' = CH₃; **LXVIId**, **LIXd**, **LXd**: R = 3,4-F, R' = H; **LXVIIIe**, **LIXe**, **LXe**: R = 3,4-Cl, R' = CH₃; **LXVIIf**, **LIXf**, **LXf**: R = 1-naphthyl, R' = CH₃; **LXVIIIg**, **LIXg**, **LXg**: R = 4-CH₃, R' = CH₃; **LXVIIIh**, **LIXh**, **LXh**: R = 4-CH₃, R' = H; **LXVIIIi**, **LIXi**, **LXi**: R = 4-OCH₃, R' = CH₃; **LXVIIIj**, **LIXj**, **LXj**: R = 4-OCH₃, R' = H; **LXIa**: R' = CH₂CH₃; **LXIb**: R' = CH(CH₃)₂; **LXIIa**: R' = CH₃; **LXIIb**: R' = H; **LXIIIa-b**: n = 1, R' = CH₃ (**LXIIIa**), H (**LXIIIb**); **LXIIIc**: n = 2, R' = CH₂CH₃; **LXIIId-e**: n = 3, R' = CH₃ (**LXIIId**), H (**LXIIIe**); **LXVa**: R' = CH₃; **LXVb**: R' = H; **LXVIa**: R' = CH₃; **LXVIb**: R' = H.

Zudem konnte durch eine Kooperation zwischen den Arbeitsgruppen *Kurz* und *Groll* 2011 der Bindungsmodus des inversen Carba-Analogon **LXVIIIc** ($R = 3,4\text{-F}$; $R' = \text{CH}_3$) an *EcDxr* aufgeklärt werden.¹⁹⁶ 2013 gelang durch Kooperation zwischen den gleichen Arbeitsgruppe die Aufklärung des Bindungsmodus des Thia-Analogon **LXa** ($R = \text{H}$; $R' = \text{CH}_3$) an *PfDxr*.¹⁹⁷

4.2. Aufgabenstellung

Durch Synthese neuer, inverser Fosmidomycin-Analoga sollten abschließende Untersuchungen von Struktur-Wirkungs-Beziehungen dieser Verbindungsklasse vorgenommen werden. Basierend auf den in der Arbeitsgruppe *Kurz* durch jahrelange, intensive Forschung erhaltenen Kenntnissen und Ergebnissen war eine gezielte Planung von Strukturmodifikationen inverser Fosmidomycin-Analoga möglich (Schema 62).



Schema 62: geplante Strukturmodifikationen inverser Fosmidomycin-Analoga.

Durch bereits publizierte Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen durch die Arbeitsgruppe *Kurz* konnte gezeigt werden, dass es sich bei inversen Fosmidomycin-Analoga um potentere Dxr-Inhibitoren handelt, als bei Fosmidomycin selbst.¹⁹⁵ Zudem konnte im Zuge dieser Untersuchungen gezeigt werden, dass aromatische Substituenten in α -Position zur Phosphonsäurefunktionalität zu einer Verbindungsklasse mit selektiver *PfDxr*-Inhibition führt. Die durch *Behrendt* entwickelten und gründlich erforschten, inversen Carba-Analoga des Fosmidomycins trugen bislang hauptsächlich elektronenziehende Substituenten in α -Position zur Phosphonsäurefunktionalität. Um eine abschließende Diskussion über Substituenteneinflüsse zu ermöglichen, sollten Donorsubstituenten in α -Position eingeführt werden.

Des Weiteren sollte eine Synthesestrategie entwickelt werden, um inverse Fosmidomycin-Derivate zu erhalten, welche Acylamino-Substituenten in α -Position tragen. Die so erhaltene amidische Funktionalität in dieser Position sollte Aufschluss über Wechselwirkungen zu Aminosäureresten (z.B. Wasserstoffbrücken-Bindungen) im katalytischen Zentrum der *PfDxr* und damit verbundene Änderung der *PfDxr*-Hemmung geben.

Weitere Fosmidomycin-Analoga sollten in Länge und Funktionalität der CH₂-Kette sowie in der metallchelatisierenden Einheit variiert werden.^{****}

Basierend auf den Ergebnissen der biologischen Evaluation sollte mit einer Auswahl der synthetisierten Verbindungen von Umeda et al. die Kristallstruktur im Komplex mit PfDxr, NADPH und einem Mg²⁺-Ion analysiert werden, um eine Aufklärung des Bindungsmodus zu ermöglichen.

4.3. Publikation

Veröffentlicht in: „Journal of Medicinal Chemistry“

(Konzuch, S., Umeda, T., Held, J., Hähn, S., Brücher, K., Lienau, C., Behrendt, C. T., Gräwert, T., Bacher, A., Illarionov, B., Fischer, M., Mordmüller, B., Tanaka, N., Kurz, T., Binding modes of reverse fosmidomycin analogs towards the antimalarial target IspC. *J. Med. Chem.* **2014**, 57, 8827-8838)

Impact factor: 5.447

Eigener Anteil an der Arbeit: 60 %, Erstautorin, Durchführung von organischen Synthesen (Verbindungen **2a**, **2b**, **2c**, **2d**, **2e**, **2f**, **5a** und **5b**), analytische Charakterisierung der Verbindungen, Mitarbeit an der Erstellung des Manuskriptes

“Reprinted from Journal of Medicinal Chemistry, 57 (21), ‘Binding Modes of Reverse Fosmidomycin Analogs toward the Antimalarial Target IspC’ Copyright 2014 American Chemical Society.”

^{****} Diese Verbindungen wurden nicht im Rahmen dieser Dissertation synthetisiert.

Binding Modes of Reverse Fosmidomycin Analogs toward the Antimalarial Target IspC

Sarah Konzuch,[†] Tomonobu Umeda,[‡] Jana Held,[§] Saskia Hähn,[†] Karin Brücher,[†] Claudia Lienau,[†] Christoph T. Behrendt,[†] Tobias Gräwert,[⊥] Adelbert Bacher,[⊥] Boris Illarionov,[⊥] Markus Fischer,[⊥] Benjamin Mordmüller,^{§,¶} Nobutada Tanaka,[‡] and Thomas Kurz^{*,†}

[†]Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Heinrich Heine Universität, Universitätsstr. 1, 40225 Düsseldorf, Germany

[‡]School of Pharmacy, Showa University, Tokyo 142-8555, Japan

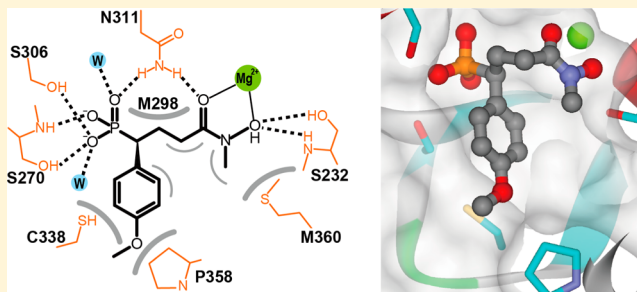
[§]Institut für Tropenmedizin, Eberhard Karls Universität Tübingen, Wilhelmstr. 27, 72074 Tübingen, Germany

[⊥]Hamburg School of Food Science, Universität Hamburg, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, Germany

[¶]Medical Research Unit, Albert Schweitzer Hospital, Lambaréné, Gabon

S Supporting Information

ABSTRACT: 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase of *Plasmodium falciparum* (PfIspC, PfDxr), believed to be the rate-limiting enzyme of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis (MEP pathway), is a clinically validated antimalarial target. The enzyme is efficiently inhibited by the natural product fosmidomycin. To gain new insights into the structure activity relationships of reverse fosmidomycin analogs, several reverse analogs of fosmidomycin were synthesized and biologically evaluated. The 4-methoxyphenyl substituted derivative **2c** showed potent inhibition of PfIspC as well as of *P. falciparum* growth and was more than one order of magnitude more active than fosmidomycin. The binding modes of three new derivatives in complex with PfIspC, reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, and Mg²⁺ were determined by X-ray structure analysis. Notably, PfIspC selectively binds the *S*-enantiomers of the study compounds.



■ INTRODUCTION

Despite considerable research activities, malaria remains one of the most widespread and life-threatening infectious diseases of the world. Because of new drug combinations and improved vector control, the mortality rate has been reduced significantly since 2004, when the number of deaths peaked at 1.8 million; however, the current situation is still alarming, and global efforts are required to accomplish the goal of malaria elimination. Despite increased funding and public awareness the World Health Organization (WHO) reported 207 million estimated malaria cases and 627,000 estimated deaths in 2012.¹

Malaria control relies heavily on early diagnosis followed by antimalarial chemotherapy to prevent death as well as potentially fatal complications such as severe anemia and coma. Malaria therapy is compromised by current and emerging parasite resistance toward nearly all established antimalarials.² In most countries with endemic malaria, fixed-dose artemisinin-based combination therapies have now become first-line treatments and parenteral artesunate has become the treatment of choice for severe malaria. However, cases of reduced parasite sensitivity toward artemisinin derivatives have been reported;³ thus, antimalarial drugs with new modes of action are urgently needed.^{4,5}

A promising approach for the discovery of antimalarials is the inhibition of the nonmevalonate isoprenoid biosynthesis (MEP pathway).^{6,7} The MEP pathway is essential in *Plasmodium* spp., which causes malaria (and also in some other pathogenic protozoa and many pathogenic bacteria including *Mycobacterium tuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*), but is absent in mammals.^{2,8} Therefore, drugs directed at enzymes of the nonmevalonate pathway should be exempt from target-related toxicity.

1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (IspC, Dxr) catalyzes the first committed reaction step of the nonmevalonate pathway (Figure 1) and has been validated as a malaria target by clinical studies using fosmidomycin, an antibiotic first isolated from *Streptomyces lavendulae*.^{4,9–13}

Although crystal structures of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase of *Plasmodium falciparum* (PfIspC, PfDxr) in the presence or absence of inhibitors (fosmidomycin, FR900098, an α -pyridyl-substituted FR900098 analog and a reverse fosmidomycin β -thia isostere) were recently reported, the rational design of improved fosmidomycin analogs is still difficult, because PfIspC undergoes a

Received: June 4, 2014

Published: September 25, 2014



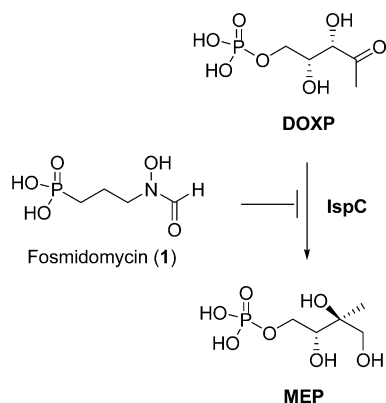


Figure 1. Inhibition of IspC.

complex conformational transition when it binds the substrate, 1-deoxyxylulose 5-phosphate (DOXP), or one of the inhibitors studied.^{14–16} Earlier studies mostly focused on *Ec*IspC and *Mt*IspC crystal structures as the basis for the rational design of (*Pf*)IspC inhibitors.^{17–28}

To gain new insights regarding the structure activity relationships of reverse fosmidomycin analogs, we have modified several key regions of the lead structures **A** and **B** (Figure 2). Specifically, we address the substitution pattern of the α -phenyl-substituent (first reverse compounds with donor substituents CH₃, OCH₃) (**2a–f**), the length (4), and the chemical functionality (β -oxa isosters **3a–b**) of the spacer as well as the nature of the metal ion chelating group (**6**, **7**). Moreover, we report the first crystal structures of *Pf*IspC in

complex with reverse α -aryl-substituted carba- and oxa-analogs (**2a**, **2c**, **3a**).

RESULTS

Chemical Synthesis. Carba-Analogs and β -Oxa Isosteres.

Carba-analogs (**2a–d**) and β -oxa isosteres (**3a–b**) of fosmidomycin (Figure 2) were prepared according to previously published procedures (Scheme S1, Supporting Information).^{29,30} Carba-analogs **2e–f** were synthesized by a modified procedure starting from diethyl 3,4-dimethoxybenzylphosphonate **8a**.³¹ Briefly, C-alkylation of **8a** with 2-(2-bromoethyl)-1,3-dioxolane in the presence of *n*-BuLi afforded 1,3-dioxolane **9a**. Hydrolysis of the 1,3-dioxolane moiety of **9a** by treatment with water and Dowex 50WX8 provided aldehyde **10a**,³² which was subsequently oxidized to carboxylic acid **11a**. Coupling reactions of **11a** with *O*-benzyl-hydroxylamine or *N*-methyl-*O*-benzylhydroxylamine furnished *O*-benzyl-protected hydroxamic acids **12a** and **14a**.³³ Dealkylation of diethyl phosphonates (**12a**, **14a**) with bromotrimethylsilane provided the corresponding phosphonic acids, which were directly converted into dibenzylphosphonates **13a** and **15a** using *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) and benzyl alcohol. Finally, catalytic hydrogenation afforded hydroxamic acids **2e** and **2f** as white solids (Scheme 1).

Carba Homologue 4. Alkylation of phosphonate **8b**^{29,34} with 2-(3-bromopropyl)-1,3-dioxolane³⁵ in the presence of *n*-BuLi afforded the protected intermediate **9b**. Acidic hydrolysis of the 1,3-dioxolane moiety provided aldehyde **10b**, which was directly oxidized to carboxylic acid **11b**. The coupling of the crude carboxylic acid **11b** with *O*-benzyl-*N*-methylhydroxyl-

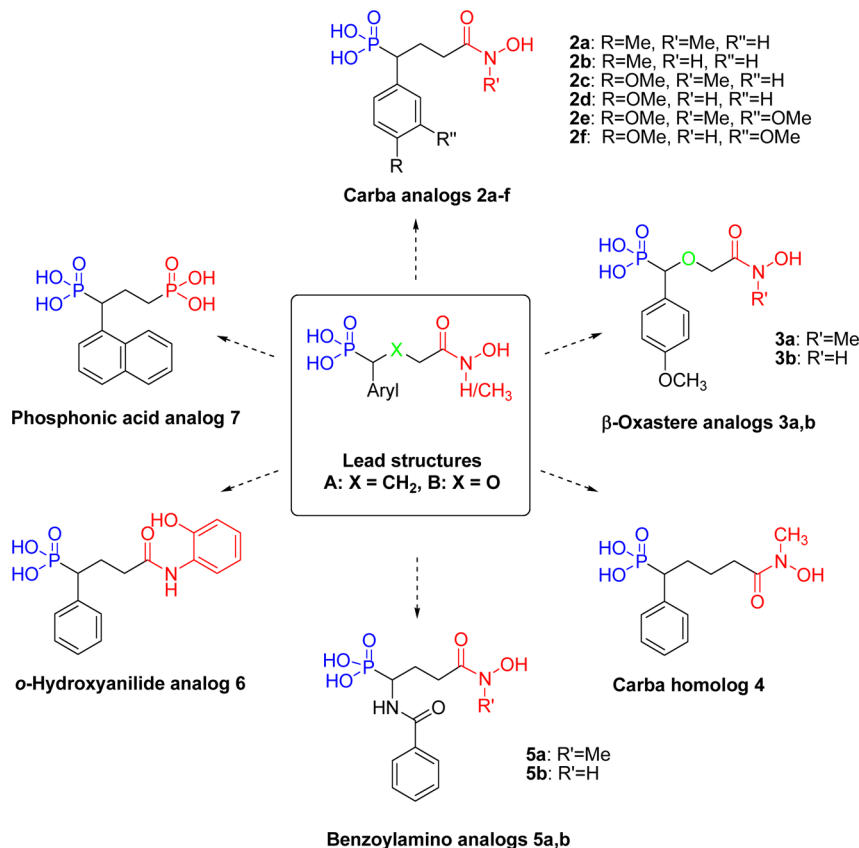
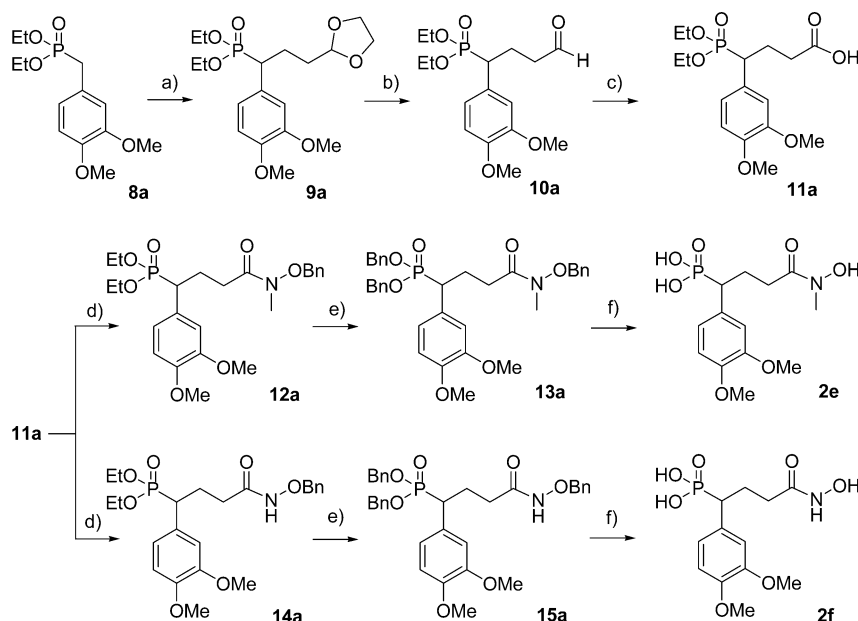
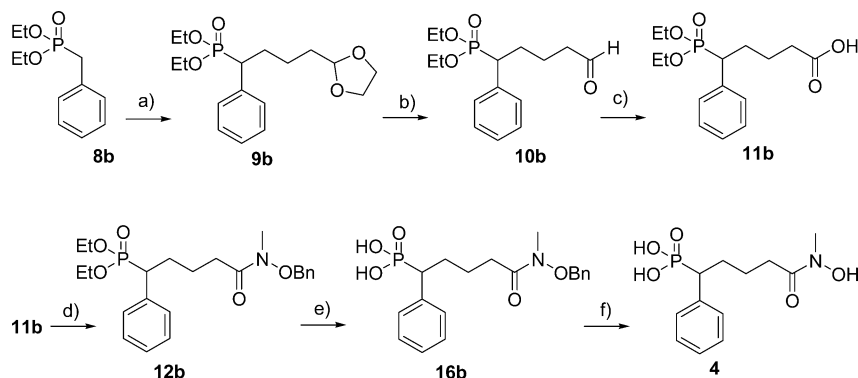


Figure 2. Lead structures and target compounds.

Scheme 1. Synthesis of Target Compounds 2e and 2f^a

^aReagents and conditions: (a) *n*-BuLi, 2-(2-bromoethyl)-1,3-dioxolane, toluene, -78°C , 12 h, 56%; (b) Dowex 50WX8, acetone/ H_2O , room temperature (rt), 24 h, 70%; (c) H_2O_2 , SeO_2 , THF, 4 h, reflux, 90%; (d) isobutyl chloroformate, NMM, BnONHR ($\text{R} = \text{H}, \text{Me}$), THF, -20°C , 10 min $\rightarrow$ rt, 30 min, 50% (**12a**), 65% (**14a**); (e) 1. TMSBr , CH_2Cl_2 , rt, 24 h; 2. THF/ H_2O , rt, 1 h; 3. DCC, BnOH , benzene, 80°C , 4 h, 18% (**13a**), 30% (**15a**).

Scheme 2. Synthesis of Compound 4^a

^aReagents and conditions: (a) *n*-BuLi, 2-(3-bromopropyl)-1,3-dioxolane, toluene, -78°C , 12 h, 77%; (b) 2 M HCl , acetone, 50°C , 3 h, 77%; (c) SeO_2 , H_2O_2 , THF, 65°C , 4 h, 66%; (d) CDI, BnONHMe , CH_2Cl_2 , rt, 12 h, 85%; (e) 1. TMSBr , CH_2Cl_2 , rt, 24 h; 2. THF/ H_2O , rt, 1 h, 81% (crude yield); (f) H_2 , Pd-C , MeOH , rt, 1 h, 92%.

amine utilizing 1,1'-carbonyldiimidazole (CDI) as a coupling agent provided *O*-benzyl-protected hydroxamic acid **12b** in 74% yield and good purity. Cleavage of phosphonic ester **12b** with bromotrimethylsilane yielded phosphonic acid **16b**. Finally, catalytic hydrogenation of crude **16b** afforded the target hydroxamate **4** in 92% yield (Scheme 2).

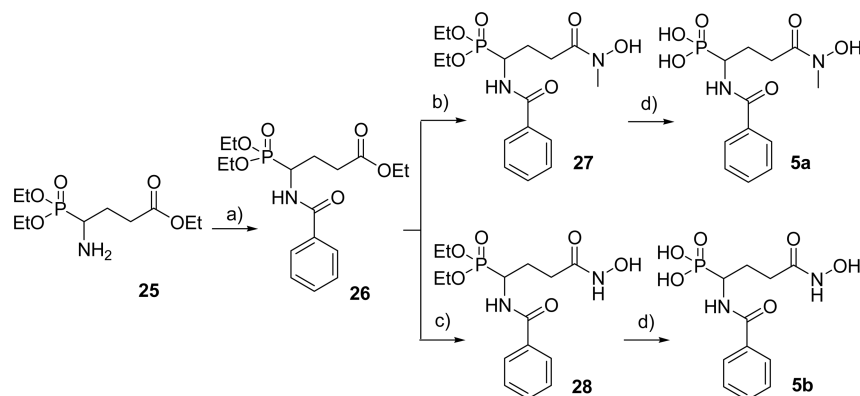
Benzoylamino Analogs 5a–b. Treatment of α -amino-phosphonate **25**³⁶ with benzoyl chloride and tetraethylammonium (TEA) afforded benzamide **26** in 59% yield. Conversion of **26** into hydroxamic acids **27** and **28** was accomplished by hydroxylaminolysis.³⁷ Finally, cleavage of the diethylphosphonate moiety using bromotrimethylsilane yielded derivatives **5a–b** (Scheme 3).

***o*-Hydroxyanilide 6.** Carboxylic acid **29**²⁹ was converted into the corresponding acyl chloride, which was subsequently reacted with 2-benzoyloxyaniline to provide anilide **30**. Catalytic

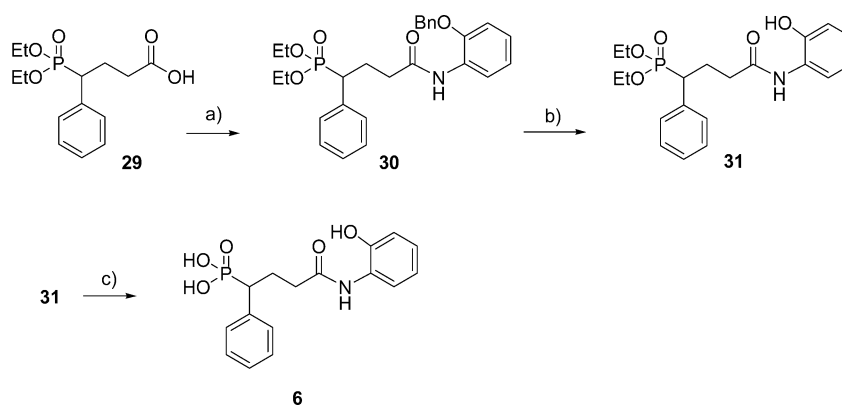
hydrogenation of **30** yielded the protected *o*-hydroxyanilide **31**. Finally, cleavage of the phosphonic acid ester group using bromotrimethylsilane led to target compound **6** with an *o*-hydroxy-anilide moiety as a potential metal ion binding group (Scheme 4).

Synthesis of Bisphosphonate 7. *C*-Alkylation of phosphonate **8e**^{17,38} with excess of 1,2-dibromoethane in the presence of *n*-butyllithium afforded bromide **32**. The Michaelis–Arbuzov reaction of **32** with triethyl phosphite provided phosphonic ester **33** (Scheme 5). Transesterification of **33** yielded the completely *O*-Bn-protected derivative **34**, which was finally deprotected by catalytic hydrogenation.

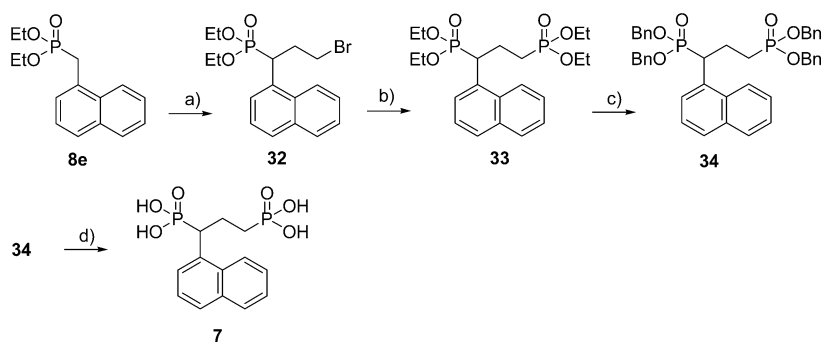
Biological Evaluation. The study compounds were screened against IspC from *P. falciparum* (PfIspC), *Escherichia coli* (EcIspC), and *Mycobacterium tuberculosis* (MtIspC) using a photometric assay that was described earlier.²⁹ IC_{50} values were

Scheme 3. Synthesis of Benzoylamino Analogs 5a–b^a

^aReagents and conditions: (a) benzoyl chloride, TEA, CH₂Cl₂, rt, 12 h, 59%; (b) *N*-methylhydroxylamine hydrochloride, NaOH, MeOH, 0 °C → rt, 12 h, 34%; (c) hydroxylamine hydrochloride, NaOH, MeOH, 0 °C → rt, 30 min, 53%; (d) 1. TMSBr, CH₂Cl₂, rt, 24 h; 2. THF/H₂O, rt, 1 h, 70% (5a), 44% (5b).

Scheme 4. Synthesis of *o*-Hydroxyanilide 6^a

^aReagents and conditions: (a) 1. (COCl)₂, DMF, toluene, rt, 1 h; 2. 2-benzyloxylaniline, pyridine, CH₂Cl₂, rt, 12 h, 70%; (b) H₂, Pd–C (10%), MeOH, 2 bar, rt, 3 h, 83%; (c) 1. TMSBr, CH₂Cl₂, rt, 24 h; 2. THF/H₂O (~100:1), rt, 1 h, 52%.

Scheme 5. Synthesis of Target Compound 7^a

^aReagents and conditions: (a) *n*-BuLi, 1,2-dibromoethane (4 equiv), toluene, –78 °C, 12 h, 60%; (b) triethyl phosphite, 160 °C, 1 h, 180 °C 12 h, 97%; (c) 1. TMSBr, CH₂Cl₂, rt, 24 h; 2. THF/H₂O, rt, 1 h; 3. DCC, BnOH, benzene, 80 °C, 4 h, 16% (3 steps); (d) H₂, Pd–C, MeOH, 1 bar, rt, 3 h, 97%.

determined by nonlinear regression analysis using the program package Dynafit.³⁹ The curve shapes were closely similar in all cases. Typical examples are shown in Figure 3 (top).

We also measured the growth-inhibitory effect of the study compounds against asexual stage *P. falciparum* malaria parasites. Specifically, we used one chloroquine-sensitive and two multidrug resistant *P. falciparum* strains of different geographic origins (3D7, Dd2, and FCR3). Parasite growth was monitored

by measuring the expression of *P. falciparum* histidine rich protein 2 by enzyme-linked immunosorbent assay exactly as described previously.⁴⁰ Reverse carba- and oxa-analogs (2, 3) are potent *P. falciparum* growth inhibitors. Several new derivatives displayed IC₅₀ values in the double digit nanomolar range (Table 1). Typical examples (same compounds as in Figure 3, top) are shown in the bottom portion of Figure 3. It

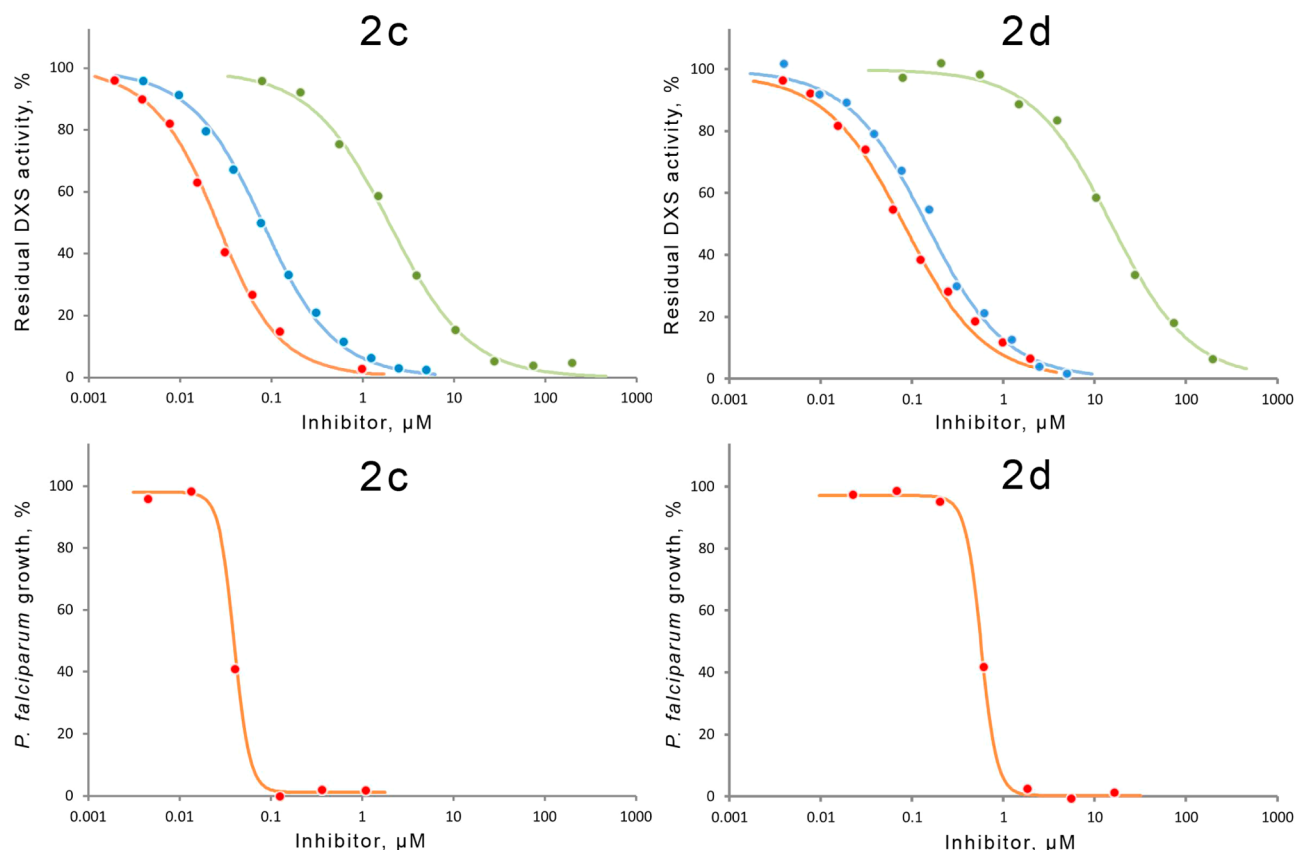


Figure 3. Top, inhibition of IspC orthologs (*PfIspC*, red; *EcIspC*, blue; *MtIspC*, green). Bottom, inhibition of *P. falciparum* blood stages; left, compound **2c**; right, compound **2d**.

should be noted that the parasite assay curves typically descend faster than do the cognate enzyme inhibition curves.

The numerical data for all compounds studied are summarized in Table 1.

The inhibitors under study are more active against IspC from *P. falciparum* than against the bacterial orthologs (Figure S1, Supporting Information, Figure 4A). Notably, the inhibition of the *Plasmodium* enzyme exceeds that of the *M. tuberculosis* enzyme by about two orders of magnitude. This is well in line with earlier observations and indicates that α -aryl analogs of fosmidomycin are more potent inhibitors for the plasmodial enzyme than for the bacterial enzymes that were included in comparative studies.^{14,30} In contrast to the differential activities of the study compounds, authentic fosmidomycin showed similar inhibition of the IspC from *P. falciparum* and the bacterial enzymes (Table 1, Figure S1).

According to Figure 4, Panel b, the IC_{50} values of the study compounds for the enzymatic target, *PfIspC*, are lower, by approximately one order of magnitude, than the IC_{50} values observed in asexual blood stages. On the other hand, due to the different curve shapes illustrated in Figure 3, the inhibitor concentrations required for 90% inhibition are similar in the enzyme and parasite assays.

The most active compounds in Table 1 (carba-analogs **2a**, **2c**) had IC_{50} values in the low nanomolar range for the plasmodial enzyme and exceed the inhibitory effect of authentic fosmidomycin to a significant degree (Table 1). Extension of the chain length (**4**) caused the inhibitory activity to drop by several orders of magnitude. The replacement of the Me^{2+} binding hydroxamic acid pharmacophore by other potentially metal ion binding groups, for example, an *o*-hydroxyanilide

moiety (**6**) and a phosphonic acid group (**7**) led to the complete loss of inhibitory activity.

Crystal Structure Analysis. Cocrystallization of *PfIspC* with reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), Mg^{2+} , and reverse fosmidomycin analogs (**2a**, **2c**, and **3a**) afforded crystals with space group $P2_1$ for **2a** and **2c** complexes and $P3_121$ for the **3a** complex (diffraction to resolutions of 2.25, 1.97, and 2.35 Å (Table S1, Supporting Information)). Structures were solved by molecular replacement using the structure of IspC in complex with NADPH, Mg^{2+} , and fosmidomycin (PDB accession code 3AU9) as the search model.

The asymmetric units of crystals of **2a** and **2c** complexes comprise two IspC subunits, whereas that of the **3a** complex comprises one subunit. The subunit in the asymmetric unit of the crystal containing **3a** is related by a crystallographic two-fold axis to form a homodimer. The structural differences between the two subunits in the asymmetric unit of **2a** and **2c** complexes are described in the "Structure determination" section of the Supporting Information. For simplicity, the following description refers primarily to subunit B of the **2c** complex.

The active site structure of the quaternary complexes reported in this paper shows significant differences from those of previously published quaternary (fosmidomycin- or FR900098-containing) complexes of *PfIspC*,¹⁵ although tertiary (three-domain structure) and quaternary (homodimer) structures are conserved (Figure 5a). The **2c** molecule is located in the active site cavity (Figure 5a).

The α -aryl substituent has van der Waals contacts with active site residues; specifically, the side chains of Ser270, Cys338, and

Table 1. Enzyme Inhibition and in Vitro Antiplasmodial Activity

	Ar	R'	PfIspC ^a IC ₅₀ (μM)	EcIspC ^a IC ₅₀ (μM)	MtIspC ^a IC ₅₀ (μM)	Pf3D7 ^b IC ₅₀ (μM)	PfDd2 ^{b,f} IC ₅₀ (μM)	PfFCR3 ^{b,f} IC ₅₀ (μM)
1			0.16 ±0.02 ^c	0.22 ±0.01 ^d	0.23 ±0.02 ^e	0.88 ^c	0.81 ^c	n.d.
2a	4-Me-Ph	Me	0.01 ±0.002	0.29 ±0.02	1.8 ±0.1	0.21	0.25	0.38
2b	4-Me-Ph	H	0.19 ±0.01	0.70 ±0.1	11 ±1	2.6	2.8	n.d.
2c	4-MeO-Ph	Me	0.02 ±0.002	0.07 ±0.003	2.0 ±0.1	0.10	0.30	0.57
2d	4-MeO-Ph	H	0.08 ±0.008	0.14 ±0.01	15 ±1.0	1.7	3.6	n.d.
2e	3,4-MeO-Ph	Me	0.06 ±0.006	0.32 ±0.01	29 ±1.0	0.29	1.2	n.d.
2f	3,4-MeO-Ph	H	0.13 ±0.02	1.5 ±0.1	163 ±34	6.8	8.1	n.d.
3a	4-MeO-Ph	Me	0.05 ±0.004	0.45 ±0.04	2.8 ±2.0	0.31	1.1	0.41
3b	4-MeO-Ph	H	2.2 ±0.1	17 ±1.0	352 ±29	>50	n.d.	n.d.
4	Ph		2.1 ±0.1	4.3 ±0.1	429 ±29	>50	n.d.	n.d.
5a	NH-CO-Ph	Me	9.1 ±1.3	11 ±0	238 ±21	>50	n.d.	n.d.
5b	NH-CO-Ph	H	>1000	741 ±94	>1000	>50	n.d.	n.d.
6	Ph		>300	>500	>500	>50	n.d.	n.d.
7	1-Naphthyl		>300	>500	>500	>50	n.d.	n.d.

^aEnzyme assay. Values were calculated from eight or more data points. In general, two or three independent determinations were performed.^{39,41} ^bIn vitro assay. Values are the mean of two duplicate determinations. ^cIC₅₀ value according to ref 30. ^dIC₅₀ value according to ref 29. ^eIC₅₀ value according to ref 14. ^fn.d., not determined. Details regarding the structure of the compounds can be found in Figure 2.

Pro358 are well ordered, whereas Trp296 and Met298 showed higher temperature factors (Figure 5b). In addition, an intramolecular interaction is observed between the *N*-methyl group and the aromatic ring of 2c. The *N*-methyl group has a contact with the side chain of Met360. A comparison of the binding mode of 2c with that of fosmidomycin reveals that in a closed conformation, as observed with Trp296 in the fosmidomycin complex, Trp296 would crash with the α -aryl substituent of 2c (Figure 5c). In fact, the flexible loop region (residues 291–299) in the 2c complex adopts a relatively open conformation. As compared to the fosmidomycin complex, the flexible loop of the 2c complex is rather disordered (poorer electron density and higher B-factors). Therefore, the cause of the tight binding of 2c to PfIspC appears to be different from that of fosmidomycin to PfIspC but similar to that of the 3,4-difluorophenyl analog¹⁷ to EcIspC. Recently, we reported on the crystal structure of PfIspC in complex with an α -phenyl substituted reverse thia analog of fosmidomycin.¹⁴ The molecular interaction between 2c and PfIspC is similar to that between the thia analog and PfIspC; however, significant conformational differences are observed for the flexible loop region.

The phosphonate group of 2c forms a tight hydrogen-bond network with the main chain NH and side chain OH of Ser270, the side chain of Asn311, two water molecules, and the side chain of Ser306 (Figure 6a). In the fosmidomycin:IspC complex, the side chain of His293 is involved in the hydrogen-bond network instead of Ser306 (Figures 5c and 6b).

The present crystal structures are the first examples of quaternary complexes of IspC with reverse carba- and oxa-analogs. The reverse-hydroxamate group coordinates an Mg²⁺ ion that is bound by residues Asp231, Glu233, and Glu315; thus, the Mg²⁺ ion has distorted trigonal bipyramidal geometry. This metal coordination geometry is consistent with that of the hydroxamate group of fosmidomycin observed in the previously published quaternary complexes of PfIspC^{14,15} but different from that of the reverse-hydroxamate group observed in the ternary complex of *E. coli* IspC crystallized in the absence of NADPH.¹⁷ The octahedral six-fold metal ion coordination observed in the ternary complex of EcIspC (two inhibitor atoms, three protein ligands, and a water molecule) is unlikely to occur in the quaternary complex of PfIspC because the water molecule would crash with the nicotinamide ring of NADPH. A comparison of a possible hydrogen-bond network of the 2c complex and the fosmidomycin (or FR900098) complex (Figures 6a,b) reveals that the metal coordination abilities and hydrogen-bond network with surrounding residues are essentially equivalent. This is consistent with the similar inhibitory activities of fosmidomycin and a reverse-hydroxamate analog reported by Kuntz.⁴²

To examine the differences in inhibitor-induced conformation changes dependent on the type of inhibitors, the crystal structures of PfIspC complexed with 2a (α -Ph-CH₃), 2c (α -Ph-OCH₃), and fosmidomycin were compared (Figure 5d). It is interesting that the degree of loop closure is related to the size of the bound inhibitor. This knowledge concerning the induced-fit mechanism of PfIspC will be useful to design new

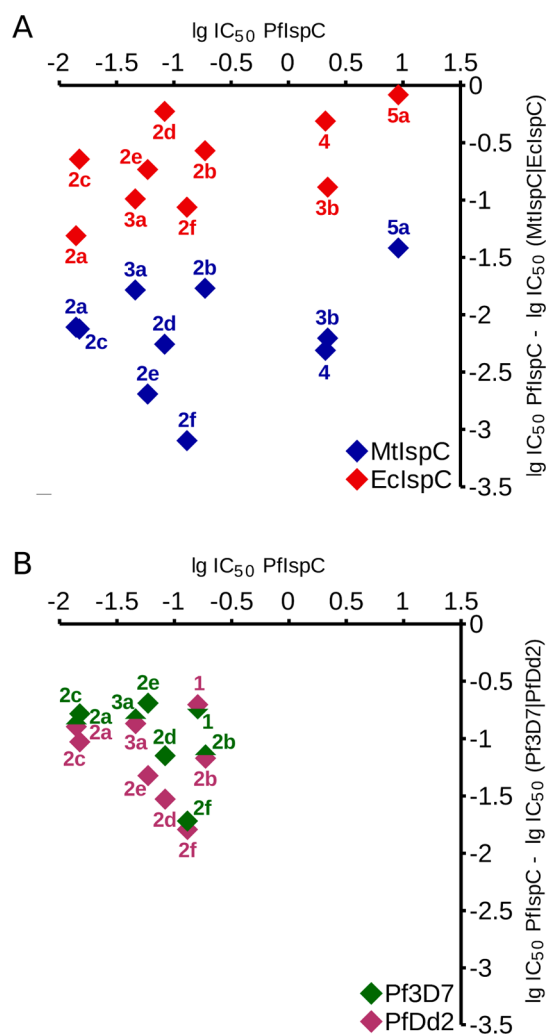


Figure 4. Top, ortholog specificity of IspC inhibition; the ordinate reflects the IC_{50} ratio of eubacterial IspCs and PfIspC; the inhibitory potency of the study compounds for PfIspC exceeds that for MtlIspC by about two orders of magnitude (blue diamonds) and that for EcIspC by close to one order of magnitude. Bottom, activity (IC_{50} values) against blood stages of two different *P. falciparum* strains versus in vitro inhibition of PfIspC (IC_{50} values); both test strains show similar responses; the sensitivity of the isolated enzyme exceeds that of the growing parasite by about one order of magnitude.

inhibitors. In addition, the flexible loop of the 2a complex is also rather disordered compared to that of the fosmidomycin complex. Thus, the primary factor of the tight binding of 2a and 2c to PfIspC compared to that of fosmidomycin, which lacks the aryl group, would be the van der Waals interactions between the α -aryl group and the core of the active site rather than the flexible loop (Figures 6a,b).

In the present crystal structure analyses, we also determined a PfIspC–NADPH– Mg^{2+} –3a quaternary complex. The 3a complex is quite a bit similar to the 2c complex. The current structure–activity relationship data (Table 1) show that β -oxa compounds have somewhat lower inhibitory activities than do their carba counterparts. This is explained by the structural comparison of the 2c complex with the fosmidomycin complex (Figure 5c). Because of the presence of a bulky substituent at the α -position, the methylene spacer of 2c adopts a different conformation than that of fosmidomycin. The methylene spacer of 3a adopts a conformation that is equivalent to that of

2c. In the fosmidomycin complex, the β -position of the carbon spacer is accommodated in a hydrophilic environment where it interacts with the side chains of Glu233, Lys312, and a water molecule, whereas the β -position of inhibitors 2c and 3a is accommodated in a hydrophobic environment and interacts with the $C\beta$ of Ser306 and the $C\epsilon$ of Met298. Therefore, the β -oxygen of α -substituted oxa derivatives may have somewhat unfavorable interactions with the active site as compared to that of the carba counterparts.

DISCUSSION

Using IspC orthologs from the protozoon, *P. falciparum*, and two eubacteria, we found that the shapes of the inhibition curves are all closely similar (cf. Figure 3). There is no sign whatsoever of positive or negative cooperativity. Whereas the natural product fosmidomycin inhibits IspC orthologs from *P. falciparum*, *E. coli* and *M. tuberculosis* with similar potency, our data confirm earlier observations that α -aryl derivatives are significantly more potent for the *Plasmodium* enzyme than for the eubacterial orthologs. With PfIspC, the most potent α -aryl derivatives that were described have IC_{50} values in the low nanomolar range. In terms of their IC_{50} values, the most potent α -aryl derivatives exceed the inhibitory potential of the natural compound, fosmidomycin, by more than an order of magnitude. A potential explanation for the higher inhibitory activities of α -aryl derivatives against PfIspC is that the difference in structural flexibilities of IspC molecules, that is, difference in interdomain and active-site loop flexibilities, may affect the inhibitory activities of bulky inhibitors. Another explanation is that the side chain of Cys338 in PfIspC would have a favorable van der Waals contact with the α -aryl group of the inhibitors (Figure 5b) as compared to the structurally corresponding serine residue in EcIspC and MtlIspC.

The IC_{50} values observed with the *Plasmodium* enzyme and with multiplying asexual *P. falciparum* blood stages are remarkably well correlated; the IC_{50} values observed for the parasite blood stage are typically one to two orders larger than the IC_{50} values observed with PfIspC in vitro. Since the inhibitors must pass through numerous membrane barriers (the erythrocyte membrane, the parasitophorous vacuole membrane, the cell membrane of the parasite, and the four membranes of the apicoplast) to reach their enzyme target in the living parasite, this may not be particularly surprising. Importantly, however, the inhibition curves observed with the isolated enzyme and the growing parasite are remarkably different insofar as the latter are much steeper. The IC_{50} values for the isolated enzyme and the growing parasite are offset by one to two units on the log scale, and the difference of inhibitory efficacy between enzyme assay and parasite assay essentially vanishes at higher inhibitor concentrations as a result of the different curve shapes. We can only speculate with regard to the causes of the curve shapes; however, there is no reason to expect a simple parallelism between IspC inhibition and *Plasmodium* proliferation. Quite possibly, growth retardation may only become relevant when the enzyme activity is depressed below a certain threshold value; such a situation could translate into a steep slope for the parasite growth curve. Of course, under the aspect of drug development, the minimal inhibitory concentration is far more relevant than the IC_{50} value, and the steeper shape of the parasite growth curves should turn out in favor of a potential therapeutic application of modified fosmidomycin derivatives.

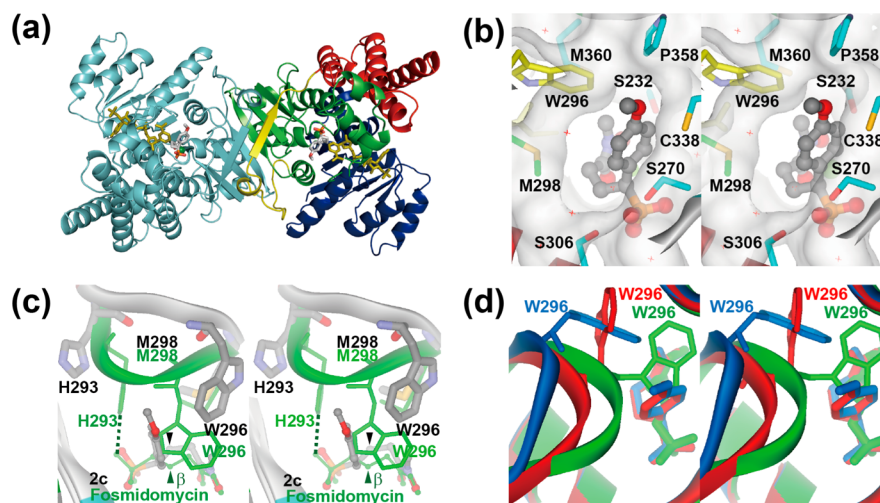


Figure 5. Crystal structure analyses of *PfIspC*. (a) Overall structure of the 2c-containing quaternary complex of *PfIspC*. One subunit is colored by domains: the NADPH-binding, catalytic, linker, and C-terminal domains are depicted in blue, green, yellow, and red, respectively. The other subunit is colored cyan. The bound 2c and NADPH molecules are shown as sticks. The bound Mg²⁺ ions are shown as spheres. (b) Close-up view of the active site with bound 2c. The side chains surrounding the α -aryl substituent are shown and the carbon atoms are colored by their B-factors: cyan (15–25 Å²), green (25–35 Å²), and yellow (35–45 Å²). Note that the side chains belonging to the flexible loop, Trp296 and Met298, show high B-factors. (c) A structural comparison of the binding mode of 2c (gray) and that of fosmidomycin (green) (PDB code 3AU9) in the active site of *PfIspC*. The β -positions of the methylene spacer of the bound inhibitors are marked by arrowheads. The bound inhibitor molecules are shown as ball-and-stick models. (d) A comparison of the induced-fit movements of the flexible loop (residues 291–299) of *PfIspC*. The 2a-, 2c-, and fosmidomycin-bound quaternary complexes of *PfIspC* are shown in blue, red, and green, respectively.

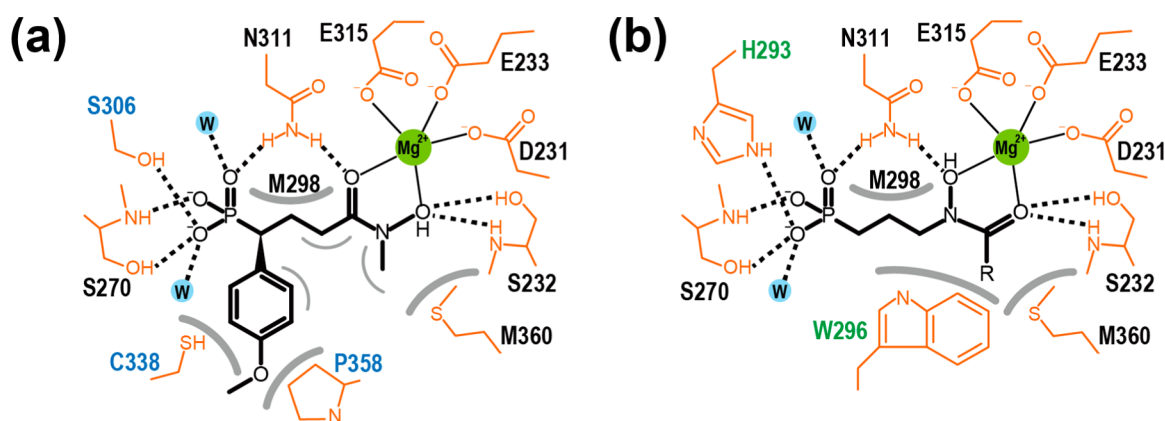


Figure 6. Schematic overview of the interactions of inhibitors in the active site of *PfIspC*. Metal coordination (2.0–2.1 Å) and possible hydrogen bonds (2.7–3.1 Å) are shown as solid and dashed lines, respectively. Intra- and intermolecular van der Waals contacts are shown as thin and thick gray arcs, respectively. (a) 2c complex. Residues uniquely involved in direct interactions with the bound inhibitor in the 2c complex are shown in blue. (b) Fosmidomycin (R = H)/FR900098 (R = CH₃) complex. Residues uniquely involved in direct interactions with the bound inhibitor in the fosmidomycin/FR900098 complex are shown in green.

Recently, we could show that *PfIspC* has a high degree of enantioselectivity for an α -arylated β -thia analog of fosmidomycin (inhibition by the *S*-enantiomer is at least three orders of magnitude stronger compared to that of the *R*-enantiomer). Pure enantiomers of the compounds reported in this paper have unfortunately not been obtained yet. However, the *S*-configuration of the bound inhibitors is the preferred interpretation in this study (Figure S2, Supporting Information) in agreement with previous studies for α -aryl substituted fosmidomycin derivatives.^{14,17,26,27} The clear omit map at 1.97 Å resolution for 2c (Figure S2, Panel b, Supporting Information) does not look like a mixture of both enantiomers. The X-ray structure data strongly suggest that the *S*-enantiomers of the compounds in this study bind preferentially to the active site of *PfIspC*. This will hopefully translate into an

increase of apparent inhibitory power of the study compounds once the preparation of pure enantiomers is achieved.

CONCLUSION

We report on kinetic and crystallographic proof for the mechanism of action of a new series of reverse analogs of fosmidomycin. By modifying different key regions of the lead structure, we provided new insights into the structure–activity relationships of reverse fosmidomycin derivatives. The 4-methoxy-phenyl substituted derivative 2c showed potent inhibition of *PfIspC* as well as of *P. falciparum* growth and exceeds the inhibitor activity of fosmidomycin by more than one order of magnitude. Crystallographic studies also demonstrated that *PfIspC* binds selectively the *S*-enantiomers of α -aryl substituted carba- and oxa-analogs of fosmidomycin.

Our results provide helpful information for the design of novel IspC inhibitors.

EXPERIMENTAL SECTION

All solvents and chemicals were used as purchased without further purification. The progress of all reactions was monitored on Merck precoated silica gel plates (with fluorescence indicator UV₂₅₄) using ethyl acetate/*n*-hexane as the solvent system. Column chromatography was performed with Fluka silica gel 60 (230–400 mesh ASTM) with the solvent mixtures specified in the corresponding experiment. Spots were visualized by irradiation with ultraviolet light (254 nm). Melting points (Mps) were taken in open capillaries using a Mettler FP 5 melting point apparatus or a Stuart melting point apparatus SMP11 and are uncorrected. Proton (¹H) and carbon (¹³C) NMR spectra were recorded using Bruker Avance 500 (500.13 MHz for ¹H; 125.76 MHz for ¹³C) or Bruker Avance 600 (600.22 MHz for ¹H; 150.93 MHz for ¹³C) spectrometers and [D₆]DMSO and CDCl₃ as solvents. Chemical shifts are given in parts per million (ppm) (δ relative to residual solvent peak for ¹H and ¹³C or to external tetramethylsilane). Elemental analysis was performed with a PerkinElmer PE 2400 CHN elemental analyzer or a vario MICRO cube elemental analyzer (Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau, Germany). If necessary, the purity was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). HPLC was performed in analogy to a previously reported procedure.⁴³ The instrument used was an Elite LaChrom system (Hitachi L-2130 pump and L-2400 UV-detector) or a Varian ProStar HPLC System (Varian ProStar 210 pump, Varian ProStar 320 UV-detector, and Varian ProStar 410 autosampler). The column was a Phenomenex Luna C-18(2) 5 μ m particle (250 mm $\times$ 4.6 mm), supported by Phenomenex Security Guard Cartridge Kit C18 (4.0 mm $\times$ 3.0 mm). Purity of all final compounds was 95% or higher, except compound **6** (purity, 92.2%).

Experimental Data for Compounds. Experimental data are listed below for selected compounds **9a–15a**, **2e**, and **2f**.

General Procedure for the Synthesis of Dioxolanes (9a–d).²⁹ At a temperature of -78°C , a 1.6 M solution of *n*-butyllithium in *n*-hexane (1.1 equiv, 44 mmol, 27.5 mL) was slowly added to a solution of the respective diethyl arylmethylphosphonate **8a–d** (1 equiv, 40 mmol) in dry toluene (50 mL) via a syringe under positive pressure of dry nitrogen. After being stirred for 1 h, 2-(2-bromoethyl)-1,3-dioxolane or 2-(3-bromopropyl)-1,3-dioxolane (1 equiv, 40 mmol) was added in one portion. The reaction mixture was allowed to warm up to room temperature (rt) and was stirred overnight. Ethyl acetate (50 mL) was added, and the solution was washed three times with an aqueous solution of NH₄Cl (10%, 50 mL). The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude oil was purified by column chromatography on silica gel using ethyl acetate/*n*-hexane (1:1) as the eluent to give compounds **9a–d** as colorless oils.

Diethyl 1-(3,4-Dimethoxyphenyl)-3-(1,3-dioxolan-2-yl)propylphosphonate (9a). Colorless oil (13.05 g, 84%); ¹H NMR (500.13 MHz, [D₆]DMSO): δ = 1.05 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.21 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.32–1.39 (m, 1H, CH₂), 1.43–1.50 (m, 1H, CH₂), 1.78–1.88 (m, 1H, CH₂), 1.96–2.05 (m, 1H, CH₂), 3.09 (ddd, *J* = 21.8, 11.4, 4.0 Hz, 1H, PCH), 3.68–3.76 (m, 9H, OCH₃, CHOOCH₂), 3.80–3.87 (m, 3H, CH₂CH₃, CHOOCH₂), 3.92–4.01 (m, 2H, CH₂CH₃), 4.74 (t, *J* = 4.6 Hz, 1H, CHOO), 6.81–6.83 (m,

1H), 6.89–6.91 (m, 2H) ppm; ¹³C NMR (125.76 MHz, [D₆]DMSO): δ = 16.0 (d, ³*J*_{C–P} = 5.5 Hz, CH₂CH₃), 16.2 (d, ³*J*_{C–P} = 5.5 Hz, CH₂CH₃), 24.0 (CH₂CH₂), 31.1 (d, ²*J*_{C–P} = 14.7 Hz, CHCH₂), 41.9 (d, ¹*J*_{C–P} = 136.8 Hz, PCH), 55.3 (OCH₃), 55.4 (OCH₃), 61.0 (d, ²*J*_{C–P} = 7.1 Hz, CH₂CH₃), 61.5 (d, ²*J*_{C–P} = 7.0 Hz, CH₂CH₃), 64.1 (CHOOCH₂), 64.2 (CHOOCH₂), 103.0 (CHOO), 111.6, 112.9 (d, ³*J*_{C–P} = 6.4 Hz), 121.1 (d, ²*J*_{C–P} = 7.4 Hz), 128.3 (d, ³*J*_{C–P} = 6.6 Hz), 147.7, 148.3 ppm; anal. calcd. for C₁₈H₂₉O₇P: C 55.66, H 7.53; found, C 55.29, H 7.89.

Diethyl 1-(3,4-Dimethoxyphenyl)-4-oxobutylphosphonate (10a).³² Dowex 50WX8 (3 mL) was added to a solution of dioxolane **9a** (14.5 mmol, 5.63 g) in water/acetone (10:1, 5 mL). After being stirred at rt for 48 h, the solution was filtered. The filtrate was concentrated, diluted with saturated aqueous NaCl solution, and extracted three times with ethyl acetate (100 mL). The organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure. Column chromatography on silica gel using ethyl acetate gave compound **10a** as a colorless oil (3.25 g, 65%); ¹H NMR (500.13 MHz, [D₆]DMSO): δ = 1.05 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.22 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.95–2.05 (m, 1H, CH₂), 2.15–2.23 (m, 1H, CH₂), 2.25–2.39 (m, 2H, CH₂), 3.09 (ddd, *J* = 21.8, 11.3, 4.2 Hz, 1H, PCH), 3.72 (s, 3H, OCH₃), 3.73 (s, 3H, OCH₃), 3.80–3.90 (m, 2H, CH₂CH₃), 3.93–4.03 (m, 2H, CH₂CH₃), 6.79–6.82 (m, 1H), 6.88–6.91 (m, 2H), 9.55 (s, 1H, CHO); ¹³C NMR (125.76 MHz, [D₆]DMSO): δ = 16.1 (d, ³*J*_{C–P} = 5.6 Hz, CH₂CH₃), 16.2 (d, ³*J*_{C–P} = 5.5 Hz, CH₂CH₃), 22.3 (CH₂CH₂), 40.9 (d, ²*J*_{C–P} = 14.8 Hz, CHCH₂), 41.5 (d, ¹*J*_{C–P} = 137.0 Hz, PCH), 55.3 (OCH₃), 55.4 (OCH₃), 61.2 (d, ²*J*_{C–P} = 7.2 Hz, CH₂CH₃), 61.6 (d, ²*J*_{C–P} = 7.0 Hz, CH₂CH₃), 111.6, 112.7 (d, ³*J*_{C–P} = 6.3 Hz), 121.2 (d, ²*J*_{C–P} = 7.3 Hz), 127.8 (d, ³*J*_{C–P} = 6.6 Hz), 147.8, 148.4, 202.6 (CHO); anal. calcd. for C₁₆H₂₅O₆P: C 55.81, H 7.32; found, C 55.79, H 7.39.

General Procedure for the Synthesis of Carboxylic Acids (11a–d).²⁹ To a solution of the respective aldehyde **10a–d** (1 equiv, 5 mmol) in tetrahydrofuran (THF) (7.5 mL), H₂O₂ (1.1 mL of a 30% solution), and SeO₂ (0.5 equiv, 2.5 mmol, 0.28 g) were added. The solution was refluxed for 4 h, and the reaction mixture was concentrated under reduced pressure. Ethyl acetate (50 mL) was added to the remaining oil, and the resulting solution was washed three times with 1 M hydrochloric acid (10 mL). After drying over Na₂SO₄, the organic solvent was removed under reduced pressure. The crude products **11c–d** were treated with diethyl ether (20 mL) and stored at 7°C to give compounds **11c–d** as white solids. Pure compounds **11a** and **11b** were obtained without further purification.

4-(Diethoxyphosphoryl)-4-(3,4-dimethoxyphenyl)butanoic acid (11a). Yellow resin (1.58 g, 88%); ¹H NMR (500.13 MHz, [D₆]DMSO): δ = 1.06 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.22 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.91–2.01 (m, 1H, CH₂), 2.06–2.10 (m, 2H, CH₂), 2.13–2.19 (m, 1H, CH₂), 3.10 (ddd, *J* = 21.8, 11.1, 4.0 Hz, 1H, PCH), 3.73 (s, 3H, OCH₃), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 3.78–3.89 (m, 1H, CH₂CH₃), 3.93–4.07 (m, 3H, CH₂CH₃), 6.80–6.81 (m, 1H), 6.87 (s, 1H), 6.91 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 12.10 (s, 1H, COOH); ¹³C NMR (125.76 MHz, [D₆]DMSO): δ = 16.0 (d, ³*J*_{C–P} = 5.5 Hz, CH₂CH₃), 16.2 (d, ³*J*_{C–P} = 5.5 Hz, CH₂CH₃), 25.0 (CH₂CH₂), 41.3 (d, ²*J*_{C–P} = 15.4 Hz, CHCH₂), 41.5 (d, ¹*J*_{C–P} = 137.7 Hz, PCH), 55.3 (OCH₃), 55.4 (OCH₃), 61.1 (d, ²*J*_{C–P} = 7.1 Hz, CH₂CH₃), 61.6 (d, ²*J*_{C–P} = 6.8 Hz, CH₂CH₃), 111.6, 112.7 (d,

$^3J_{C-P} = 6.3$ Hz), 121.2 (d, $^2J_{C-P} = 7.3$ Hz), 127.9 (d, $^3J_{C-P} = 6.7$ Hz), 147.8, 148.4, 173.6 (COOH); HPLC analysis: retention time = 1.84 min; peak area, 93.3%. Eluent A, 5 mM NH_4OAc solution; eluent B, $CH_3CN/isocratic$ (1:1) over 20 min at a flow rate of 1 mL min^{-1} .

General Procedure for the Synthesis of *o*-Bn-Protected Hydroxamic Acids (12a, 14a).³³ To a solution of the carboxylic acid 11a (1 equiv, 5 mmol, 1.80 g) in dry THF (50 mL), *N*-methylmorpholin (NMM) (1.1 equiv, 5.5 mmol, 506 mg) was added. The solution was cooled down to $-20^\circ C$, and isobutyl chloroformate (1.1 equiv, 5.5 mmol, 751 mg) was added. After 10 min, the appropriate hydroxylamine (1 equiv, 5 mmol) was added dropwise. The reaction mixture was warmed up to rt overnight. The precipitated NMM-hydrochloride was filtered off, and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved in H_2O /ethyl acetate, and the aqueous layer was extracted three times with ethyl acetate (50 mL). The organic layers were combined and washed twice with a saturated aqueous solution of $NaHCO_3$ (10 mL), dried over Na_2SO_4 , filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel using ethyl acetate/*n*-hexane (1:1) as the eluent to give compounds 12a and 14a as yellow oils.

Diethyl 4-[Benzyloxy(methyl)amino]-1-(3,4-dimethoxyphenyl)-4-oxobutylphosphonate (12a). Yellow oil (1.53 g, 64%); ^1H NMR (600.22 MHz, $[D_6]DMSO$): $\delta = 1.05$ (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.21 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.90–1.97 (m, 1H, CH_2), 2.13–2.28 (m, 3H, CH_2), 3.10–3.14 (m, 4H, PCH, NCH_3), 3.71–3.77 (m, 7H, OCH_3 , CH_2CH_3), 3.80–3.86 (m, 1H, CH_2CH_3), 3.94–4.01 (m, 2H, CH_2CH_3), 4.66 (dd, $J = 22.5$, 9.9 Hz, 2H, $PhCH_2$), 6.82 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.88 (s, 1H), 6.92 (d, $J = 8.2$ Hz), 7.17–7.18 (m, 2H), 7.30–7.36 (m, 3H) ppm; ^{13}C NMR (150.93 MHz, $[D_6]DMSO$): $\delta = 16.0$ (d, $^3J_{C-P} = 5.5$ Hz, CH_2CH_3), 16.2 (d, $^3J_{C-P} = 5.5$ Hz, CH_2CH_3), 24.6 (CH_2CH_2), 29.2 (d, $^2J_{C-P} = 16.2$ Hz, $CHCH_2$), 32.6 (NCH_3), 41.7 (d, $^1J_{C-P} = 137.2$ Hz, PCH), 55.3 (OCH_3), 55.4 (OCH_3), 61.1 (d, $^2J_{C-P} = 7.0$ Hz, CH_2CH_3), 61.5 (d, $^2J_{C-P} = 6.9$ Hz, CH_2CH_3), 75.1 ($PhCH_2$), 111.6, 112.8 (d, $^3J_{C-P} = 6.4$ Hz), 121.2 (d, $^2J_{C-P} = 7.4$ Hz), 128.1 (d, $^3J_{C-P} = 6.7$ Hz), 128.3, 128.6, 129.3, 147.8 (d, $^5J_{C-P} = 2.3$ Hz), 148.4 (d, $^4J_{C-P} = 1.7$ Hz), 173.0 (C=O) ppm; anal. calcd. for $C_{24}H_{34}NO_7P$: C 60.12, H 7.15, N 2.92; found, C 60.37, H 7.31, N 2.65.

Diethyl 4-(Benzyloxyamino)-1-(3,4-dimethoxyphenyl)-4-oxobutylphosphonate (14a). Yellow oil (1.07 g, 46%); ^1H NMR (500.13 MHz, $[D_6]DMSO$): $\delta = 1.05$ (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.22 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.82 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, CH_2), 1.91–1.99 (m, 1H, CH_2), 2.12–2.21 (m, 1H, CH_2), 3.05 (ddd, $J = 21.8$, 11.3, 3.5 Hz, 1H, PCH), 3.72 (s, 3H, OCH_3), 3.73 (s, 3H, OCH_3), 3.79–3.87 (m, 2H, CH_2CH_3), 3.93–4.00 (m, 2H, CH_2CH_3), 4.74 (s, 2H, $PhCH_2$), 6.78 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.84 (s, 1H), 6.89 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 10.51 (s, 0.1H, *E*-isomer, OH), 10.87 (s, 0.9H, *Z*-isomer, OH) ppm; ^{13}C NMR (125.76 MHz, $[D_6]DMSO$): $\delta = 16.1$ (d, $^3J_{C-P} = 5.6$ Hz, CH_2CH_3), 16.2 (d, $^3J_{C-P} = 5.4$ Hz, CH_2CH_3), 25.3 (CH_2CH_2), 29.9 ($CHCH_2$), 41.7 (d, $^1J_{C-P} = 136.7$ Hz, PCH), 55.3 (OCH_3), 55.4 (OCH_3), 61.2 (d, $^2J_{C-P} = 6.9$ Hz, CH_2CH_3), 61.6 (d, $^2J_{C-P} = 6.7$ Hz, CH_2CH_3), 76.6 ($PhCH_2$), 111.5, 112.7 (d, $^3J_{C-P} = 6.3$ Hz), 121.2 (d, $^3J_{C-P} = 7.0$ Hz), 127.8 (d, $^2J_{C-P} = 6.7$ Hz), 128.1, 128.2, 128.6, 136.0, 147.7 (d, $^5J_{C-P} = 2.8$ Hz), 148.3, 168.5 (C=O) ppm; anal. calcd. for

$C_{23}H_{32}NO_7P$: C 59.35, H 6.93, N 3.01; found, C 59.08, H 7.22, N 2.82.

General Procedure for the Synthesis of Tri-*o*-benzyl-Protected Phosphonohydroxamic Acids (15a,c,d, 13a, 24, 34).²⁹ To a solution of the respective phosphonic acid diethyl ester (14a,c,d, 12a, 23, 33) (1 equiv, 3 mmol) in dry CH_2Cl_2 (10 mL), trimethylsilyl bromide (5 equiv, 15 mmol, 1.99 mL in case of compounds 15a,c,d, 13a, 24; 10 equiv, 30 mmol, 3.98 mL in case of compound 34) was added at $0^\circ C$. After 1 h, the solution was allowed to warm up to rt and was stirred for 23 h. The solvent was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in THF (10 mL) and treated with water (0.1 mL). After 30 min, the solvent was evaporated, and the residue was dried under reduced pressure overnight. The residue was dissolved in benzene (20 mL). 2-Benzyl-1,3-dicyclohexyl-isourea (2 equiv, 6 mmol, 1.89 g in case of compounds 15a,c,d, 13a, 24; 4 equiv, 12 mmol, 3.78 g in case of compound 34) was added. The mixture was refluxed for 6 h. After the mixture was cooled to rt, ethyl acetate (30 mL) was added, solid 1,3-dicyclohexyl-urea was filtered off, and the solvent was removed under reduced pressure. Column chromatography on silica gel using ethyl acetate provided compounds 15a,c,d, 13a, 24, and 34.

Dibenzyl 4-[Benzyloxy(methyl)amino]-1-(3,4-dimethoxyphenyl)-4-oxobutylphosphonate (13a). Yellow oil (550 mg; 30%); ^1H NMR (500.13 MHz, $[D_6]DMSO$): $\delta = 1.99$ –2.03 (m, 1H, CH_2), 2.20–2.28 (m, 3H, CH_2), 3.09 (s, 3H, NCH_3), 3.26–3.32 (m, 1H, PCH), 3.61 (s, 3H, OCH_3), 3.73 (s, 3H, OCH_3), 4.64 (dd, $J = 24.6$, 9.9 Hz, 2H, $PhCH_2$), 4.76 (dd, $J = 12.0$, 7.8 Hz, 1H, $PhCH_2$), 4.85 (dd, $J = 12.0$, 6.8 Hz, 1H, $PhCH_2$), 4.96 (dd, $J = 12.0$, 7.1 Hz, 1H, $PhCH_2$), 5.02 (dd, $J = 12.0$, 8.5 Hz, 1H, $PhCH_2$), 6.83–6.84 (m, 1H), 6.87 (s, 1H), 6.91 (d, $J = 8.3$ Hz), 7.17–7.18 (m, 4H), 7.29–7.37 (m, 11H) ppm; ^{13}C NMR (125.76 MHz, $[D_6]DMSO$): $\delta = 24.4$ (CH_2CH_2), 29.2 (d, $^2J_{C-P} = 16.4$ Hz, $CHCH_2$), 32.6 (NCH_3), 41.8 (d, $^1J_{C-P} = 136.3$ Hz, PCH), 55.2 (OCH_3), 55.4 (OCH_3), 66.5 (d, $^2J_{C-P} = 6.9$ Hz, CH_2CH_3), 66.8 (d, $^2J_{C-P} = 6.5$ Hz, CH_2CH_3), 75.1 ($PhCH_2$), 111.7, 112.8 (d, $^3J_{C-P} = 6.2$ Hz), 121.2 (d, $^3J_{C-P} = 7.4$ Hz), 127.4, 127.6, 127.7 (d, $^2J_{C-P} = 7.2$ Hz), 127.9, 128.0, 128.2, 128.2, 128.3, 128.6, 129.3, 134.3, 136.5 (d, $^3J_{C-P} = 6.1$ Hz), 136.6 (d, $^3J_{C-P} = 6.4$ Hz), 147.9 (d, $^5J_{C-P} = 2.3$ Hz), 148.5 (d, $^4J_{C-P} = 1.5$ Hz), 172.9 (C=O) ppm; anal. calcd. for $C_{34}H_{38}NO_7P$: C 67.65, H 6.35, N 2.32; found, C 67.43, H 6.20, N 2.28.

Dibenzyl 4-(Benzyloxyamino)-1-(3,4-dimethoxyphenyl)-4-oxobutylphosphonate (15a). Yellow oil (248 mg; 14%); ^1H NMR (500.13 MHz, $[D_6]DMSO$): $\delta = 1.83$ –1.86 (m, 2H, CH_2), 1.97–2.06 (m, 1H, CH_2), 2.24–2.28 (m, 1H, CH_2), 3.23 (ddd, $J = 22.0$, 11.4, 3.2 Hz, 1H, PCH), 3.61 (s, 3H, OCH_3), 3.73 (s, 3H, OCH_3), 4.73–4.77 (m, 3H, $PhCH_2$), 4.83–4.87 (m, 1H, $PhCH_2$), 4.94–5.04 (m, 2H, $PhCH_2$), 6.80 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.83 (s, 1H), 6.89 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.17–7.19 (m, 2H), 7.30–7.37 (m, 12H), 10.51 (s, 0.1H, *E*-isomer, OH), 10.87 (s, 0.9H, *Z*-isomer, OH) ppm; ^{13}C NMR (125.76 MHz, $[D_6]DMSO$): $\delta = 5.2$ (CH_2CH_2), 29.8 (d, $^2J_{C-P} = 16.0$ Hz, $CHCH_2$), 41.8 (d, $^1J_{C-P} = 136.1$ Hz, PCH), 55.2 (OCH_3), 55.4 (OCH_3), 66.5 (d, $^2J_{C-P} = 6.7$ Hz, CH_2CH_3), 66.8 (d, $^2J_{C-P} = 6.8$ Hz, CH_2CH_3), 76.6 ($PhCH_2$), 111.6, 112.7 (d, $^3J_{C-P} = 6.3$ Hz), 121.3 (d, $^3J_{C-P} = 7.3$ Hz), 127.4, 127.5, 127.6, 128.0, 128.1, 128.2, 128.2, 128.4, 128.6, 136.0, 136.5 (d, $^3J_{C-P} = 6.4$ Hz), 136.6 (d, $^3J_{C-P} = 6.0$ Hz), 147.9 (d, $^5J_{C-P} = 2.5$ Hz), 148.4, 168.47 (C=O) ppm; anal. calcd. for $C_{33}H_{36}NO_7P$: C 67.22, H 6.15, N 2.38; found, C 67.47, H 6.27, N 2.36.

General Procedure for the Synthesis of Carboxylic Acid 20, Hydroxamic Acid 22, o-Hydroxyanilide 31, Bisphosphonate 7, and Target Compounds 2a-f, 3b, and 4.²⁹ To a solution of the appropriate o-Bn-protected hydroxamic acid (1 mmol) in freshly distilled methanol (20 mL), Pd-C catalyst (10%, 40 mg) was added. The mixture was hydrogenated for 1 h (in the case of compounds 2a, 2c, 4, 20, 22, 31) and 3 h (in the case of compounds 2b, 2d-f, 3b, 7). The catalyst was removed by filtration, and the solvent was evaporated under reduced pressure. Pure target compounds 2b and 2d-f were obtained as white solids after the addition of ethyl acetate. Recrystallization in ethyl acetate gave compound 31 as colorless crystals. Pure compounds 2a, 2c, 3b, 4, 7, 20, and 22 were obtained without further purification.

1-(3,4-Dimethoxyphenyl)-4-[hydroxy(methyl)amino]-4-oxobutylphosphonic acid (2e). White solid (290 mg, 87%), Mp: 70 °C; ¹H NMR (500.13 MHz, [D₆]DMSO): δ = 1.89–1.99 (m, 1H, CH₂), 2.19 (s, 3H, CH₃), 2.77–2.84 (m, 1H, PCH), 3.03 (s, 3H, NCH₃), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 3.72 (s, 3H, OCH₃), 6.74–6.76 (m, 1H), 6.85–6.87 (m, 2H), 9.68 (br s, 1H, OH) ppm; ¹³C NMR (125.76 MHz, [D₆]DMSO): δ = 25.3 (CH₂CH₂), 30.1 (d, ²J_{C-P} = 15.2 Hz, CHCH₂), 35.6 (NCH₃), 44.1 (d, ¹J_{C-P} = 136.8 Hz, PCH), 55.3 (OCH₃), 55.45 (OCH₃), 111.6, 112.8 (d, ³J_{C-P} = 5.6 Hz), 121.3 (d, ²J_{C-P} = 7.2 Hz), 130.5 (d, ³J_{C-P} = 6.5 Hz), 147.3, 148.3, 172.7 (C=O) ppm; anal. calcd. for C₁₃H₂₀NO₇P: C 46.85, H 6.05, N 4.20; found, C 46.61, H 6.05, N 4.06.

1-(3,4-Dimethoxyphenyl)-4-(hydroxyamino)-4-oxobutylphosphonic acid (2f). White solid (313 mg, 98%), Mp: 75 °C; ¹H NMR (500.13 MHz, [D₆]DMSO): δ = 1.73–1.93 (m, 3H, CH₂), 2.20–2.28 (m, 1H, CH₂), 2.75 (ddd, J = 14.9, 10.9, 3.5 Hz, 1H, PCH), 3.72 (s, 6H, OCH₃), 6.75–6.76 (m, 1H), 6.84–6.87 (m, 2H), 8.66 (br s, 1H, OH), 9.71 (s, 0.1H, E-isomer, NH), 10.27 (s, 0.9H, Z-isomer, NH) ppm; ¹³C NMR (125.76 MHz, [D₆]DMSO): δ = 26.4 (CH₂CH₂), 30.6 (d, ²J_{C-P} = 15.2 Hz, CHCH₂), 44.2 (d, ¹J_{C-P} = 134.6 Hz, PCH), 55.3 (OCH₃), 55.4 (OCH₃), 111.6, 112.8 (d, ³J_{C-P} = 6.2 Hz), 121.1 (d, ³J_{C-P} = 6.7 Hz), 130.5 (d, ²J_{C-P} = 6.4 Hz), 147.3 (OCH₃), 148.2 (OCH₃), 168.8 (C=O) ppm; HPLC analysis: retention time = 1.54 min; peak area, 97.5%. Eluent A, 5 mM NH₄OAc solution; eluent B, CH₃CN/isocratic (1:1) over 20 min at a flow rate of 1.5 mL min⁻¹.

■ ASSOCIATED CONTENT

■ Supporting Information

Experimental procedures, analytical data, enzyme assays, biological evaluation of in vitro antiplasmodial activity, and experimental data regarding crystallization and structure determination. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: (+49)21181-14985. Fax: -13847. E-mail: thomas.kurz@uni-duesseldorf.de.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

N.T. was supported in part by a grant from the Takeda Science Foundation, the Naito Foundation, and a Grant-in-Aid for Scientific Research (C) from the MEXT of Japan. We are very

grateful for the support by the Hans–Fischer–Gesellschaft and the Deutsche Forschungsgemeinschaft, Grant No. GR 3866/1-1.

■ ABBREVIATIONS USED

n-BuLi, *n*-butyllithium; CDI, 1,1'-carbodiimidazole; DCC, *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide; DMF, *N,N*-dimethylformamide; DMSO, dimethyl sulfoxide; DOXP, 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate; Dxr (IspC), 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase; MEP, 2C-methyl-D-erythritol 4-phosphate; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NMM, *N*-methymorpholine; Pd–C, palladium on activated carbon; rt, room temperature; TEA, triethylamine; THF, tetrahydrofuran; TMSBr, bromotrimethylsilane; WHO, World Health Organization

■ REFERENCES

- (1) *World Malaria Report 2013*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2013. http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2013/wmr2013_no_profiles.pdf?ua=1.
- (2) Rodriguez-Concepcion, M. The MEP Pathway: A New Target for the Development of Herbicides, Antibiotics, And Antimalarial Drugs. *Curr. Pharm. Des.* **2004**, *10* (19), 2391–2400.
- (3) Dondorp, A. M.; Nosten, F.; Yi, P.; Das, D.; Phyo, A. P.; Tarning, J.; Lwin, K. M.; Arie, F.; Hanpithakpong, W.; Lee, S. J.; Ringwald, P.; Silamut, K.; Imwong, M.; Chotivanich, K.; Lim, P.; Herdman, T.; An, S. S.; Yeung, S.; Singhasivanon, P.; Day, N. P. J.; Lindgardh, N.; Socheat, D.; White, N. J. Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *361* (5), 455–467.
- (4) Kuroda, Y.; Okuhara, M.; Goto, T.; Okamoto, M.; Terano, H.; Kohsaka, M.; Aoki, H.; Imanaka, H. Studies on New Phosphonic Acid Antibiotics. IV. Structure Determination of FR-33289, FR-31564, and FR-32863. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1980**, *33* (1), 29–35.
- (5) Koppisch, A. T.; Fox, D. T.; Blegg, B. S. J.; Poulter, C. D. *E. coli* MEP Synthase: Steady-State Kinetic Analysis and Substrate Binding. *Biochemistry* **2002**, *41* (1), 236–243.
- (6) Rohmer, M.; Knani, M.; Simonin, P.; Sutter, B.; Sahm, H. Isoprenoid Biosynthesis in Bacteria: A Novel Pathway for the Early Steps Leading to Isopentenyl Diphosphate. *Biochem. J.* **1993**, *295* (Pt. 2), 517–524.
- (7) Rohmer, M.; Grosdemange-Billiard, C.; Seemann, M.; Tritsch, D. Isoprenoid Biosynthesis as a Novel Target for Antibacterial and Antiparasitic Drugs. *Curr. Opin. Invest. Drugs* **2004**, *5*, 154–162.
- (8) Rohdich, F.; Bacher, A.; Eisenreich, W. Isoprenoid Biosynthetic Pathways as Anti-Infective Drug Targets. *Biochem. Soc. Trans.* **2005**, *33*, 785–791.
- (9) Okuhara, M.; Kuroda, Y.; 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. *J. Antibiot.* **1980**, *33*, 24–28.
- (10) Jomaa, H.; Wiesner, J.; Sanderbrand, S.; Altincicek, B.; Weidemeyer, C.; Hintz, M.; Turbachova, I.; Eberl, M.; Zeidler, J.; Lichtenthaler, H. K.; Soldati, D.; Beck, E. Inhibitors of the Nonmevalonate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis as Antimalarial Drugs. *Science* **1999**, *285* (5433), 1573–1576.
- (11) Borrmann, S.; Lundgren, I.; Oyakhrome, S.; Impouma, B.; Matsigui, P.-B.; Adegnik, A. A.; Issifou, S.; Kun, J. F. J.; Hutchinson, D.; Wiesner, J.; Jomaa, H.; Kremsner, P. G. Fosmidomycin Plus Clindamycin for Treatment of Pediatric Patients Aged 1 to 14 Years with *Plasmodium falciparum* Malaria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50* (8), 2713–2718.
- (12) Oyakhrome, S.; Issifou, S.; Pongratz, P.; Barondi, F.; Ramharter, M.; Kun, J. F.; Missinou, M. A.; Lell, B.; Kremsner, P. G. Randomized Controlled Trial of Fosmidomycin–Clindamycin versus Sulfadoxine–Pyrimethamine in the Treatment of *Plasmodium falciparum* Malaria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51* (5), 1869–1871.

- (13) Na-Bangshang, K.; Ruengwearayut, R.; Karbwang, J.; Chaumung, A.; Hutchinson, D. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Fosmidomycin Monotherapy and Combination Therapy with Clindamycin in the Treatment of Multidrug Resistant Falciparum Malaria. *Malar. J.* **2007**, *6*, 1–10.
- (14) Kunfermann, A.; Lienau, C.; Illarionov, B.; Held, J.; Gräwert, T.; Behrendt, C.; Werner, P.; Hahn, 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. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 8151–8162.
- (15) Umeda, T.; Tanaka, N.; Kusakabe, Y.; Nakanishi, M.; Kitade, Y.; Nakamura, K. T. Molecular Basis of Fosmidomycin's Action on the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *Sci. Rep.* **2011**, *1*, Article 9.
- (16) 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 Med. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 278–282.
- (17) Behrendt, C. T.; Kunfermann, A.; Illarionova, V.; Matheeußen, A.; Pein, M. K.; Gräwert, T.; Kaiser, J.; Bacher, A.; Eisenreich, W.; Illarionov, B.; Fischer, M.; Maes, L.; Groll, M.; Kurz, T. Reverse Fosmidomycin Derivatives against the Antimalarial Drug Target IspC (Dxr). *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 6796–6802.
- (18) Reuter, K.; Sanderbrand, S.; Jomaa, H.; Wiesner, J.; Steinbrecher, I.; Beck, E.; Hintz, M.; Klebe, G.; Stubbs, M. T. Crystal Structure of 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate Reductoisomerase, a Crucial Enzyme in the Non-mevalonate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 5378–5384.
- (19) Yajima, S.; Hara, K.; Sanders, J. M.; Yin, F.; Ohsawa, K.; Wiesner, J.; Jomaa, H.; Oldfield, E. Crystallographic Structures of Two Bisphosphonate:1-Deoxyxylulose-5-phosphate Reductoisomerase Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10824–10825.
- (20) Deng, L.; Endo, K.; Kato, M.; Cheng, G.; Yajima, S.; Song, Y. Structures of 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate Reductoisomerase/Lipophilic Phosphonate Complexes. *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 165–170.
- (21) Yajima, S.; Nonaka, T.; Kuzuyama, T.; Seto, H.; Ohsawa, K. Crystal Structure of 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate Reductoisomerase Complexed with Cofactors: Implications of a Flexible Loop Movement upon Substrate Binding. *J. Biochem.* **2002**, *131*, 313–317.
- (22) Steinbacher, S.; Kaiser, J.; Eisenreich, W.; Huber, R.; Bacher, A.; Rohdich, F. Structural Basis of Fosmidomycin Action Revealed by the Complex with 2-C-Methyl-D-erythritol 4-Phosphate Synthase (IspC). Implications for the Catalytic Mechanism and Anti-Malaria Drug Development. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 18401.
- (23) Mac Sweeney, A.; Lange, R.; Fernandes, R. P.; Schulz, H.; Dale, G. E.; Douangamath, A.; Proteau, P. J.; Oefner, C. The Crystal Structure of *E. coli* 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate Reductoisomerase in a Ternary Complex with the Antimalarial Compound Fosmidomycin and NADPH Reveals a Tight-Binding Closed Enzyme Conformation. *J. Mol. Biol.* **2005**, *345*, 115–127.
- (24) Yajima, S.; Hara, K.; Iino, D.; Sasaki, Y.; Kuzuyama, T.; Ohsawa, K.; Seto, H. Structure of 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate Reductoisomerase in a Quaternary Complex with a Magnesium Ion, NADPH, and the Antimalarial Drug Fosmidomycin. *Acta Crystallogr., Sect. F: Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2007**, *63*, 466–470.
- (25) Jansson, A. M.; 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, B. R.; Larhed, M.; Jones, T. A.; Karlén, A.; Mowbray, S. L. DXR Inhibition by Potent Mono- and Disubstituted Fosmidomycin Analogs. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 6190–6199.
- (26) Andaloussi, M.; Henriksson, L. M.; Wieckowska, A.; Lindh, M.; Björkelid, C.; Larsson, A. M.; Suresh, S.; Iyer, H.; Srinivasa, B. R.; Bergfors, T.; Unge, T.; Mowbray, S. L.; Larhed, M.; Jones, T. A.; Karlén, A. Design, Synthesis, and X-ray Crystallographic Studies of α -Aryl Substituted Fosmidomycin Analogues as Inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate Reductoisomerase. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 4964–4976.
- (27) Deng, L.; Diao, J.; Chen, P.; Pujari, V.; Yao, Y.; Cheng, G.; Crick, D. C.; Prasad, B. V. V.; Song, Y. Inhibition of 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate Reductoisomerase by Lipophilic Phosphonates: SAR, QSAR, and Crystallographic Studies. *J. Med. Chem.* **2011**, No. 54, 4721–4734.
- (28) Henriksson, L. M.; Unge, T.; Carlsson, J.; Aqvist, J.; Mowbray, S. L.; Jones, T. A. Structures of *Mycobacterium tuberculosis* 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate Reductoisomerase Provide New Insights into Catalysis. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 19905–19916.
- (29) Behrendt, C. T.; Kunfermann, A.; Illarionova, V.; Matheeußen, A.; Gräwert, T.; Groll, M.; Rohdich, F.; Bacher, A.; Eisenreich, W.; Fischer, M.; Maes, L.; Kurz, T. Synthesis and Antiplasmodial Activity of Highly Active Reverse Analogues of the Antimalarial Drug Candidate Fosmidomycin. *ChemMedChem* **2010**, *5*, 1673–1676.
- (30) Brücher, K.; Illarionov, B.; Held, J.; Tschan, S.; Kunfermann, A.; Pein, M. K.; Bacher, A.; Gräwert, T.; Maes, L.; Mordmüller, B.; Fischer, M.; Kurz, T. α -Substituted β -Oxa Isosteres of Fosmidomycin: Synthesis and Biological Evaluation. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 6566–6575.
- (31) Hirano, H.; Osawa, E.; Yamaoka, Y.; Yokoi, T. Gastric-Mucous Membrane Protection Activity of Coptisine Derivatives. *Biol. Pharm. Bull.* **2001**, *24*, 1277–1281.
- (32) De Macedo Puyau, P.; Perie, J. J. Synthesis of Substrate Analogues and Inhibitors for the Phosphoglycerate Mutase Enzyme. *Phosphorus, Sulphur Silicon Relat. Elem.* **1997**, *129*, 13–45.
- (33) Shendage, D. M.; Fröhlich, R.; Haufe, G. Highly Efficient Stereoconservative Amidation and Deamination of α -Amino Acids. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 3675–3678.
- (34) Vugt, D. J.; Koningstein, M. M.; Schmitz, R. F.; De Canter, F. J. J.; Groen, M. B.; Orru, R. V. A. Multicomponent Synthesis of Dihydropyrimidines and Thiazines. *Chem.—Eur. J.* **2006**, *12*, 7178–7189.
- (35) Varseev, G. N.; Maier, M. E. A Novel Palladium-Catalyzed Arylation–Dehydroaromatization Reaction: Synthesis of 7-Aryltetralones. *Org. Lett.* **2005**, *7* (18), 3881–3884.
- (36) Diel, P. J.; Maier, L. Organic Phosphorus Compounds 79¹ Preparation and Properties of α -Amino- ω -carboxyalkylphosphon- and Phosphinic Acids. *Phosphorus Sulfur Relat. Elem.* **1987**, *29*, 201–209.
- (37) Neelapapu, R.; Holzle, D. L.; Velaparthi, S.; Bai, H.; Brunsteiner, M.; Blond, S. Y.; Petukhov, P. A. Design, Synthesis, Docking, and Biological Evaluation of Novel Diazide-Containing Isoxazole- and Pyrazole-Based Histone Deacetylase Probes. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 4350–4364.
- (38) Aspinall, H. C.; Greeves, N.; McIver, E. G. Modular Chiral Polyether Podands and Their Lanthanide Complexes. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 10453–10463.
- (39) Kuzmic, P. Program DYNAFIT for the Analysis of Enzyme Kinetic Data; Application to HIV Proteinase. *Anal. Biochem.* **1996**, *237*, 260–273.
- (40) Noedl, H.; Bronnert, J.; Yingyuen, K.; Attlmayr, B.; Kollaritsch, H.; Fukuda, M. Simple Histidine-Rich Protein 2 Double-Site Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Use in Malaria Drug Sensitivity Testing. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 3575–3577.
- (41) Press, W. H.; Teukolsky, S. A.; Vetterling, W. T.; Flannery, B. P. *Numerical Recipes: The Art of Scientific Computing*, 3rd ed.; Cambridge University Press: New York, 2007; Chapter 15, pp 773–774 and pp 788–816.
- (42) Kuntz, L.; Tritsch, D.; Grosdemange-Billiard, C.; Hemmerlin, A.; Willem, A.; Bach, T. J.; Rohmer, M. Isoprenoid Biosynthesis as a Target for Antibacterial and Antiparasitic Drugs: Phosphonohydroxamic Acids as Inhibitors of Deoxyxylulose Phosphate Reductoisomerase. *Biochem. J.* **2005**, *386*, 127–135.
- (43) Haemers, T.; Wiesner, J.; Busson, R.; Jomaa, H.; Van Calenberg, S. Synthesis of α -Aryl-Substituted and Conformationally Restricted Fosmidomycin Analogues as Promising Antimalarials. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 3856–3863.

Supporting Information

Binding modes of reverse fosmidomycin analogs towards the antimalarial target

IspC

Sarah Konzuch,[†] Tomonobu Umeda,^{||} Jana Held,[#] Saskia Hähn,[†] Karin Brücher,[†] Claudia Lienau,[†] Christoph T. Behrendt,[†] Tobias Gräwert,[§] Adelbert Bacher,[§] Boris Illarionov,[§] Markus Fischer,[§] Benjamin Mordmüller,^{#,▽} Nobutada Tanaka,^{||} and Thomas Kurz^{*,†}

[†]Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Heinrich Heine Universität, Universitätsstr. 1, 40225 Düsseldorf, Germany; ^{||}School of Pharmacy, Showa University, Tokyo 142-8555, Japan; [#]Institut für Tropenmedizin, Eberhard Karls Universität Tübingen, Wilhelmstr. 27, 72074 Tübingen, Germany; [§]Hamburg School of Food Science, Universität Hamburg, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, Germany; and [▽]Medical Research Unit, Albert Schweitzer Hospital, Lambaréné, Gabon

Table of Contents

Chemistry	S2
Biological evaluation	S30
Crystal structure	S33
References	S38

Chemistry

All solvents and chemicals were used as purchased without further purification. The progress of all reactions was monitored on Merck precoated silica gel plates (with fluorescence indicator UV₂₅₄) using ethyl acetate / *n*-hexane as solvent system. Column chromatography was performed with Fluka silica gel 60 (230-400 mesh ASTM) with the solvent mixtures specified in the corresponding experiment. Spots were visualized by irradiation with ultraviolet light (254 nm). Melting points (mp) were taken in open capillaries using a Mettler FP 5 melting-point apparatus or a Stuart melting point apparatus SMP11 and are uncorrected. Proton (¹H) and carbon (¹³C) NMR spectra were recorded using Bruker Avance 500 (500.13 MHz for ¹H; 125.76 MHz for ¹³C) or Bruker Avance 600 (600.22 MHz for ¹H; 150.93 MHz for ¹³C) spectrometers using [D₆]DMSO and CDCl₃ as solvents. Chemical shifts are given in parts per million (ppm, δ relative to residual solvent peak for ¹H and ¹³C or to external tetramethylsilane). Elemental analysis was performed with a Perkin Elmer PE 2400 CHN elemental analyser or a vario MICRO cube elemental analyser (Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau, Germany). If necessary, the purity was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). HPLC was performed in analogy to a previously reported procedure.¹ The Instrument was an Elite LaChrom system (Hitachi L-2130 pump and L-2400 UV-detector) or a Varian ProStar HPLC System (Varian ProStar 210 pump, Varian ProStar 320 UV-detector and Varian ProStar 410 autosampler). The column was a Phenomenex Luna C-18(2) 5 μ m particle (250 mm $\times$ 4.6 mm), supported by Phenomenex Security Guard Cartridge Kit C18 (4.0 mm $\times$ 3.0 mm). Purity of all final compounds was 95 % or higher, except compound **6** (purity 92.2 %).

Materials. Diethylphosphonates **8a-e** and α -hydroxyphosphonate **18** have been previously described.²⁻⁹ α -Aminophosphonate **25** and carboxylic acid **29** have been prepared according to known procedures.^{10,11}

General procedure for the synthesis of dioxolanes (9a-d).¹¹ At a temperature of -78 °C, a 1.6 M solution of *n*-butyllithium in *n*-hexane (1.1 eq, 44 mmol, 27.5 mL) was slowly added to a solution of the

respective diethyl arylmethylphosphonate **8a-d** (1 eq, 40 mmol) in dry toluene (50 mL) via a syringe under positive pressure of dry nitrogen. After stirring for 1 h, 2-(2-bromoethyl)-1,3-dioxolane or 2-(3-bromopropyl)-1,3-dioxolane (1 eq, 40 mmol) was added in one portion. The reaction mixture was allowed to warm up to room temperature and stirred overnight. Ethyl acetate (50 mL) was added and the solution was washed three times with an aqueous solution of NH_4Cl (10 %, 50 mL). The organic layer was dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude oil was purified by column chromatography on silica gel using ethyl acetate / *n*-hexane (1:1) as the eluent to give compounds **9a-d** as colorless oils.

Diethyl 1-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(1,3-dioxolan-2-yl)propylphosphonate (9a). Colorless oil (13.05 g, 84 %); ^1H NMR (500.13 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 1.05 (t, J = 7.0 Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.21 (t, J = 7.0 Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.32-1.39 (m, 1H, CH_2), 1.43-1.50 (m, 1H, CH_2), 1.78-1.88 (m, 1H, CH_2), 1.96-2.05 (m, 1H, CH_2), 3.09 (ddd, J = 21.8, 11.4, 4.0 Hz, 1H, PCH), 3.68-3.76 (m, 9H, OCH_3 , CHOOCH_2), 3.80-3.87 (m, 3H, CH_2CH_3 , CHOOCH_2), 3.92-4.01 (m, 2H, CH_2CH_3), 4.74 (t, J = 4.6 Hz, 1H, CHOO), 6.81-6.83 (m, 1H), 6.89-6.91 (m, 2H) ppm; ^{13}C NMR (125.76 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 16.0 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 5.5 Hz, CH_2CH_3), 16.2 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 5.5 Hz, CH_2CH_3), 24.0 (CH_2CH_2), 31.1 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 14.7 Hz, CHCH_2), 41.9 (d, $^1J_{\text{C-P}}$ = 136.8 Hz, PCH), 55.3 (OCH_3), 55.4 (OCH_3), 61.0 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 7.1 Hz, CH_2CH_3), 61.5 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 7.0 Hz, CH_2CH_3), 64.1 (CHOOCH_2), 64.2 (CHOOCH_2), 103.0 (CHOO), 111.6, 112.9 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 6.4 Hz), 121.1 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 7.4 Hz), 128.3 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 6.6 Hz), 147.7, 148.3 ppm; anal. calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{O}_7\text{P}$: C 55.66, H 7.53, found: C 55.29, H 7.89.

Diethyl 4-(1,3-dioxolan-2-yl)-1-phenylbutylphosphonate (9b). Colorless oil (8.60 g, 63 %); ^1H NMR (600.22 MHz, CDCl_3): δ = 1.08 (t, J = 7.0 Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.26-1.38 (m, 5H, CH_2CH_3 , CH_2), 1.56-1.68 (m, 2H, CH_2), 1.99-2.04 (m, 1H, CH_2), 2.08-2.13 (m, 1H, CH_2), 2.98 (ddd, J = 22.6, 11.2, 3.6 Hz, 1H, PCH), 3.67-3.71 (m, 1H, CHOOCH_2), 3.77-3.79 (m, 2H, CHOOCH_2), 3.85-3.91 (m, 3H, CHOOCH_2 , CH_2CH_3), 3.98-4.09 (m, 2H, CH_2CH_3), 4.75 (t, J = 4.7 Hz, 1H, CHOO), 7.22-7.24 (m, 1H), 7.29-7.31 (m, 4H) ppm; ^{13}C NMR (150.93 MHz, CDCl_3): δ = 16.2 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 5.7 Hz, CH_2CH_3), 16.4 (d,

$^3J_{C-P} = 6.2$ Hz, CH_2CH_3), 22.2 (d, $^2J_{C-P} = 15.8$ Hz, CH_2), 29.6 (d, $^2J_{C-P} = 3.1$ Hz, CH_2), 33.4 (CH_2), 44.7 (d, $^1J_{C-P} = 137.4$ Hz, PCH), 61.7 (d, $^2J_{C-P} = 7.3$ Hz, CH_2CH_3), 62.5 (d, $^2J_{C-P} = 6.8$ Hz, CH_2CH_3), 64.7 ($CHOOCH_2$), 64.8 ($CHOOCH_2$), 104.2 ($CHOO$), 127.1 (d, $^5J_{C-P} = 3.1$ Hz), 128.5 (d, $^4J_{C-P} = 1.9$ Hz), 129.2 (d, $^3J_{C-P} = 6.7$ Hz), 136.0 (d, $^2J_{C-P} = 6.4$ Hz) ppm; anal. calcd. for $C_{17}H_{27}O_5P$: C 59.64, H 7.95, found: C 59.44, H 7.88.

Diethyl 3-(1,3-dioxolan-2-yl)-1-p-tolylpropylphosphonate (9c). Colorless oil (9.72 g, 71 %); ^1H NMR (500.13 MHz, $[D_6]DMSO$): $\delta = 1.03$ (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.20 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.32 (ddd, $J = 18.2, 13.8, 4.1$ Hz, 1H, CH_2), 1.45 (dq, $J = 15.1, 4.9$ Hz, 1H, CH_2), 1.77-1.93 (m, 1H, CH_2), 1.93-2.08 (m, 2H, CH_2), 2.27 (s, 3H, $PhCH_3$), 3.12 (ddd, $J = 21.8, 11.3, 3.1$ Hz, 1H, PCH), 3.88-4.07 (m, 8H, CH_2CH_3 , $CHOOCH_2$), 4.72 (t, $J = 4.1$ Hz, 1H, $CHOO$), 7.15 (dd, $J = 22.3, 7.7$ Hz, 4H) ppm; ^{13}C NMR (125.76 MHz, $[D_6]DMSO$): $\delta = 16.0$ (d, $^3J_{C-P} = 5.3$ Hz, CH_2CH_3), 16.2 (d, $^3J_{C-P} = 5.5$ Hz, CH_2CH_3), 20.6 ($PhCH_3$), 23.9 (d, $^3J_{C-P} = 2.0$ Hz, CH_2CH_2), 31.1 (d, $^2J_{C-P} = 14.8$ Hz, $CHCH_2$), 42.0 (d, $^1J_{C-P} = 136.5$ Hz, PCH), 61.1 (d, $^2J_{C-P} = 7.0$ Hz, CH_2CH_3), 61.5 (d, $^2J_{C-P} = 7.0$ Hz, CH_2CH_3), 64.1 ($CHOOCH_2$), 64.2 ($CHOOCH_2$), 103.0 ($CHOO$), 128.8, 128.9 (d, $^3J_{C-P} = 6.8$ Hz), 133.0 (d, $^2J_{C-P} = 6.7$ Hz), 135.8 (d, $^5J_{C-P} = 3.0$ Hz) ppm; anal. calcd. for $C_{17}H_{27}O_5P$: C 59.64, H 7.95, found: C 59.45, H 8.26.

Diethyl 3-(1,3-dioxolan-2-yl)-1-(4-methoxyphenyl)propylphosphonate (9d). Colorless oil (7.45 g, 52 %); ^1H NMR (500.13 MHz, $[D_6]DMSO$): $\delta = 1.03$ (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.20 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.29-1.36 (m, 1H, CH_2), 1.41-1.48 (m, 1H, CH_2), 1.77-1.81 (m, 1H, CH_2), 2.01 (m, 1H, CH_2), 3.11 (ddd, $J = 21.9, 11.5, 4.0$ Hz, 1H, PCH), 3.63-3.76 (m, 6H, CH_2CH_3 , $CHOOCH_2$), 3.67-3.88 (m, 3H, CH_2CH_3 , $CHOOCH_2$), 3.91-4.01 (m, 2H, CH_2CH_3), 4.73 (t, $J = 4.6$ Hz, 1H, $CHOO$), 6.89 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.21 (dd, $J = 8.7, 2.1$ Hz, 2H) ppm; ^{13}C NMR (125.76 MHz, $[D_6]DMSO$): $\delta = 16.0$ (d, $^3J_{C-P} = 5.5$ Hz, CH_2CH_3), 16.2 (d, $^3J_{C-P} = 5.5$ Hz, CH_2CH_3), 23.9 (d, $^3J_{C-P} = 1.5$ Hz, CH_2CH_2), 31.1 (d, $^2J_{C-P} = 14.9$ Hz, $CHCH_2$), 41.5 (d, $^1J_{C-P} = 137.1$ Hz, PCH), 54.9 (OCH_3), 61.0 (d, $^2J_{C-P} = 6.9$ Hz, CH_2CH_3), 61.5 (d, $^2J_{C-P} = 6.7$ Hz, CH_2CH_3), 64.1 ($CHOOCH_2$), 64.2 ($CHOOCH_2$), 103.0 ($CHOO$),

113.6, 127.8 (d, $^2J_{C-P} = 7.0$ Hz), 130.0 (d, $^3J_{C-P} = 6.9$ Hz), 158.1 ppm; anal. calcd. for $C_{17}H_{27}O_6P$: C 56.98, H 7.59, found: C 56.74, H 7.75.

Diethyl 1-(3,4-dimethoxyphenyl)-4-oxobutylphosphonate (10a).¹² Dowex 50WX8 (3mL) was added to a solution of dioxolane **9a** (14.5 mmol, 5.63 g) in water/acetone (10:1, 5 mL). After stirring at room temperature for 48 hours, the solution was filtered. The filtrate was concentrated, diluted with saturated aqueous NaCl solution and extracted three times with ethyl acetate (100 mL). The organic layer was dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure. Column chromatography on silica gel using ethyl acetate gave compound **10a** as a colorless oil (3.25 g, 65 %); ^1H NMR (500.13 MHz, $[D_6]DMSO$): $\delta = 1.05$ (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.22 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.95-2.05 (m, 1H, CH_2), 2.15-2.23 (m, 1H, CH_2), 2.25-2.39 (m, 2H, CH_2), 3.09 (ddd, $J = 21.8, 11.3, 4.2$ Hz, 1H, PCH), 3.72 (s, 3H, OCH_3), 3.73 (s, 3H, OCH_3), 3.80-3.90 (m, 2H, CH_2CH_3), 3.93-4.03 (m, 2H, CH_2CH_3), 6.79-6.82 (m, 1H), 6.88-6.91 (m, 2H), 9.55 (s, 1H, CHO); ^{13}C NMR (125.76 MHz, $[D_6]DMSO$): $\delta = 16.1$ (d, $^3J_{C-P} = 5.6$ Hz, CH_2CH_3), 16.2 (d, $^3J_{C-P} = 5.5$ Hz, CH_2CH_3), 22.3 (CH_2CH_2), 40.9 (d, $^2J_{C-P} = 14.8$ Hz, $CHCH_2$), 41.5 (d, $^1J_{C-P} = 137.0$ Hz, PCH), 55.3 (OCH_3), 55.4 (OCH_3), 61.2 (d, $^2J_{C-P} = 7.2$ Hz, CH_2CH_3), 61.6 (d, $^2J_{C-P} = 7.0$ Hz, CH_2CH_3), 111.6, 112.7 (d, $^3J_{C-P} = 6.3$ Hz), 121.2 (d, $^2J_{C-P} = 7.3$ Hz), 127.8 (d, $^3J_{C-P} = 6.6$ Hz), 147.8, 148.4, 202.6 (CHO); anal. calcd. for $C_{16}H_{25}O_6P$: C 55.81, H 7.32, found: C 55.79, H 7.39.

General procedure for the synthesis of aldehydes (10b-d).¹¹ Dioxolanes **9b-d** (30 mmol) were reacted with 2 M hydrochloric acid (100 mL) and acetone (10 mL) at 50 °C for 3 h. Acetone was removed under reduced pressure and the aqueous layer was extracted three times with CH_2Cl_2 (50 mL). The organic layer was dried over Na_2SO_4 and filtered. The solvent was evaporated under reduced pressure. Compound **10b** was used as crude product without further purification in the next step. Column chromatography on silica gel using ethyl acetate gave compounds **10c-d** as colorless oils.

Diethyl 5-oxo-1-phenylpentylphosphonate (10b). Colorless oil (7.79 g, 87 %, crude yield); ^1H NMR (500.13 MHz, CDCl_3): δ = 1.06 (t, J = 7.0 Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.26 (t, J = 7.0 Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.53 (m, 2H, CH_2), 1.92-2.10 (m, 2H, CH_2), 2.38 (m, 2H, CH_2), 2.98 (ddd, J = 22.7, 11.2, 4.1 Hz, 1H, PCH), 3.68 (m, 1H, CH_2CH_3), 3.87 (m, 1H, CH_2CH_3), 4.03 (m, 2H, CH_2CH_3), 7.27 (m, 1H), 7.27-7.35 (m, 4H), 9.67 (t, J = 1.5 Hz, 1H, CHO) ppm; ^{13}C NMR (125.76 MHz, CDCl_3): δ = 16.2 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 5.6 Hz, CH_2CH_3), 16.3 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 5.8 Hz, CH_2CH_3), 20.2 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 15.9 Hz, CH_2), 29.2 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 3.3 Hz, CHCH_2), 43.4 (CH_2), 44.5 (d, $^1J_{\text{C-P}}$ = 137.7 Hz, PCH), 61.8 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 7.2 Hz, CH_2CH_3), 62.6 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 7.1 Hz, CH_2CH_3), 127.2 (d, $^5J_{\text{C-P}}$ = 3.0 Hz), 128.5 (d, $^4J_{\text{C-P}}$ = 2.5 Hz), 129.1 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 6.9 Hz), 135.6 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 6.7 Hz), 201.8 (CHO) ppm.

Diethyl 4-oxo-1-*p*-tolylbutylphosphonate (10c). Colorless oil (5.91 g, 66 %); ^1H NMR (500.13 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 1.04 (t, J = 7.0 Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.21 (t, J = 7.0 Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.92-2.10 (m, 2H, CH_2), 2.11-2.44 (m, 6H, CH_2 , PhCH_3), 3.13 (ddd, J = 21.7, 11.1, 3.9 Hz, 1H, PCH), 3.65-3.77 (m, 1H, CH_2CH_3), 3.77-3.88 (m, 1H, CH_2CH_3), 3.87-4.05 (m, 2H, CH_2CH_3), 6.98-7.30 (m, 4H), 9.55 (s, 1H, CHO) ppm; ^{13}C NMR (125.76 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 16.0 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 5.5 Hz, CH_2CH_3), 16.2 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 5.5 Hz, CH_2CH_3), 20.5 (PhCH_3), 22.1 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 1.5 Hz, CH_2CH_2), 40.8 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 14.6 Hz, CHCH_2), 41.5 (d, $^1J_{\text{C-P}}$ = 136.6 Hz, PCH), 61.2 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 7.0 Hz, CH_2CH_3), 61.6 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 6.8 Hz, CH_2CH_3), 128.9, 132.6 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 6.8 Hz), 136.0 (d, $^5J_{\text{C-P}}$ = 3.3 Hz), 202.5 (CHO) ppm; anal. calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{O}_4\text{P}$: C 60.39, H 7.77, found: C 60.14, H 7.48.

Diethyl 1-(4-methoxyphenyl)-4-oxobutylphosphonate (10d). Colorless oil (9.05 g, 96 %); ^1H NMR (500.13 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 1.03 (t, J = 7.0 Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.21 (t, J = 7.0 Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.91-2.38 (m, 4H, CH_2), 3.12 (ddd, J = 21.9, 11.4, 4.1 Hz, 1H, PCH), 3.67-3.85 (m, 6H, CH_2CH_3 , OCH_3), 3.93-4.03 (m, 2H, CH_2CH_3), 6.89 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.20 (dd, J = 8.6, 2.0 Hz, 2H), 9.55 (s, 1H, CHO) ppm; ^{13}C NMR (125.76 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 16.1 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 5.5 Hz, CH_2CH_3), 16.3 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 5.7 Hz, CH_2CH_3), 22.2 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 1.2 Hz, CH_2CH_2), 40.9 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 14.7 Hz, CHCH_2), 41.0 (d, $^1J_{\text{C-P}}$ = 137.0 Hz, PCH), 55.0 (OCH_3), 61.2 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 6.8 Hz, CH_2CH_3), 61.7 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 6.7 Hz,

CH₂CH₃), 113.6, 127.4 (d, $^2J_{C-P}$ = 6.8 Hz), 130.2 (d, $^3J_{C-P}$ = 6.8 Hz), 158.3, 202.7 (CHO) ppm; anal. calcd. for C₁₅H₂₃O₅P: C 57.32, H 7.38, found: C 56.99, H 7.42.

General procedure for the synthesis of carboxylic acids (11a-d).¹¹ To a solution of the respective aldehyde **10a-d** (1 eq, 5 mmol) in THF (7.5 mL), H₂O₂ (1.1 mL of a 30 % solution) and SeO₂ (0.5 eq, 2.5 mmol, 0.28 g) were added. The solution was refluxed for 4 h and the reaction mixture was concentrated under reduced pressure. Ethyl acetate (50 mL) was added to the remaining oil and the resulting solution was washed three times with 1 M hydrochloric acid (10 mL). After drying over Na₂SO₄, the organic solvent was removed under reduced pressure. The crude products **11c-d** were treated with diethyl ether (20 mL) and stored at 7 °C to give compounds **11c-d** as white solids. Pure compounds **11a** and **11b** were obtained without further purification.

4-(Diethoxyphosphoryl)-4-(3,4-dimethoxyphenyl)butanoic acid (11a). Yellow resin (1.58 g, 88 %); ¹H NMR (500.13 MHz, [D₆]DMSO): δ = 1.06 (t, J = 7.0 Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.22 (t, J = 7.0 Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.91-2.01 (m, 1H, CH₂), 2.06-2.10 (m, 2H, CH₂), 2.13-2.19 (m, 1H, CH₂), 3.10 (ddd, J = 21.8, 11.1, 4.0 Hz, 1H, PCH), 3.73 (s, 3H, OCH₃), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 3.78-3.89 (m, 1H, CH₂CH₃), 3.93-4.07 (m, 3H, CH₂CH₃), 6.80-6.81 (m, 1H), 6.87 (s, 1H), 6.91 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 12.10 (s, 1H, COOH); ¹³C NMR (125.76 MHz, [D₆]DMSO): δ = 16.0 (d, $^3J_{C-P}$ = 5.5 Hz, CH₂CH₃), 16.2 (d, $^3J_{C-P}$ = 5.5 Hz, CH₂CH₃), 25.0 (CH₂CH₂), 41.3 (d, $^2J_{C-P}$ = 15.4 Hz, CHCH₂), 41.5 (d, $^1J_{C-P}$ = 137.7 Hz, PCH), 55.3 (OCH₃), 55.4 (OCH₃), 61.1 (d, $^2J_{C-P}$ = 7.1 Hz, CH₂CH₃), 61.6 (d, $^2J_{C-P}$ = 6.8 Hz, CH₂CH₃), 111.6, 112.7 (d, $^3J_{C-P}$ = 6.3 Hz), 121.2 (d, $^2J_{C-P}$ = 7.3 Hz), 127.9 (d, $^3J_{C-P}$ = 6.7 Hz), 147.8, 148.4, 173.6 (COOH); HPLC analysis: retention time = 1.84 min; peak area: 93.3 %. Eluent A: 5 mM NH₄OAc solution; eluent B: CH₃CN, isocratic (1:1) over 20 min at a flow rate of 1 mL min⁻¹.

5-(Diethoxyphosphoryl)-5-phenylpentanoic acid (11b). Colorless oil (1.04 g; 66 %); ¹H NMR (600.22 MHz, [D₆]DMSO): δ = 1.01 (t, J = 7.0 Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.20 (t, J = 7.0 Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.28-1.39 (m, 2H, CH₂), 1.81-1.97 (m, 2H, CH₂), 2.12-2.22 (m, 2H, CH₂), 3.16 (ddd, J = 22.2, 11.3,

4.0 Hz, 1H, PCH), 3.68-3.73 (m, 1H, CH₂CH₃), 3.77-3.84 (m, 1H, CH₂CH₃), 3.92-4.00 (m, 2H, CH₂CH₃), 7.23-7.27 (m, 1H), 7.31-7.34 (m, 4H), 11.98 (s, 1H, COOH) ppm; ¹³C NMR (150.93 MHz, [D₆]DMSO): δ = 15.9 (d, ³J_{C-P} = 5.5 Hz, CH₂CH₃), 16.2 (d, ³J_{C-P} = 5.5 Hz, CH₂CH₃), 22.6 (d, ³J_{C-P} = 15.7 Hz, CH₂), 28.6 (d, ²J_{C-P} = 2.7 Hz, CHCH₂), 33.0 (CH₂), 42.6 (d, ¹J_{C-P} = 136.0 Hz, PCH), 61.1 (d, ²J_{C-P} = 7.1 Hz, CH₂CH₃), 61.5 (d, ²J_{C-P} = 6.7 Hz, CH₂CH₃), 126.7 (d, ⁵J_{C-P} = 2.9 Hz), 128.1, 129.0 (d, ³J_{C-P} = 6.7 Hz), 136.2 (d, ²J_{C-P} = 6.9 Hz), 174.1 (COOH) ppm; anal. calcd. for C₁₅H₂₃O₅P: C 57.32, H 7.38, found: C 57.56, H 7.23.

4-(Diethoxyphosphoryl)-4-*p*-tolylbutanoic acid (11c). White solid (1.19 g, 76 %); mp: 78 °C; ¹H NMR (500.13 MHz, [D₆]DMSO): δ = 1.04 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.21 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.88-2.02 (m, 1H, CH₂), 2.02-2.13 (m, 2H, CH₂), 2.13-2.24 (m, 1H, CH₂), 2.30 (s, 3H, PhCH₃), 3.15 (ddd, *J* = 21.9, 11.1, 4.1 Hz, 1H, PCH), 3.64-3.77 (m, 1H, CH₂CH₃), 3.76-3.89 (m, 1H, CH₂CH₃), 3.89-4.08 (m, 2H, CH₂CH₃), 7.06-7.25 (m, 4H), 12.1 (s, 1H, COOH) ppm; ¹³C NMR (125.76 MHz, [D₆]DMSO): δ = 16.0 (d, ³J_{C-P} = 5.5 Hz, CH₂CH₃), 16.2 (d, ³J_{C-P} = 5.7 Hz, CH₂CH₃), 20.6 (PhCH₃), 24.8 (CH₂CH₂), 41.3 (d, ²J_{C-P} = 15.2 Hz, CHCH₂), 41.6 (d, ¹J_{C-P} = 136.8 Hz, PCH), 61.2 (d, ²J_{C-P} = 6.9 Hz, CH₂CH₃), 61.6 (d, ²J_{C-P} = 6.8 Hz, CH₂CH₃), 128.8, 128.9, 132.6 (d, ²J_{C-P} = 6.9 Hz), 136.0 (d, ⁵J_{C-P} = 2.7 Hz), 173.7 (COOH) ppm; anal. calcd. for C₁₈H₂₃O₅P: C 57.32, H 7.38, found: C 57.32, H 7.24.

4-(Diethoxyphosphoryl)-4-(4-methoxyphenyl)butanoic acid (11d). White solid (1.04 g, 63%); mp: 92 °C; ¹H NMR (500.13 MHz, [D₆]DMSO): δ = 1.04 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.21 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.90-2.23 (m, 4H, CH₂), 3.13 (ddd, *J* = 22.0, 11.2, 4.1 Hz, 1H, PCH), 3.67-3.85 (m, 5H, OCH₃, CH₂CH₃), 3.93-4.02 (m, 2H, CH₂CH₃), 6.90 (d, *J* = 8.5 Hz, 3H), 7.20 (dd, *J* = 8.7, 2.1 Hz, 3H), 12.1 (s, 1H, COOH) ppm; ¹³C NMR (125.76 MHz, [D₆]DMSO): δ = 16.1 (d, ³J_{C-P} = 5.4 Hz, CH₂CH₃), 16.3 (d, ³J_{C-P} = 5.5 Hz, CH₂CH₃), 25.0 (CH₂CH₂), 31.4 (d, ²J_{C-P} = 15.5 Hz, CHCH₂), 41.2 (d, ¹J_{C-P} = 137.4 Hz, PCH), 55.0 (OCH₃), 61.2 (d, ²J_{C-P} = 7.1 Hz, CH₂CH₃), 61.7 (d, ²J_{C-P} = 6.9 Hz,

CH₂CH₃), 113.8, 127.4 (d, $^2J_{C-P}$ = 6.9 Hz), 130.1 (d, $^3J_{C-P}$ = 6.6 Hz), 158.3 (d, $^5J_{C-P}$ = 2.7 Hz), 173.8 (COOH) ppm; anal. calcd. for C₁₅H₂₃O₆P: C 54.54, H 7.02, found: C 54.40, H 7.28.

General procedure for the synthesis of O-Bn-protected hydroxamic acids (12b-d, 14c-d, 21, 23).¹¹

To a solution of the respective carboxylic acid **11b-d**, **20** (1 eq, 5 mmol) in dry CH₂Cl₂ (50 mL) 1,1'-carbonyldiimidazole (1.1 eq, 5.5 mmol, 0.9 g) was added in small portions. After stirring at room temperature for 45 min, the appropriate hydroxylamine (1 eq, 5 mmol) was added in one portion. The solution was stirred overnight and the solvent was removed under reduced pressure. The remaining residue was dissolved in ethyl acetate (30 mL) and the organic layer was washed three times with an aqueous solution of citric acid (10 %, 10 mL) and once with a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (10 mL). The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel using ethyl acetate / *n*-hexane (1:1) as the eluent to give compounds **12b-d**, **14c-d**, **21** and **23** as colorless oils.

Diethyl 5-[benzyloxy(methyl)amino]-5-oxo-1-phenylpentylphosphonate (12b). Colorless oil (1.84 g, 85 %); ¹H NMR (500.13 MHz, [D₆]DMSO): δ = 1.00 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.19 (t, J = 7.0 Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.23-1.32 (m, 2H, CH₂), 1.75-1.93 (m, 2H, CH₂), 2.23-2.34 (m, 2H, CH₂), 3.09 (s, 3H, NCH₃), 3.11 (ddd, J = 21.9, 11.1, 4.0 Hz, 1H, PCH), 3.64-3.72 (m, 1H, CH₂CH₃), 3.75-3.83 (m, 1H, CH₂CH₃), 3.91-3.99 (m, 2H, CH₂CH₃), 4.84 (s, 2H, PhCH₂), 7.21-7.46 (m, 10H) ppm; ¹³C NMR (125.76 MHz, [D₆]DMSO): δ = 16.0 (d, $^3J_{C-P}$ = 5.5 Hz, CH₂CH₃), 16.2 (d, $^3J_{C-P}$ = 5.5 Hz, CH₂CH₃), 22.2 (CH₂CH₂), 28.7 (d, $^2J_{C-P}$ = 2.9 Hz, CHCH₂), 30.9 (CH₂), 32.7 (NCH₃), 42.8 (d, $^1J_{C-P}$ = 135.5 Hz, PCH), 61.1 (d, $^2J_{C-P}$ = 7.1 Hz, CH₂CH₃), 61.5 (d, $^2J_{C-P}$ = 6.9 Hz, CH₂CH₃), 75.0 (PhCH₂), 127.0 (d, $^5J_{C-P}$ = 2.7 Hz), 128.1 (d, $^4J_{C-P}$ = 1.8 Hz), 128.4, 128.6, 129.0 (d, $^3J_{C-P}$ = 6.8 Hz), 129.4, 134.8, 136.6 (d, $^2J_{C-P}$ = 6.9 Hz), 173.4 (C=O) ppm; anal. calcd. for C₂₃H₃₂NO₅P: C 63.73, H 7.44, N 3.23, found: C 63.53, H 7.29, N 3.20.

Diethyl 4-(benzyloxyamino)-4-oxo-1-*p*-tolylbutylphosphonate (12c). Colorless oil (1.56 g, 72 %); ^1H NMR (500.13 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 1.04 (t, J = 7.0 Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.21 (t, J = 7.0 Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.81 (t, J = 7.4 Hz, 2H, CH_2), 1.89-2.06 (m, 1H, CH_2), 2.07-2.43 (m, 4H, CH_2 , PhCH_3), 3.00-3.21 (ddd, J = 22.0, 11.3, 3.2 Hz, 1H, PCH), 3.62-3.76 (m, 1H, CH_2CH_3), 3.76-3.89 (m, 1H, CH_2CH_3), 3.89-4.14 (m, 2H, CH_2CH_3), 4.52 (s, 0.26H, *E*-isomer, PhCH_2), 4.74 (s, 1.74H, *Z*-isomer, PhCH_2), 7.13 (s, 4H) 7.36 (s, 5H), 10.50 (s, 0.13H, *E*-isomer, NH), 10.86 (s, 0.87H, *Z*-isomer, NH) ppm; ^{13}C NMR (125.76 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 16.0 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 5.5 Hz, CH_2CH_3), 16.2 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 5.5 Hz, CH_2CH_3), 20.6 (PhCH_3), 25.1 (CH_2CH_2), 29.8 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 16.3 Hz, CHCH_2), 41.8 (d, $^1J_{\text{C-P}}$ = 136.6 Hz, PCH), 61.2 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 7.2 Hz, CH_2CH_3), 61.5 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 6.6 Hz, CH_2CH_3), 76.6 (PhCH_2), 128.1, 128.2, 128.6, 128.9, 128.9 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 6.7 Hz), 132.6 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 5.5 Hz), 135.9 (d, $^5J_{\text{C-P}}$ = 2.6 Hz), 168.5 (C=O) ppm; anal. calcd. for $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{NO}_5\text{P}$: C 63.00, H 7.21, N 3.34, found: C 62.79, H 7.55, N 3.31.

Diethyl 4-[benzyloxy(methyl)amino]-1-(4-methoxyphenyl)-4-oxobutylphosphonate (12d). Colorless oil (1.48 g, 66 %); ^1H NMR (500.13 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 1.04 (t, J = 7.0 Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.21 (t, J = 7.0 Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.87-1.97 (m, 1H, CH_2), 2.14-2.22 (m, 3H, CH_2), 3.09-3.16 (m, 4H, NCH_3 , PCH), 3.67-3.84 (m, 4H, OCH_3 , CH_2CH_3), 3.77-3.84 (m, 1H, CH_2CH_3), 3.93-3.99 (m, 2H, CH_2CH_3), 4.62-4.69 (m, 2H, PhCH_2), 6.91 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.19-7.21 (m, 4H), 7.33-7.35 (m, 3H) ppm; ^{13}C NMR (125.76 MHz, CDCl_3): δ = 16.5 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 5.6 Hz, CH_2CH_3), 16.7 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 5.6 Hz, CH_2CH_3), 24.9 (CH_2CH_2), 29.7 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 15.8 Hz, CHCH_2), 33.1 (NCH_3), 41.7 (d, $^1J_{\text{C-P}}$ = 137.2 Hz, PCH), 55.4 (OCH_3), 61.6 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 7.0 Hz, CH_2CH_3), 62.0 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 6.8 Hz, CH_2CH_3), 75.6 (PhCH_2), 114.2, 128.0, 128.7, 129.0, 129.8, 130.5 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 6.5 Hz), 134.8, 158.7, 173.4 (C=O) ppm; anal. calcd. for $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{NO}_6\text{P}$: C 61.46, H 7.18, N 3.12, found: C 61.22, H 7.06, N 2.93.

Diethyl 4-[benzyloxy(methyl)amino]-4-oxo-1-*p*-tolylbutylphosphonate (14c). Colorless oil (1.74 g, 83 %); ^1H NMR (500.13 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 1.04 (t, J = 7.0 Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.21 (t, J = 6.8 Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.86-1.99 (m, 1H, CHCH_2), 2.13-2.26 (m, 3H, CH_2), 2.29 (s, 3H, PhCH_3), 3.10 (s, 3H,

NCH₃), 3.12-3.22 (m, 1H, PCH), 3.65-3.78 (m, 1H, CH₂CH₃), 3.78-3.89 (m, 1H, CH₂CH₃), 3.89-4.03 (m, 2H, CH₂CH₃), 4.66 (dd, $J = 24.2, 9.9$ Hz, 2H, PhCH₂), 7.04-7.27 (m, 6H), 7.27-7.49 (m, 3H) ppm; ¹³C NMR (125.76 MHz, [D₆]DMSO): $\delta = 16.5$ (d, $^3J_{C-P} = 5.5$ Hz, CH₂CH₃), 16.6 (d, $^3J_{C-P} = 5.6$ Hz, CH₂CH₃), 21.0 (PhCH₃), 24.7 (CH₂CH₂), 29.7 (d, $^2J_{C-P} = 15.3$ Hz, CHCH₂), 33.1 (NCH₃), 42.2 (d, $^1J_{C-P} = 136.5$ Hz, PCH), 61.6 (d, $^2J_{C-P} = 6.8$ Hz, CH₂CH₃), 62.0 (d, $^2J_{C-P} = 6.9$ Hz, CH₂CH₃), 75.6 (PhCH₂), 124.4, 128.3, 128.7, 129.0, 129.8, 133.2 (d, $^3J_{C-P} = 6.6$ Hz), 134.8, 136.4 (d, $^5J_{C-P} = 2.9$ Hz), 173.3 (C=O) ppm; anal. calcd. for C₂₃H₃₂NO₅P: C 63.73, H 7.44, N 3.23, found: C 63.55, H 7.45, N 3.16.

Diethyl 4-(benzyloxyamino)-1-(4-methoxyphenyl)-4-oxobutylphosphonate (14d). Colorless oil (1.39 g, 64 %); ¹H NMR (500.13 MHz, [D₆]DMSO): $\delta = 1.04$ (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.21 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.79-1.82 (m, 2H, CH₂), 1.89-1.97 (m, 1H, CH₂), 2.15-2.21 (m, 1H, CH₂), 3.00-3.21 (ddd, $J = 22.0, 11.3, 3.4$ Hz, 1H, PCH), 3.66-3.71 (m, 1H, CH₂CH₃), 3.73 (s, 3H, OCH₃), 3.77-3.83 (m, 1H, CH₂CH₃), 3.92-3.99 (m, 2H, CH₂CH₃), 4.74 (s, 2H, PhCH₂), 6.88 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.17 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H), 7.33-7.36 (m, 5H), 10.86 (s, 1H, NH) ppm; ¹³C NMR (125.76 MHz, CDCl₃): $\delta = 16.0$ (d, $^3J_{C-P} = 5.4$ Hz, CH₂CH₃), 16.2 (d, $^3J_{C-P} = 5.5$ Hz, CH₂CH₃), 25.2 (CH₂CH₂), 29.8 (d, $^2J_{C-P} = 17.2$ Hz, CHCH₂), 41.3 (d, $^1J_{C-P} = 136.8$ Hz, PCH), 61.1 (d, $^2J_{C-P} = 7.1$ Hz, CH₂CH₃), 61.5 (d, $^2J_{C-P} = 6.4$ Hz, CH₂CH₃), 76.6 (PhCH₂), 113.7, 128.1, 128.2, 128.6, 130.6 (d, $^2J_{C-P} = 6.7$ Hz), 136.0, 158.1, 168.5 (C=O) ppm; anal. calcd. for C₂₂H₃₀NO₆P: C 60.68, H 6.94, N 3.22, found: C 60.57, H 7.17, N 3.11.

Diethyl {2-[benzyloxy(methyl)amino]-2-oxoethoxy}(4-methoxyphenyl)methylphosphonate (21). Colorless oil (2.26 g, quant.); ¹H NMR (500.13 MHz, CDCl₃): $\delta = 1.21$ (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.30 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH₂CH₃), 3.17 (s, 3H, NCH₃), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 3.94-4.03 (m, 1H, CH₂CH₃), 4.03 (d, $J = 16.1$ Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.05-4.13 (m, 1H, CH₂CH₃), 4.17 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH₂CH₃), 4.31 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, OCH₂C=O), 4.68 (dd, $J = 39.7, 10.5$ Hz, 2H, PhCH₂), 4.95 (d, $^2J_{H,P} = 14.4$ Hz, 1H, PCH), 6.90 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.17-7.24 (m, 2H), 7.29-7.35 (m, 3H), 7.38 (dd, $J = 8.7, 2.0$ Hz, 2H)

ppm; ^{13}C NMR (125.76 MHz, CDCl_3): δ = 16.4 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 5.8 Hz, CH_2CH_3), 16.5 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 5.8 Hz, CH_2CH_3), 33.5 (NCH_3), 55.3 (OCH_3), 63.0 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 6.6 Hz, CH_2CH_3), 63.3 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 6.9 Hz, CH_2CH_3), 65.6 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 12.8 Hz, CH_2CH_3), 76.4 (PhCH_2), 77.3 (d, $^1J_{\text{C-P}}$ = 169.5 Hz, PCH), 114.0 (d, $^4J_{\text{C-P}}$ = 1.5 Hz), 125.6 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 2.1 Hz), 128.7, 129.1, 129.3, 130.0 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 6.2 Hz), 134.0, 159.9 (d, $^5J_{\text{C-P}}$ = 2.5 Hz), 171.2 (C=O) ppm; anal. calcd. for $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{NO}_7\text{P}$: C 58.53, H 6.70, N 3.10, found: C 58.75, H 6.55, N 3.14.

Diethyl [2-(benzyloxyamino)-2-oxoethoxy](4-methoxyphenyl)methylphosphonate (23). Colorless oil (1.97 g, 90 %); ^1H NMR (500.13 MHz, CDCl_3): δ = 1.19 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.23 (t, J = 7.1 Hz, CH_2CH_3), 3.82 (s, 3H, OCH_3), 3.87-4.04 (m, 4H, CH_2CH_3), 3.89 (d, J = 15.8 Hz, 1H, $\text{OCH}_2\text{C=O}$), 4.18 (dd, J = 15.9, 1.4 Hz, 1H, $\text{OCH}_2\text{C=O}$), 4.43 (d, $^2J_{\text{H,P}}$ = 15.7 Hz, 1H, PCH), 4.99 (dd, J = 31.0, 11.1 Hz, 2H, PhCH_2), 6.90 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.23-7.26 (m, 1H), 7.31-7.43 (m, 4H), 7.46 (d, J = 6.7 Hz, 2H), 10.04 (s, 1H, NH) ppm; ^{13}C NMR (125.76 MHz, CDCl_3): δ = 16.3 (CH_2CH_3), 16.4 (CH_2CH_3), 55.3 (OCH_3), 63.2 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 7.3 Hz, CH_2CH_3), 63.7 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 6.6 Hz, CH_2CH_3), 69.2 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 14.2 Hz), 78.2 (PhCH_2), 79.0 (d, $^1J_{\text{C-P}}$ = 171.8 Hz, PCH), 114.2 (d, $^4J_{\text{C-P}}$ = 1.4 Hz), 124.7 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 2.1 Hz), 128.5, 128.7, 129.2 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 6.0 Hz), 129.3, 135.2, 160.3 (d, $^5J_{\text{C-P}}$ = 2.6 Hz), 166.2 (C=O) ppm; anal. calcd. for $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{NO}_7\text{P}$: C 56.60, H 6.41, N 3.30, found: C 56.39, H 6.38, N 3.12.

General procedure for the synthesis of O-Bn-protected hydroxamic acids (12a, 14a).¹³ To a solution of the carboxylic acid **11a** (1 eq, 5 mmol, 1.80 g) in dry THF (50 mL) *N*-methyilmorpholin (NMM) (1.1 eq, 5.5 mmol, 506 mg) was added. The solution was cooled down to -20 °C and isobutyl chloroformate (1.1 eq, 5.5 mmol, 751 mg) was added. After 10 min, the appropriate hydroxylamine (1 eq, 5 mmol) was added dropwise. The reaction mixture was warmed up to room temperature overnight. The precipitated NMM-hydrochloride was filtered off and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved in H_2O / ethyl acetate and the aqueous layer was extracted three times with ethyl acetate (50 mL). The organic layers were combined and washed twice with a saturated aqueous solution of NaHCO_3 (10 mL), dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced

pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel using ethyl acetate/*n*-hexane (1:1) as the eluent to give compounds **12a** and **14a** as yellow oils.

Diethyl 4-[benzyloxy(methyl)amino]-1-(3,4-dimethoxyphenyl)-4-oxobutylphosphonate (12a).

Yellow oil (1.53 g, 64 %); ^1H NMR (600.22 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 1.05 (t, J = 7.0 Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.21 (t, J = 7.0 Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.90-1.97 (m, 1H, CH_2), 2.13-2.28 (m, 3H, CH_2), 3.10-3.14 (m, 4H, PCH , NCH_3), 3.71-3.77 (m, 7H, OCH_3 , CH_2CH_3), 3.80-3.86 (m, 1H, CH_2CH_3), 3.94-4.01 (m, 2H, CH_2CH_3), 4.66 (dd, J = 22.5, 9.9 Hz, 2H, PhCH_2), 6.82 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.88 (s, 1H), 6.92 (d, J = 8.2 Hz), 7.17-7.18 (m, 2H), 7.30-7.36 (m, 3H) ppm; ^{13}C NMR (150.93 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 16.0 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 5.5 Hz, CH_2CH_3), 16.2 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 5.5 Hz, CH_2CH_3), 24.6 (CH_2CH_2), 29.2 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 16.2 Hz, CHCH_2), 32.6 (NCH_3), 41.7 (d, $^1J_{\text{C-P}}$ = 137.2 Hz, PCH), 55.3 (OCH_3), 55.4 (OCH_3), 61.1 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 7.0 Hz, CH_2CH_3), 61.5 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 6.9 Hz, CH_2CH_3), 75.1 (PhCH_2), 111.6, 112.8 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 6.4 Hz), 121.2 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 7.4 Hz), 128.1 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 6.7 Hz), 128.3, 128.6, 129.3, 147.8 (d, $^5J_{\text{C-P}}$ = 2.3 Hz), 148.4 (d, $^4J_{\text{C-P}}$ = 1.7 Hz), 173.0 (C=O); anal. calcd. for $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{NO}_7\text{P}$: C 60.12, H 7.15, N 2.92, found: C 60.37, H 7.31, N 2.65.

Diethyl 4-(benzyloxyamino)-1-(3,4-dimethoxyphenyl)-4-oxobutylphosphonate (14a).

Yellow oil (1.07 g, 46 %); ^1H NMR (500.13 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 1.05 (t, J = 7.0 Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.22 (t, J = 7.0 Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.82 (t, J = 7.5 Hz, 2H, CH_2), 1.91-1.99 (m, 1H, CH_2), 2.12-2.21 (m, 1H, CH_2), 3.05 (ddd, J = 21.8, 11.3, 3.5 Hz, 1H, PCH), 3.72 (s, 3H, OCH_3), 3.73 (s, 3H, OCH_3), 3.79-3.87 (m, 2H, CH_2CH_3), 3.93-4.00 (m, 2H, CH_2CH_3), 4.74 (s, 2H, PhCH_2), 6.78 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.84 (s, 1H), 6.89 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 10.51 (s, 0.1H, *E*-isomer, OH), 10.87 (s, 0.9H, *Z*-isomer, OH) ppm; ^{13}C NMR (125.76 MHz, DMSO-d_6): δ = 16.1 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 5.6 Hz, CH_2CH_3), 16.2 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 5.4 Hz, CH_2CH_3), 25.3 (CH_2CH_2), 29.9 (CHCH_2), 41.7 (d, $^1J_{\text{C-P}}$ = 136.7 Hz, PCH), 55.3 (OCH_3), 55.4 (OCH_3), 61.2 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 6.9 Hz, CH_2CH_3), 61.6 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 6.7 Hz, CH_2CH_3), 76.6 (PhCH_2), 111.5, 112.7 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 6.3 Hz), 121.2 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 7.0 Hz), 127.8 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 6.7 Hz), 128.1, 128.2, 128.6, 136.0, 147.7 (d,

$^5J_{C-P} = 2.8$ Hz), 148.3, 168.5 (C=O) ppm; anal. calcd. for $C_{23}H_{32}NO_7P$: C 59.35, H 6.93, N 3.01, found: C 59.08, H 7.22, N 2.82.

General procedure for the synthesis of phosphonic acids 16b-d and target compounds 3a, 5a-b, 6.¹¹ To a solution of the respective phosphonic acid diethyl ester (**12b-d**, **22**, **27**, **28**, **31**) (1 eq, 3 mmol) in dry dichloromethane (10 mL), trimethylsilyl bromide (5 eq, 1.99 mL, 15 mmol) was added at 0 °C. After 1 h, the solution was allowed to warm up to room temperature and stirred for additional 23 h. The solvent was removed under reduced pressure; the remaining residue was dissolved in THF (10 mL), and water (0.1 mL) was added. After 30 min the solvent was evaporated and the resulting residue dried under reduced pressure overnight. Compound **16b** was used as crude product in the next step without further purification. Pure phosphonic acids **16c-d** and **6** were obtained at 7 °C after addition of ethyl acetate and filtration. Compound **3a** was provided as pure crystalline solid after crystallization from ethyl acetate. Target compounds **5a-b** were obtained as yellow oils.

{2-[Hydroxy(methyl)amino]-2-oxoethoxy}(4-methoxyphenyl)methylphosphonic acid (3a). Colorless crystals (229 mg, 25 %); mp: 143 °C; ^1H NMR (500.13 MHz, $[D_6]DMSO$): δ = 3.05 (s, 3H, NCH_3), 3.75 (s, 3H, OCH_3), 4.15 (d, J = 16.1 Hz, 1H, $OCH_2C=O$), 4.29 (d, J = 16.1 Hz, 1H, $OCH_2C=O$), 4.61 (d, $^2J_{H,P}$ = 13.9 Hz, 1H, PCH), 6.90 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.30 (dd, J = 8.6, 1.6 Hz, 2H), 9.85 (br s, 1H, OH) ppm; ^{13}C NMR (125.76 MHz, $[D_6]DMSO$): δ = 35.6 (NCH_3), 55.0 (OCH_3), 66.4 (d, $^3J_{C-P}$ = 10.8 Hz), 78.1 (d, $^1J_{C-P}$ = 161.5 Hz, PCH), 113.2, 127.9, 129.4 (d, J_{C-P} = 5.5 Hz), 158.8 (d, J_{C-P} = 2.1 Hz), 169.6 (C=O) ppm; anal. calcd. for $C_{11}H_{16}NO_7P$: C 43.29, H 5.28, N 4.59, found: C 43.15, H 5.30, N 4.47.

4-[Benzyloxy(methyl)amino]-4-oxo-1-*p*-tolylbutylphosphonic acid (16c). White solid (679 mg, 60 %); mp: 164 °C; ^1H NMR (500.13 MHz, $[D_6]DMSO$): δ = 1.83-1.97 (m, 1H, CH_2), 2.16-2.25 (m, 3H, CH_2), 2.27 (s, 3H, $PhCH_3$), 2.82 (ddd, J = 13.6, 11.1, 1.8 Hz, 1H, PCH), 3.08 (s, 3H, NCH_3), 4.45-4.83 (dd, J = 21.6, 9.7 Hz, 2H, $PhCH_2$), 6.98-7.28 (m, 6H), 7.28-7.56 (m, 3H) ppm; ^{13}C NMR

(125.76 MHz, [D₆]DMSO): δ = 21.0 (PhCH₃), 25.3 (CH₂CH₂), 30.1 (d, $^2J_{C-P}$ = 15.1 Hz, CHCH₂), 33.1 (NCH₃), 44.4 (d, $^1J_{C-P}$ = 134.1 Hz, PCH), 75.6 (PhCH₂), 128.7, 129.0, 129.4 (d, $^4J_{C-P}$ = 6.3 Hz), 129.8, 133.1, 134.8, 135.4 (d, $^3J_{C-P}$ = 6.7 Hz), 135.6 (d, $^5J_{C-P}$ = 2.7 Hz), 173.7 (C=O) ppm; anal. calcd. for C₁₉H₂₄NO₅P: C 60.47, H 6.41, N 3.71, found: C 60.22, H 6.37, N 3.61.

4-[Benzyloxy(methyl)amino]-1-(4-methoxyphenyl)-4-oxobutylphosphonic acid (16d). White solid (389 mg, 33 %); mp: 144 °C; ¹H NMR (500.13 MHz, [D₆]DMSO): δ = 1.86-1.94 (m, 1H, CH₂), 2.18-2.25 (m, 3H, CH₂), 2.79-2.86 (m, 1H, PCH), 3.09 (s, 3H, NCH₃), 3.72 (s, 3H, OCH₃), 4.62-4.68 (m, 2H, PhCH₂), 6.86-6.88 (m, 2H), 7.16-7.19 (m, 4H), 7.31-7.37 (m, 3H), 9.83 (br s, 2H, OH) ppm; ¹³C NMR (125.76 MHz, [D₆]DMSO): δ = 25.4 (CH₂CH₂), 30.1 (d, $^2J_{C-P}$ = 15.0 Hz, CHCH₂), 33.1 (NCH₃), 43.9 (d, $^1J_{C-P}$ = 134.9 Hz, PCH), 55.4 (OCH₃), 75.6 (PhCH₂), 113.9, 128.7, 129.3, 129.8, 130.2 (d, $^4J_{C-P}$ = 7.0 Hz), 130.4 (d, $^3J_{C-P}$ = 6.5 Hz), 134.8, 158.2, 173.7 (C=O) ppm; anal. calcd. for C₁₉H₂₄NO₆P: C 58.01, H 6.15, N 3.56, found: C 57.91, H 6.20, N 3.39.

1-Benzamido-4-[hydroxyl(methyl)amino]-4-oxobutylphosphonic acid (5a). Yellow oil (607 mg, 64 %); ¹H NMR (600.22 MHz, [D₆]DMSO): δ = 1.86-1.94 (m, 1H, CH₂), 2.02-2.09 (m, 1H, CH₂), 2.21-2.46 (m, 2H, CH₂), 2.80 (s, 3H, NCH₃), 4.23-4.30 (m, 1H, PCH), 7.44-7.47 (m, 2H), 7.51-7.53 (m, 1H), 7.87-7.89 (m, 2H), 8.12-8.15 (m, 1H, CONH), 9.71 (s, 1H, OH) ppm; ¹³C NMR (150.93 MHz, [D₆]DMSO): δ = 24.1 (CH₂CH₂), 28.6 (d, $^2J_{C-P}$ = 14.8 Hz, CHCH₂), 37.0 (NCH₃), 40.0 (d, $^1J_{C-P}$ = 153.2 Hz, PCH), 127.4, 128.0, 131.0, 134.3, 166.0 (d, $^3J_{C-P}$ = 4.2 Hz, CONH), 172.5 (C=O) ppm; HPLC analysis: retention time = 1.82 min; peak area: 99.8 %. Eluent A: 5 mM NH₄OAc solution; eluent B: CH₃CN, isocratic (1:1) over 20 min at a flow rate of 1 mL min⁻¹.

1-Benzamido-4-(hydroxyamino)-4-oxobutylphosphonic acid (5b). Yellow oil (390 mg, 43 %); ¹H NMR (600.22 MHz, [D₆]DMSO): δ = 1.84-2.09 (m, 4H, CH₂), 4.18-4.29 (m, 1H, PCH), 4.78 (br s, P(OH)₂), 7.34-7.56 (m, 3H), 7.87-7.90 (m, 2H), 8.20 (d, J = 9.6 Hz, 1H, CONH), 10.09 (s, 0.3H), 10.32 (br s, 0.6H) ppm; ¹³C NMR (150.93 MHz, [D₆]DMSO): δ = 25.1 (CH₂CH₂), 28.6 (CHCH₂), 47.0 (d,

$^1J_{C-P}$ = 151.8 Hz, PCH), 127.5, 128.0, 131.1, 134.3, 166.2 (C=O), 168.6 (C=O) ppm; HPLC analysis: retention time = 1.88 min; peak area: 99.8 %. Eluent A: 5 mM NH_4OAc solution; eluent B: CH_3CN , isocratic (1:1) over 20 min at a flow rate of 1 mL min^{-1} .

4-(2-Hydroxyphenylamino)-4-oxo-1-phenylbutylphosphonic acid (6). Colorless foam (885 mg, 88 %); ^1H NMR (500.13 MHz, CDCl_3): δ = 2.00-2.12, 2.20-2.30, 2.30-2.40 (3m, 4H, CH_2), 2.91 (ddd, J = 21.9, 11.2, 3.8 Hz, 1H, PCH), 3.52 (br s, OH), 6.74 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 6.83 (dd, J = 7.9, 1.0 Hz, 1H), 6.93 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.18-7.35 (m, 5H), 7.59 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 9.16 (s, 1H, NH), 9.64 (br s, 1H, OH) ppm; ^{13}C NMR (125.76 MHz, CDCl_3): δ = 25.9 (CHCH_2), 34.1 (d, $^3J_{C-P}$ = 14.8 Hz, CH_2CH_2), 44.6 (d, $^1J_{C-P}$ = 133.6 Hz, PCH), 115.9, 118.8, 122.5, 124.6, 126.1, 126.1 (d, J_{C-P} = 2.8 Hz), 127.9 (d, J_{C-P} = 1.2 Hz), 129.1 (d, J_{C-P} = 6.4 Hz), 138.0 (d, J_{C-P} = 6.4 Hz), 147.9, 171.2 (C=O) ppm; HPLC analysis: retention time = 8.71 min; peak area: 92.2 %. Eluent A: 5 mM NH_4OAc solution; eluent B: CH_3CN , gradient (0 – 95 %) over 20 min at a flow rate of 1 mL min^{-1} .

General procedure for the synthesis of tri-*O*-benzyl protected phosphonohydroxamic acids (15a,c,d, 13a, 24, 34).¹¹ To a solution of the respective phosphonic acid diethyl ester (**14a,c,d**, **12a**, **23**, **33**) (1 eq, 3 mmol) in dry CH_2Cl_2 (10 mL), trimethylsilyl bromide (5 eq, 15 mmol, 1.99 mL in case of compounds **15a,c,d**, **13a**, **24**; 10 eq, 30 mmol, 3.98 mL in case of compound **34**) was added at 0 °C. After 1 h, the solution was allowed to warm up to room temperature and stirred for 23 h. The solvent was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in THF (10 mL) and treated with water (0.1 mL). After 30 min, the solvent was evaporated and the residue was dried under reduced pressure overnight. The residue was dissolved in benzene (20 mL). 2-Benzyl-1,3-dicyclohexyl-isourea (2 eq, 6 mmol, 1.89 g in case of compounds **15a,c,d**, **13a**, **24**; 4 eq, 12 mmol, 3.78 g in case of compound **34**) was added. The mixture was refluxed for 6 h. After cooling to room temperature, ethyl acetate (30 mL) was added, solid 1,3-dicyclohexyl-urea was filtered off and the solvent was removed under reduced pressure. Column chromatography on silica gel using ethyl acetate provided compounds **15a,c,d**, **13a**, **24** and **34**.

Dibenzyl 4-[benzyloxy(methyl)amino]-1-(3,4-dimethoxyphenyl)-4-oxobutylphosphonate (13a).

Yellow oil (550 mg; 30 %); ^1H NMR (500.13 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 1.99-2.03 (m, 1H, CH_2), 2.20-2.28 (m, 3H, CH_2), 3.09 (s, 3H, NCH_3), 3.26-3.32 (m, 1H, PCH), 3.61 (s, 3H, OCH_3), 3.73 (s, 3H, OCH_3), 4.64 (dd, J = 24.6, 9.9 Hz, 2H, PhCH_2), 4.76 (dd, J = 12.0, 7.8 Hz, 1H, PhCH_2), 4.85 (dd, J = 12.0, 6.8 Hz, 1H, PhCH_2), 4.96 (dd, J = 12.0, 7.1 Hz, 1H, PhCH_2), 5.02 (dd, J = 12.0, 8.5 Hz, 1H, PhCH_2), 6.83-6.84 (m, 1H), 6.87 (s, 1H), 6.91 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.17-7.18 (m, 4H), 7.29-7.37 (m, 11H) ppm; ^{13}C NMR (125.76 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 24.4 (CH_2CH_2), 29.2 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 16.4 Hz, CHCH_2), 32.6 (NCH_3), 41.8 (d, $^1J_{\text{C-P}}$ = 136.3 Hz, PCH), 55.2 (OCH_3), 55.4 (OCH_3), 66.5 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 6.9 Hz, CH_2CH_3), 66.8 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 6.5 Hz, CH_2CH_3), 75.1 (PhCH_2), 111.7, 112.8 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 6.2 Hz), 121.2 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 7.4 Hz), 127.4, 127.6, 127.7 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 7.2 Hz), 127.9, 128.0, 128.2, 128.2, 128.3, 128.6, 129.3, 134.3, 136.5 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 6.1 Hz), 136.6 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 6.4 Hz), 147.9 (d, $^5J_{\text{C-P}}$ = 2.3 Hz), 148.5 (d, $^4J_{\text{C-P}}$ = 1.5 Hz), 172.9 (C=O) ppm; anal. calcd. for $\text{C}_{34}\text{H}_{38}\text{NO}_7\text{P}$: C 67.65, H 6.35, N 2.32, found: C 67.43, H 6.20, N 2.28.

Dibenzyl 4-(benzyloxyamino)-1-(3,4-dimethoxyphenyl)-4-oxobutylphosphonate (15a).

Yellow oil (248 mg; 14 %); ^1H NMR (500.13 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 1.83-1.86 (m, 2H, CH_2), 1.97-2.06 (m, 1H, CH_2), 2.24-2.28 (m, 1H, CH_2), 3.23 (ddd, J = 22.0, 11.4, 3.2 Hz, 1H, PCH), 3.61 (s, 3H, OCH_3), 3.73 (s, 3H, OCH_3), 4.73-4.77 (m, 3H, PhCH_2), 4.83-4.87 (m, 1H, PhCH_2), 4.94-5.04 (m, 2H, PhCH_2), 6.80 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.83 (s, 1H), 6.89 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.17-7.19 (m, 2H), 7.30-7.37 (m, 12H), 10.51 (s, 0.1H, *E*-isomer, OH), 10.87 (s, 0.9H, *Z*-isomer, OH) ppm; ^{13}C NMR (125.76 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 25.2 (CH_2CH_2), 29.8 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 16.0 Hz, CHCH_2), 41.8 (d, $^1J_{\text{C-P}}$ = 136.1 Hz, PCH), 55.2 (OCH_3), 55.4 (OCH_3), 66.5 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 6.7 Hz, CH_2CH_3), 66.8 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 6.8 Hz, CH_2CH_3), 76.6 (PhCH_2), 111.6, 112.7 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 6.3 Hz), 121.3 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 7.3 Hz), 127.4, 127.5, 127.6, 128.0, 128.1, 128.2, 128.2, 128.4, 128.6, 136.0, 136.5 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 6.4 Hz), 136.6 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 6.0 Hz), 147.9 (d, $^5J_{\text{C-P}}$ = 2.5 Hz), 148.4, 168.47 (C=O) ppm; anal. calcd. for $\text{C}_{33}\text{H}_{36}\text{NO}_7\text{P}$: C 67.22, H 6.15, N 2.38, found: C 67.47, H 6.27, N 2.36.

Dibenzyl 4-(benzyloxyamino)-4-oxo-1-*p*-tolylbutylphosphonate (15c). Colorless oil (620 mg, 38 %); ^1H NMR (500.13 MHz, CDCl_3): δ = 1.43-1.94 (m, 2H, CH_2), 1.94-2.11 (m, 2H, CH_2), 2.28 (s, 3H, PhCH_3), 3.25 (ddd, J = 22.2, 11.6, 3.4 Hz, 1H, PCH), 4.45-4.64 (m, 0.26H, *E*-isomer, PhCH_2), 4.66-4.90 (m, 3.74H, *Z*-isomer, PhCH_2), 4.90-5.07 (m, 2H, PhCH_2), 6.90-7.23 (m, 6H) 7.24-7.65 (m, 13H), 10.53 (s, 0.13H, *E*-isomer, NH), 10.90 (s, 0.87H, *Z*-isomer, NH) ppm; ^{13}C NMR (125.76 MHz, CDCl_3): δ = 20.6 (PhCH_3), 25.0 (CH_2CH_2), 29.8 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 13.9 Hz, CHCH_2), 41.9 (d, $^1J_{\text{C-P}}$ = 136.0 Hz, PCH), 66.6 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 7.0 Hz, CH_2CH_3), 66.7 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 6.5 Hz, CH_2CH_3), 76.6 (PhCH_2), 127.3, 127.6, 127.9, 128.1, 128.2, 128.2, 128.3, 128.6, 128.9 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 4.0 Hz), 129.0, 132.2 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 7.6 Hz), 136.0, 136.1 (d, $^5J_{\text{C-P}}$ = 3.1 Hz), 136.4, 136.5 (d, $^5J_{\text{C-P}}$ = 2.3 Hz), 136.5, 168.4 (C=O) ppm; anal. calcd. for $\text{C}_{32}\text{H}_{34}\text{NO}_5\text{P}$: C 70.70, H 6.30, N 2.58, found: C 70.29, H 6.41, N 2.89.

Dibenzyl [2-(benzyloxyamino)-2-oxoethoxy](4-methoxyphenyl)methylphosphonate (15d). Colorless oil (101 mg, 6 %); ^1H NMR (500.13 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 1.80-1.83 (m, 2H, CH_2), 1.95-2.04 (m, 1H, CH_2), 2.22-2.27 (m, 1H, CH_2), 3.20-3.26 (ddd, J = 3.2, 11.3, 23.2 Hz 1H, PCH), 3.74 (s, 3H, OCH_3), 4.69-4.83 (m, 4H, PhCH_2), 4.92-5.01 (m, 2H, PhCH_2), 6.88 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.15-7.19 (m, 4H), 7.29-7.39 (m, 13H), 10.50 (s, 0.1H, *E*-isomer, NH), 10.86 (s, 0.9H, *Z*-isomer, NH) ppm; ^{13}C NMR (125.76 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 25.1 (CH_2CH_2), 29.8 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 16.2 Hz, CHCH_2), 41.4 (d, $^1J_{\text{C-P}}$ = 136.4 Hz, PCH), 55.0 (OCH_3), 66.5 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 6.6 Hz, CH_2CH_3), 66.7 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 6.6 Hz, CH_2CH_3), 76.6 (PhCH_2), 113.8, 127.4, 127.6, 127.9, 128.1, 128.2, 128.2, 128.4, 128.6, 130.2 (d, $J_{\text{C-P}}$ = 6.9 Hz), 136.0, 136.5, 136.5, 136.6, 128.3, 168.4 (C=O) ppm; anal. calcd. for $\text{C}_{32}\text{H}_{34}\text{NO}_6\text{P}$: C 68.68, H 6.12, N 2.50, found: C 68.49, H 6.27, N 2.59.

Dibenzyl [2-(benzyloxyamino)-2-oxoethoxy](4-methoxyphenyl)methylphosphonate (24). Pale yellow oil (590 mg, 35 %); ^1H NMR (500.13 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 3.77 (s, 3H, OCH_3), 3.78 (m, 1H, $\text{OCH}_2\text{C=O}$), 3.88 (d, J = 13.8 Hz, 1H, $\text{OCH}_2\text{C=O}$), 4.78 (s, 2H, PhCH_2), 4.87 (dd, J = 11.8, 8.2 Hz, 1H, PhCH_2), 4.96 (dd, J = 11.9, 7.0 Hz, 1H, PhCH_2), 5.04 (d, $^2J_{\text{H-P}}$ = 14.1 Hz, 1H, PCH), 5.07 (d, J = 7.4 Hz, 2H, PhCH_2), 6.94 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.21-7.25 (m, 2H), 7.29-7.40 (m, 15H), 10.78 (s, 0.1H, *E*-isomer,

NH), 11.11 (s, 0.9H, *Z*-isomer, NH) ppm; ^{13}C NMR (125.76 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 55.7 (OCH₃), 66.9 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 13.6 Hz, OCH₂C=O), 67.2 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 6.2 Hz, PhCH₂), 67.6 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 6.5 Hz, PhCH₂), 76.9 (PhCH₂), 77.0 (d, $^1J_{\text{C-P}}$ = 167.0 Hz, PCH), 113.7, 125.5, 127.5, 127.6, 128.1 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 5.3 Hz), 128.2, 128.3, 128.3, 128.7, 129.7 (d, $J_{\text{C-P}}$ = 5.8 Hz), 135.7, 136.3 (d, $J_{\text{C-P}}$ = 5.8 Hz), 136.4 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 6.2 Hz), 159.4 (d, $^5J_{\text{C-P}}$ = 2.1 Hz), 165.1 (C=O) ppm; anal. calcd. for C₃₁H₃₂NO₇P: C 66.30, H 5.74, N 2.49, found: C 66.10, H 5.97, N 2.32.

Tetrabenzyl 1-(naphthalen-1-yl)propane-1,3-diylldiposphonate (34). White solid (332 mg; 16 %) mp: 109 °C; ^1H NMR (500.13 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 1.39-1.59 (m, 1H, PCH₂), 1.69-1.89 (m, 1H, PCH₂), 2.05-2.32 (m, 1H, CHCH₂), 2.36-2.48 (m, 1H, CHCH₂), 4.39 (ddd, J = 13.9, 10.1, 4.2 Hz, 1H, PCH), 4.56 (dd, J = 11.8, 7.8 Hz, 1H, PhCH₂), 4.75 (dd, J = 11.9, 7.1 Hz, 1H, PhCH₂), 4.81-5.13 (m, 6H, PhCH₂), 7.08-7.45 (m, 20H), 7.45-7.66 (m, 4H), 7.88 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.96 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 8.17 (d, J = 8.1 Hz, 1H) ppm; ^{13}C NMR (125.76 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 22.8 (dd, $^1J_{\text{C-P}}$ = 137.8 Hz, $^3J_{\text{C-P}}$ = 12.4 Hz, PCH₂), 23.8 (m, CHCH₂), 36.5 (dd, $^1J_{\text{C-P}}$ = 132.4 Hz, $^3J_{\text{C-P}}$ = 8.3 Hz, PCH), 66.3 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 6.0 Hz, PhCH₂), 66.7 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 7.0 Hz, PhCH₂), 66.9 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 6.7 Hz, PhCH₂), 123.5, 125.3 (d, $^4J_{\text{C-P}}$ = 3.4 Hz), 125.5 ($^4J_{\text{C-P}}$ = 5.3 Hz), 125.6, 126.2, 127.2, 127.6, 127.6, 127.9, 128.1 (d, $^4J_{\text{C-P}}$ = 1.7 Hz), 128.3, 128.6, 131.5 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 5.8 Hz), 132.3 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 6.1 Hz), 133.4 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 13.9 Hz), 136.3 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 6.4 Hz), 136.4 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 1.6 Hz), 136.1 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 6.4 Hz), 136.4 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 2.6 Hz) ppm; anal. calcd. for C₂₁H₃₂O₆P₂: C 71.30, H 5.84 found: C 71.22, H 5.80.

General procedure for the synthesis of carboxylic acid 20, hydroxamic acid 22, *o*-hydroxyanilide 31, bisphosphonate 7 and target compounds 2a-f, 3b and 4.¹¹ To a solution of the appropriate *O*-Bn-protected acid (1 mmol) in freshly distilled methanol (20 mL), Pd-C catalyst (10 %, 40 mg) was added. The mixture was hydrogenated for 1 h (in case of compounds **2a**, **2c**, **4**, **20**, **22**, **31**) or 3 h (in case of compounds **2b**, **2d-f**, **3b**, **7**) at atmospheric pressure. The catalyst was removed by filtration and the solvent was evaporated under reduced pressure. Pure target compounds **2b** and **2d-f** were obtained as white solids after addition of ethyl acetate and subsequent filtration. Recrystallization from ethyl acetate

provided compound **31** as pure crystalline solid. Pure compounds **2a**, **2c**, **3b**, **4**, **7**, **20** and **22** were obtained without further purification.

4-[Hydroxy(methyl)amino]-4-oxo-1-*p*-tolylbutylphosphonic acid (2a). Colorless oil (282 mg, 98 %); ^1H NMR (500.13 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 1.86-2.00 (m, 1H, CH_2), 2.11-2.23 (m, 3H, CH_2), 2.26 (s, 3H, PhCH_3), 2.73-2.89 (m, 1H, PCH), 3.02 (s, 3H, NCH_3), 6.95-7.10 (m, 2H), 7.18 (dd, J = 8.0, 1.8 Hz, 2H), 10.16 (OH) ppm; ^{13}C NMR (125.76 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 20.5 (PhCH_3), 25.1 (CH_2CH_2), 30.0 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 15.3 Hz, CHCH_2), 35.5 (NCH_3), 44.3 (d, $^1J_{\text{C-P}}$ = 133.1 Hz, PCH), 128.4, 128.9 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 6 Hz), 134.9 (d, $^5J_{\text{C-P}}$ = 2.9 Hz), 135.3 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 6.2 Hz), 172.5 (C=O) ppm; HPLC analysis: retention time = 1.88 min; peak area: 99.6 %. Eluent A: 5 mM NH_4OAc solution; eluent B: CH_3CN , isocratic (1:1) over 20 min at a flow rate of 1 mL min^{-1} .

4-(Hydroxyamino)-4-oxo-1-*p*-tolylbutylphosphonic acid (2b). White solid (265 mg, 97 %); mp: $184\text{ }^\circ\text{C}$; ^1H NMR (500.13 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 1.69 (s, 0.5H, CH_2), 1.78 (t, J = 7.8 Hz, 1.5H, CH_2), 1.84-2.03 (m, 1H, CH_2), 2.27 (s, 3H, PhCH_3), 2.80 (ddd, J = 21.8, 11.2, 3.6 Hz, 1H, PCH), 3.17 (s 1H, CH_2), 6.91-7.91 (m, 4H), 8.68 (s, 1H, NH), 9.69 (s, 0.18H, *E*-isomer, OH), 10.25 (s, 0.82H, *Z*-isomer, OH) ppm; ^{13}C NMR (125.76 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 20.5 (PhCH_3), 26.1 (CH_2CH_2), 30.5 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 15.4 Hz, CHCH_2), 44.3 (d, $^1J_{\text{C-P}}$ = 133.7 Hz, PCH), 128.5 (d, $^4J_{\text{C-P}}$ = 1.0 Hz), 128.9 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 6.0 Hz), 134.9 (d, $^5J_{\text{C-P}}$ = 2.7 Hz), 135.1 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 6.6 Hz), 168.7 (C=O) ppm; HPLC analysis: retention time = 1.89 min; peak area: 97.7 %. Eluent A: 5 mM NH_4OAc solution; eluent B: CH_3CN , isocratic (1:1) over 20 min at a flow rate of 1 mL min^{-1} .

4-[Hydroxy(methyl)amino]-1-(4-methoxyphenyl)-4-oxobutylphosphonic acid (2c). Colorless oil (300 mg, 99 %); ^1H NMR (500.13 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 1.89-1.97 (m, 1H, CH_2), 2.15-2.25 (m, 3H, CH_2), 2.76-2.83 (m, 1H, PCH), 3.02 (s, 3H, NCH_3), 3.72 (s, 3H, OCH_3) 6.84 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.15 (dd, J = 8.6, 1.9 Hz, 2H), 9.77 (br s, 1H, OH) ppm; ^{13}C NMR (125.76 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 25.2 (CH_2CH_2), 30.0 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 15.0 Hz, CHCH_2), 35.6 (NCH_3), 43.7 (d, $^1J_{\text{C-P}}$ = 134.9 Hz, PCH), 54.9

(OCH₃), 113.3, 129.9 (d, ³J_{C-P} = 6.1 Hz), 130.1 (d, ²J_{C-P} = 6.9 Hz) 157.6, 172.6 (C=O) ppm; HPLC analysis: retention time = 1.82 min; peak area: 96.0%. Eluent A: 5 mM NH₄OAc solution; eluent B: CH₃CN, isocratic (1:1) over 20 min at a flow rate of 1 mL min⁻¹.

4-(Hydroxyamino)-1-(4-methoxyphenyl)-4-oxobutylphosphonic acid (2d). White solid (246 mg, 85 %); mp: 168 °C; ¹H NMR (600.22 MHz, [D₆]DMSO): δ = 1.77-1.80 (m, 2H, CH₂CH₂), 1.86-1.92 (m, 1H, CHCH₂), 2.19-2.25 (m, 1H, CHCH₂), 2.74 (ddd, *J* = 21.7, 11.1, 3.5 Hz, 1H, PCH), 3.72 (s, 3H, OCH₃), 6.85 (d, *J* = 8.5 Hz), 7.15 (d, *J* = 7.1 Hz), 10.28 (s, 1H) ppm; ¹³C NMR (150.93 MHz, [D₆]DMSO): δ = 26.3 (CH₂CH₂), 30.6 (d, ²J_{C-P} = 14.9 Hz, CHCH₂), 43.9 (d, ¹J_{C-P} = 134.8 Hz, PCH), 54.9 (OCH₃), 113.4, 129.9 (d, ³J_{C-P} = 5.8 Hz), 157.6, 168.8 (C=O) ppm; HPLC analysis: retention time = 1.87 min; peak area: 95.8%. Eluent A: 5 mM NH₄OAc solution; eluent B: CH₃CN, isocratic (1:1) over 20 min at a flow rate of 1 mL min⁻¹.

1-(3,4-Dimethoxyphenyl)-4-[hydroxy(methyl)amino]-4-oxobutylphosphonic acid (2e). White solid (290 mg, 87 %) mp: 70 °C; ¹H NMR (500.13 MHz, [D₆]DMSO): δ = 1.89-1.99 (m, 1H, CH₂), 2.19 (s, 3H, CH₂), 2.77-2.84 (m, 1H, PCH), 3.03 (s, 3H, NCH₃), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 3.72 (s, 3H, OCH₃), 6.74-6.76 (m, 1H), 6.85-6.87 (m, 2H), 9.68 (br s, 1H, OH) ppm; ¹³C NMR (125.76 MHz, [D₆]DMSO): δ = 25.3 (CH₂CH₂), 30.1 (d, ²J_{C-P} = 15.2 Hz, CHCH₂), 35.6 (NCH₃), 44.1 (d, ¹J_{C-P} = 136.8 Hz, PCH), 55.3 (OCH₃), 55.45 (OCH₃), 111.6, 112.8 (d, ³J_{C-P} = 5.6 Hz), 121.3 (d, ²J_{C-P} = 7.2 Hz), 130.5 (d, ³J_{C-P} = 6.5 Hz), 147.3, 148.3, 172.7 (C=O) ppm; anal. calcd. for C₁₃H₂₀NO₇P: C 46.85, H 6.05, N 4.20, found: C 46.61, H 6.05, N 4.06.

1-(3,4-Dimethoxyphenyl)-4-(hydroxyamino)-4-oxobutylphosphonic acid (2f). White solid (313 mg, 98 %), mp: 75 °C; ¹H NMR (500.13 MHz, [D₆]DMSO): δ = 1.73-1.93 (m, 3H, CH₂), 2.20-2.28 (m, 1H, CH₂), 2.75 (ddd, *J* = 14.9, 10.9, 3.5 Hz, 1H, PCH), 3.72 (s, 6H, OCH₃), 6.75-6.76 (m, 1H), 6.84-6.87 (m, 2H), 8.66 (br s, 1H, NH), 9.71 (s, 0.1H, *E*-isomer, OH), 10.27 (s, 0.9H, *Z*-isomer, OH) ppm; ¹³C NMR (125.76 MHz, [D₆]DMSO): δ = 26.4 (CH₂CH₂), 30.6 (d, ²J_{C-P} = 15.2 Hz, CHCH₂), 44.2 (d,

$^1J_{C-P} = 134.6$ Hz, PCH), 55.3 (OCH₃), 55.4 (OCH₃), 111.6, 112.8 (d, $^3J_{C-P} = 6.2$ Hz), 121.1 (d, $^3J_{C-P} = 6.7$ Hz), 130.5 (d, $^2J_{C-P} = 6.4$ Hz), 147.3 (OCH₃), 148.2 (OCH₃), 168.8 (C=O) ppm; HPLC analysis: retention time = 1.54 min; peak area: 97.5%. Eluent A: 5 mM NH₄OAc solution; eluent B: CH₃CN, isocratic (1:1) over 20 min at a flow rate of 1.5 mL min⁻¹.

[2-(Hydroxyamino)-2-oxoethoxy](4-methoxyphenyl)methylphosphonic acid (3b). Colorless oil (291 mg, quant.); ^1H NMR (500.13 MHz, [D₆]DMSO): $\delta = 3.74$ (s, 3H, OCH₃), 3.75 (m, 0.9H, *Z*-isomer, CH₂C=O), 3.88 (d, $J = 14.7$ Hz, 0.9H, *Z*-isomer, OCH₂C=O), 4.06 (d, $J = 16.1$ Hz, 0.1H, *E*-isomer, OCH₂C=O), 4.12 (d, $J = 16.1$ Hz, 0.1H, *E*-isomer, OCH₂C=O), 4.45 (d, $^2J_{H,P} = 15.0$ Hz, 0.9H, *Z*-isomer, PCH), 4.53 (d, $^2J_{H,P} = 13.2$ Hz, 0.1H, *E*-isomer, PCH), 6.90 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.28 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 8.96 (br s, 0.2H, *Z*-isomer, OH), 10.20 (br s, 0.01H, *E*-isomer, OH), 10.41 (br s, 0.01H, *E*-isomer, NH), 10.73 (s, 0.9H, *Z*-isomer, NH) ppm; ^{13}C NMR (125.76 MHz, [D₆]DMSO): $\delta = 55.0$ (OCH₃), 68.2 (d, $^3J_{C-P} = 12.8$ Hz), 79.2 (d, $^1J_{C-P} = 161.7$ Hz, PCH), 113.3, 127.8, 129.2 (d, $^3J_{C-P} = 5.3$ Hz), 158.8 (d, $^5J_{P,C} = 2.0$ Hz), 165.3 (C=O) ppm; HPLC analysis: retention time = 1.85 min; peak area: 96.7 %. Eluent A: 5 mM NH₄OAc solution; eluent B: CH₃CN, isocratic (1:1) over 20 min at a flow rate of 1 mL min⁻¹.

5-[Hydroxy(methyl)amino]-5-oxo-1-phenylpentylphosphonic acid (4). Pale yellow foam (264 mg, 92 %); ^1H NMR (500.13 MHz, [D₆]DMSO): $\delta = 1.25$ -1.38 (m, 2H, CH₂CH₂), 1.74-1.87 (m, 1H, CHCH₂), 1.90-2.01 (m, 1H, CHCH₂), 2.21-2.34 (m, 2H, CH₂CH₂), 2.79 (ddd, $J = 22.0, 11.4, 3.6$ Hz, 1H, PCH), 3.03 (s, 3H, NCH₃), 7.15-7.23 (m, 1H), 7.23-7.34 (m, 4H), 9.79 (s, 1H, OH) ppm; ^{13}C NMR (125.76 MHz, [D₆]DMSO): $\delta = 29.4$ (CH₂CH₂), 31.1 (CHCH₂), 35.6 (NCH₃), 45.2 (d, $^1J_{C-P} = 133.0$ Hz, PCH), 125.9, 127.8 (d, $^3J_{C-P} = 1.6$ Hz), 129.0 (d, $^4J_{C-P} = 6.3$ Hz), 138.5 (d, $^2J_{C-P} = 6.6$ Hz), 172.5 (C=O) ppm; HPLC analysis: retention time = 1.88 min; peak area: 97.3%. Eluent A: 5 mM NH₄OAc solution; eluent B: CH₃CN, isocratic (1:1) over 20 min at a flow rate of 1 mL min⁻¹.

1-(Naphthalen-1-yl)propane-1,3-diylidiphosphonic acid (7). Yellow resin (320 mg, 97 %); ^1H NMR (500.13 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 1.11-1.31 (m, 2H, PCH_2), 1.34-1.56 (m, 1H, CHCH_2), 1.56-1.83 (m, 1H, CHCH_2), 3.92 (ddd, J = 13.0, 10.3, 4.2 Hz, 1H, PCH), 7.51 (dd, J = 15.4, 8.0 Hz, 3H), 7.64 (d, J = 5.9 Hz, 1H), 7.80 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.92 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 8.18 (d, J = 7.7 Hz, 1H) ppm; ^{13}C NMR (125.76 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 22.4 (dd, $^1J_{\text{C-P}}$ = 141.4 Hz, $^3J_{\text{C-P}}$ = 14.9 Hz, PCH_2), 24.8 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 7.1 Hz, CHCH_2), 37.6 (dd, $^1J_{\text{C-P}}$ = 149.0 Hz, $^3J_{\text{C-P}}$ = 16.8 Hz, PCH), 123.6, 125.2 (d, $^4J_{\text{C-P}}$ = 4.1 Hz), 125.4, 125.9, 126.0, 126.7, 128.5, 132.4 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 4.8 Hz), 133.3 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 6.1 Hz), 134.2 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 10.1 Hz) ppm; HPLC analysis: retention time = 1.81 min; peak area: 95.4%. Eluent A: 5 mM NH_4OAc solution; eluent B: CH_3CN , isocratic (1:1) over 5 min at a flow rate of 1 mL min $^{-1}$.

2-[(Diethoxyphosphoryl)(4-methoxyphenyl)methoxy]acetic acid (20). White solid (282 mg, 85 %); mp: 86 °C; ^1H NMR (500.13 MHz, CDCl_3): δ = 1.24 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.29 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH_2CH_3), 3.82 (s, 3H, OCH_3), 4.01 (d, J = 16.7 Hz, 1H, $\text{OCH}_2\text{C=O}$), 4.02-4.16 (m, 4H, CH_2CH_3), 4.26 (dd, J = 16.7, 1.5 Hz, 1H, $\text{OCH}_2\text{C=O}$), 4.81 (d, $^2J_{\text{H,P}}$ = 14.9 Hz, 1H, PCH), 6.07 (br s, 1H, OH), 6.92 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.35 (dd, J = 8.7, 2.0 Hz, 2H) ppm; ^{13}C NMR (125.76 MHz, CDCl_3): δ = 16.3 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 5.4 Hz, CH_2CH_3), 16.4 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 5.4 Hz, CH_2CH_3), 55.3 (OCH_3), 63.6 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 7.1 Hz, CH_2CH_3), 63.9 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 6.7 Hz, CH_2CH_3), 67.2 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 13.7 Hz, $\text{OCH}_2\text{C=O}$), 78.5 (d, $^1J_{\text{C-P}}$ = 171.1 Hz, PCH), 114.2 (d, $^4J_{\text{C-P}}$ = 1.6 Hz), 124.7 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 2.5 Hz), 129.4 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 5.8 Hz), 160.2 (d, $^5J_{\text{C-P}}$ = 2.7 Hz), 171.3 (C=O) ppm; anal. calcd. for $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{O}_7\text{P}$: C 50.60, H 6.37, found: C 50.40, H 6.52.

Diethyl 2-[hydroxy(methyl)amino]-2-oxoethoxy(4-methoxyphenyl)methylphosphonate (22). Colorless oil (354 mg, 98 %); ^1H NMR (500.13 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 1.11 (t, J = 7.0 Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.21 (t, J = 7.1 Hz, CH_2CH_3), 3.04 (s, 3H, NCH_3), 3.76 (s, 3H, OCH_3), 3.82-3.91 (m, 1H, CH_2CH_3), 3.91-3.99 (m, 1H, CH_2CH_3), 4.02-4.13 (m, 3H, CH_2CH_3 , $\text{OCH}_2\text{C=O}$), 4.22 (d, J = 16.2 Hz, 1H, $\text{OCH}_2\text{C=O}$), 4.95 (d, $^2J_{\text{H,P}}$ = 14.1 Hz, 1H, PCH), 6.95 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.32 (dd, J = 8.6, 1.7 Hz, 2H), 9.72 (s, 1H, OH) ppm; ^{13}C NMR (125.76 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 16.1 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 5.5 Hz, CH_2CH_3),

16.2 (d, $^3J_{C-P}$ = 5.8 Hz, CH_2CH_3), 35.5 (NCH₃), 55.0 (OCH₃), 62.0 (d, $^2J_{C-P}$ = 6.4 Hz, CH_2CH_3), 62.4 (d, $^2J_{C-P}$ = 6.6 Hz, CH_2CH_3), 65.2 (d, $^3J_{C-P}$ = 13.1 Hz), 76.3 (d, $^1J_{C-P}$ = 167.2 Hz, PCH), 113.6, 125.9, 129.7 (d, $^3J_{C-P}$ = 6.0 Hz), 159.2 (d, $^5J_{C-P}$ = 2.4 Hz), 168.7 (C=O) ppm; anal. calcd. for C₁₅H₂₄NO₇P: C 49.86, H 6.69, N 3.88, found: C 49.58, H 6.77, N 3.69.

Diethyl 4-(2-hydroxyphenylamino)-4-oxo-1-phenylbutylphosphonate (31). Colorless crystals (325 mg, 88 %); mp: 145 °C; ^1H NMR (500.13 MHz, CDCl₃): δ = 1.07 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.17 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH_2CH_3), 2.18-2.32 (m, 2H, CH_2), 2.39-2.51 (m, 2H, CH_2), 3.10 (ddd, J = 22.0, 9.2, 5.2 Hz, 1H, PCH), 3.69-3.78 (m, 1H, CH_2CH_3), 3.81-3.90 (m, 1H, CH_2CH_3), 3.90-3.99 (m, 2H, CH_2CH_3), 6.74 (dt, J = 7.9, 1.3 Hz, 1H), 6.90 (dd, J = 8.1, 1.3 Hz, 1H), 6.96-7.01 (m, 1H), 7.16 (dd, J = 8.0, 1.3 Hz, 1H), 7.17-7.27 (m, 6H), 8.35 (s, 1H, NH), 9.12 (br s, 1H, OH) ppm; ^{13}C NMR (125.76 MHz, CDCl₃): δ = 16.2 (d, $^3J_{C-P}$ = 5.7 Hz, CH_2CH_3), 16.3 (d, $^3J_{C-P}$ = 5.8 Hz, CH_2CH_3), 26.3 (d, $^2J_{C-P}$ = 1.3 Hz, CHCH₂), 34.5 (d, $^3J_{C-P}$ = 12.3 Hz, CH_2CH_2), 43.3 (d, $^1J_{C-P}$ = 137.8 Hz, PCH), 64.4 (d, $^2J_{C-P}$ = 6.9 Hz, CH_2CH_3), 62.8 (d, $^2J_{C-P}$ = 7.2 Hz, CH_2CH_3), 118.7, 120.1, 122.0, 125.9, 126.4, 127.6 (d, J_{C-P} = 1.8 Hz), 128.8 (d, J_{C-P} = 1.7 Hz), 129.2 (d, J_{C-P} = 6.6 Hz), 135.4 (d, J_{C-P} = 6.9 Hz), 148.4, 172.0 (C=O) ppm; anal. calcd. for C₂₀H₂₆NO₅P: C 61.37, H 6.70, N 3.58, found: C 61.50, H 6.92, N 3.60.

General procedure for the synthesis of hydroxamic acids 27 and 28.¹⁴ To a solution of *N*-methylhydroxylamine hydrochloride (300 mmol, synthesis of compound **27**) or hydroxylamine hydrochloride (300 mmol, synthesis of compound **28**) in MeOH (150 mL) powdered KOH (205 eq, 307.5 mmol, 17.25 g) was added portionwise at 0 °C. The solution was stirred for 1 h at room temperature after the addition was complete. The precipitate was filtered off, and the filtrate containing the appropriate hydroxylamine was added dropwise to an ice cooled solution of ester **25** (1 eq, 1.5 mmol, 557 mg) in MeOH (7.5 mL). Subsequently, an additional amount of powdered KOH (10 eq, 15 mmol, 842 mg) was added to the reaction mixture, and the solution was stirred at room temperature for 12 h (in case of compound **27**) or for 30 min. (in case of compound **28**). MeOH was removed at room temperature under reduced pressure, the remaining solid was treated with saturated aqueous

NH₄Cl solution (30 mL) and extracted three times with ethyl acetate (50 mL). The combined organic layers were washed with brine (30 mL), dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure. Compound **27** was obtained in sufficient purity without further purification. Compound **28** was obtained as pure, white solid after addition of ethyl acetate and subsequent isolation by filtration.

Diethyl 1-benzamido-4-(hydroxyl(methyl)amino)-4-oxobutylphosphonate (27). Yellow oil (190 mg, 34 %) ¹H NMR (600.22 MHz, [D₆]DMSO): δ = 1.18 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.23 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.91-2.06 (m, 2H, CH₂), 2.41-2.44 (m, 2H, CH₂), 3.06 (s, 3H, NCH₃), 3.96-4.09 (m, 4H, CH₂CH₃), 4.46-4.53 (m, 1H, PCH), 7.47 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.54 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.87 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 8.53 (d, *J* = 9.2 Hz, CONH), 9.73 (s, 1H, OH) ppm; ¹³C NMR (150.93 MHz, [D₆]DMSO): δ = 16.2 (d, ³*J*_{C-P} = 5.5 Hz, CH₂CH₃), 16.3 (d, ³*J*_{C-P} = 4.9 Hz, CH₂CH₃), 23.3 (CH₂CH₂), 28.1 (d, ²*J*_{C-P} = 14.7 Hz, CHCH₂), 35.6 (NCH₃), 45.2 (d, ¹*J*_{C-P} = 156.1 Hz, PCH), 61.6 (d, ²*J*_{C-P} = 6.5 Hz, CH₂CH₃), 61.9 (d, ²*J*_{C-P} = 6.9 Hz, CH₂CH₃), 127.4, 128.2, 131.3, 133.9, 166.3 (d, ³*J*_{C-P} = 3.5 Hz, CONH), 172.1 (C=O) ppm; anal. calcd. for C₁₆H₂₅N₂O₆P: C 51.61, H 6.77, N 7.52, found: C 51.36, H 6.89, N 7.41.

Diethyl 1-benzamido-4-(hydroxyamino)-4-oxobutylphosphonate (28). White solid (285 mg, 53 %), mp: 157 °C; ¹H NMR (500.13 MHz, [D₆]DMSO): δ = 1.18 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.23 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.91-2.10 (m, 4H, CH₂), 3.97-4.08 (m, 4H, CH₂CH₃), 4.40-4.70 (m, 1H, PCH), 7.46-7.49 (m, 2H), 7.53-7.56 (m, 1H), 7.88 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 8.58 (d, *J* = 9.2 Hz, CONH), 8.70 (s, 0.9H, OH), 8.97 (s, 0.1H, OH), 9.81 (s, 0.1H, NH), 10.34 (s, 0.9H, NH) ppm; ¹³C NMR (125.76 MHz, [D₆]DMSO): δ = 16.2 (d, ³*J*_{C-P} = 5.6 Hz, CH₂CH₃), 16.3 (d, ³*J*_{C-P} = 5.1 Hz, CH₂CH₃), 24.3 (d, ³*J*_{C-P} = 3.3 Hz, CH₂CH₂), 28.7 (d, ²*J*_{C-P} = 14.1 Hz, CHCH₂), 45.3 (d, ¹*J*_{C-P} = 155.7 Hz, PCH), 61.6 (d, ²*J*_{C-P} = 6.6 Hz, CH₂CH₃), 61.9 (d, ²*J*_{C-P} = 6.5 Hz, CH₂CH₃), 127.4, 128.1, 131.3, 133.9, 166.3 (CONH), 168.2 (C=O) ppm; anal. calcd. for C₁₅H₂₃N₂O₆P: C 50.28, H 6.47, N 7.82, found: C 50.21, H 6.30, N 7.86.

Benzyl 2-[(diethoxyphosphoryl)(4-methoxyphenyl)methoxy]acetate (19).⁸ A solution of α -hydroxyphosphonate **18** (1 eq, 5 mmol, 1.37 g) in dry DMF (50 mL) was treated with benzyl 2-bromoacetate (1.2 eq, 6 mmol, 0.96 mL) and neutral silver oxide (1.5 eq, 7.5 mmol, 1.74 g). After stirring over night at room temperature, the reaction mixture was diluted with ethyl acetate and filtered. The solution was concentrated under reduced pressure and the remaining residue was dissolved in diethyl ether (50 mL). The organic layer was washed three times with water (10 mL), dried over MgSO_4 and filtered. The solvent was removed under reduced pressure and the crude oil was purified by column chromatography on silica gel using ethyl acetate / *n*-hexane (1:1) as the eluent. Compound **19** (1.12 g, 53 %) was obtained as colorless oil; ^1H NMR (500.13 MHz, CDCl_3): δ = 1.20 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.28 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH_2CH_3), 3.81 (s, 3H, OCH_3), 3.91-3.99 (m, 1H, CH_2CH_3), 4.02 (d, J = 16.7 Hz, 1H, $\text{OCH}_2\text{C}=\text{O}$), 4.04-4.17 (m, 3H, CH_2CH_3), 4.23 (dd, J = 16.6, 1.0 Hz, 1H, $\text{OCH}_2\text{C}=\text{O}$), 4.89 (d, $^2J_{\text{H,P}}$ = 14.4 Hz, 1H, PCH), 5.15 (s, 2H, PhCH_2), 6.89 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.29-7.39 (m, 7H) ppm; ^{13}C NMR (125.76 MHz, CDCl_3): δ = 16.3 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 5.7 Hz, CH_2CH_3), 16.4 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 5.8 Hz, CH_2CH_3), 55.3 (OCH_3), 63.1 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 6.5 Hz, CH_2CH_3), 63.3 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 7.0 Hz, CH_2CH_3), 65.9 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 14.3 Hz, $\text{OCH}_2\text{C}=\text{O}$), 66.6 (PhCH_2), 77.8 (d, $^1J_{\text{C-P}}$ = 146.9 Hz, PCH), 114.0 (d, $^4J_{\text{C-P}}$ = 1.6 Hz), 125.2 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 2.7 Hz), 128.4, 128.5, 128.6, 129.9 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 6.0 Hz), 135.3, 160.0 (d, $^5J_{\text{C-P}}$ = 2.7 Hz), 169.6 ($\text{C}=\text{O}$) ppm; anal. calcd. for $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{O}_6\text{P}$: C 59.71, H 6.44, found: C 59.65, H 6.50.

Ethyl 4-benzamido-4-(diethoxyphosphoryl)butanoate (26). To a solution of aminophosphonate **25** (1 eq, 20 mmol, 5.35 g) in dry CH_2Cl_2 (30 mL), triethylamine (0.9 eq, 18 mmol, 2.5 mL) was added at 0 °C. After 20 minutes, a solution of benzoylchloride (1.2 eq, 24 mmol, 2.77 mL) in dry CH_2Cl_2 (20 mL) was added dropwise. After stirring over night at room temperature, the organic layer was washed once with 1M hydrochloric acid (20 mL), once with a saturated aqueous solution of NaHCO_3 (20 mL) and two times with a saturated aqueous solution of NaCl (20 mL). Afterwards, the organic layer was dried over MgSO_4 and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel using ethyl acetate/*n*-hexane (3:1) as the eluent to give compound **26**

(4.38 g, 59 %) as yellow oil; ^1H NMR (500.13 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 1.14 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.18 (t, J = 7.0 Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.23 (t, J = 7.0 Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.93-2.10 (m, 2H, CH_2), 2.31-2.43 (m, 2H, CH_2), 3.96-4.08 (m, 6H, CH_2CH_3), 4.46-4.54 (m, 1H, PCH), 7.46-7.49 (m, 2H), 7.53-7.56 (m, 1H), 7.85-7.87 (m, 2H), 8.55 (d, J = 9.3 Hz, 1H, CONH) ppm; ^{13}C NMR (125.76 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 14.4 (CH_2CH_3), 16.2 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 5.6 Hz, CH_2CH_3), 16.2 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 5.2 Hz, CH_2CH_3), 23.7 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 3.2 Hz, CH_2CH_2), 29.9 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 14.3 Hz, CHCH_2), 44.7 (d, $^1J_{\text{C-P}}$ = 157.0 Hz, PCH), 59.8 (CH_2CH_3), 61.6 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 6.8 Hz, CH_2CH_3), 62.0 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 6.6 Hz, CH_2CH_3), 127.4, 128.2, 131.3, 133.8, 166.3 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 3.9 Hz, CONH), 172.0 (C=O) ppm; anal. calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{NO}_6\text{P}$: C 54.98, H 7.06, N 3.77, found: C 55.12, H 7.19, N 3.75.

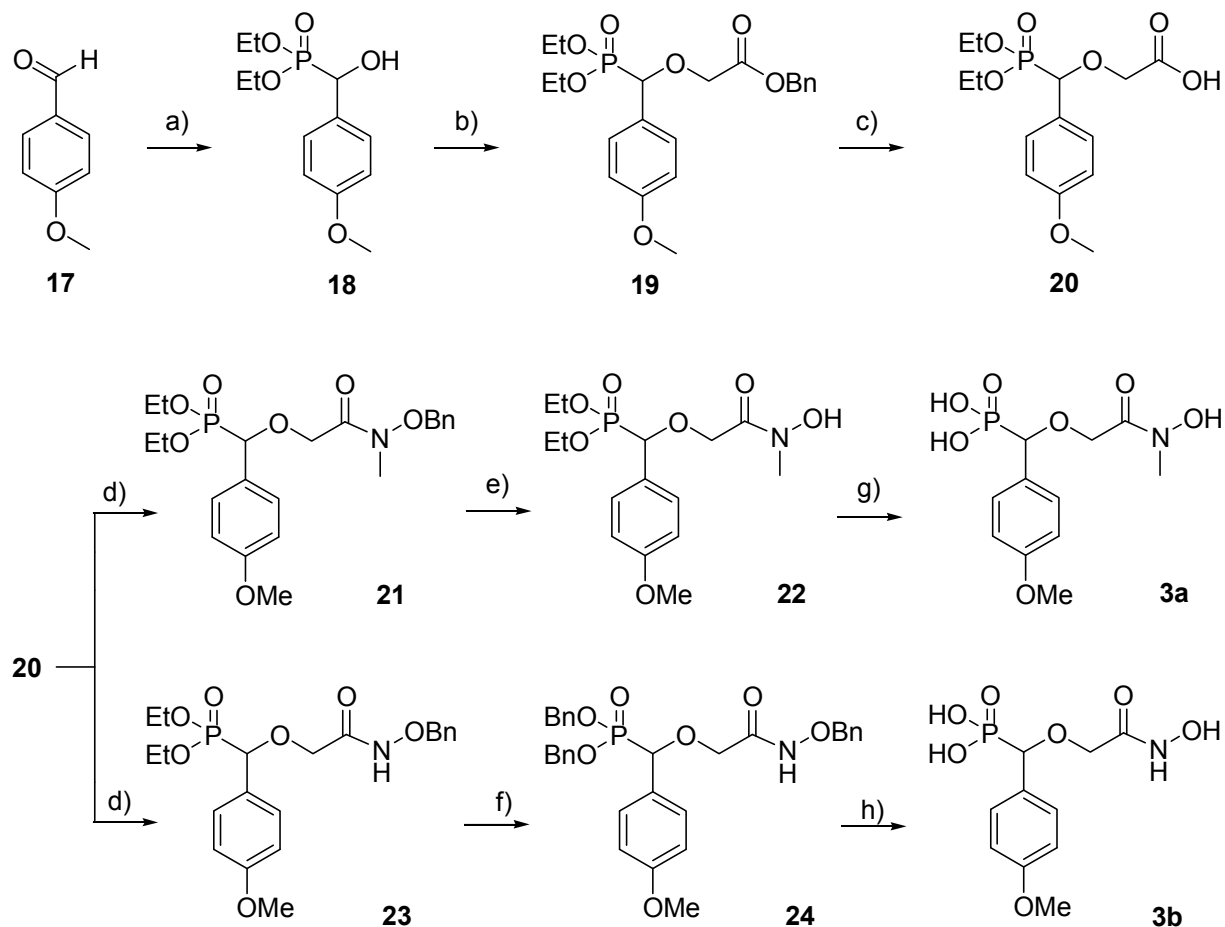
Diethyl 4-[2-(benzyloxy)phenylamino]-4-oxo-1-phenylbutylphosphonate (30). A solution of carboxylic acid **29** (1 eq, 3 mmol, 1.44 g) in dry toluene (15 mL) was treated with DMF (1.33 eq, 4 mmol, 0.31 mL). Afterwards, oxalyl chloride (4.34 eq, 13 mmol, 1.11 mL) was added slowly and the mixture was stirred for 2 h at room temperature. After decantation of the aqueous layer, the organic layer was evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in 10 mL dry CH_2Cl_2 and added dropwise to an ice cold solution of 2-(benzyloxy)benzenamine (1 eq, 3 mmol, 598 mg) and dry pyridine (2 eq, 6 mmol, 0.48 mL) in dry CH_2Cl_2 (10 mL). Afterwards, the reaction mixture was allowed to warm up to room temperature and stirred for 12 h. The solution was washed once with water (10 mL), two times with an aqueous solution of citric acid (5 %, 10 mL) and once again with water (10 mL). The organic layer was dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel using ethyl acetate as the eluent to give compound **30** (1.39 g, 96 %) as a yellow oil; ^1H NMR (500.13 MHz, CDCl_3): δ = 1.09 (t, J = 7.0 Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.28 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH_2CH_3), 2.14–2.23, 2.26–2.39, 2.50–2.60 (3m, 4H, CH_2CH_2), 3.16 (ddd, J = 22.1, 10.4, 4.1 Hz, 1H, PCH), 3.68-3.78 (m, 1H, CH_2CH_3), 3.85-3.94 (m, 1H, CH_2CH_3), 4.01-4.10 (m, 2H, CH_2CH_3), 5.09 (s, 2H, PhCH_2), 6.91 (dd, J = 7.8, 1.6 Hz, 1H), 6.94-7.02 (m, 2H), 7.21-7.40 (m, 10H), 7.64 (s, 1H, NH), 8.37 (dd, J = 7.7, 1.4 Hz, 1H) ppm; ^{13}C NMR (125.76 MHz,

CDCl₃): δ = 16.2 (d, $^3J_{C-P}$ = 5.7 Hz, CH₂CH₃), 16.4 (d, $^3J_{C-P}$ = 6.1 Hz, CH₂CH₃), 25.7 (d, $^2J_{C-P}$ = 1.5 Hz, CHCH₂), 35.2 (d, $^3J_{C-P}$ = 14.7 Hz, CH₂CH₂), 43.5 (d, $^1J_{C-P}$ = 137.6 Hz, PCH), 62.0 (d, $^2J_{C-P}$ = 7.3 Hz, CH₂CH₃), 62.6 (d, $^2J_{C-P}$ = 6.8 Hz, CH₂CH₃), 70.9 (PhCH₂), 111.7, 120.0, 121.5, 123.6, 127.3 (d, J_{C-P} = 2.8 Hz), 127.5, 127.9, 128.3, 128.6 (d, J_{C-P} = 2.3 Hz), 128.8, 129.3 (d, J_{C-P} = 6.9 Hz), 135.54 (d, J_{C-P} = 7.0 Hz), 136.38, 146.96, 170.07 (C=O) ppm; anal. calcd. for C₂₇H₃₂NO₅P: C 67.35, H 6.70, N 2.91, found: C 67.09, H 6.77, N 2.93.

Diethyl 3-bromo-1-(naphthalene-1-yl)propylphosphonate (32).¹⁵ A solution of **8e** (1 eq, 40 mmol, 11.13 g) in dry toluene (50 mL) was cooled down to -78 °C, treated with *n*-butyllithium (1.6 M solution in *n*-hexane) (1 eq, 40 mmol, 25.0 mL) and stirred for 1 h. 1,2-dibromethane (4 eq, 160 mmol, 30.06 g) was added in one portion and the mixture was allowed to warm up to room temperature. After stirring over night, saturated aqueous NH₄Cl solution (100 mL) was added and the product was extracted two times with EtOAc (50 mL). The organic layer was dried over MgSO₄, evaporated and the resulting residue was purified by column chromatography on silica gel with ethyl acetate / *n*-hexane (1:1) as the eluent to give compound **32** (9.25 g, 60 %, mp: 57 °C) as a white solid; ¹H NMR (500.13 MHz, [D₆]DMSO): δ = 0.83 (t, J = 7.0 Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.20 (t, J = 7.0 Hz, 3H, CH₂CH₃), 2.61 (m, 2H, CH₂Br), 3.24 (dd, J = 16.1, 8.5 Hz, 1H, CHCH₂), 3.48 (m, 1H, CHCH₂), 3.57 (m, 1H, CH₂CH₃), 3.75 (m, 1H, CH₂CH₃), 4.00 (dd, J = 13.8, 7.0 Hz, 2H, CH₂CH₃), 4.33 (ddd, J = 23.2, 9.3, 5.1 Hz, 1H, PCH), 7.58 (m, 4H), 7.89 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.96 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 8.21 (d, J = 8.4 Hz, 1H) ppm; ¹³C NMR (125.76 MHz, [D₆]DMSO): δ = 16.2 (d, $^3J_{C-P}$ = 5.4 Hz, CH₂CH₃), 16.6 (d, $^3J_{C-P}$ = 5.5 Hz, CH₂CH₃), 32.7 (d, $^2J_{C-P}$ = 17.3 Hz, CHCH₂), 33.9 (CH₂Br), 35.8 (d, $^1J_{C-P}$ = 138.5 Hz, PCH), 62.1 (d, $^2J_{C-P}$ = 7.0 Hz, CH₃CH₂), 62.4 (d, $^2J_{C-P}$ = 7.1 Hz, CH₃CH₂), 123.7, 125.8 (d, $^4J_{C-P}$ = 3.3 Hz), 126.1, 126.2 (d, $^3J_{C-P}$ = 5.7 Hz), 126.7, 128.1 (d, $^4J_{C-P}$ = 2.2 Hz), 129.1, 131.5 (d, $^3J_{C-P}$ = 6.3 Hz), 132.5 (d, $^2J_{C-P}$ = 6.4 Hz), 133.9 ppm; anal. calcd. for C₁₇H₂₂BrO₃P: C 53.00, H 5.76, found: C 52.98, H 5.85.

Tetraethyl 1-(naphthalene-1-yl)propane-1,3-diylldiphosphonate (33). Triethyl phosphite (6.67 eq, 100 mmol, 16.62 g) was heated to 160 °C, treated with **32** (1 eq, 15 mmol, 5.78 g) and stirred for 1 h at

160 °C. Afterwards, the temperature was raised to 180 °C and the solution was refluxed for 5 h. After cooling down to 80 °C, triethyl phosphite was removed under reduced pressure. The remaining crude product was purified by column chromatography on silica gel using ethyl acetate / *n*-hexane (1:1) → ethyl acetate (100 %) → ethyl acetate / methanol (5:1) as the eluents to give compound **33** (6.40 g, 96 %) as yellow oil; ¹H NMR (500.13 MHz, [D₆]DMSO): δ = 0.83 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.10-1.30 (m, 9H, CH₂CH₃), 1.36-1.54 (m, 1H, PCH₂), 1.73 (tdd, *J* = 21.0, 10.9, 5.7 Hz, 1H, PCH₂), 2.07-2.25 (m, 1H, CHCH₂), 2.29-2.44 (m, 1H, CHCH₂), 3.50-3.65 (m, 1H, CH₂CH₃), 3.67-3.81 (m, 1H, CH₂CH₃), 3.82-3.96 (m, 4H, CH₂CH₃), 3.96-4.10 (m, 2H, CH₂CH₃), 4.29 (ddd, *J* = 22.6, 9.8, 3.9 Hz, 1H, PCH), 7.55 (dd, *J* = 15.8, 7.6 Hz, 3H), 7.62 (m, 1H), 7.87 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.95 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 8.25 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H) ppm; ¹³C NMR (125.76 MHz, [D₆]DMSO): δ = 15.7 (d, ³*J*_{C-P} = 5.5 Hz, CH₂CH₃), 16.1 (d, ³*J*_{C-P} = 5.0 Hz, CH₂CH₃), 16.1 (d, ³*J*_{C-P} = 4.2 Hz, CH₂CH₃), 16.2 (d, ³*J*_{C-P} = 5.1 Hz, CH₂CH₃), 22.5 (dd, ¹*J*_{C-P} = 141.3 Hz, ³*J*_{C-P} = 12.5 Hz, PCH₂), 24.8 (d, ²*J*_{C-P} = 7.1 Hz, CHCH₂), 36.5 (dd, ¹*J*_{C-P} = 136.9 Hz, ³*J*_{C-P} = 16.9 Hz, PCH), 60.8 (d, ²*J*_{C-P} = 5.6 Hz, CH₂CH₃), 60.9 (d, ²*J*_{C-P} = 5.4 Hz, CH₂CH₃), 61.4 (d, ²*J*_{C-P} = 6.9 Hz, CH₂CH₃), 61.7 (d, ²*J*_{C-P} = 6.7 Hz, CH₂CH₃), 123.6, 125.3 (d, ⁴*J*_{C-P} = 2.8 Hz), 125.4 (d, ⁴*J*_{C-P} = 5.4 Hz), 125.6, 126.1, 127.5, 128.6, 132.0 (d, ³*J*_{C-P} = 6.0 Hz), 132.3 (d, ³*J*_{C-P} = 8.3 Hz), 133.3 (d, ²*J*_{C-P} = 13.7 Hz) ppm; anal. calcd. for C₂₁H₃₂O₆P₂: C 57.01, H 7.29, found: C 56.72, H 6.89.

Scheme S1. Synthesis of β -oxa isosteres **3a** and **3b**^a

^aReagents and conditions: a) DEP, TEA, rt, 12 h, 90 %; b) BrCH₂CO₂Bn, Ag₂O, DMF, rt, 24 h, 53 %; c) H₂, Pd-C, MeOH, 1 bar, rt, 2 h, 85 %; d) CDI, BnONHR (R = H, Me), CH₂Cl₂, rt, 12 h, 100 % (**21**), 90 % (**23**); e) H₂, Pd-C, MeOH, rt, 2 h, 98 %, f) 1. TMSBr, CH₂Cl₂, rt, 24 h, 2. THF/H₂O, rt, 1 h, 3. DCC, BnOH, benzene, 80 °C, 4 h, 35 % (3 steps); g) 1. TMSBr, CH₂Cl₂, rt, 24 h; 2. THF/H₂O, rt, 1 h, 25 % (2 steps); h) H₂, Pd-C, MeOH, 1 bar, rt, 2 h, 100 %.⁸

Biological evaluation

Gene Expression and Protein Purification. The recombinant *E. coli* strain M15 pREP4 pQEIspCplasart¹¹ was grown at 37 °C to an optical density of 0.6 in LB medium supplemented with ampicillin (180 mg L⁻¹) and kanamycin (50 mg L⁻¹). Isopropylthiogalactoside was added to final

concentration of 1 mM, and the cell suspension was cultivated at 30 °C overnight under shaking (120 rpm). Cells were harvested by centrifugation, washed with 0.9 % NaCl solution, and resuspended in loading buffer (100 mM Tris hydrochloride, pH 7.4, containing 0.5 M NaCl and 20 mM imidazole). The suspension was passed through a cell disruption device (FrenchPress - basis Z model, Constant Systems Limited, Northamptonshire, U.K.) and was then centrifuged. The supernatant was subjected to a Ni²⁺-chelating Sepharose fast flow column (volume, 40 mL) that had been pre-equilibrated with loading buffer. The column was flushed with 100 mM Tris hydrochloride, pH 7.4, containing 0.5 M NaCl and 250 mM imidazole. Fractions were combined and dialyzed overnight against 50 mM Tris hydrochloride, pH 7.4, containing 2 mM DTT and 0.02 NaN₃. *Pf*IspC was obtained with approximately 95 % purity, as estimated by SDS-PAGE analysis.

IC₅₀ Determination Using the Photometric Assay. Assays were conducted in 384-well plates with flat clear bottom (Nunc, Wiesbaden, Germany). Assay mixtures with a total volume of 60 µL contained 100 mM Tris hydrochloride, pH 7.6, 5 mM MnCl₂, 5 mM DTT, 0.5 mM NADPH, 0.02 U of IspC protein, and test compounds. Dilution series (1:3) of inhibitors covered the concentration range of 200-0.003 µM. The reaction was started by addition of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate in 100 mM Tris hydrochloride, pH 8.0, to a final concentration of 0.5-5.0 mM. The reaction was monitored photometrically (room temperature) at 340 nm in a plate reader (SpectraMax M5, Molecular Devices, Biberach an der Riss, Germany). IC₅₀ values (mean ± standard deviation calculated from eight or more measuring points) were evaluated using a nonlinear regression method as described earlier.¹⁶ The IC₅₀ values are provided in Table 1.

In vitro drug sensitivity assay. The chloroquine-sensitive *P. falciparum* strain 3D7 and the chloroquine-resistant strain Dd2 were kept in continuous culture as previously described.¹⁷ In brief, parasites were kept at 37 °C, 5 % CO₂ and 5 % oxygen at 5 % hematocrit in erythrocytes of blood group 0 rhesus + in complete culture medium (RPMI 1640, 25 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 50 µg/ml

gentamicin and 0.5% w/v AlbuMAX) with daily change of medium. Synchronization of parasite culture was performed with sorbitol twice a week.¹⁸

All compounds were dissolved in DMSO at stock concentrations between 25 and 100 mM. Further dilutions were prepared in complete culture medium so that final concentrations of solvent did not interfere with parasite growth. Antiplasmodial activity of compounds was evaluated in a drug sensitivity assay against the two laboratory strains using the histidine-rich protein 2 (HRP2) assay according to standard procedures.¹⁹ Briefly, 96-well plates were precoated with a threefold dilution of the different compounds before ring stage parasites were added in complete culture medium at a hematocrit of 1.5% and a parasitemia of 0.05% in a total volume of 225 μ l per well. After three days of incubation plates were frozen until analyzed by HRP2-ELISA. As internal control chloroquine was evaluated in each assay. All compounds were evaluated in duplicate.

Statistics. The 50% inhibitory concentrations (IC₅₀) were determined by analysing the nonlinear regression of log concentration–response curves using the drc-package, version 0.9.0 of R, version 2.10.1(R Development Core Team).²⁰

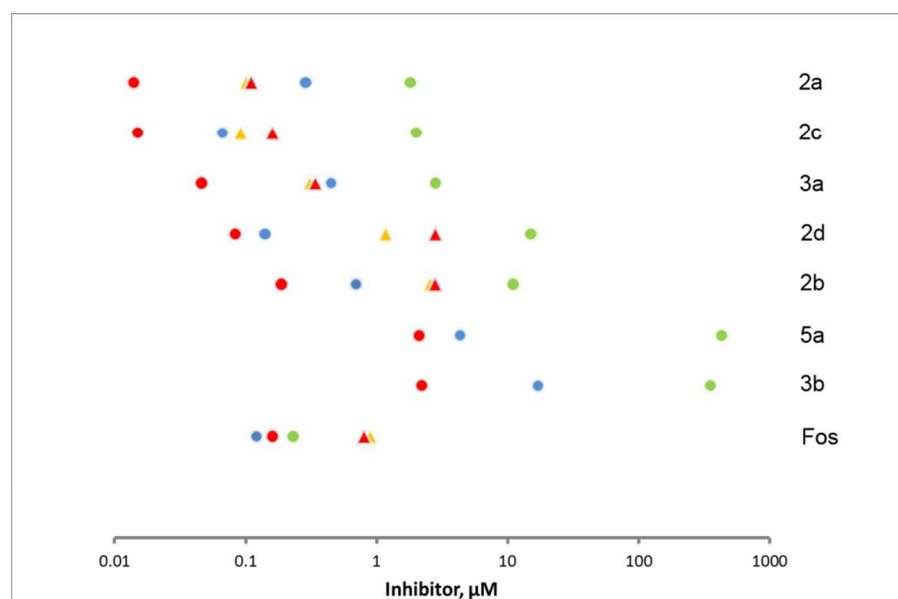


Figure S1. IC₅₀ values for fosmidomycin and its structural analogs determined in enzymatic IspC and *Plasmodium* growth assays (for exact numbers see Table 1). Circles indicate IC₅₀ values from

photometric IspC assay, triangles – IC₅₀ values from *Plasmodium* growth assay. Data for IspC of *E. coli* are shown in blue, for IspC of *M. tuberculosis* are shown in green, for IspC of *P. falciparum* are shown in red. Data for *P. falciparum* strains 3D7 and Dd2 are shown in orange and red, respectively.

Crystal structure analyses

Crystallization. Expression and purification of *PfIspC* were performed as previously described.²¹ *PfIspC* inhibitors used for crystallographic analyses here were α -aryl-substituted carba-analogs **2a** and **2c**, and an α -aryl-substituted oxa-analog **3a**. To obtain the quaternary (*PfIspC*-NADPH-Mg²⁺-each of the Inhibitor) complexes, protein solution (10 mg/ml *PfIspC*, 50 mM Tris-HCl pH 7.8, and 2 mM DTT) was mixed with each of the inhibitor solution (50 mM Tris-HCl pH 7.8, 2 mM DTT, 6 mM NADPH, 4 mM MgCl₂, and 4 mM each of the inhibitor) at a volume ratio of 1:1. Crystallization was performed using the hanging-drop method, in which 2 μ l of the quaternary complex solution (5 mg/ml *PfIspC*, 3 mM NADPH, 2 mM Mg²⁺, and 2 mM each of the inhibitor) was mixed with the same volume of reservoir solution (0.1 M Tris-HCl pH 7.0, 20%(w/v) PEG3000, and 0.2 M calcium acetate) and incubated at 293 K. The drops were suspended over 500 μ l of reservoir solution in 24-well plates. Crystals grew to a final size of 20 x 20 x 150 mm³ within 3-7 days.

X-ray data collection. The crystals were mounted in nylon loops and flash-cooled in a cold nitrogen-gas stream at 100 K just prior to data collection. Data were collected by the rotation method at 100 K using an ADSC Q315r CCD detector with synchrotron radiation ($\lambda = 0.98$ Å on beamline 17A of the Photon Factory (PF), Tsukuba, Japan). The Laue group and unit-cell parameters were determined using the HKL2000 package.²² Cell parameters and data-collection statistics are summarized in supplementary Table S1.

Structure determination. Initial phase determination was performed for the **2c** complex of *PfIspC* by molecular replacement (MR) using the coordinate set of the fosmidomycin complex of *PfIspC* (PDB code 3AU9). The phase determination was performed using the MOLREP²³ program from the CCP4²⁴

suite. Model building and refinement at a 1.97 Å resolution were performed with the XtalView²⁵ and REFMAC5²⁶ programs. The refined **2c** complex model was then used as a template for the structure refinement of **2a** complex because the crystals of these quaternary complexes are isomorphous to each other. The **2a** complex of *PfIspC* was refined at a 2.25 Å resolution. The refined **2c** model was also used for structure determination of **3a** complex by the MR method, which was performed using procedures similar to those described above. The **3a** complex of *PfIspC* was refined at a 2.35 Å resolution. Refinement statistics for the quaternary complexes of *PfIspC* are summarized in Table S1. Figure **5a** was produced with the PyMOL (<http://www.pymol.org>) program. Figures **5b**, **5c**, and **5f** were produced with the DS ViewerPro (Accelrys, Inc.) program. Figures **5d** and **5e** were produced with the ISIS/Draw 2.5 (MDL Information System) and Illustrator CS5 (Adobe) programs. Figure **S2** was produced with the XtalView and Raster3D²⁷ programs. Least-squares comparisons of the molecular models were performed using the XtalView program. The structural descriptions in this paper are for the subunit B in the asymmetric unit of the **2a** and **2c** complexes, because the flexible loop regions (residues 291-299) of the subunit A of these complexes have some VDW contacts with a neighboring molecule in the crystal and they show rather ordered and different conformation compared with the flexible loop of the subunit B of these complexes. Such crystallographic artifacts (tight packing effects) are not observed for both subunits of the previously reported fosmidomycin and FR900098 complexes, because the *c*-axes of the fosmidomycin- and FR900098-complex crystals (ca. 111 Å) are significantly longer than those of the **2a**- and **2c**-complex crystals (ca. 104 Å). Atomic coordinates for the reported structures have been deposited with the Protein Data Bank under accession codes 3WQQ (*PfIspC*-NADPH-Mg²⁺-**2a**), 3WQR (*PfIspC*-NADPH-Mg²⁺-**2c**), and 3WQS (*PfIspC* -NADPH-Mg²⁺-**3a**).

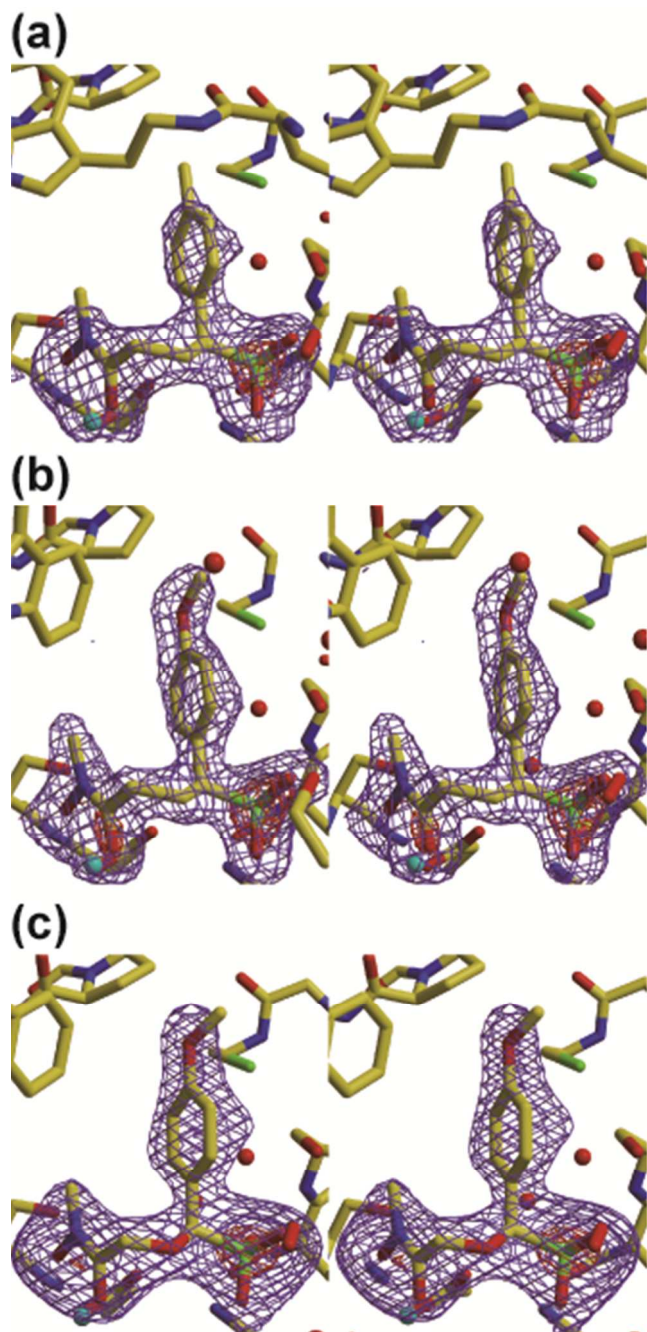


Figure S2. Stereo diagrams showing the $|F_o| - |F_c|$ omit maps of bound inhibitors in (a) **2a**, (b) **2c**, and (c) **3a** complexes at 2.25-, 1.97-, and 2.35Å resolutions, respectively. To exclude a model bias, the structures were refined in the absence of the inhibitor molecules before the map calculation. The amplitude $|F_c|$ and the phase angle calculated from the partial structure were then used to calculate the $|F_o| - |F_c|$ omit map. The contour levels are 3.0 σ (purple) and 10.0 σ (red).

Table S1. Data collection and refinement statistics for the quaternary complexes of *Pf*lspC.

Data set (PDB ID)	2a (3WQQ)	2c (3WQR)	3a (3WQS)
Data collection			
Radiation source	PF BL17A	PF BL17A	PF BL17A
Wavelength	0.980	0.980	0.980
Detector	ADSC Q315r	ADSC Q315r	ADSC Q315r
Space group	$P2_1$	$P2_1$	$P3_121$
Cell dimensions			
a, b, c (Å)	51.042, 76.260, 104.231	51.081, 76.551, 104.095	91.550, 91.550, 107.868
α, β, γ (°)	90, 90.823, 90	90, 90.683, 90	90, 90, 120
Asymmetric unit	2 subunits (1 dimer)	2 subunits (1 dimer)	1 subunit (a half dimer)
Resolution (Å)	2.25 (2.29–2.25)	1.97 (2.00–1.97)	2.35 (2.39–2.35)
Unique reflections	35,499	56,024	22,254
R_{sym} (%)	9.0 (54.2)	9.7 (68.2)	6.0 (59.6)
$I/\sigma(I)$	18.4 (2.1)	19.0 (2.1)	42.6 (3.2)
Completeness (%)	93.4 (87.8)	99.1 (98.4)	99.9 (99.8)
Redundancy	2.9 (2.7)	3.5 (3.4)	7.1 (5.8)

Refinement			
Resolution (Å)	50-2.25	50-1.97	50-2.35
No. of reflections	33,637	53,106	21,058
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$	0.185/0.240	0.180/0.230	0.209/0.259
No. of atoms			
Protein	6,552 ^a	6,552 ^a	3,276 ^a
NADPH	96 (2 x 48)	96 (2 x 48)	48
Mg ²⁺	2 (2 x 1)	2 (2 x 1)	1
Inhibitor	38 (19 x 2)	40 (20 x 2)	20
Solvent	183	497	86
Average B-factors			
Protein	38.7	26.0	51.3
NADPH	34.0	22.2	47.9
Inhibitor	33.1	19.2	47.0
Mg ²⁺	20.9	10.4	38.2
Solvent	36.8	34.5	46.1
RMS deviations			
Bond lengths (Å)	0.012	0.010	0.014

Bond angles (°)	1.404	1.210	1.499
PDB code	3VWF	3VWG	3VWH

^aResidues 75-76 and 487-488 are not included in the model.

References

- 1) Haemers, T.; Wiesner, J.; Busson, R.; Jomaa, H.; Van Calenbergh, S. Synthesis of alpha-aryl-substituted and conformationally restricted fosmidomycin analogues as promising antimalarials. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, *17*, 3856-3863.
- 2) Vugts, D. J.; Koningstein, M. M.; Schmitz, R. F.; De Canter, F. J. J.; Groen, M. B.; Orru, R. V. A. Multicomponent Synthesis of Dihydropyrimidines and Thiazines. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 7178-7189.
- 3) Khartulyari, A. S.; Kapur, M.; Maier, M. E. Concise Strategy to the Core Structure of the Macrolide Queenslondon. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 5833-5836.
- 4) Hirano, H.; Osawa, E.; Yamaoka, Y.; Yokoi, T. Gastric-Mucous Membrane Protection Activity of Coptisine Derivatives. *Biol. Pharm. Bull.* **2001**, *24*, 1277-1281.
- 5) Aspinall, H. C.; Greeves, N.; McIver, E. G. Modular chiral polyether podands and their lanthanide complexes. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 10453-10463.
- 6) Al-Riyami, L. Pineda, M. A.; Rzepecka, J.; Huggan, J. K.; Khalaf, A. I.; Sucklling, C. J.; Scott, F. J.; Rodgers, D. T.; Harnett, M. M.; Harnett, W. Designing Anti-inflammatory Drugs from Parasitic Worms: A Synthetic Small Molecule Analogue of the *Acanthocheilonema viteae*

- Product ES-62 Prevents Development of Collagen-Induced Arthritis. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 9982–10002.
- 7) Behrendt, C. T.; Kunfermann, A.; Illarionova, V.; Matheeußen, A.; Pein, M. K.; Gräwert, T.; Kaiser, J.; Bacher, A.; Eisenreich, W.; Illarionov, B.; Fischer, M.; Maes, L.; Groll, M.; Kurz, T. Reverse Fosmidomycin Derivatives against the Antimalarial Drug Target IspC (Dxr). *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 6796-6802.
 - 8) Brücher, K.; Illarionov, B.; Held, J.; Tschan, S.; Kunfermann, A.; Pein, M.; Bacher, A.; Gräwert, T.; Maes, L.; Mordmueller, B.; Fischer, M.; Kurz, T. α -Substituted β -oxa isosteres of Fosmidomycin: Synthesis and biological evaluation. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 6566-6575.
 - 9) Wu, Q.; Zhou, J.; Yao, Z.; Xu, F.; Shen, Q. Lanthanide Amides $[(\text{Me}_3\text{Si})_2\text{N}]_3\text{Ln}(\mu\text{-Cl})\text{Li}(\text{THF})_3$ Catalyzed Hydrophosphonylation of Aryl Aldehydes. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 7498-7501.
 - 10) Diel, P. J.; Maier, L. Organische Phosphorverbindungen 79¹ Herstellung und Eigenschaften von α -Amino- ω -Carboxyalkylphosphon- und Phosphinsäuren. *Phosphorus and Sulfur* **1987**, *29*, 201-209.
 - 11) Behrendt, C. T.; Kunfermann, A.; Illarionova, V.; Matheeußen, A.; Gräwert, T.; Groll, M.; Rohdich, F.; Bacher, A.; Eisenreich, W.; Fischer, M.; Maes, L.; Kurz, T. Synthesis and Antiplasmodial Activity of Highly Active Reverse Analogues of the Antimalarial Drug Candidate Fosmidomycin. *ChemMedChem* **2010**, *5*, 1673-1676.
 - 12) De Macedo Puyau, P.; Perie, J. J. Synthesis of Substrate Analogues and Inhibitors for the Phosphoglycerate Mutase Enzyme. *Phosphorus, Sulphur, and Silicon*. **1997**, *129*, 13-45.
 - 13) Shendage, D. M.; Fröhlich, R.; Haufe, G. Highly Efficient Stereoconservative Amidation and Deamination of α -Amino Acids. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 3675-3678.

- 14) Neelarapu, R.; Holzle, D. L.; Velaparthi, S.; Bai, H.; Brunsteiner, M.; Blond, S. Y.; Petukhov, P. A. Design, Synthesis, Docking, and Biological Evaluation of Novel Diazide-Containing Isoxazole- and Pyrazole-Based Histone Deacetylase Probes. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 4350-4364.
- 15) Kurz, T.; Schlüter, K.; Kaula, U.; Bergmann, B.; Walter, R. D.; Geffken, D. Synthesis and antimalarial activity of chain substituted pivaloyloxymethyl ester analogues of Fosmidomycin and FR90098. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 5121-5135.
- 16) Kuzmic, P. Program DYNAFIT for the analysis of enzyme kinetic data; Application to HIV proteinase. *Anal. Biochem.* **1996**, *237*, 260-273.
- 17) Trager, W.; Jensen, J. B. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* **1976**, *193*, 673-675.
- 18) Lambros, C.; Vanderberg, J. P. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J. Parasitol.* **1979**, *65*, 418-420.
- 19) Noedl, H.; Bronnert, J.; Yingyuen, K.; Attlmayr, B.; Kollaritsch, H.; Fukuda, M. Simple Histidine-Rich Protein 2 Double-Site Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Use in Malaria Drug Sensitivity Testing. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 3575-3577.
- 20) R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, **2009**.
- 21) Umeda, T.; Tanaka, N.; Kusakabe, Y.; Nakanishi, M.; Kitade, Y.; Nakamura, K.T. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic study of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase from *Plasmodium falciparum*. *Acta Crystallogr.* **2010**, *F66*, 330-332.

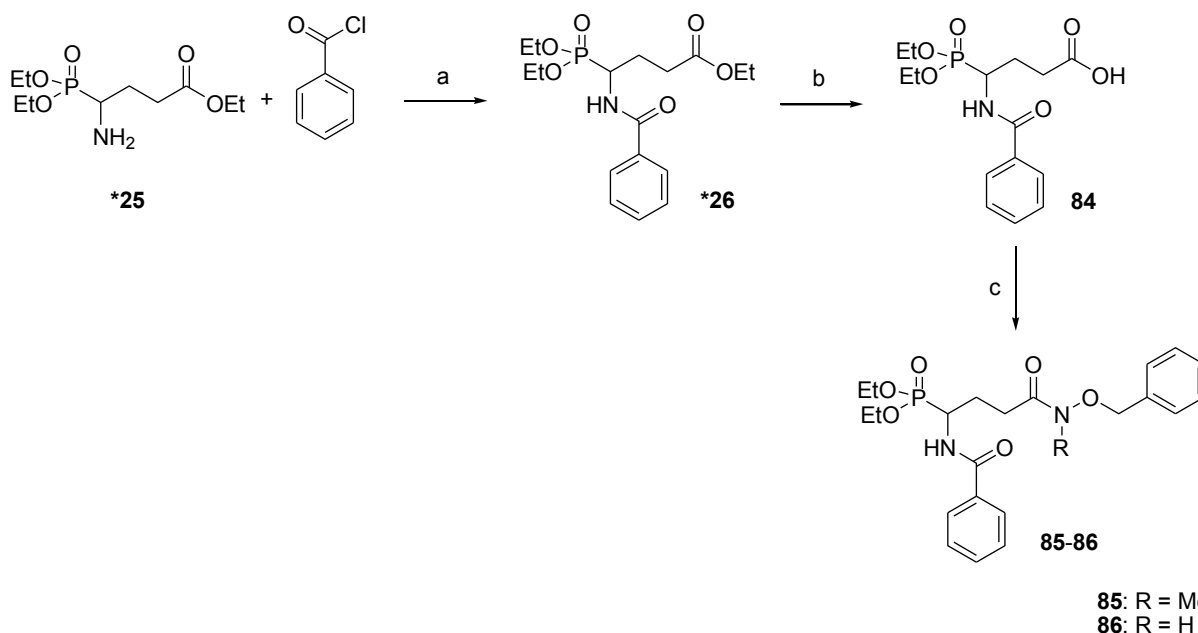
- 22) Otwinowski, Z.; Minor, W. Processing of X-ray data collected in oscillation mode. *Methods in Enzymol.* **1997**, 276, 307-326.
- 23) Vagin, A.; Teplyakov, A. MOLREP: an automated program for molecular replacement. *J. Appl. Cryst.* **1997**, 30, 1022-1025 .
- 24) Collaborative computational project, number 4. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr.* **1994**, D50, 760-763.
- 25) McRee, D.E. XtalView/Xfit: a versatile program for manipulating atomic coordinates and electron density. *J. Struct. Biol.* **1999**, 125, 156-165.
- 26) Murshudov, G.N., Vagin, A.A. & Dodson, E.J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr.* **1997**, D53, 240-255.
- 27) Merritt, E.A. & Murphy, E.P. Raster3D version 2.0: a program for photorealistic molecular graphics. *Acta Crystallogr.* **1994**, D50, 869-873.

4.4. Synthese inverser, α -Acylamino-substituierter Fosmidomycin-Derivate

Da für die Synthese inverser α -Acylamino-substituierter Fosmidomycin-Derivate eine neue Synthesestrategie entwickelt werden musste, soll diese in diesem Abschnitt näher diskutiert werden.

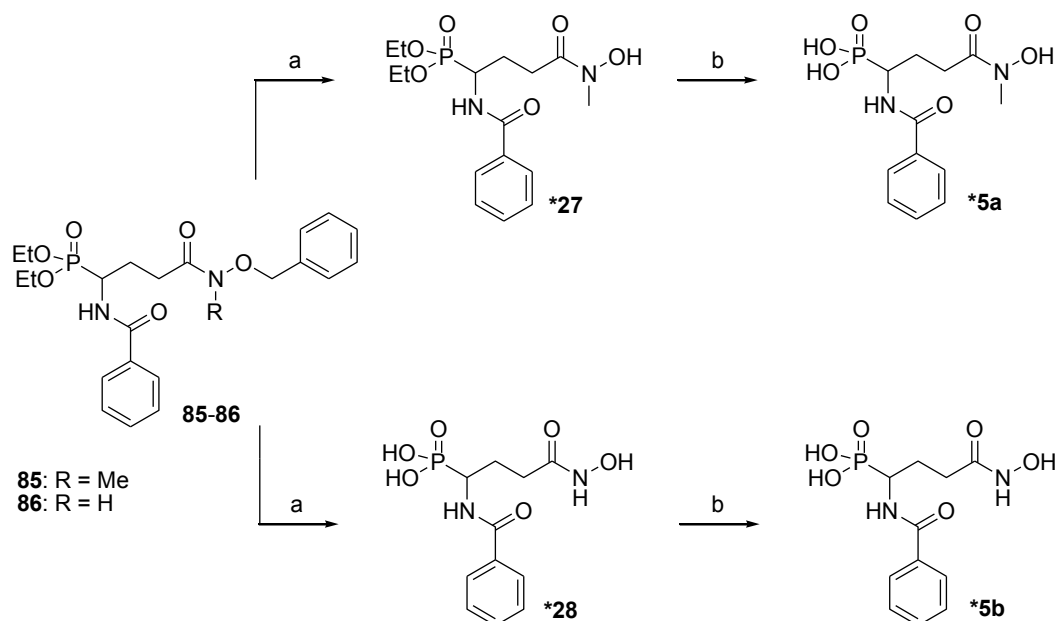
Das benötigte α -Aminophosphonat ***25** wurde entsprechend einer Literaturvorschrift ausgehend von Triethylphosphit und Bernsteinsäureanhydrid in drei Syntheseschritten hergestellt.¹⁹⁹

Zur Synthese der α -Benzylamino-substituierten Fosmidomycin-Derivaten ***5a** und ***5b** wurde im folgenden Schritt durch Reaktion mit Benzoylchlorid und Triethylamin zunächst das Benzamid ***26** erhalten. Die basische Hydrolyse der Carbonsäureesterfunktion von ***26** erfolgte mittels Kaliumhydroxid in einem Methanol/Wasser-Gemisch nach anschließender Kristallisation aus Ethylacetat/Methanol mit einer Ausbeute von 67 %. Die geschützten *N*-H- oder *N*-Methyl-Hydroxamsäure-Derivate **85-86** wurden durch Reaktion mit *O*-Benzyl-geschützten Hydroxylamin-Derivaten gewonnen (Schema 63). Aktivierung der Carbonsäuregruppe mittels 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI) ergab *O*-Benzyl-geschützte Hydroxamsäuren in mäßigen Ausbeuten von 49-58 %. Hingegen führte die Verwendung von Chlorameisensäure-*iso*-butylester (CAIBE) als Aktivierungsreagenz in Verbindung mit *N*-Methylmorpholin (NMM) als Base zu einer deutlichen Steigerung der Aubeute.



Schema 63: Synthese der Benzyl-geschützten Hydroxamsäure-Analoga **85-86**; Reagenzien und Bedingungen: (a) Benzoylchlorid, Triethylamin, DCM, RT, 12 h, 59 %; (b) KOH, MeOH/H₂O (3:1), RT, 12 h, 67 %; (c) NMM, Chlorameisensäure-*iso*-butylester, BnONHR (R = Me, H), THF, -20 °C, 10 min → RT, 30 min, 76 % (**85**), 65 % (**86**).

Die Abspaltung der Schutzgruppen der Verbindungen **85** und **86** erfolgte in beiden möglichen Reihenfolgen. Die Palladium-katalysierte Hydrolyse der Benzyl-Schutzgruppe mit anschließender TMSBr-vermittelten Desalkylierung der Phosphonsäurediethylester erwies sich in Bezug auf Reinheit und Ausbeute der Zwischenprodukte günstiger als die umgekehrte Reihenfolge (Schema 64).



Schema 64: Synthese α -Benzoylamino-substituierter Fosmidomycin-Derivate ***5a** und ***5b**; Reagenzien und Bedingungen: (a) H_2 , Pd-C, MeOH, RT, 1 h, 95 % (***27**), 91 % (***28**); (b) 1. TMSBr, DCM, RT, 24 h; 2. THF/ H_2O , RT, 1 h, 70 % (***5a**), 44 % (***5b**).

Die katalytische Hydrogenolyse von **85** und **86** führte zur Abspaltung der Benzyl-Schutzgruppen, wodurch die freien Hydroxamsäuren ***27** und ***28** in nahezu quantitativer Ausbeute erhalten werden konnten. Die Phosphonsäurediethylester wurden anschließend mit einem Überschuss an Trimethylsilylbromid (TMSBr) unter wasserfreien Bedingungen mit anschließender Hydrolyse in die freien Phosphonsäuren überführt. Aufgrund der hohen Polarität der freien Phosphonsäure-Derivate war eine chromatographische Reinigung an Kieselgel nicht möglich. Die Rohprodukte wurden in Ethanol gelöst und mit wenig Petrolether versetzt. Nach Lagerung über Nacht bei 7 °C konnte eine Verunreinigung als braunes Öl abgetrennt werden. Die dadurch erhaltenen Endstufen ***5a** und ***5b** konnten als gelbe Öle mit einer HPLC-Reinheit von >99 % erhalten werden.

Wie in der Publikation beschrieben, konnte dieser Syntheseweg um drei Schritte verkürzt werden. Mittels Hydroxylaminolyse war es möglich die Carbonsäureesterfunktion von ***26** direkt in eine *N*-H oder *N*-methylierte, freie Hydroxamsäure zu überführen, sodass nach anschließender Desalkylierung der Phosphonsäurediethylester das Endprodukt erhalten werden konnte.

Nach gleichem Syntheseprinzip sollten weitere, in α -Position unterschiedlich substituierte, inverse Fosmidomycin-Derivate hergestellt werden. Anstelle der Benzoyl-Gruppe sollten z. B. Cyclopropionyl-, Acetyl-, Trifluoracetyl- und Pivaloyl-Gruppen eingeführt werden. Aufgrund schwieriger Substanzeigenschaften freier Phosphonsäure- und Hydroxamsäure-Gruppen konnten Endverbindungen nicht analysenrein gewonnen werden. Verunreinigte Zwischen- und Endprodukte konnten teilweise wegen ihrer hohen Polarität nicht chromatographisch gereinigt werden, sodass die Synthesen nicht weitergeführt werden konnten.

Unter Einsatz von Mesylchlorid sollte außerdem in α -Position eine Sulfonamid-Gruppe anstelle einer Carbonsäureamid-Gruppe eingeführt werden. Es konnten ebenfalls keine analysenreinen Endverbindungen erhalten werden.

Die inversen Carba-Analoga ***2c** und ***2d** mit +M-Substituenten am Phenylring in α -Position konnten nach bekanntem Syntheseweg nach *Behrendt* hergestellt werden.¹⁹⁵ Die Carba-Analoga ***2e** und ***2f** wurden über einen leicht modifizierten Syntheseweg hergestellt.

4.5. Biologische Evaluation

Von den vorgestellten Testsubstanzen wurde ihre Inhibition der Enzyme *P. falciparum*-Dxr, *E. coli*-Dxr (*EcDxr*) und *M. tuberculosis*-Dxr (*MtDxr*) durch die Arbeitsgruppe Fischer untersucht. Zudem wurde durch die Arbeitsgruppe Mordmüller die Hemmwirkung der Substanzen auf das Zellwachstum des Chloroquin-sensitiven *P. falciparum*-Stammes 3D7 und des multiresistenten *P. falciparum*-Stammes Dd2 evaluiert (Tab. 21).

Tabelle 21: Antiplasmodiale *in vitro*-Aktivität und Enzym-Inhibition von Fosmidomycin und inversen α -substituierten Analoga.

	Ar	R'	<i>Pf</i> 3D7 IC ₅₀ [μ M] ^a	<i>Pf</i> Dd2 IC ₅₀ [μ M] ^a	<i>Pf</i> Dxr IC ₅₀ [μ M] ^b	<i>EcDxr</i> IC ₅₀ [μ M] ^b	<i>MtDxr</i> IC ₅₀ [μ M] ^b
*1			0.88 ^c	0.81 ^c	0.16 $\pm$ 0.02 ^c	0.22 $\pm$ 0.01 ^d	0.23 $\pm$ 0.02 ^e
*2c	4-MeO-Ph	Me	0.10	0.30	0.02 $\pm$ 0.002	0.07 $\pm$ 0.003	2.0 $\pm$ 0.1
*2d	4-MeO-Ph	H	1.7	3.6	0.08 $\pm$ 0.008	0.14 $\pm$ 0.01	15 $\pm$ 1.0
*2e	3,4-MeO-Ph	Me	0.29	1.2	0.06 $\pm$ 0.006	0.32 $\pm$ 0.01	29 $\pm$ 1.0
*2f	3,4-MeO-Ph	H	6.8	8.1	0.13 $\pm$ 0.02	1.5 $\pm$ 0.1	163 $\pm$ 34
*5a	NH-CO-Ph	Me	> 50	n.b.	9.1 $\pm$ 1.3	11 $\pm$ 0	238 $\pm$ 21
*5b	NH-CO-Ph	H	> 50	n.b.	> 1000	741 $\pm$ 94	> 1000

^aMittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Doppelbestimmungen; ^bMittelwerte $\pm$ -Standardabweichung aus nichtlinearer Regression aus mindestens 8 Messpunkten;⁴⁵⁻⁴⁶ ^cIC₅₀-Wert übernommen aus Brücher, 2012;¹³³ ^dIC₅₀-Wert übernommen aus Behrendt, 2010;¹⁹⁵ ^eIC₅₀-Wert übernommen aus Kunfermann, 2013;¹⁹⁷ n.b. = nicht bestimmt.

Die IC₅₀-Werte der Carba-Analoga ***2a** (*Pf*Dxr IC₅₀ = 0.01 μ M) und ***2c** (*Pf*Dxr IC₅₀ = 0.02 μ M) zeigen, dass die Einführung von Donor-Substituenten zu einer Inhibition der *Pf*Dxr im niedrigen nanomolaren Bereich geführt hat. Im Vergleich mit Fosmidomycin (*Pf*Dxr IC₅₀ = 0.16 μ M) konnte die Inhibition um das 8- bis 16-fache gesteigert werden. Damit zählen diese Inhibitoren zu den aktivsten der bisher synthetisierten, inversen Carba-Analoga. Die potentesten Inhibitoren dieser Klasse wurden von Behrendt synthetisiert und tragen in α -Position unsubstituierte, 3,4-Chlor- oder 3,4-Fluor-Phenyl-Substituenten und hemmen *Pf*Dxr im einstelligen, nanomolaren Bereich. Die 3,4-Dimethoxyphenyl-substituierten Fosmidomycin-Analoga ***2e** und ***2f** zeigen eine etwas schwächere Inhibition von *Pf*Dxr (*Pf*Dxr IC₅₀ = 0.06 μ M (***2e**), *Pf*Dxr IC₅₀ = 0.13 μ M (***2f**)) gegenüber den Derivaten, welche in

α -Position einen 4-Methoxyphenyl-Substituenten tragen (*PfDxr* IC₅₀ = 0.02 μ M (***2c**), *PfDxr* IC₅₀ = 0.08 μ M (***2d**)).

Die Verlängerung der CH₂-Kette (***4**), die Benzoylamino-Substitution in α -Position (***5a-b**) sowie der Austausch der Hydroxamsäure-Gruppe gegen andere Metall-chelatisierende Gruppen (***6**, ***7**) führten hingegen zu einer Verringerung bis hin zu komplettem Verlust der inhibitorischen Aktivität.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die *PfDxr*-hemmende Aktivität der Substanzen um ein Vielfaches stärker ist, als ihre bakterielle Aktivität gegenüber *EcDxr* und *MtDxr* (siehe *Figure 3). Dieser Trend stimmt mit den biologischen Aktivitäten der β -oxa- und β -thia-isosteren Fosmidomycin-Analoga, welche von *Brücher* und *Lienau* synthetisiert wurden, überein. Fosmidomycin hingegen weist sowohl gegen *PfDxr* als auch gegen *EcDxr* und *MtDxr* Aktivitäten in gleicher Größenordnung auf. Zudem führt *N*-Methylsubstitution der Hydroxamsäurefunktionalität der inversen Fosmidomycin-Analoga zu einer Steigerung der antiplasmodialen und enzymhemmenden *in vitro*-Aktivität.

Bei Vergleich der Ergebnisse der Zellkulturassays mit denen der Enzymassays lässt sich feststellen, dass die *PfDxr*-Inhibition im Allgemeinen etwa eine Zehnerpotenz höher ist, als die der *P.falciparum*-Wachstumshemmung. Diese Beobachtung ist im Einklang mit der Tatsache, dass ein Inhibitor im Zellkulturassay zunächst zahlreiche Membrane durchdringen muss, um das Target Dxr, welches im Apikoplasten des *Plasmodium* lokalisiert ist, erreichen zu können.²⁰⁰ Ein weiterer, genereller Trend ist die höhere antiplasmodiale Aktivität von *N*-methylierten Hydroxamsäuren gegenüber *N*-unsubstituierten Hydroxamsäuren, sowohl im Enzym-Assay als auch im Zellkultur-Assay.

4.6. Strukturbiologie

2011 berichtete *Umeda* et al. erstmals die Kristallstruktur von *PfDxr* in Ab- und Anwesenheit eines Inhibitors. Zuvor waren Dxr-Kristallstrukturen nur von *E.coli*²⁰¹⁻²⁰⁵, *Zymomonas mobilis*²⁰⁶, *M. tuberculosis*²⁰⁷ und *Thermotoga maritima*²⁰⁸ bekannt.

Die Bindung von Fosmidomycin im Komplex mit einem Mg²⁺-Ion und einem NADPH-Molekül an *PfDxr* ermöglichte es *Umeda* erstmalig den Bindungsmodus von Fosmidomycin an *PfDxr* aufzuklären. Bisher konnte der Bindungsmechanismus von Fosmidomycin nur an Beispielen der *EcDxr* und *MtDxr* untersucht werden.^{203-205, 207, 209}

Wie *Steinbacher* bereits 2003 durch Kristallisation von Fosmidomycin an *EcDxr* zeigen konnte, konkurriert Fosmidomycin kompetitiv mit DOXP um dessen Bindestelle. Die Metall-chelatisierende Hydroxamsäure-Gruppe von Fosmidomycin imitiert die α -Hydroxyketon-Funktionalität von DOXP. Die Phosphonat-Einheit von Fosmidomycin bildet außerdem zur Phosphatgruppe von DOXP analoge Wechselwirkungen zum Enzym aus.

Die *PfDxr*-Hemmwerte der inversen Fosmidomycin-Analoga ***2c** zeigen, dass diese Verbindung zu den potentesten *PfDxr*-Inhibitoren gehört, welche in der Publikation vorgestellt wurden (*Table 1). *Umeda et al.* gelang es, Fosmidomycin-Analoga ***2c** und zwei weitere Verbindungen (***2a** und ***3a**)^{†††} im quaternären Komplex mit einem NADPH-Molekül und einem Mg^{2+} -Ion an *PfDxr* zu binden, um die Bindungsmodi zu untersuchen. Anhand der Kristallstrukturen konnte gezeigt werden, dass das S-Enantiomer der untersuchten Inhibitoren selektiv an das Enzym bindet (Abb. 32).

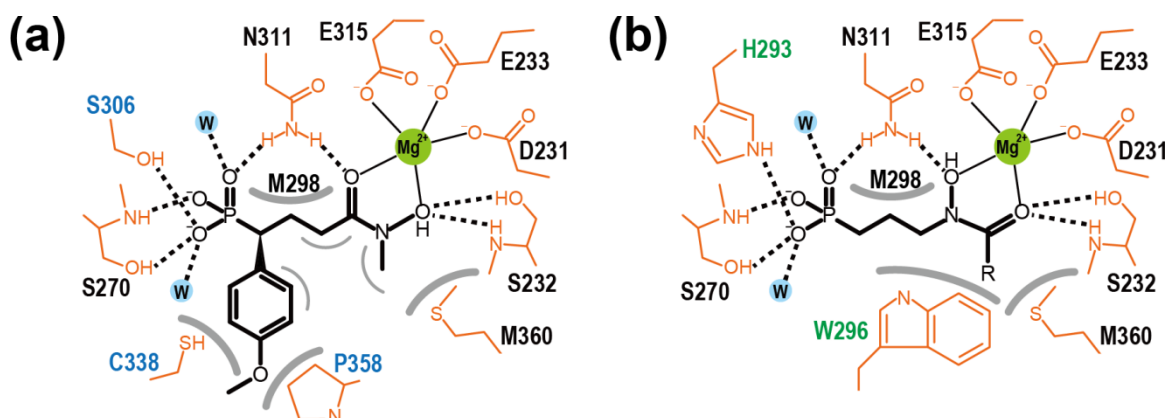


Abbildung 32: Schematische Darstellung der Wechselwirkungen von Inhibitoren im aktiven Zentrum von *PfDxr*. Koordination des Metallkations Mg^{2+} (2.0-2.1 Å) und mögliche Wasserstoffbrückenbindungen (2.7-3.1 Å) sind als schwarze, durchgezogene und gestrichelte Linien gekennzeichnet. (a) Inhibitor ***2c** im Komplex mit *PfDxr*. Aminosäurereste, welche ausschließlich mit ***2c** interagieren, sind in blau gezeigt. (b) Fosmidomycin (R = H) im Komplex mit *PfDxr*. Aminosäurereste, welche ausschließlich mit Fosmidomycin interagieren, sind in grün gezeigt. Reprinted with permission from reference¹⁹⁸. Copyright 2014 American Chemical Society.

Der Inhibitionsmechanismus soll beispielhaft an Verbindung ***2c** diskutiert werden (Abb. 32). Das inverse Fosmidomycin-Derivats ***2c** und Fosmidomycin selbst koordinieren mit ihren Hydroxamsäure-Funktionalitäten gleichermaßen das Mg^{2+} -Kation und bilden zu analogen Aminosäure-Resten Wasserstoffbrücken aus. Durch zusätzliche Koordination an Asp231, Glu233 und Glu315 weist das Mg^{2+} -Ion eine trigonal bipyramidale Geometrie auf. Die Phosphonat-Gruppe von ***2c** bildet Wasserstoffbrücken-Bindungen zu Ser270, Asn311, Ser306 und zwei Wasser-Molekülen aus. An dem Wasserstoffbrücken-Netzwerk von Fosmidomycin ist His293 anstelle von Ser306 beteiligt. Inhibitor ***2c** bildet van-der-Waals-Bindungen zu Cys338 und Pro358, welche im quaternären Komplex mit Fosmidomycin nicht zu beobachten sind. Zudem konnte eine intramolekulare Wechselwirkung zwischen dem α -Arylsubstituenten und der N-Methyl-Gruppe von ***2c** beobachtet werden (Abb. 32).

^{†††} Diese Verbindungen wurden nicht im Rahmen dieser Dissertation synthetisiert.

4.7. Zusammenfassung

Fosmidomycin ist ein Antibiotikum, welches Ende der 1970er Jahre erstmals aus *Streptomyces lavendulae* isoliert wurde. Es weist sehr gute antiplasmodiale Eigenschaften und gute Verträglichkeit auf und befindet sich aktuell in Kombination mit Piperaquin in klinischer Phase II für die Behandlung von unkomplizierter *Malaria tropica*.

Mithilfe von Strukturmodifikationen konnten in diesem Teil der Arbeit abschließende Einblicke in die Struktur-Wirkungs-Beziehungen der in der Arbeitsgruppe Kurz gründlich erforschten inversen Fosmidomycin-Analoga gewonnen werden. Die Einführung von Mono- und Dimethoxyphenyl-Substituenten in α -Position zur Phosphonsäurefunktionalität führte zu Fosmidomycin-Analoga ***2c**-***2f**, welche eine Inhibition der PfDxr im niedrigen nanomolaren Bereich aufweisen (PfDxr IC₅₀ = 0.02 ± 0.002 μ M (***2c**), PfDxr IC₅₀ = 0.08 ± 0.008 μ M (***2d**), PfDxr IC₅₀ = 0.06 ± 0.006 μ M (***2e**), PfDxr IC₅₀ = 0.13 ± 0.02 μ M (***2f**)). Die IC₅₀-Werte der *P. falciparum*-Wachstumshemmung liegen im einstelligen bis submikromolaren Bereich und sind somit ein bis zwei Zehnerpotenzen höher (Abb. 33). Dieser Unterschied lässt sich anhand der zahlreichen Membrane erklären, welche ein Inhibitor im Zellkulturassay durchdringen muss, um das Target Dxr zu erreichen.

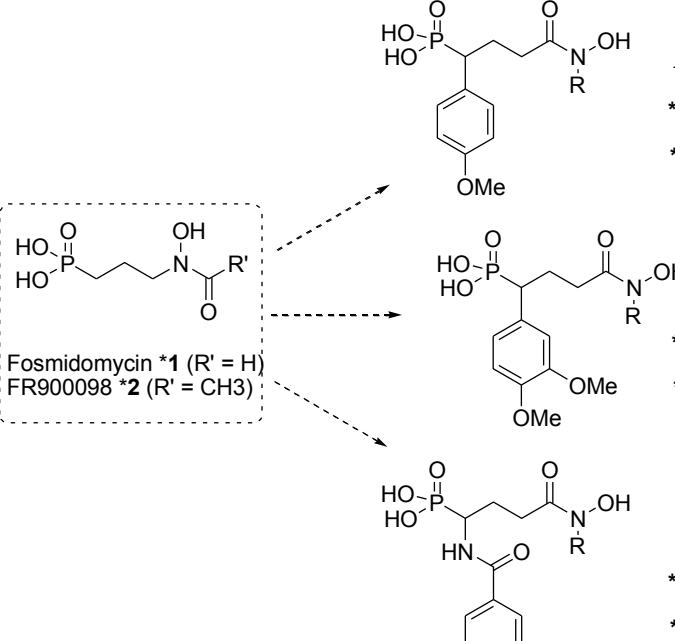
		Pf3D7 IC ₅₀ [μ M]	PfDd2 IC ₅₀ [μ M]	PfDxr IC ₅₀ [μ M]
 Fosmidomycin *1 (R' = H) FR900098 *2 (R' = CH₃)	*2c (R = Me)	0.10	0.30	0.02 ± 0.002
	*2d (R = H)	1.7	3.6	0.08 ± 0.008
	*2e (R = Me)	0.29	1.2	0.06 ± 0.006
	*2f (R = H)	6.8	8.1	0.13 ± 0.02
	*5a (R = Me)	> 50	n.b.	9.1 ± 1.3
	*5b (R = H)	> 50	n.b.	> 1000

Abbildung 33: antiplasmodiale *in vitro* Aktivität und Enzyminhibition der inversen Fosmidomycin-Analoga ***2c**-***2f** und ***5a**-***5b**; n. b. = nicht bestimmt.

Weitere Variationen der Fosmidomycin-Analoga in Länge der CH₂-Kette (***4**) sowie in der metallchelatisierenden Einheit (***6**, ***7**) führten zu einer Verringerung bis hin zu komplettem Verlust der inhibitorischen Aktivität. ⁺⁺⁺

⁺⁺⁺ Diese Verbindungen wurden nicht im Rahmen dieser Dissertation synthetisiert.

Die Entwicklung eines neuartigen Syntheseweges führte zu α -Benzoylamino-substituierter Fosmidomycin-Derivate ***5a** und ***5b**. Die *N*-Methyl-substituierte Verbindung **5a** weist einen IC₅₀-Wert gegenüber *PfDxr* von 9.1 μ M auf, wohingegen die NH-unsubstituierte Verbindung **5b** keine Aktivität gegen *PfDxr* zeigt (Abb. 33).

Neben der Untersuchung der antiplasmodialen *in vitro*-Aktivität und der Enzymhemmung wurde zudem die Strukturbiologie der synthetisierten Verbindungen mit den stärksten Hemmwirkungen gegenüber *PfDxr* untersucht. Kooperationspartner *Umeda* et al. gelang es die Kristallisation von Fosmidomycin-Analoga ***2c** und zwei weiteren Verbindungen (***2a** und ***3a**)^{†††} im quarternären Komplex mit einem NADPH-Molekül und einem Mg²⁺-Ion an *PfDxr*, um die Bindungsmodi zu untersuchen. Die Kristallstrukturen zeigen, dass es das S-Enantiomer der untersuchten Inhibitoren ist, welches selektiv an das Enzym bindet.

5. Summary

The first part of this work deals with the modification of lead structures **1** (MMV396717) and **II** (MMV006962). Prior to this work these two compounds were selected as lead structures based on the results of a target-based screening of all Malaria Box compounds of MMV against *PfDxr*.

Compounds included in the Malaria Box were chosen from 20 000 antimalarial hits published by Genomics Institute of the Novartis Research Foundation (GNF), GlaxoSmithKline (GSK) and St. Jude Children's Research Hospital. Considering other characteristics such as physicochemical properties, commercial availability, chemical diversity and cytotoxicity, MMV selected 400 final compounds contained in the Open Access Malaria Box.

At this, the initial aim of MMV is to catalyze antimalarial drug research and therefore the Malaria Box is available free of charge for research groups all over the world.

A screening of the 400 Malaria Box compounds, carried out by the research group of Markus Fischer, identified two moderate *PfDxr* inhibitors with IC_{50} values lower than 100 μ M.

In this work the two starting compounds **1** (MMV396717) and **II** (MMV006962) were structurally optimized in several key regions of the molecule (Figure 1). Thus, first insights into the structure-activity relationships of pyrrolopyrazoles and benzimidazoles could be provided.

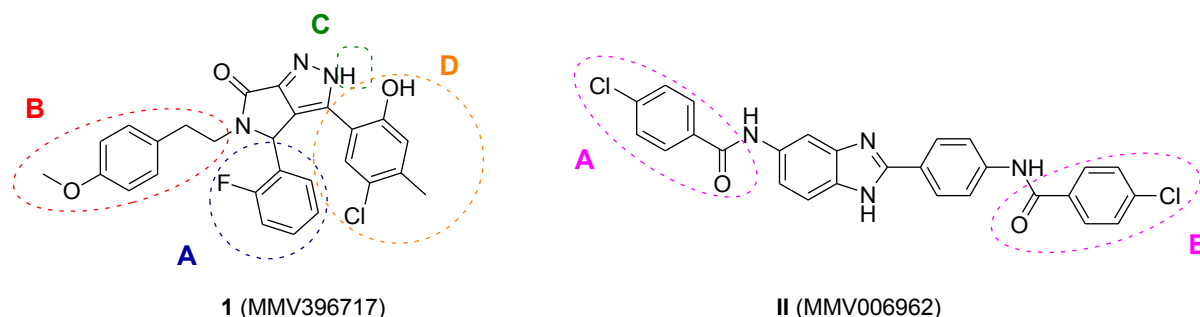
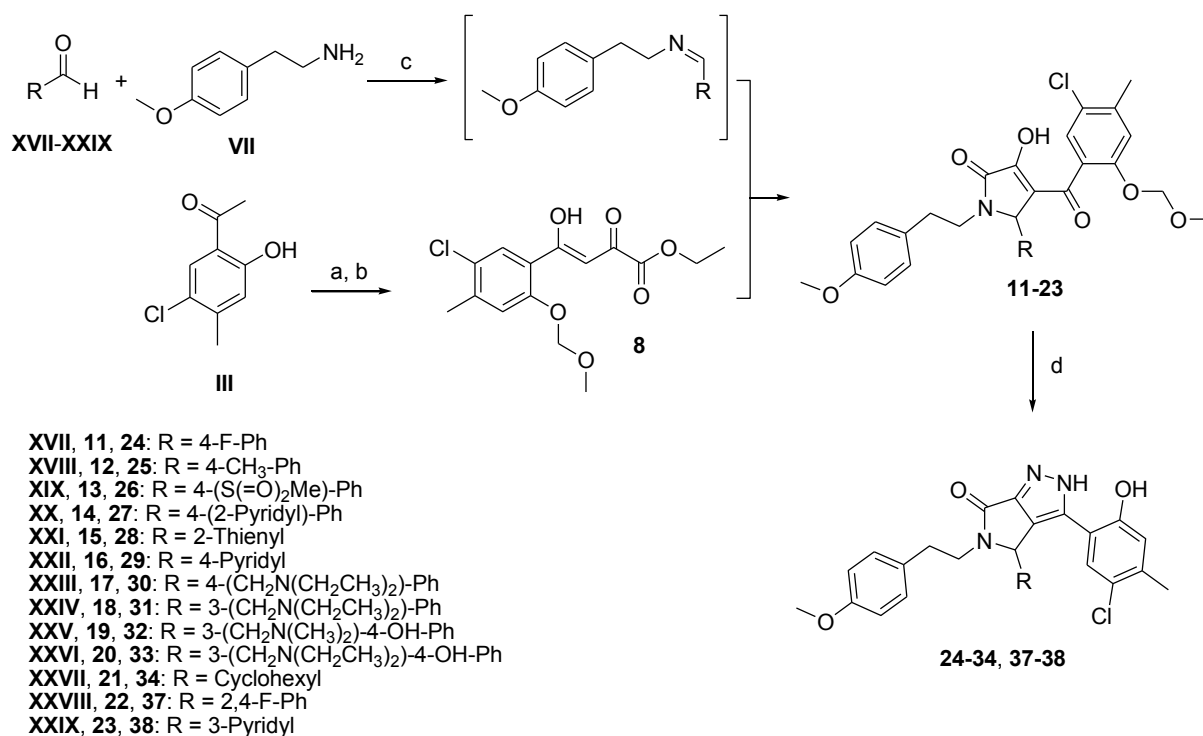


Figure 1: lead structures **1** (MMV396717) and **II** (MMV006962).

Replacement of various substituents of lead structure **1** (MMV396717) led to changes of lipophilicity and also of electronic and steric properties. Compounds substituted with basic phenyl rings in molecule region A showed potent growth inhibition of laboratory chloroquine sensitive 3D7 and multiresistant Dd2 strains of *P. falciparum*. The most active inhibitors exhibited IC_{50} values in the low double-digit nanomolar range towards both *P. falciparum* strains. The synthesis of pyrrolopyrazoles is shown in scheme 1.



Scheme 1: Synthesis of pyrrolopyrazoles with modified molecule region A; Reagents and conditions: (a) (a) NaH 60 % in mineral oil, abs. DMF, 0 °C → RT, 30 min; MOMCl, 0 °C → rt, 1h; (b) NaH 60 % in mineral oil, abs. toluene, 70 °C, 10 min → diethyl oxalate, reflux, 30 min; (c) EtOH, cat. AcOH, rt, 12 h; (d) N₂H₄·H₂O, conc. AcOH, reflux, 1 h → cat. conc. H₂SO₄, reflux, 30 min (**24-34**) or: 1. N₂H₄·H₂O, conc. AcOH, reflux, 1 h; 2. TFA, DCM, rt, 12 h (**37-38**).

The most active compound **33** (Figure 2), which is 3-((diethylamino)methyl)-4-hydroxyphenyl substituted in molecule region A, showed *in vitro* activity towards both *P. falciparum* strains (*Pf*3D7 IC₅₀ = 0.12 μM; *Pf*Dd2 IC₅₀ = 0.023 μM).

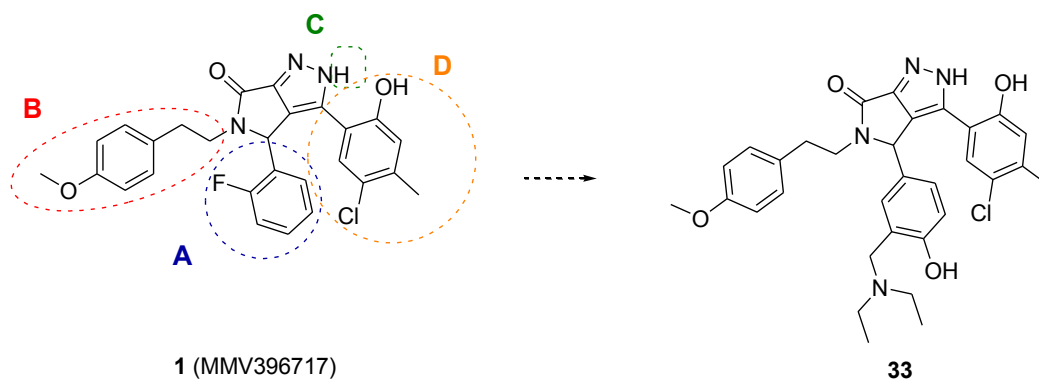
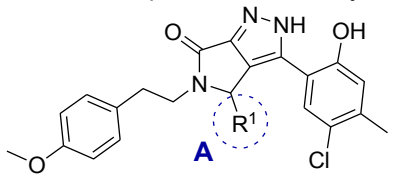


Figure 2: lead structure **1** (MMV396717) and derivative **33** mit modified molecule region A.

The *in vitro* activity of **33** exceeds that of lead structure **1** (MMV396717) about two orders of magnitude (*Pf*3D7 IC₅₀ = 2.6 μM; *Pf*Dd2 IC₅₀ = 2.0 μM). The *Pf*Dxr inhibition of **33** and lead structure **1** (MMV396717) are in a similar range. Moreover, as compared with lead structure **1** (MMV396717) the derivative **33** shows reduced cytotoxicity against HeLa-cells (Table 1). The *Pf*Dxr IC₅₀ values of **33** and all other synthesized pyrrolopyrazoles show clearly that *Pf*Dxr inhibition only contributes a small part to their antiparasmodial activity.

Table 1: antiplasmodial and cytotoxic properties of lead structure **1** (MMV396717) and derivative **33**.



	1 (MMV396717)	33
R ¹	2-F-Ph	3-(CH ₂ N(CH ₂ CH ₃) ₂)-4-OH-Ph
<i>Pf</i> 3D7 IC ₅₀ [μM] ^a	2.6	0.012
<i>Pf</i> Dd2 IC ₅₀ [μM] ^a	2.0	0.023
<i>Pf</i> Dxr IC ₅₀ [μM] ^b	23 ± 4.0	20 ± 3.0
HeLa IC ₅₀ [μM]	30	> 125

^aValues are the mean of two duplicate determinations. ^bValues were calculated from 3-9 data points;⁴⁵⁻⁴⁶ n.d. = not determined.

Using X-ray analysis, it could be proved that lead structure **1** (MMV396717) and derivative **33** exist as 2*H*-tautomer under crystalline condition (Figure 3).

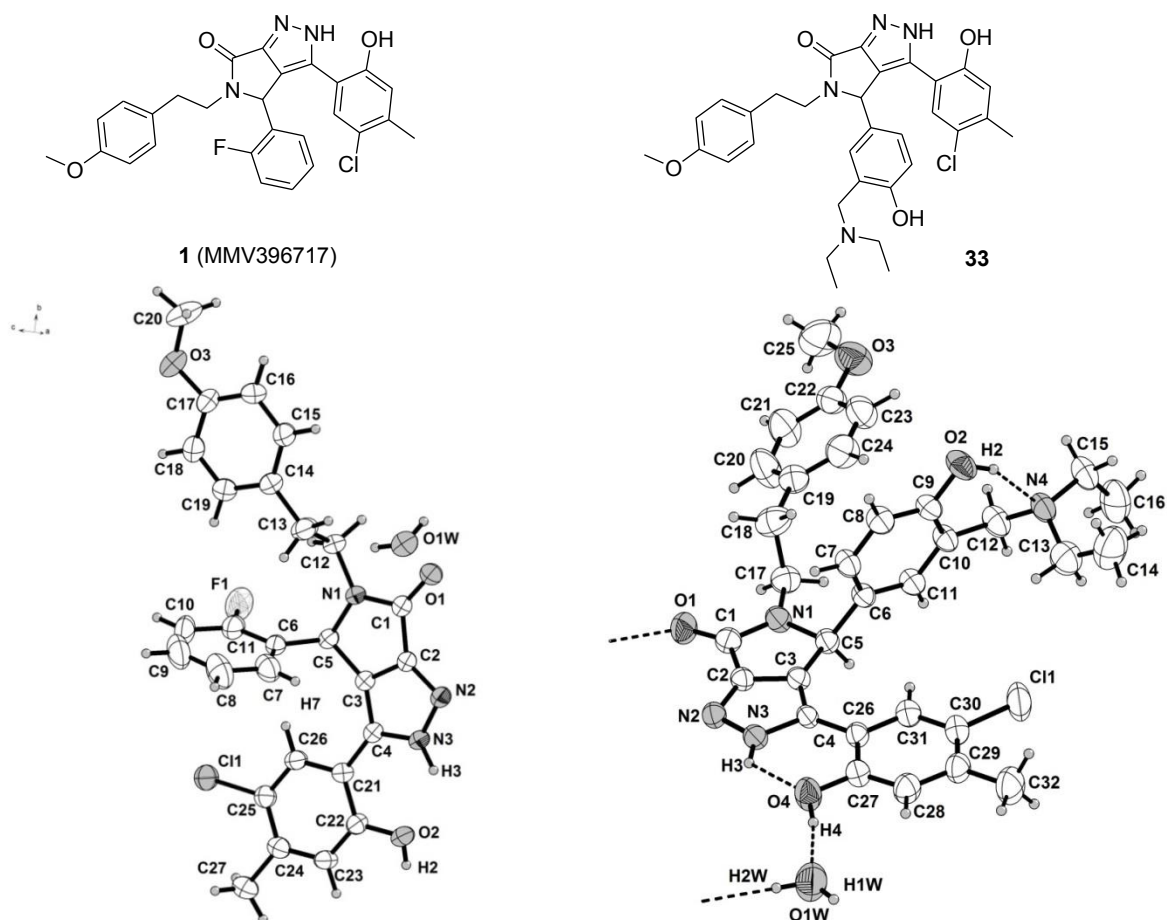


Figure 3: X-ray structure analysis, asymmetric unit; *left*: lead structure **1** (MMV396717), *right*: compound **33**.

Replacement of the 4-chlorophenyl substituents of lead structure **II** (MMV006962) led to changes of lipophilicity and also of electronic and steric properties as well. Introduction of bulky substituents led to compounds **76** and **80** with the highest *in vitro* antiplasmodial activity against *P. falciparum* (Figure 4).

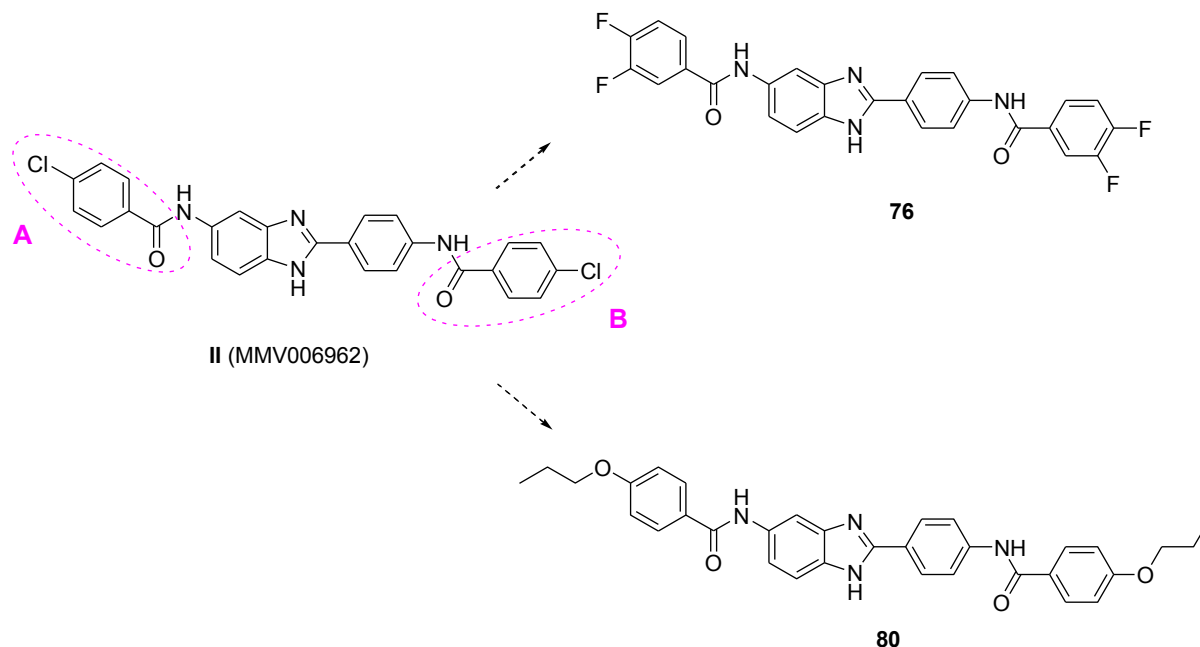


Figure 4: lead structure **II** (MMV006962) and most active derivatives **76** and **80** against *P. falciparum* with modified molecule region A and B.

3,4-Difluorophenyl-substituted derivative **76** shows a little less activity against asexual blood stages of the chloroquine sensitive *P. falciparum* 3D7 strain than lead structure **II** (MMV006962) (*Pf*3D7 IC_{50} = 0.62 μ M (**76**); *Pf*3D7 IC_{50} = 0.25 μ M (**II** (MMV006962)). However, the inhibitory potency for *P. berghei* liver stages could be improved significantly (*Pb*EEF IC_{50} = 0.011 μ M (**76**); *Pb*EEF IC_{50} = 0.093 μ M (**II** (MMV006962)). Moreover, the selectivity index of compound **76** based on IC_{50} values for *Plasmodium berghei* and HepG2 cells is more than five times higher than that of lead structure **II** (MMV006962) (Table 2). The IC_{50} values of compound **76** show clearly its dual activity against asexual *P. falciparum* blood stages and *P. berghei* liver stages.

Derivative **80** with 4-(*n*-propoxy)phenyl substituents in molecule regions A and B is the most potent *P. falciparum* growth inhibitor but it exhibits no activity against liver stages of *P. berghei*. Thus, compound **80** shows no dual activity.

The *Pf*Dxr IC_{50} values of the studied benzimidazoles also show clearly that *Pf*Dxr inhibition only contributes a small part to their antiplasmodial activity.

Table 2: antiplasmodial and cytotoxic properties of lead structure **II** (MMV006962) and derivatives **76** and **80**.

	II (MMV006962)	76	80
<i>Pf</i> 3D7 IC ₅₀ [μM] ^a	0.25	0.62	0.019
<i>Pf</i> Dd2 IC ₅₀ [μM] ^a	0.091	n.d.	0.039
<i>Pf</i> Dxr IC ₅₀ [μM] ^b	81 ± 5.0	181 ± 4.0	> 500
<i>Pb</i> EEF IC ₅₀ [μM]	0.093	0.011	> 50
HepG2 IC ₅₀ [μM]	1.6	1.0	> 50
HepG2 IC ₅₀ / <i>Pb</i> EEF IC ₅₀ ^c	17	94	n.d.
HeLa IC ₅₀ [μM] ^b	19	n.d.	> 125

^aValues are the mean of two duplicate determinations. ^bValues were calculated from 3-9 data points;⁴⁵⁻⁴⁶ ^cThe calculation of the selectivity indices was based on non-rounded IC₅₀ values; n.d. = not determined.

Despite promising antiplasmodial *in vitro* activity the pyrrolopyrazole **33** and the benzimidazole **80** don't show any antiplasmodial *in vivo* activity. Due to their low solubility in water and their high AlogP values the resorption of the compound by the human body could be difficult or even blocked. Further investigation of these substance classes should aim on the reduction of molecular weight and improvement of water solubility. So far only few drug classes show activity against plasmodial liver stages. Thus, new antimalarial drugs with causal prophylactic and transmission blocking properties are urgently needed to achieve the goal of malaria eradication. Taken all together, development of more benzimidazole derivatives with dual activity against asexual blood and liver stages is promising. For specific derivatization an identified mechanism of action would be favourable.

The natural product fosmidomycin shows strong antiplasmodial activity and was first isolated from *Streptomyces lavendulae*. In combination with piperaquine, fosmidomycin is currently evaluated in phase II clinical trials for the therapy of uncomplicated *Malaria tropica*.

Structural modifications carried out in the second part of this work provided completing insights into structure-activity relationships of reverse fosmidomycin analogs, which are well explored by Kurz et al.. Introduction of mono- and dimethoxyphenyl substituents in α-position with respect to the phosphonate group led to fosmidomycin analogs ***2c-*2f**, which display an inhibition of *Pf*Dxr in a low nanomolar range (*Pf*Dxr IC₅₀ = 0.02 ± 0.002 μM (***2c**), *Pf*Dxr IC₅₀ = 0.08 ± 0.008 μM (***2d**), *Pf*Dxr IC₅₀ = 0.06 ± 0.006 μM (***2e**), *Pf*Dxr IC₅₀ = 0.13 ± 0.02 μM (***2f**)). The same compounds ***2c-*2f** have IC₅₀ values toward *P. falciparum* growth in the single-digit to sub micromolar range (Figure 5). This difference can be explained with the

several membrane barriers an inhibitor has to pass in a cell culture assay to reach the target in the living parasite.

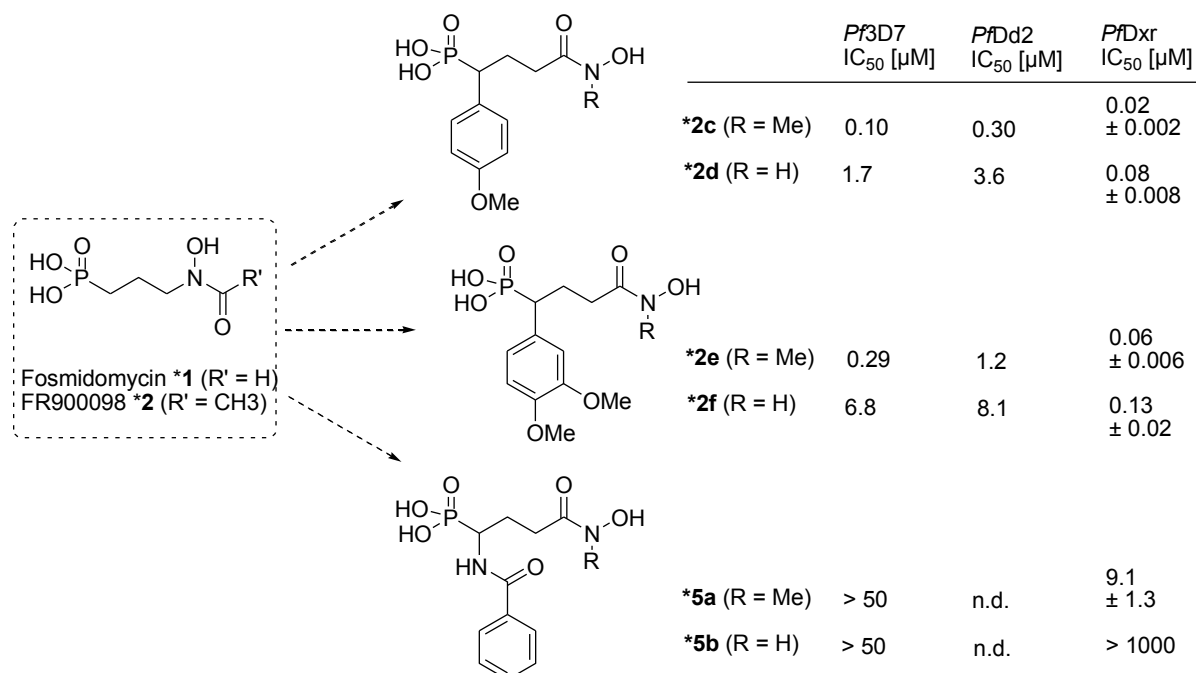


Figure 5: *In vitro* antiplasmodial activity and enzyme inhibition of reverse fosmidomycin analogs ***2c**-***2f** and ***5a**-***5b**; n. d. = not determined.

Further variations of fosmidomycin analogs concerning chain length (***4**) and the metal ion chelating group (***6**, ***7**) led to decrease or even to complete loss of inhibitory activity.^{§§§§}

Development of a new route of synthesis led to α-benzoylamino-substituted fosmidomycin analogs ***5a** und ***5b**. The *N*-methyl-substituted compound **5a** exhibits an IC₅₀ value of 9.1 μM toward *PfDxr*, whereas the *NH*-unsubstituted compound **5b** is not active (Figure 5).

Besides studying of antiplasmodial *in vitro* activity and enzyme inhibition the structural biology of the synthesized compounds with the strongest *PfDxr* inhibition effects was also analyzed.

Cooperation partner *Umeda* et al. analyzed the binding modes of fosmidomycin analog ***2c** (***2a** and ***3a**)^{§§§§} in quarternary complex with *PfDxr*, NADPH and Mg²⁺ by X-ray structure analysis.

The crystal structure shows clearly that the enzyme binds selectively the *S*-enantiomers of the study compounds.

§§§§ The synthesis of these compounds wasn't part of this work.

6. Experimenteller Teil

6.1. Verwendete Geräte und Analysemethoden

Ausbeuteangaben beziehen sich auf die ausgefällten, säulenchromatographischen gereinigten und/oder umkristallisierten Produkte.

Als Trockenmittel für organische Phasen wurde Natriumsulfat verwendet.

Chemikalien von kommerziellen Anbietern wurden in der höchsten Reinheitsstufe ohne weitere Reinigung verwendet.

Schmelzpunkte wurden mit einer Stuart SMP11-Schmelzpunktapparatur gemessen und sind unkorrigiert.

^1H -NMR-Spektren wurden mit den Geräten Bruker Avance III-300 (300 MHz), Bruker Avance DRX-500 (500 MHz) oder Bruker Avance III-600 (600 MHz) gemessen. ^{13}C -NMR-Spektren wurden mit den Geräten Bruker Avance III-300 (75 MHz), Bruker Avance DRX-500 (125 MHz) oder Bruker Avance III-600 (150 MHz) gemessen.

Chemische Verschiebung δ wurden in ppm angegeben, die Ermittlung der Protonenverhältnisse erfolgte mittels Integration. Als interne Standards der ^1H -NMR und ^{13}C -NMR-Spektren dienten die undeuterten Lösungsmittelanteile. Die Lösungsmittelsignale wurden auf die in der Literatur angegebenen Werte kalibriert.²¹⁰

Tabelle 22: Verschiebung δ der undeuterten Lösungsmittelanteile.

Lösungsmittel	δ / ppm (^1H)	δ / ppm (^{13}C)
CDCl_3	7.26	77.16
DMSO-d_6	77.16	39.52

Für die Multiplizitäten der Signale wurden folgende Abkürzungen verwendet: br s = breites Singulett, s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multipllett. Die Kopplungskonstanzen J wurden in Hz angegeben. Die Spektrenbearbeitung erfolgte mit dem Programm MestRec 4.5.6.0.

Elementaranalysen wurden mit den Geräten Perkin Elmer PE 2400 CHN Elemental Analyzer oder Vario MICRO Cube Elemental Analyzer gemessen.

Massenspektrometrische Bestimmungen (ESI-HRMS) wurden mit dem Massenspektrometer Bruker Daltonics UHR-QTOF maXis 4G aufgenommen. Das Molekülion M wurde jeweils mit angelagertem H-Atom als $[\text{M} + \text{H}]^+$ im m/z = Masse/Ladungsverhältnis angegeben.

Für dünnschichtchromatographische Untersuchungen wurden mit Kieselgel 60 und Fluoreszenzindikator F₂₅₄ beschichtete DC-Aluminiumplatten von Merck verwendet. Die Detektion erfolgte mithilfe von Fluoreszenzlöschung bei UV-Licht der Wellenlänge 254 nm oder durch Anfärbung mit wässriger Kaliumpermanganat-Lösung.

Säulenchromatographische Reinigungen wurden manuell oder mittels Flash-Chromatographie an einem Combi Flash® Rf 200 durchgeführt. Im Falle manueller Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 (0.04-0.063 mm / 230-400 mesh, Porengröße 60 Å) der Hersteller Macherey-Nagel oder Fluka verwendet.

Zur Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) wurde ein Varian ProStar HPLC-System (Varian ProStar Pumpe 210, Varian ProStar 320 UV-Detektor und Varian ProStar 410 Autosampler) verwendet.

Für analytische HPLC-Untersuchungen wurde als Trennsäule eine RP-Säule Phenomenex Luna C18(2) (250 mm · 4.6 mm, Partikelgröße 5 µm) in Kombination mit Phenomenex Security Guard Cartridge C18 (4.0 mm · 3.0 mm) verwendet. Als Laufmittel wurden Gemische aus Acetonitril und Wasser oder Methanol und Wasser verwendet.

Röntgenstrukturanalysen wurden am Einkristalldiffraktometer Xcalibur (Eos) der Firma Oxford Diffraction durchgeführt. Die graphische Darstellung erfolgte mittels Programmpaket SHELXTL.

6.2. Allgemeine Arbeitsvorschriften

AAV 1: Synthese der Diketoester-Derivate **3**, **8**, **57** und **58** ausgehend von Acetphenon-Derivaten **2**, **7**, **56** und **XXXVII** in Anlehnung an die Literatur⁶⁷

Das entsprechende Acetphenon (1.0 eq) wurde unter Inertgasbedingungen in abs. Toluol (2.5 mL pro mmol) vorgelegt und portionsweise mit NaH in Mineralöl (60 %, 1.5 eq) versetzt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung auf 70 °C erwärmt. Nach 10 min erfolgte die Zugabe von Diethyloxalat (1.8 eq) und es wurde 30 min refluxiert. Nach Abkühlung auf RT wurden 2M HCl (20 mL pro mmol) zugegeben und die wässrige Phase 3 x mit EtOAc (jeweils 50 mL pro mmol) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer eingedunstet. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte mittels Umkristallisation aus EtOAc/*n*-Hexan oder flashchromatographisch an Kieselgel mit einem Elutionsgradienten von EtOAc/*n*-Hexan (0:1 → 1:0).

AAV 2: Zyklisierung zu Pyrrolinonen 4, 9, 11-23, 39-44, 59-63 und 69-71 in Anlehnung an die Literatur⁶⁸

Das ausgewählte primäre Amin (1.0 eq) und der entsprechende Aldehyd (1.0 eq) wurden in EtOH (10 mL pro mmol) und katalytischen Mengen AcOH vorgelegt und 15 min bei RT gerührt. Anschließend wurde eine Lösung des ausgewählten Diketoester-Derivats (1.0 eq) in EtOH (5 mL pro mmol) gelöst, zu dem Reaktionsansatz zugegeben und bei RT gerührt. Nach 12 h wurde die Reaktionsmischung filtriert, der Rückstand mit EtOH gewaschen und am Hochvakuum getrocknet.

AAV 3: Zyklisierung von Pyrrolinonen 4, 9, 22-23, 42-44, 59-63, XLVIII und 69-71 zu Pyrrolopyrazolen 5, 10, 35-36, 48-50, 64-68 und 72-75 in Anlehnung an die Literatur⁷⁹

Das entsprechende Pyrrolinon-Derivat (1.0 eq) wurde in AcOH (5 mL pro mmol) bei 85°C gelöst, mit Hydrazin-Monohydrat (1.5 eq) versetzt und 2 h bei gleicher Temperatur gerührt. Nach Abkühlung auf RT wurde mit gesättigter NaHCO₃-Lösung ein pH-Wert von 8 eingestellt und die wässrige Phase 3 x mit EtOAc (jeweils 50 mL pro mmol) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte mittels Umkristallisation aus EtOAc/*n*-Hexan oder flashchromatographisch an Kieselgel mit einem Elutionsgradienten von EtOAc/*n*-Hexan (0:1 → 1:0).

AAV 4: Abspaltung der Methoxymethyl-Schutzgruppe mittels TFA zur Gewinnung der Zielverbindungen 1 (MMV396717), 37-38, 51-53 und 66 ausgehend von Pyrrolopyrazolen 10, 35-36, 48-50 und 65 in Anlehnung an die Literatur¹¹⁰

Zu einer Suspension des MOM-geschützten Pyrrolopyrazols in DCM (10 mL pro mmol) wurden bei 0 °C langsam TFA (3 mL pro mmol) getropft, nach 15 min wurde auf RT erwärmt und 2h bei gleicher Temperatur gerührt. Anschließend wurde wässrige NaHCO₃-Lösung (5 g NaHCO₃ in 40 mL H₂O) zugegeben und die wässrige Phase 3 x mit EtOAc (jeweils 50 mL pro mmol) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte mittels Umkristallisation aus EtOAc/*n*-Hexan oder flashchromatographisch an Kieselgel mit einem Elutionsgradienten von EtOAc/*n*-Hexan (0:1 → 1:0).

AAV 5: Zyklisierung zu Pyrrolopyrazolen mit simultaner Abspaltung der Methoxymethyl-Schutzgruppe zur Gewinnung der Zielverbindungen 1 (MMV396717), 24-34 und 45-47 ausgehend von Pyrrolinonen 9, 11-21 und 39-41

Das entsprechende Pyrrolinon-Derivat (1.0 eq) wurde in AcOH (5 mL pro mmol) bei 85°C gelöst, mit Hydrazin-Monohydrat (1.5 eq) und 2 h bei gleicher Temperatur gerührt. Anschließend wurden katalytische Mengen konz. H₂SO₄ (0.02 mL pro mmol) zugefügt und weitere 30 min bei 85 °C gerührt. Nach Abkühlung auf RT wurde mit gesättigter NaHCO₃-Lösung ein pH-Wert von 8 eingestellt und die wässrige Phase 3 x mit EtOAc (jeweils 50 mL pro mmol) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte mittels Umkristallisation aus EtOAc/*n*-Hexan oder flashchromatographisch an Kieselgel mit einem Elutionsgradienten von EtOAc/*n*-Hexan (0:1 → 1:0).

AAV 6: Synthese der Benzimidazol-Derivate II (MMV006962), LXIII-LXVII, 76-83 in Anlehnung an die Literatur⁴⁴

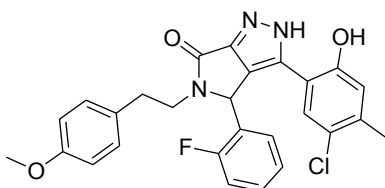
Diamin **LVI** (1.0 eq) wurde unter Inertgasbedingungen in einem Gemisch aus abs. THF (3 mL pro mmol) und abs. Pyridin (6 mL pro mmol) gelöst. Anschließend wurde langsam das entsprechende Carbonsäure- oder Sulfonsäurechlorid (2.5 eq) zugegeben und 6 h bei 70°C gerührt. Nach Abkühlung auf RT wurde die Reaktionsmischung in H₂O (15 mL pro mmol) gegeben, filtriert und 3x mit H₂O (jeweils 20 mL pro mmol) und einmal mit MeOH (20 mL pro mmol) gewaschen. Der Rückstand wurde am Hochvakuum getrocknet.

AAV 7: Synthese der *N*-Benzyl-geschützten Phosphonohydroxamsäuren 85-86 ausgehend von Carbonsäure 84

Carbonsäure **84** (1.0 eq) wurde unter Inertgasbedingungen in abs. THF (10 mL pro mmol) gelöst und mit *N*-Methylmorpholin (1.1 eq) versetzt. Bei -20 °C wurde Chlorameisensäure-*iso*-butylester (1.1 eq) zugetropft. Nach 10 min wurde das entsprechende Amin (1.0 eq) in 2 mL pro mmol abs. THF gelöst und dem Ansatz zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht auf RT erwärmt. Anschließend wurde das ausgefallene NMM-Hydrochlorid filtriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingeeengt. Der Rückstand wurde in 50 mL EtOAc/H₂O (1:1) aufgenommen, die wässrige Phase 3x mit jeweils 50 mL EtOAc extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Das Rohprodukt wurde aus EtOAc/*n*-Hexan umkristallisiert.

6.3. Analytische Daten der Verbindungen aus Kapitel 3.4.3.

3-(5-Chlor-2-hydroxy-4-methylphenyl)-4-(2-fluorphenyl)-5-(4-methoxyphenethyl)-4,5-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-6(2H)-on **1** (MMV396717)



- a) In Anlehnung an die Literatur¹²⁰ wurden 582 mg **5** (1.0 mmol, 1.0 eq) in 10 mL DCM gelöst, mit 1.3 mL 46%iger HBr (10.0 mmol, 10 eq) und 81 mg Tetrabutylammoniumbromid (25 mol%, 0.25 eq) versetzt und 24 h refluxiert. Nach Abkühlung auf RT wurde das Reaktionsgemisch durch Zugabe von 25 mL DCM verdünnt. Nach Abtrennung der organischen Phase wurde diese 3 x mit 10 mL H₂O gewaschen und die organische Phase anschließend über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel mit einem Elutionsgradienten von EtOAc/*n*-Hexan (0:1 → 1:0) gereinigt.
- b) Hergestellt aus 984 mg **9** (2.0 mmol, 1.0 eq) und 0.15 mL Hydrazin-Monohydrat (150 mg, 3.0 mmol, 1.5 eq) und katalytischen Mengen H₂SO₄ nach **AAV 5**.
- c) Hergestellt aus 536 mg **10** (1.0 mmol, 1.0 eq) nach **AAV 4**.

Ausbeute a) 7 %
 b) 81 %
 c) 89 %

Schmelzpunkt > 250 °C

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.17 (s, 3H, PhCH₃), 2.54-2.59 (m, 1H, NCH₂CH₂), 2.79-2.84 (m, 2H, NCH₂CH₂), 3.70 (s, 3H, OCH₃), 3.78-3.82 (m, 1H, NCH₂CH₂), 5.97 (s, 1H, CH), 6.80-6.83 (m, 3H, H_{Ar}), 7.03-7.04 (m, 3H, H_{Ar}), 7.12 (dd, *J*₁ = *J*₂ = 6.9 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.21 (dd, *J*₁ = *J*₂ = 9.0 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.26 (s, 1H, H_{Ar}), 7.34-7.35 (m, 1H, H_{Ar}), 10.32 (br s, 0.15H, OH), 10.51 (s, 0.85H, OH), 13.52 (s, 0.85H, NH), 14.19 (br s, 0.15H, NH)

(600 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 2.26 (s, 3H, PhCH₃), 2.77-2.82 (m, 1H, NCH₂CH₂), 2.96-3.00 (m, 1H, NCH₂CH₂), 3.07-3.11 (m, 1H, NCH₂CH₂), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 4.06-4.11 (m, 1H, NCH₂CH₂), 5.91 (s, 1H, CH), 6.81-6.84 (m, 3H, H_{Ar}), 6.90-6.95 (m, 2H, H_{Ar}), 7.10-7.12 (m, 3H, H_{Ar}), 7.22-7.24 (m, 1H, H_{Ar}), 7.38 (dd, *J* = 12.9, 6.7 Hz, 1H, H_{Ar}), 10.64 (br s, 1H, OH), 13.06 (br s, 1H, NH)

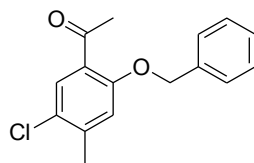
^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 19.4 (PhCH_3), 32.9 (NCH_2CH_2), 42.0 (NCH_2CH_2), 54.0 (CH), 54.9 (OCH_3), 113.8, 114.2, 115.7 (d, $^2J_{\text{CF}} = 21.0$ Hz), 118.1, 123.0, 123.8 (d, $J = 11.8$ Hz), 124.9, 127.3, 129.3, 130.4, 130.5 (d, $^3J_{\text{CF}} = 7.7$ Hz), 132.6, 136.6, 150.3, 152.8, 157.7, 160.7 (d, $^1J_{\text{CF}} = 247.0$ Hz), 161.8 ($\text{C}=\text{O}$)

$\text{C}_{27}\text{H}_{23}\text{ClFN}_3\text{O}_3$ [491.94]

Berechnet [%] C = 65.92, H = 4.71, N = 8.54

Gefunden [%] C = 66.08, H = 4.91, N = 8.52

1-(2-(Benzyloxy)-5-chlor-4-methylphenyl)ethanon **2**



In Anlehnung an eine Literaturvorschrift¹¹⁴ wurde zu einer Suspension aus 1.85 g **III** (10.0 mmol, 1.0 eq), 3 g K₂CO₃ (20.0 mmol, 2.0 eq) und 1.66 g KI (10.0 mmol, 1.0 eq) in 40 mL Aceton 2.38 mL Benzylbromid zugetropft (3.42 g, 20.0 mmol, 2.0 eq) und 2 h refluxiert. Nach Abkühlung auf RT wurde die Reaktionsmischung filtriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingengt. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel mit einem Eluentengemisch von EtOAc/*n*-Hexan (2:8, isokratisch) gereinigt.

Ausbeute 94 %, farblose Kristalle

Schmelzpunkt 87 °C

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.36 (s, 3H, PhCH₃), 2.48 (s, 3H, C(O)CH₃), 5.23 s, 2H, PhCH₂), 7.33-7.37 (m, 2H, H_{Ar}), 7.40-7.43 (m, 2H, H_{Ar}), 7.50-7.51 (m, 2H H_{Ar}), 7.58 (s, 1H, H_{Ar})

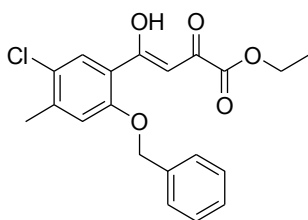
¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 20.0 (PhCH₃), 31.6 (C(O)CH₃), 70.4 (PhCH₂), 116.5, 124.9, 126.8, 127.9, 128.0, 128.4, 129.2, 136.1, 141.5, 156.2, 196.7 (C(O)CH₃).

C₁₆H₁₅ClO₂ [274.74]

Berechnet [%] C = 69.95, H = 5.50

Gefunden [%] C = 69.79, H = 5.39

(Z)-Ethyl-4-(2-(Benzyloxy)-5-chlor-4-methylphenyl)-4-hydroxy-2-oxobut-3-enoat **3**



Hergestellt aus 2.75 g **2** (10.0 mmol, 1.0 eq) und 2.63 g Diethyloxalat (18.0 mmol, 1.8 eq) nach **AAV 1**.

Ausbeute 76 %, gelbe Kristalle

Schmelzpunkt 134 °C

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 1.17 (t, ³J_{HH} = 7.1 Hz, 3H, OCH₂CH₃), 2.36 (s, 0.4H, PhCH₃), 2.41 (s, 2.6H, PhCH₃), 4.09 (q, ³J_{HH} = 7.1 Hz, 0.2H, OCH₂CH₃), 4.20 (q, ³J_{HH} = 7.1 Hz, 1.8H, OCH₂CH₃), 5.22 (s, 0.2H, PhCH₂), 5.28 (s, 1.8H, PhCH₂), 7.25 (s, 1H, CH), 7.35-7.44 (m, 5H, H_{Ar}), 7.52 (d, J = 7.1 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.77 (s, 1H, OH)

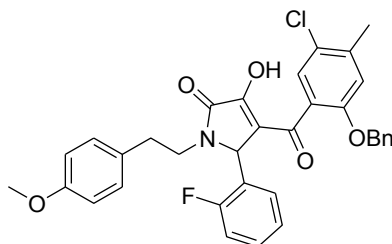
¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 14.1 (OCH₂CH₃), 20.6 (PhCH₃), 62.4 (OCH₂CH₃), 71.2 (PhCH₂), 103.3, 117.2, 123.5, 125.9, 128.2, 128.5, 128.9, 129.9, 136.2, 143.6, 157.0, 161.9 (C=O), 168.5 (C=O), 188.2 (C=O)

C₂₀H₁₉ClO₅ [374.81]

Berechnet [%] C = 64.87, H = 5.44

Gefunden [%] C = 64.68, H = 5.23

4-(2-(Benzyloxy)-5-chlor-4-methylbenzoyl)-5-(2-fluorphenyl)-3-hydroxy-1-(4-methoxyphenethyl)-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on **4**



Hergestellt aus 937 mg **3** (2.5 mmol, 1.0 eq), 310 mg 2-Fluorbenzaldehyd (**VI**, 2.5 mmol, 1.0 eq) und 378 mg 2-(4-Methoxyphenyl)ethylamin (**VII**, 2.5 mmol, 1.0 eq) nach **AAV 2**.

Ausbeute 45 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 180 °C (Zersetzung)

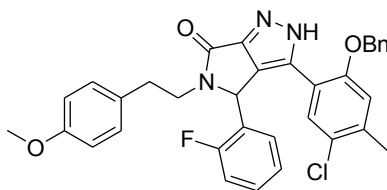
¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.35 (s, 3H, PhCH₃), 2.41-2.46 (m, 1H, NCH₂CH₂), 2.67-2.75 (m, 2H, NCH₂CH₂), 3.62-3.67 (m, 1H, NCH₂CH₂), 3.69 (s, 3H, OCH₃), 4.92 (d, *J* = 10.4 Hz, PhCH₂, 1H), 5.09 (d, *J* = 10.4 Hz, PhCH₂, 1H), 5.49 (s, 1H, CH), 6.30 (br s, 1H, H_{Ar}), 6.71 (br s, 1H, H_{Ar}), 6.80 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.00 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.13-7.147 (m, 2H, H_{Ar}), 7.22-7.26 (m, 2H, H_{Ar}), 7.34-7.42 (m, 5H, H_{Ar})

¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 20.0 (PhCH₃), 32.4 (NCH₂CH₂), 41.9 (NCH₂CH₂), 54.9 (OCH₃), 70.7 (PhCH₂), 113.8, 115.1, 115.2 (d, ²*J*_{CF} = 21.9 Hz), 123.1 (d, *J* = 11.4 Hz), 124.1, 124.5, 128.1, 128.2, 128.4, 128.7, 129.2, 129.36, 129.41, 129.8 (d, ³*J*_{CF} = 8.2 Hz), 130.0, 136.0, 139.0, 155.1, 157.7, 161.0 (d, ¹*J*_{CF} = 246.6 Hz), 165.1 (C=O)

C₃₄H₂₉ClFNO₅ [586.05]

Verbindung **4** Wurde als Rohprodukt weiter umgesetzt.

3-(2-(Benzyloxy)-5-chlor-4-methylphenyl)-4-(2-fluorphenyl)-5-(4-methoxyphenethyl)-4,5-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-6(2H)-on **5**



Hergestellt aus 586 mg **4** (1.0 mmol, 1.0 eq) und 73 μ L Hydrazin-Monohydrat (75 mg, 1.5 mmol, 1.5 eq) nach **AAV 3**.

Ausbeute 68 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 173 °C

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.23 (s, 3H, PhCH₃), 2.43-2.48 (m, 1H, NCH₂CH₂), 2.55-2.60 (m, 1H, NCH₂CH₂), 2.64-2.68 (m, 1H, NCH₂CH₂), 3.66 (s, 3H, OCH₃), 3.74-3.79 (m, 1H, NCH₂CH₂), 5.14 (s, 0.2H, PhCH₂), 5.21 (s, 1.8H, PhCH₂), 5.55 (s, 0.1H, CH), 5.70 s, 0.9H, CH), 6.80 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 6.93-6.97 (m, 3H, H_{Ar}), 7.08-7.16 (m, 3H, H_{Ar}), 7.27-7.39 (m, 7H, H_{Ar}), 13.69 (s, 0.9H, NH), 14.01 (s, 0.1H, NH)

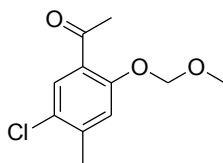
¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 19.7 (PhCH₃), 32.8 (NCH₂CH₂), 41.7 (NCH₂CH₂), 53.8 (CH), 54.8 (OCH₃), 70.0 (PhCH₂), 113.7, 115.7, 115.9, 116.3, 123.4 (d, J = 11.6 Hz), 124.7, 124.9, 125.8, 127.6, 127.9, 128.0, 128.4, 129.3, 129.5, 130.3, 130.5 (d, $^3J_{CF}$ = 8.3 Hz), 131.9, 136.3, 137.1, 150.3, 153.1, 157.7, 160.6 (d, $^1J_{CF}$ = 247.8 Hz), 161.6 (C=O)

C₃₄H₂₉ClFN₃O₃ [582.06]

Berechnet [%] C = 70.16, H = 5.02, N = 7.22

Gefunden [%] C = 69.88, H = 4.93, N = 7.06

1-(5-Chlor-2-(methoxymethoxy)-4-methylphenyl)ethanon **7**



In Anlehnung an eine Literaturvorschrift¹¹³ wurde unter Schutzgasatmosphäre 440 mg NaH in Mineralöl (60 %, 11.0 mmol, 1.1 eq) in 20 mL abs. DMF suspendiert und 1.85 g in 15 mL abs. DMF gelöstes 1-(5-Chlor-2-hydroxy-4-methylphenyl)ethanon **III** (10.0 mmol, 1.0 eq) bei 0 °C langsam zugetropft. Nach vollständiger Zugabe wurde 30 min bei RT gerührt. Anschließend wurde bei 0 °C langsam 0.84 mL MOMCl (886 mg, 11.0 mmol, 1.1 eq) zugetropft und bei RT für 1 h gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit 50 mL ges. NH₄Cl-Lösung versetzt und die wässrige Phase 3x mit jeweils 100 mL DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden 2x mit jeweils 50 mL 1M NaOH-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer eingengt. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel mit einem Elutionsgradienten von EtOAc/*n*-Hexan (0:1 → 1:0) gereinigt.

Ausbeute 85 %, farblose Kristalle

Schmelzpunkt 47 °C

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.35 (s, 3H, PhCH₃), 2.56 (s, 3H, C(O)CH₃), 3.43 (s, 3H, OCH₂OCH₃), 5.33 (s, 2H, OCH₂OCH₃), 7.24 (s, 1H, H_{Ar}), 7.57 (s, 1H, H_{Ar})

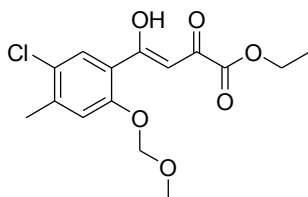
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 20.0 (PhCH₃), 31.4 (C(O)CH₃), 56.1 (OCH₂OCH₃), 94.2 (OCH₂OCH₃), 117.9, 125.7, 127.5, 129.2, 141.2, 154.3, 197.0 (C(O)CH₃)

C₁₁H₁₃ClO₃ [288.67]

Berechnet [%] C = 57.78, H = 5.73

Gefunden [%] C = 58.02, H = 5.77

(Z)-Ethyl-4-(5-chlor-2-(methoxymethoxy)-4-methylphenyl)-4-hydroxy-2-oxobut-3-enoat **8**



Hergestellt aus 2.89 g **7** (10.0 mmol, 1.0 eq) und 2.63 g Diethyloxalat (18.0 mmol, 1.8 eq) nach **AAV 1**.

Ausbeute 73 %, gelbe Kristalle

Schmelzpunkt 82 °C

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 1.25 (t, ³J_{HH} = 7.1 Hz, 0.3H, OCH₂CH₃), 1.29 (t, ³J_{HH} = 7.1 Hz, 2.7H, OCH₂CH₃), 2.35 (s, 0.3H, PhCH₃), 2.37 (s, 2.7H, PhCH₃), 3.38 (s, 0.3H, OCH₂OCH₃), 3.46 (s, 2.7H, OCH₂OCH₃), 4.25 (q, 0.2H, OCH₂CH₃), 4.29 (q, 2.8H, OCH₂CH₃), 5.27 (s, 0.2H, OCH₂OCH₃), 5.37 (s, 1.8H, OCH₂OCH₃), 7.24 (s, 0.9H, H_{Ar}), 7.25 (s, 0.1H, H_{Ar}), 7.28 (s, 1H, CH), 7.67 (s, 0.1H, H_{Ar}), 7.75 (s, 0.9H, H_{Ar})

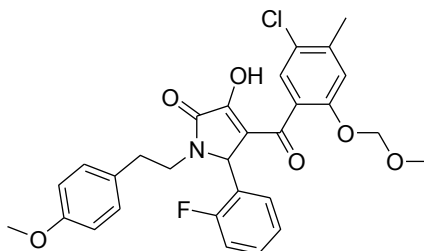
¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 13.7 (OCH₂CH₃), 20.1 (PhCH₃), 56.3 (minor OCH₂OCH₃), 56.4 (major OCH₂OCH₃), 62.1 (OCH₂CH₃), 94.2 (minor OCH₂OCH₃), 94.7 (major OCH₂OCH₃), 102.7 (CH), 117.8 (minor), 118.0 (major), 123.7 (major), 125.0 (minor), 126.1 (minor), 126.2 (major), 129.4 (major), 129.4 (minor), 142.8, 154.6 (major), 154.6 (minor), 159.4 (minor C=O), 161.5 (major C=O), 167.9 (C=O), 187.7 (major C=O), 188.3 (minor C=O)

C₁₅H₁₇ClO₆ [328.74]

Berechnet [%] C = 54.80, H = 5.21

Gefunden [%] C = 54.99, H = 5.20

4-(5-Chlor-2-(methoxymethoxy)-4-methylbenzoyl)-5-(2-fluorophenyl)-3-hydroxy-1-(4-methoxyphenethyl)-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on **9**



Hergestellt aus 822 mg **8** (2.5 mmol, 1.0 eq), 310 mg 2-Fluorbenzaldehyd (**VI**, 2.5 mmol, 1.0 eq) und 378 mg 2-(4-Methoxyphenyl)ethylamin (**VII**, 2.5 mmol, 1.0 eq) nach **AAV 2**.

Ausbeute 75 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 196 °C (Zersetzung)

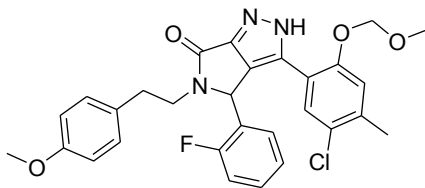
¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.31 (s, 3H, PhCH₃), 2.56-2.61 (m, 1H, NCH₂CH₂), 2.74-2.83 (m, 2H, NCH₂CH₂), 3.27 (s, 3H, OCH₂OCH₃), 3.70 (s, 3H, OCH₃), 3.75-3.79 (m, 1H, NCH₂CH₂), 5.07 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H, OCH₂OCH₃), 5.11 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H, OCH₂OCH₃), 5.53 (s, 1H, CH), 6.83 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.02 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.10 (2 s, 2H, H_{Ar}), 7.18-7.24 (m, 3H, H_{Ar}), 7.37 (dd, *J* = 12.1, 6.4 Hz, 1H, H_{Ar})

¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 19.9 (PhCH₃), 32.4 (NCH₂CH₂), 41.8 (NCH₂CH₂), 54.9 (OCH₃), 55.7 (OCH₂OCH₃), 94.4 (OCH₂OCH₃), 113.8, 115.6 (d, ²*J*_{C,F} = 22.0 Hz), 117.0, 118.6, 123.2, 124.6, 125.1, 127.7, 129.3, 130.0, 130.2 (d, ³*J*_{C,F} = 8.6 Hz), 138.4, 152.9, 157.8, 161.0 (d, ¹*J*_{C,F} = 247.3 Hz), 165.0 (C=O), 185.96 (C=O), 186.03 (C=O)

C₂₉H₂₇ClFNO₆ [539.98]

HPLC 25 Minuten Laufzeit, Gradientenelution (50 % Acetonitril in H₂O bis 100 % Acetonitril in 20 Minuten), Flussrate: 1.5 mL/min, Retentionszeit: 3.005 min (96.6 % AUC)

3-(5-Chlor-2-(methoxymethoxy)-4-methylphenyl)-4-(2-fluorophenyl)-5-(4-methoxyphenethyl)-4,5-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-6(2H)-on **10**



Hergestellt aus 810 mg **9** (1.5 mmol, 1.0 eq) und 0.11 mL Hydrazin-Monohydrat (113 mg, 2.25 mmol, 1.5 eq) nach **AAV 3**.

Ausbeute 55 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 196 °C

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.23 (br s, 0.3H, PhCH₃), 2.24 (s, 2.7H, PhCH₃), 2.57-2.62 (m, 1H, NCH₂CH₂), 2.81-2.88 (m, 2H, NCH₂CH₂), 3.22 (br s, 0.3H, OCH₂OCH₃), 3.27 (s, 2.7H, OCH₂OCH₃), 3.70 (s, 3H, OCH₃), 3.81-3.86 (m, 1H, NCH₂CH₂), 5.03 (d, *J* = 5.9 Hz, 0.1H, OCH₂OCH₃), 5.19 (m, 1H, OCH₂OCH₃), 5.27 (d, *J* = 6.8 Hz, 0.9H, OCH₂OCH₃), 5.69 (br s, 0.1H, CH), 5.87 (s, 0.9H, CH), 6.83 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.05-7.06 (m, 3H, H_{Ar}), 7.11-7.20 (m, 3H, H_{Ar}), 7.31-7.34 (m, 2H, H_{Ar}), 13.66 (s, 0.9H, NH), 14.04 (s, 0.1H, NH)

¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 19.7 (PhCH₃), 32.8 (NCH₂CH₂), 42.0 (NCH₂CH₂), 54.0 (CH), 54.8 (OCH₃), 55.7 (OCH₂OCH₃), 94.2 (OCH₂OCH₃), 113.8, 115.8 (d, ²*J*_{CF} = 21.3 Hz), 116.7, 117.6, 123.3 (d, *J* = 11.9 Hz), 125.0 (d, ⁴*J*_{CF} = 3.0 Hz), 125.6, 125.7, 127.9, 129.4, 129.7, 130.4, 130.7 (d, ³*J*_{CF} = 7.9 Hz), 131.8, 137.0, 150.3, 151.6, 157.7, 160.6 (d, ¹*J*_{CF} = 247.4 Hz), 161.7 (C=O)

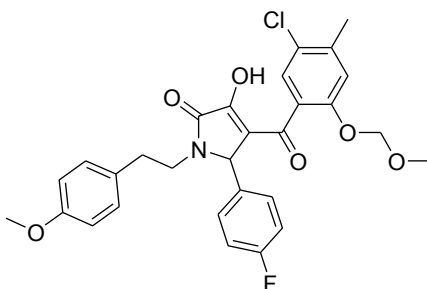
C₂₉H₂₇ClFN₃O₄ [535.99]

Berechnet [%] C = 64.98, H = 5.08, N = 7.84

Gefunden [%] C = 64.79, H = 5.18, N = 7.54

6.4. Analytische Daten der Verbindungen aus Kapitel 3.4.4.

4-(5-Chlor-2-(methoxymethoxy)-4-methylbenzoyl)-5-(4-fluorphenyl)-3-hydroxy-1-(4-methoxyphenethyl)-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on **11**



Hergestellt aus 329 mg **8** (1.0 mmol, 1.0 eq), 124 mg 4-Fluorbenzaldehyd (**XVII**, 1.0 mmol, 1.0 eq) und 151 mg 2-(4-Methoxyphenyl)ethylamin (**VII**, 1.0 mmol, 1.0 eq) nach **AAV 2**.

Ausbeute 64 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 174 °C (Zersetzung)

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.31 (s, 3H, PhCH₃), 2.57-2.62 (m, 1H, NCH₂CH₂), 2.72-2.80 (m, 2H, NCH₂CH₂), 3.27 (s, 3H, OCH₂OCH₃), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 3.72-3.77 (m, 1H, NCH₂CH₂), 5.08 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H, OCH₂OCH₃), 5.12 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H, OCH₂OCH₃), 5.29 (s, 1H, CH), 6.83 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.04 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.09 (s, 1H, H_{Ar}), 7.11 (s, 1H, H_{Ar}), 7.19 (dd, *J*₁ = *J*₂ = 8.8 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.31 (dd, *J* = 8.3, 5.6 Hz, 2H, H_{Ar})

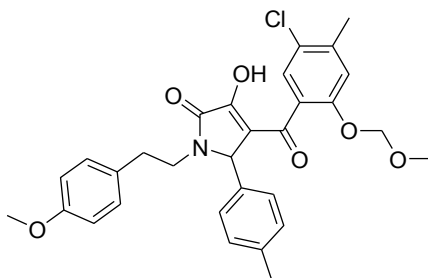
¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 19.9 (PhCH₃), 32.5 (NCH₂CH₂), 41.5 (NCH₂CH₂), 54.9 (OCH₃), 55.7 (OCH₂OCH₃), 59.4 (CH), 94.3 (OCH₂OCH₃), 113.7, 115.2 (d, ²*J*_{CF} = 21.4 Hz), 117.0, 119.8, 125.1, 127.7, 129.4, 129.9 (d, ³*J*_{CF} = 8.1 Hz), 130.2, 130.3, 132.4, 138.6, 153.0, 153.6, 157.7, 161.8 (d, ¹*J*_{CF} = 244.0 Hz), 164.6 (C=O), 186.2 (C=O)

C₂₉H₂₇ClFNO₆ [539.98]

Berechnet [%] C = 64.50, H = 5.04, N = 2.59

Gefunden [%] C = 64.30, H = 4.97, N = 2.53

4-(5-Chlor-2-(methoxymethoxy)-4-methylbenzoyl)-3-hydroxy-1-(4-methoxyphenethyl)-5-*p*-tolyl-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on **12**



Hergestellt aus 822 mg **8** (2.5 mmol, 1.0 eq), 300 mg *p*-Tolualdehyd (**XVIII**, 2.5 mmol, 1.0 eq) und 378 mg 2-(4-Methoxyphenyl)ethylamin (2.5 mmol, 1.0 eq) nach **AAV 2**.

Ausbeute 47 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 188 °C (Zersetzung)

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.28 (s, 3H, PhCH₃), 2.31 (s, 3H, PhCH₃), 2.56-2.61 (m, 1H, NCH₂CH₂), 2.74 (m, 2H, NCH₂CH₂), 3.28 (s, 3H, OCH₂OCH₃), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 3.73-3.76 (m, 1H, NCH₂CH₂), 5.07 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H, OCH₂OCH₃), 5.11 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H, OCH₂OCH₃), 5.20 (s, 1H, CH), 6.83 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.03 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.086-7.088 (m, 2H, H_{Ar}), 7.14 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.16 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H_{Ar})

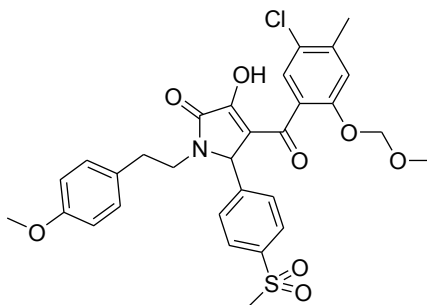
¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 19.9 (PhCH₃), 20.6 (PhCH₃), 32.5 (NCH₂CH₂), 41.4 (NCH₂CH₂), 54.9 (OCH₃), 55.7 (OCH₂OCH₃), 60.0 (CH), 94.4 (OCH₂OCH₃), 113.7, 117.0, 125.1, 127.7, 127.8, 129.0, 129.4, 130.3, 133.1, 137.3, 138.5, 153.0, 157.7

C₃₀H₃₀ClNO₆ [536.02]

Berechnet [%] C = 67.22, H = 5.64, N = 2.61

Gefunden [%] C = 66.93, H = 5.50, N = 2.52

4-(5-Chlor-2-(methoxymethoxy)-4-methylbenzoyl)-3-hydroxy-1-(4-methoxyphenethyl)-5-(4-(methylsulfonyl)phenyl)-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on **13**



Hergestellt aus 329 mg **8** (1.0 mmol, 1.0 eq), 184 mg 4-(Methylsulfonyl)benzaldehyd (**XIX**, 1.0 mmol, 1.0 eq) und 151 mg 2-(4-Methoxyphenyl)ethylamin (1.0 mmol, 1.0 eq) nach **AAV 2**.

Ausbeute 53 %, beiger Feststoff

Schmelzpunkt 160 °C (Zersetzung)

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.31 (s, 3H, PhCH₃), 2.61-2.67 (m, 1H, NCH₂CH₂), 2.74-2.79 (m, 2H, NCH₂CH₂), 3.23 (s, 3H, CH₃), 3.25 (s, 3H, CH₃), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 3.75-3.82 (m, 1H, NCH₂CH₂), 5.08 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H, OCH₂OCH₃), 5.11 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H, OCH₂OCH₃), 5.40 (s, 1H, CH), 6.83 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.05 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.09 (s, 1H, H_{Ar}), 7.13 (s, 1H, H_{Ar}), 7.55 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.92 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H_{Ar})

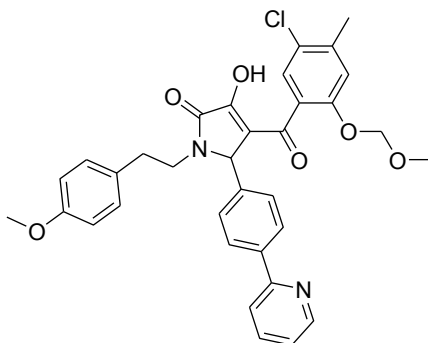
¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 19.9 (PhCH₃), 32.4 (NCH₂CH₂), 41.7 (NCH₂CH₂), 43.3 (SO₂CH₃), 54.9 (OCH₃), 55.7 (OCH₂OCH₃), 59.5 (CH), 94.3 (OCH₂OCH₃), 113.7, 117.0, 119.5, 125.1, 127.1, 127.7, 128.8, 129.5, 130.2, 138.6, 140.5, 142.5, 153.0, 153.9, 157.7, 164.9 (C=O) 186.1 (C=O)

C₃₀H₃₀ClNO₈S [600.08]

Berechnet [%] C = 60.05, H = 5.04, N = 2.33, S = 5.34

Gefunden [%] C = 59.84, H = 5.03, N = 2.28, S = 5.24

4-(5-Chlor-2-(methoxymethoxy)-4-methylbenzoyl)-3-hydroxy-1-(4-methoxyphenethyl)-5-(4-pyridin-2-yl)phenyl)-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on **14**



Hergestellt aus 329 mg **8** (1.0 mmol, 1.0 eq), 183 mg 4-(Pyridin-4-yl)benzaldehyd (**XX**, 1.0 mmol, 1.0 eq) und 151 mg 2-(4-Methoxyphenyl)ethylamin (1.0 mmol, 1.0 eq) nach **AAV 2**.

Ausbeute 68 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 190 °C (Zersetzung)

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.31 (s, 3H, PhCH₃), 2.61-2.66 (m, 1H, NCH₂CH₂), 2.75-2.85 (m, 2H, NCH₂CH₂), 3.28 (s, 3H, OCH₂OCH₃), 3.70 (s, 3H, OCH₃), 3.78-3.82 (m, 1H, NCH₂CH₂), 5.11 (dd, *J* = 21.1, 6.7 Hz, 2H, OCH₂OCH₃), 5.34 (s, 1H, CH), 6.83 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.06 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.10 (s, 1H, H_{Ar}), 7.13 (s, 1H, H_{Ar}), 7.34 (dd, *J* = 6.8, 5.0 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.39 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.87 (ddd, *J* = 7.9, 7.8, 1.6 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.96 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H_{Ar}), 8.08 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H_{Ar}), 8.66 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H, H_{Ar}), 11.90 (br s, 1H, OH)

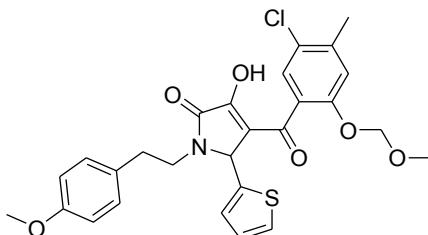
¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 19.9 (PhCH₃), 32.5 (NCH₂CH₂), 41.6 (NCH₂CH₂), 54.9 (OCH₃), 55.7 (OCH₂OCH₃), 59.9 (CH), 94.3 (OCH₂OCH₃), 113.7, 117.0, 119.8, 120.2, 122.6, 125.1, 126.6, 127.8, 128.3, 129.5, 130.3, 130.4, 137.16, 137.20, 138.5, 138.6, 149.4, 153.0, 153.6, 155.5, 157.7, 164.7 (C=O), 186.2 (C=O)

C₃₄H₃₁ClN₂O₆ [599.07]

Berechnet [%] C = 68.17, H = 5.22, N = 4.68

Gefunden [%] C = 67.89, H = 5.12, N = 4.62

4-(5-Chlor-2-(methoxymethoxy)-4-methylbenzoyl)-3-hydroxy-1-(4-methoxyphenethyl)-5-(thien-2-yl)-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on **15**



Hergestellt aus 822 mg **8** (2.5 mmol, 1.0 eq), 280 mg Thiophen-2-carbaldehyd (**XXI**, 2.5 mmol, 1.0 eq) und 378 mg 2-(4-Methoxyphenyl)ethylamin (2.5 mmol, 1.0 eq) nach **AAV 2**.

Ausbeute 38 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 168 °C (Zersetzung)

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.32 (s, 3H, PhCH₃), 2.53-2.58 (m, 1H, NCH₂CH₂), 2.75-2.80 (m, 1H, NCH₂CH₂), 2.91-2.96 (m, 1H, NCH₂CH₂), 3.30 (s, 3H, OCH₂OCH₃), 3.71-3.76 (m, 4H, OCH₃, NCH₂CH₂), 5.12 (dd, *J* = 26.1, 6.7 Hz, 2H, OCH₂OCH₃), 5.65 (s, 1H, CH), 6.84 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.02 (dd, *J* = 4.9, 3.6 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.07 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.12-7.13 (m, 2H, H_{Ar}), 7.26 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.51 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, H_{Ar})

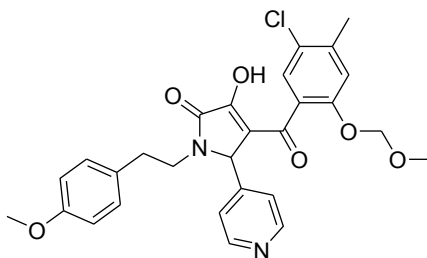
¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 20.0 (PhCH₃), 32.5 (NCH₂CH₂), 41.6 (NCH₂CH₂), 54.9 (OCH₃), 55.6 (CH), 55.8 (OCH₂OCH₃), 94.3 (OCH₂OCH₃), 113.8, 117.1, 119.4, 125.1, 126.4, 126.8, 127.8, 128.5, 129.5, 130.3, 138.7, 140.1, 153.0, 153.6, 157.7, 164.0 (C=O), 186.0 (C=O).

C₂₇H₂₆ClNO₆S [528.02]

Berechnet [%] C = 61.42, H = 4.96, N = 2.65, S = 6.07

Gefunden [%] C = 61.13, H = 4.74, N = 2.52, S = 6.22

4-(5-Chlor-2-(methoxymethoxy)-4-methylbenzoyl)-3-hydroxy-1-(4-methoxyphenethyl)-5-(pyridin-4-yl)-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on **16**



Hergestellt aus 493 mg **8** (1.5 mmol, 1.0 eq), 161 mg Isonicotinaldehyd (**XXII**, 1.5 mmol, 1.0 eq) und 227 mg 2-(4-Methoxyphenyl)ethylamin (1.5 mmol, 1.0 eq) nach **AAV 2**.

Ausbeute 36 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 170 °C (Zersetzung)

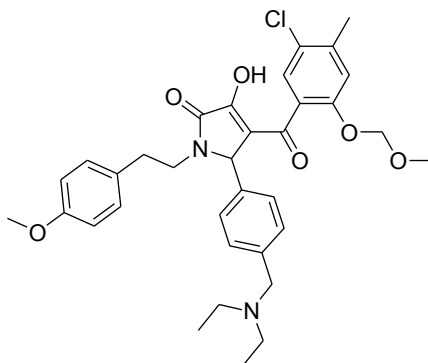
¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.31 (s, 3H, PhCH₃), 2.61-2.66 (m, 1H, NCH₂CH₂), 2.74-2.80 (m, 2H, NCH₂CH₂), 3.25 (s, 3H, OCH₂OCH₃), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 3.76-3.81 (m, 1H, NCH₂CH₂), 5.07 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H, OCH₂OCH₃), 5.10 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H, OCH₂OCH₃), 5.30 (s, 1H, CH), 6.83 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.05 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.09 (s, 1H, H_{Ar}), 7.13 (s, 1H, H_{Ar}), 7.31 (d, *J* = 4.8 Hz, 2H, H_{Ar}), 8.57 (d, *J* = 4.9 Hz, 2H, H_{Ar})

¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 19.9 (PhCH₃), 32.4 (NCH₂CH₂), 41.8 (NCH₂CH₂), 54.9 (OCH₃), 55.7 (OCH₂OCH₃), 59.1 (CH), 94.3 (OCH₂OCH₃), 113.8, 117.0, 118.8, 123.0, 125.1, 127.7, 129.5, 130.1, 138.5, 146.0, 150.0, 152.9, 157.8, 165.0 (C=O)

C₂₈H₂₇ClN₂O₆ [522.98]

HPLC 25 Minuten Laufzeit, Gradientenelution (50 % Acetonitril in H₂O bis 100 % Acetonitril in 20 Minuten), Flussrate: 1.0 mL/min, Retentionszeit: 5.925 min (98.4 % AUC)

4-(5-Chlor-2-(methoxymethoxy)-4-methylbenzoyl)-5-(4-((diethylamino)methyl)phenyl)-3-hydroxy-1-(4-methoxyphenethyl)-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on **17**



Hergestellt aus 493 mg **8** (1.5 mmol, 1.0 eq), 287 mg 4-((Diethylamino)methyl)benzaldehyd (**XXIII**, 1.5 mmol, 1.0 eq) und 227 mg 2-(4-Methoxyphenyl)ethylamin (1.5 mmol, 1.0 eq) nach **AAV 2**.

Ausbeute 69 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 191 °C (Zersetzung)

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 1.21 (s, 6H, CH₂N(CH₂CH₃)₂), 2.20 (s, 3H, PhCH₃), 2.40-2.46 (m, 1H, NCH₂CH₂), 2.63-2.71 (m, 2H, NCH₂CH₂), 2.98 (br s, 4H, CH₂N(CH₂CH₃)₂), 3.15 (s, 3H, OCH₂OCH₃), 3.57-3.60 (m, 1H, NCH₂CH₂), 3.70 (s, 3H, OCH₃), 4.05 (d, *J* = 12.7 Hz, 1H, OCH₂OCH₃), 4.21 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H, OCH₂OCH₃), 4.85 (s, 1H, CH₂N(CH₂CH₃)₂), 4.92 (s, 1H, CH₂N(CH₂CH₃)₂), 5.13 (s, 1H, CH), 6.79-6.80 (m, 3H, H_{Ar}), 6.94-6.97 (m, 3H, H_{Ar}), 7.28-7.36 (m, 4H, H_{Ar}), 11.42 (s, 1H, OH)

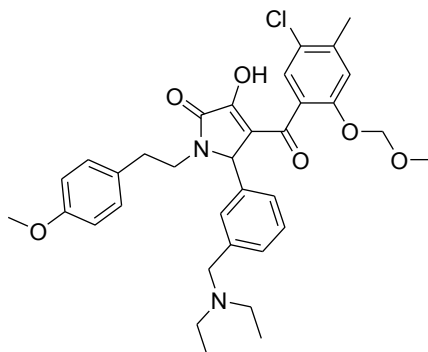
¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 7.8 (CH₂N(CH₂CH₃)₂), 19.6 (PhCH₃), 32.4 (NCH₂CH₂), 41.6 (NCH₂CH₂), 45.3 (CH₂N(CH₂CH₃)₂), 54.8 (OCH₃), 55.3 (OCH₂OCH₃), 59.4 (CH), 94.3 (OCH₂OCH₃), 113.4, 113.6, 117.9, 124.8, 127.6, 127.9, 129.3, 129.6, 130.2, 130.5, 133.7, 135.1, 141.8, 152.1, 157.6, 169.1 (C=O), 182.3 (C=O)

C₃₄H₃₉ClN₂O₆ [607.14]

Berechnet [%] C = 67.26, H = 6.47, N = 4.61

Gefunden [%] C = 67.06, H = 6.52, N = 4.58

4-(5-Chlor-2-(methoxymethoxy)-4-methylbenzoyl)-5-(3-((diethylamino)methyl)phenyl)-3-hydroxy-1-(4-methoxyphenethyl)-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on **18**



Hergestellt aus 822 mg **8** (2.5 mmol, 1.0 eq), 280 mg 3-((Diethylamino)methyl)benzaldehyd (**XXIV**, 2.5 mmol, 1.0 eq) und 378 mg 2-(4-Methoxyphenyl)ethylamin (2.5 mmol, 1.0 eq) nach **AAV 2**.

Ausbeute 26 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 175 °C (Zersetzung)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 1.06-1.10 (m, 6H, CH₂N(CH₂CH₃)₂), 2.53 (s, 3H, PhCH₃), 2.62-2.99 (m, 6H, CH₂), 3.27 (s, 3H, OCH₂OCH₃), 3.70 (s, 3H, OCH₃), 3.94-4.28 (m, 2H, CH₂), 4.89-4.96 (m, 2H, OCH₂OCH₃), 5.09 (s, 1H, CH), 6.81 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 6.91-7.01 (m, 4H, H_{Ar}), 7.28-7.44 (m, 4H, H_{Ar})

Die Protonen einer CH₂-Gruppe sind von DMSO-d₆ verdeckt.

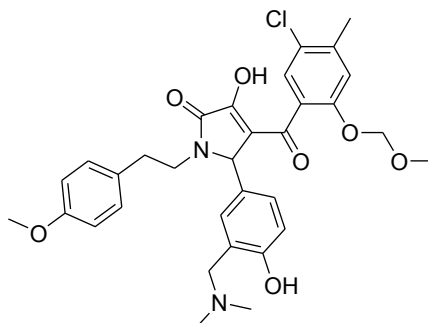
C₃₄H₃₉ClN₂O₆ [607.14]

Berechnet [%] C = 67.26, H = 6.47, N = 4.61

Gefunden [%] C = 67.00, H = 6.59, N = 4.72

Aufgrund mangelnder Substanzmenge konnte kein ¹³C-NMR der Verbindung **18** aufgenommen werden.

4-(5-Chlor-2-(methoxymethoxy)-4-methylbenzoyl)-5-(3-((dimethylamino)methyl)-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1-(4-methoxyphenethyl)-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on **19**



Hergestellt aus 822 mg **8** (2.5 mmol, 1.0 eq), 448 mg 3-((Dimethylamino)methyl)-4-hydroxybenzaldehyd (**XXV**, 2.5 mmol, 1.0 eq) und 378 mg 2-(4-Methoxyphenyl)ethylamin (2.5 mmol, 1.0 eq) nach **AAV 2**.

Ausbeute 76 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 176 °C (Zersetzung)

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.25 (s, 3H, PhCH₃), 2.43-2.48 (m, 1H, NCH₂CH₂), 2.55 (s, 6H, CH₂N(CH₃)₂), 2.67-2.74 (m, 2H, NCH₂CH₂), 3.28 (s, 3H, OCH₂OCH₃), 3.63-3.68 (m, 1H, NCH₂CH₂), 3.69 (s, 3H, OCH₃), 4.02-4.07 (m, 2H, CH₂N(CH₃)₂), 4.97-5.00 (m, 3H, CH, OCH₂OCH₃), 6.79-6.81 (m, 3H, H_{Ar}), 6.91 (s, 1H, H_{Ar}), 6.97 (s, 1H, H_{Ar}), 7.00 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.09 (br s, 1H, H_{Ar}), 7.21 (s, 1H, H_{Ar}), 10.36 (br s, 2H, 2xOH)

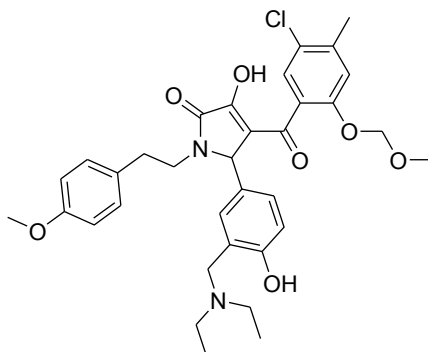
¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 19.7 (PhCH₃), 32.5 (NCH₂CH₂), 41.3, 42.1, 54.8 (OCH₃), 55.4 (OCH₂OCH₃), 59.5 (CH), 95.0 (OCH₂OCH₃), 113.6, 114.8, 117.3, 118.1, 124.9, 128.2, 129.3, 130.1, 130.7, 134.1, 135.2, 152.5, 155.6, 157.6, 168.2 (C=O), 181.6 (C=O)

C₃₂H₃₅ClN₂O₇ [595.08]

Berechnet [%] C = 64.59, H = 5.93, N = 4.71

Gefunden [%] C = 64.36, H = 5.98, N = 4.63

4-(5-Chlor-2-(methoxymethoxy)-4-methylbenzoyl)-5-(3-((diethylamino)methyl)-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1-(4-methoxyphenethyl)-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on **20**



Hergestellt aus 329 mg **8** (0.5 mmol, 1.0 eq), 352 mg 3-((Diethylamino)methyl)-4-hydroxybenzaldehyd (**XXVI**, 0.5 mmol, 1.0 eq) und 151 mg 2-(4-Methoxyphenyl)ethylamin (0.5 mmol, 1.0 eq) nach **AAV 2**.

Ausbeute 43 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 138 °C

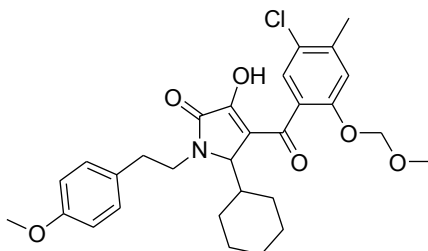
¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 1.09 (t, ³J_{HH} = 6.7 Hz, 6H, CH₂N(CH₂CH₃)₂), 2.25 (s, 3H, PhCH₃), 2.45-2.48 (m, 1H, NCH₂CH₂), 2.69-2.73 (m, 2H, NCH₂CH₂), 2.86-2.87 (m, 4H, CH₂N(CH₂CH₃)₂), 3.28 (s, 3H, OCH₂OCH₃), 3.67-3.73 (m, 4H, NCH₂CH₂ & OCH₃), 4.03-4.10 (m, 2H, OCH₂OCH₃), 4.97-5.00 (m, 3H, CH₂N(CH₂CH₃)₂ & CH), 6.78-6.82 (m, 3H, H_{Ar}), 6.93 (s, 1H, H_{Ar}), 6.97 (s, 1H, H_{Ar}), 7.00 (d, J = 8.6 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.13 (br s, 1H, H_{Ar}), 7.27 (br s, 1H, H_{Ar}), 10.23 (br s, 1H, OH)

¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 8.9 (CH₂N(CH₂CH₃)₂), 19.7 (PhCH₃), 32.5 (NCH₂CH₂), 41.2 (NCH₂CH₂), 45.9, 54.9, 55.5, 59.5, 95.0 (OCH₂OCH₃), 113.6, 114.7, 118.2, 124.9, 128.2, 129.3, 130.7, 152.6, 155.7, 157.6

C₃₄H₃₉ClN₂O₇ [623.14]

HPLC 25 Minuten Laufzeit, Gradientenelution (50 % Acetonitril in H₂O bis 100 % Acetonitril in 20 Minuten), Flussrate: 1.0 mL/min, Retentionszeit: 3.512 min (94.0 % AUC)

(4-(5-Chlor-2-(methoxymethoxy)-4-methylbenzoyl)-5-cyclohexyl-3-hydroxy-1-(4-methoxyphenethyl)-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on **21**



Hergestellt aus 822 mg **8** (2.5 mmol, 1.0 eq), 280 mg Cyclohexanaldehyd (**XXVII**, 2.5 mmol, 1.0 eq) und 378 mg 2-(4-Methoxyphenyl)ethylamin (2.5 mmol, 1.0 eq) nach **AAV 2**.

Ausbeute 49 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 177 °C

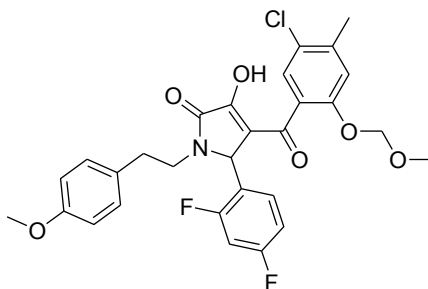
¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 0.92-1.08 (m, 2H, CH₂(Cyclohexyl)), 1.13-1.27 (m, 3H, CH₂(Cyclohexyl)), 1.47 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, CH₂(Cyclohexyl)), 1.60 (t, *J* = 11.1 Hz, 2H, CH₂(Cyclohexyl)), 1.71 (dd, *J* = 25.8, 12.2 Hz, 2H, CH₂(Cyclohexyl)), 1.92-1.96 (m, 1H, CH(Cyclohexyl)), 2.34 (s, 3H, PhCH₃), 2.74-2.78 (m, 1H, NCH₂CH₂), 2.85-2.90 (m, 1H, NCH₂CH₂), 3.30 (s, 3H, OCH₃), 3.25-3.28 (m, 1H, NCH₂CH₂), 3.71 (s, 3H, OCH₂OCH₃), 4.00-4.02 (m, 1H, NCH₂CH₂), 4.37 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, CH), 5.07 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H, OCH₂OCH₃), 5.12 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H, OCH₂OCH₃), 6.85 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.13-7.14 (m, 3H, H_{Ar}), 7.20 (s, 1H, H_{Ar}), 11.38 (s, 1H, OH)

¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 20.0 (PhCH₃), 26.1, 26.2, 26.3, 27.6, 28.1, 32.4 (NCH₂CH₂), 42.4 (NCH₂CH₂), 54.9 (OCH₃), 55.7 (OCH₂OCH₃), 60.2 (CH), 94.2 (OCH₂OCH₃), 113.7, 116.8, 119.0, 125.1, 128.2, 129.4, 130.4, 130.6, 138.8, 152.9, 153.3, 157.7, 165.0 (C=O), 186.9 (C=O)

C₂₉H₃₄ClNO₆ [528.04]

Verbindung **21** wurde als Rohprodukt umgesetzt.

4-(5-Chlor-2-(methoxymethoxy)-4-methylbenzoyl)-5-(2,4-difluorophenyl)-3-hydroxy-1-(4-methoxyphenethyl)-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on **22**



Hergestellt aus 822 mg **8** (2.5 mmol, 1.0 eq), 355 mg 3,4-Difluorbenzaldehyd (**XXVIII**, 2.5 mmol, 1.0 eq) und 378 mg 2-(4-Methoxyphenyl)ethylamin (2.5 mmol, 1.0 eq) nach **AAV 2**.

Ausbeute 58 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 174 °C (Zersetzung)

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.31 (s, 3H, PhCH₃), 2.59-2.64 (m, 1H, NCH₂CH₂), 2.74-2.79 (m, 1H, NCH₂CH₂), 2.82-2.87 (m, 1H, NCH₂CH₂), 3.27 (s, 3H, OCH₂OCH₃), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 3.75-3.80 (m, 1H, NCH₂CH₂), 5.07 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H, OCH₂OCH₃), 5.11 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H, OCH₂OCH₃), 5.49 (s, 1H, CH), 6.82 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.03 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.07-7.12 (m, 3H, H_{Ar}), 7.25-7.28 (m, 2H, H_{Ar})

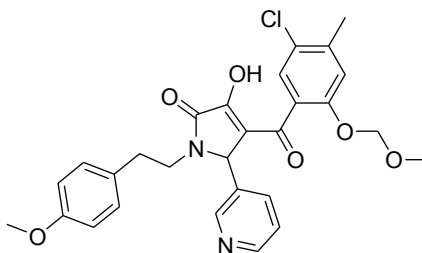
¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 19.9 (PhCH₃), 32.4 (NCH₂CH₂), 41.8 (NCH₂CH₂), 54.9 (OCH₃), 55.7 (OCH₂OCH₃), 94.3 (OCH₂OCH₃), 104.1, 111.9, 113.8, 117.0, 118.6, 119.5, 125.1, 127.7, 129.3, 130.0, 130.2, 138.5, 152.9, 154.1, 157.8, 161.1 (dd, ¹*J*_{CF} = 250.7 Hz, ³*J*_{CF} = 12.2 Hz), 162.0 (dd, ¹*J*_{CF} = 245.4 Hz, ³*J*_{CF} = 9.9 Hz), 164.9 (C=O), 186.2 (C=O)

C₂₉H₂₆ClF₂NO₆ [557.97]

Berechnet [%] C = 62.42, H = 4.70, N = 2.51

Gefunden [%] C = 62.28, H = 4.57, N = 2.49

4-(5-Chlor-2-(methoxymethoxy)-4-methylbenzoyl)-3-hydroxy-1-(4-methoxyphenethyl)-5-(pyridin-3-yl)-1H-pyrrol-2(5H)-on **23**



Hergestellt aus 822 mg **8** (2.5 mmol, 1.0 eq), 214 mg Nicotinaldehyd (**XXIX**, 2.5 mmol, 1.0 eq) und 378 mg 2-(4-Methoxyphenyl)ethylamin (2.5 mmol, 1.0 eq) nach **AAV 2**.

Ausbeute 87 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 164 °C (Zersetzung)

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.31 (s, 3H, PhCH₃), 2.59-2.65 (m, 1H, NCH₂CH₂), 2.74-2.82 (m, 2H, NCH₂CH₂), 3.25 (s, 3H, OCH₂OCH₃), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 3.75-3.81 (m, 1H, NCH₂CH₂), 5.09 (dd, *J* = 21.7, 6.7 Hz, 2H, OCH₂OCH₃), 5.33 (s, 1H, CH), 6.83 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.05 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.09 (s, 1H, H_{Ar}), 7.13 (s, 1H, H_{Ar}), 7.39 (dd, *J* = 7.9, 4.8 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.60-7.63 (m, 1H, H_{Ar}), 8.52 (dd, *J* = 4.7, 1.3 Hz, 1H, H_{Ar}), 8.55 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H_{Ar})

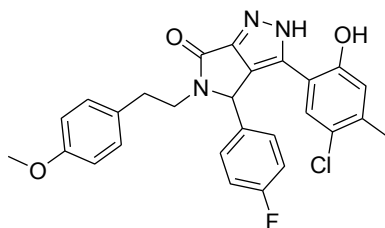
¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 19.9 (PhCH₃), 32.5 (NCH₂CH₂), 41.7 (NCH₂CH₂), 54.9 (OCH₃), 55.8 (OCH₂OCH₃), 57.9 (CH), 94.4 (OCH₂OCH₃), 113.8, 117.0, 119.1, 123.7, 125.2, 127.8, 129.5, 130.2, 132.3, 135.0, 138.6, 149.3, 149.6, 153.0, 157.8, 164.9 (C=O), 185.9 (C=O)

C₂₈H₂₇ClN₂O₆ [522.98]

Berechnet [%] C = 64.30, H = 5.20, N = 5.36

Gefunden [%] C = 64.38, H = 5.07, N = 5.46

3-(5-Chlor-2-hydroxy-4-methylphenyl)-4-(4-fluorophenyl)-5-(4-methoxyphenethyl)-4,5-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-6(2*H*)-on **24**



Hergestellt aus 270 mg **11** (0.5 mmol, 1.0 eq) und 37 μ L Hydrazin-Monohydrat (38 mg, 0.75 mmol, 1.5 eq) und katalytischen Mengen H_2SO_4 nach **AAV 5**.

Ausbeute 74 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt > 250 °C

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO-d_6), δ (ppm): 2.18 (s, 3H, PhCH_3), 2.55-2.60 (m, 1H, NCH_2CH_2), 2.77-2.83 (m, 2H, NCH_2CH_2), 3.70 (s, 3H, OCH_3), 3.78-3.82 (m, 1H, NCH_2CH_2), 5.72 (s, 0.8H, CH), 5.83 (br s, 0.2H, CH), 6.82-6.83 (m, 3H, H_{Ar}), 7.05 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H_{Ar}), 7.13-7.19 (m, 5H, H_{Ar}), 10.41 (br s, 0.2H, OH), 10.56 (s, 0.8H, OH), 13.47 (s, 0.8H, NH), 14.22 (br s, 0.2H, NH)

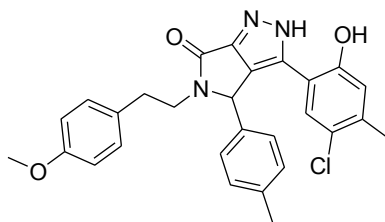
$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO-d_6), δ (ppm): 19.4 (PhCH_3), 32.9 (NCH_2CH_2), 41.7 (NCH_2CH_2), 54.9 (OCH_3), 58.9 (CH), 113.8, 114.3, 115.6 (d, $^2J_{\text{CF}} = 21.7$ Hz), 118.2, 123.0, 126.1, 127.7, 129.4, 129.9 (d, $J = 6.2$ Hz), 130.6, 132.7, 133.3 (d, $^4J_{\text{CF}} = 3.4$ Hz), 136.6, 149.8, 152.7, 157.7, 161.7 (d, $^1J_{\text{CF}} = 245.7$ Hz), 161.8 (C=O)

$\text{C}_{27}\text{H}_{23}\text{ClFN}_3\text{O}_3$ [491.94]

Berechnet [%] C = 65.92, H = 4.71, N = 8.54

Gefunden [%] C = 65.77, H = 4.70, N = 8.41

3-(5-Chlor-2-hydroxy-4-methylphenyl)-5-(4-methoxyphenethyl)-4-*p*-tolyl-4,5-dihydropyrrolo[3,4-*c*]pyrazol-6(2*H*)-on **25**



Hergestellt aus 107 mg **12** (107 mg, 0.2 mmol, 1.0 eq) und 15 μ L Hydrazin-Monohydrat (15 mg, 0.3 mmol, 1.5 eq) und katalytischen Mengen H_2SO_4 nach **AAV 5**.

Ausbeute 54 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 246 °C

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO-d_6), δ (ppm): 2.19 (s, 3H, PhCH_3), 2.25 (s, 3H, PhCH_3), 2.56-2.61 (m, 1H, NCH_2CH_2), 2.75-2.82 (m, 2H, NCH_2CH_2), 3.71 (s, 3H, OCH_3), 3.79-3.84 (m, 1H, NCH_2CH_2), 5.67 (s, 1H, CH), 6.82-6.84 (m, 3H, H_{Ar}), 7.04-7.07 (m, 4H, H_{Ar}), 7.13 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, H_{Ar}), 7.18 (s, 1H, H_{Ar}), 10.57 (br s, 0.7H, OH), 13.41 (br s, 0.7H, NH)

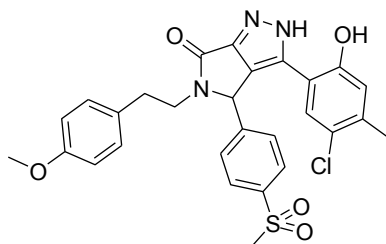
$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO-d_6), δ (ppm): 19.4 (PhCH_3), 20.6 (PhCH_3), 32.9 (NCH_2CH_2), 41.6 (NCH_2CH_2), 54.9 (OCH_3), 59.3 (CH), 113.7, 118.2, 122.9, 127.6, 127.7, 129.3, 129.4, 130.6, 136.4, 137.6, 157.7

$\text{C}_{28}\text{H}_{26}\text{ClN}_3\text{O}_3$ [487.98]

Berechnet [%] C = 68.92, H = 5.37, N = 8.61

Gefunden [%] C = 68.82, H = 5.52, N = 8.31

3-(5-Chlor-2-hydroxy-4-methylphenyl)-5-(4-methoxyphenethyl)-4-(4-(methylsulfonyl)phenyl)-4,5-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-6(2*H*)-on **26**



Hergestellt aus 300 mg **13** (0.5 mmol, 1.0 eq) und 37 µL Hydrazin-Monohydrat (38 mg, 0.75 mmol, 1.5 eq) und katalytischen Mengen H₂SO₄ nach **AAV 5**.

Ausbeute 37 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 249 °C (Zersetzung)

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.18 (s, 3H, PhCH₃), 2.58-2.63 (m, 1H, NCH₂CH₂), 2.75-2.84 (m, 2H, NCH₂CH₂), 3.19 (s, 3H, SO₂CH₃), 3.70 (s, 3H, OCH₃), 3.81-3.87 (m, 1H, NCH₂CH₂), 5.83 (s, 1H, CH), 6.82-6.84 (m, 3H, H_{Ar}), 7.05-7.07 (m, 2H, H_{Ar}), 7.25 (s, 1H, H_{Ar}), 7.41 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.86 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 10.52 (br s, 1H, OH), 13.56 (br s, 1H, NH)

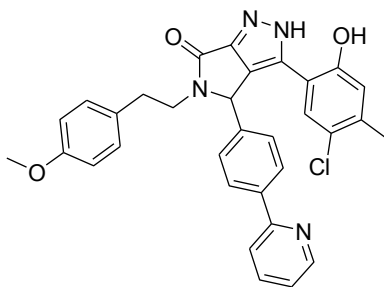
¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 19.4 (PhCH₃), 32.8 (NCH₂CH₂), 41.9 (NCH₂CH₂), 43.2 (SO₂CH₃), 54.9 (OCH₃), 59.2 (CH), 113.8, 118.3, 123.1, 127.4, 127.5, 128.7, 129.4, 130.5, 136.8, 140.5, 143.1, 152.8, 157.7

C₂₈H₂₆ClN₃O₅S [552.04]

Berechnet [%] C = 60.92, H = 4.75, N = 7.61, S = 5.81

Gefunden [%] C = 60.66, H = 4.65, N = 7.45, S = 5.76

3-(5-Chlor-2-hydroxy-4-methylphenyl)-5-(4-methoxyphenethyl)-4-(4-(pyridin-2-yl)phenyl)-4,5-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-6(2H)-on **27**



Hergestellt aus 140 mg **14** (0.25 mmol, 1.0 eq) und 18 µL Hydrazin-Monohydrat (19 mg, 0.375 mmol, 1.5 eq) und katalytischen Mengen H₂SO₄ nach **AAV 5**.

Ausbeute 58 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 240 °C (Zersetzung)

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.16 (s, 3H, PhCH₃), 2.60-2.65 (m, 1H, NCH₂CH₂), 2.80-2.87 (m, 2H, NCH₂CH₂), 3.96 (s, 3H, OCH₃), 3.81-3.87 (m, 1H, NCH₂CH₂), 5.78 (s, 1H, CH), 6.81-6.83 (m, 3H, H_{Ar}), 7.07 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.24 (s, 1H, H_{Ar}), 7.27 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.32-7.34 (m, 1H, H_{Ar}), 7.84-7.86 (m, 1H, H_{Ar}), 7.92 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, H_{Ar}), 8.03 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H_{Ar}), 8.63 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H, H_{Ar}), 10.56 (br s, 1H, OH), 13.47 (br s, 1H, NH)

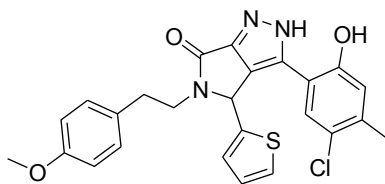
¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 19.4 (PhCH₃), 32.9 (NCH₂CH₂), 41.8 (NCH₂CH₂), 54.9 (OCH₃), 59.4 (CH), 113.8, 118.2, 120.2, 120.7, 123.0, 126.8, 127.7, 128.2, 129.4, 130.6, 136.5, 137.2, 138.5, 149.4, 152.9, 155.2, 157.7

C₃₂H₂₇ClN₄O₃ [551.03]

Berechnet [%] C = 69.75, H = 4.94, N = 10.17

Gefunden [%] C = 69.78, H = 4.96, N = 9.87

3-(5-Chlor-2-hydroxy-4-methylphenyl)-5-(4-methoxyphenethyl)-4-(thien-2-yl)-4,5-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-6(2H)-on **28**



Hergestellt aus 528 mg **15** (528 mg, 1.0 mmol, 1.0 eq) und 73 µL Hydrazin-Monohydrat (75 mg, 1.5 mmol, 1.5 eq) und katalytischen Mengen H₂SO₄ nach **AAV 5**.

Ausbeute 58 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 211 °C (Zersetzung)

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.20-2.21 (m, 3H, PhCH₃), 2.54-2.65 (m, 1H, NCH₂CH₂), 2.81-2.86 (m, 1H, NCH₂CH₂), 2.97-3.02 (m, 1H, NCH₂CH₂), 3.33-3.35 (m, 3H, OCH₃), 3.79-3.85 (m, 1H, NCH₂CH₂), 6.08 (s, 1H, CH), 6.83-6.86 (m, 3H, H_{Ar}), 7.02 (br s, 1H, H_{Ar}), 7.08-7.11 (m, 2H, H_{Ar}), 7.24-7.34 (m, 2H, H_{Ar}), 7.46 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H, H_{Ar}), 10.45 (br s, 0.2H, OH), 10.62 (s, 0.8H, OH), 13.95 (s, 0.8H, NH), 14.24 (br s, 0.2H, NH)

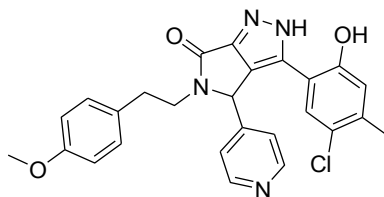
¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 19.4 (PhCH₃), 32.9 (NCH₂CH₂), 41.7 (NCH₂CH₂), 54.9 (OCH₃), 55.0 (CH), 113.8, 114.2, 118.2, 123.0, 125.8, 126.8, 126.9, 127.7, 128.1, 129.4, 130.6, 133.1, 136.6, 140.7, 149.4, 152.9, 157.7, 161.1 (C=O)

C₂₅H₂₂ClN₃O₃S [479.98]

Berechnet [%] C = 62.56, H = 4.62, N = 8.75, S = 6.68

Gefunden [%] C = 62.78, H = 4.68, N = 8.55, S = 6.38

3-(5-Chlor-2-hydroxy-4-methylphenyl)-5-(4-methoxyphenethyl)-4-(pyridin-4-yl)-4,5-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-6(2*H*)-on **29**



Hergestellt aus 685 mg **16** (1.31 mmol, 1.0 eq) und 96 µL Hydrazin-Monohydrat (99 mg, 1.97 mmol, 1.5 eq) und katalytischen Mengen H₂SO₄ nach **AAV 5**.

Ausbeute 66 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 190 °C

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.19 (s, 3H, PhCH₃), 2.59-2.64 (m, 1H, NCH₂CH₂), 2.79-2.84 (m, 2H, NCH₂CH₂), 3.70 (s, 3H, OCH₃), 3.82-3.90 (m, 1H, NCH₂CH₂), 5.72 (s, 1H, CH), 6.82-6.83 (m, 3H, H_{Ar}), 7.06 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.17 (s, 2H, H_{Ar}), 7.31 (s, 1H, H_{Ar}), 8.50 (d, *J* = 3.7 Hz, 2H, H_{Ar}), 10.28 (br s, 0.1H, OH), 10.52 (s, 0.9H, OH), 13.60 (s, 0.9H, NH), 14.20 (br s, 0.1H, NH)

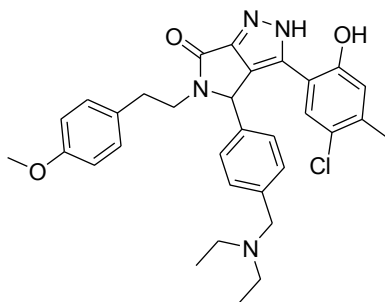
¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 19.4 (PhCH₃), 32.8 (NCH₂CH₂), 42.0 (NCH₂CH₂), 54.9 (OCH₃), 58.8 (CH), 113.8, 114.0, 118.2, 122.9, 123.1, 125.3, 127.5, 129.4, 130.4, 132.8, 136.9, 146.7, 149.8, 152.7, 157.7, 161.9, 166.8 (C=O)

C₂₆H₂₃ClFN₄O₃ [474.94]

Berechnet [%] C = 63.08, H = 4.79, N = 10.51

Gefunden [%] C = 62.95, H = 4.81, N = 10.26

3-(5-Chlor-2-hydroxy-4-methylphenyl)-4-(4-((diethylamino)methyl)phenyl)-5-(4-methoxyphenethyl)-4,5-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-6(2H)-on **30**



Hergestellt aus 304 mg **17** (0.5 mmol, 1.0 eq) und 37 μ L Hydrazin-Monohydrat (38 mg, 0.75 mmol, 1.5 eq) und katalytischen Mengen H_2SO_4 nach **AAV 5**.

Ausbeute 73 %, beige Kristalle

Schmelzpunkt 194 °C (Zersetzung)

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO-d_6), δ (ppm): 0.91 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.1$ Hz, 6H, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 2.16 (s, 3H, PhCH_3), 2.41 (q, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 2.52-2.54 (m, 1H, NCH_2CH_2), 2.67-2.80 (m, 1H, NCH_2CH_2), 2.85 (ddd, $J = 13.9, 8.0, 5.3$ Hz, 1H, NCH_2CH_2), 3.50 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 3.69 (s, 3H, OCH_3), 3.74-3.79 (m, 1H, NCH_2CH_2), 5.69 (s, 1H, CH), 6.81-6.82 (m, 3H, H_{Ar}), 7.03 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H_{Ar}), 7.07 (s, 1H, H_{Ar}), 7.13 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, H_{Ar}), 7.27 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, H_{Ar})

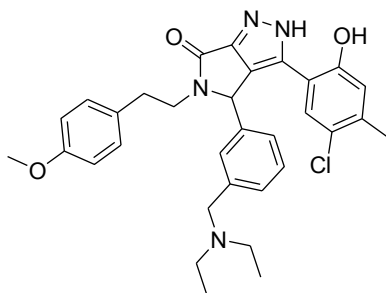
$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO-d_6), δ (ppm): 11.4 ($\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 19.4 (PhCH_3), 33.0 (NCH_2CH_2), 41.9 (NCH_2CH_2), 46.0 ($\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 54.8 (OCH_3), 56.7 (OCH_2OCH_3), 59.6 (CH), 113.7, 114.7, 118.2, 122.8, 126.1, 127.7, 127.9, 128.5, 128.6, 129.4, 130.6, 136.3, 136.5, 140.4, 153.2, 157.7, 161.1

$\text{C}_{32}\text{H}_{35}\text{ClN}_4\text{O}_3$ [559.10]

Berechnet [%] C = 68.74, H = 6.31, N = 10.02

Gefunden [%] C = 68.75, H = 6.46, N = 9.72

3-(5-Chlor-2-hydroxy-4-methylphenyl)-4-(3-((diethylamino)methyl)phenyl)-5-(4-methoxyphenethyl)-4,5-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-6(2H)-on **31**



Hergestellt aus 607 mg **18** (1.0 mmol, 1.0 eq) und 73 μ L Hydrazin-Monohydrat (75 mg, 1.5 mmol, 1.5 eq) und katalytischen Mengen H_2SO_4 nach **AAV 5**.

Ausbeute 57 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 151 °C

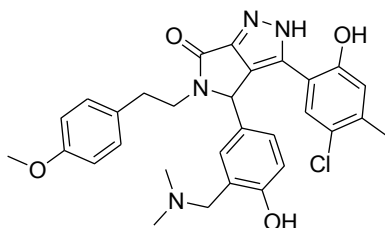
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO-d_6), δ (ppm): 0.86 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.1$ Hz, 6H, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 2.17 (s, 3H, PhCH_3), 2.31-2.36 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 2.52-2.57 (m, 1H, NCH_2CH_2), 2.76-2.86 (m, 2H, NCH_2CH_2), 3.41 (d, $^2J_{\text{HH}} = 13.9$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 3.50 (d, $^2J_{\text{HH}} = 13.6$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 3.70 (s, 3H, OCH_3), 3.75-3.82 (m, 1H, NCH_2CH_2), 5.71 (s, 1H, CH), 6.81-6.83 (m, 3H, H_{Ar}), 7.03 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H_{Ar}), 7.09 (s, 1H, H_{Ar}), 7.12 (s, 1H, H_{Ar}), 7.17-7.28 (m, 3H, H_{Ar})

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO-d_6), δ (ppm): 11.4 ($\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 19.4 (PhCH_3), 33.0 (NCH_2CH_2), 41.9 (NCH_2CH_2), 46.0 ($\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 54.8 (OCH_3), 56.7 (CH), 59.6 ($\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 113.7, 114.7, 118.2, 122.8, 126.1, 127.8, 127.9, 128.5, 128.6, 129.4, 130.6, 136.3, 136.5, 140.4, 153.2, 157.7, 161.1 (C=O)

$\text{C}_{32}\text{H}_{35}\text{ClN}_4\text{O}_3$ [559.10]

HPLC 25 Minuten Laufzeit, Gradientenelution (75 % Acetonitril in H_2O bis 100 % Acetonitril in 20 Minuten), Flussrate: 1.0 mL/min, Retentionszeit: 1.949 min (98.5 % AUC)

3-(5-Chlor-2-hydroxy-4-methylphenyl)-4-(3-((dimethylamino)methyl)-4-hydroxyphenyl)-5-(4-methoxyphenethyl)-4,5-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-6(2H)-on **32**



Hergestellt aus 595 mg **19** (1.0 mmol, 1.0 eq) und 73 μ L Hydrazin-Monohydrat (75 mg, 1.5 mmol, 1.5 eq) und katalytischen Mengen H_2SO_4 nach **AAV 5**.

Ausbeute 72 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 241 °C (Zersetzung)

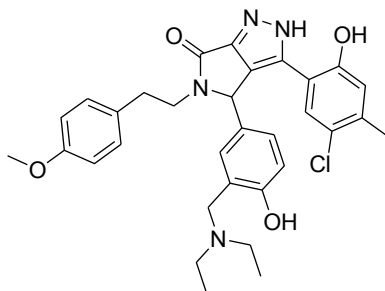
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO-d_6), δ (ppm): 2.15 (s, 6H, NCH_3), 2.17 (s, 3H, PhCH_3), 2.52-2.56 (m, 1H, NCH_2CH_2), 2.77 (ddd, $J = 13.9, 8.6, 5.7$ Hz, 1H, NCH_2CH_2), 2.84 (ddd, $J = 14.0, 8.6, 5.7$ Hz, 1H, NCH_2CH_2), 3.45 (d, $^2J_{\text{HH}} = 14.0$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 3.51 (d, $^2J_{\text{HH}} = 13.9$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 3.70 (s, 3H, OCH_3), 3.73-3.78 (m, 1H, NCH_2CH_2), 5.61 (s, 1H, CH), 6.68 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H_{Ar}), 6.81-6.84 (m, 3H, H_{Ar}), 6.88 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H_{Ar}), 6.39 (s, 1H, H_{Ar}), 7.04 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H_{Ar}), 7.08 (s, 1H, H_{Ar})

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO-d_6), δ (ppm): 19.4 (PhCH_3), 33.0 (NCH_2CH_2), 41.7 (NCH_2CH_2), 44.1 ($\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 54.9 (OCH_3), 59.2, 59.7, 113.7, 114.7, 115.6, 118.2, 122.8, 123.1, 127.6, 127.8, 128.7, 129.4, 130.7, 136.2, 153.0, 156.9, 157.7

$\text{C}_{30}\text{H}_{31}\text{ClN}_4\text{O}_4$ [547.04]

HPLC 25 Minuten Laufzeit, Gradientenelution (25 % Acetonitril in H_2O bis 100 % Acetonitril in 20 Minuten), Flussrate: 1.0 mL/min, Retentionszeit: 6.048 min (99.5 % AUC)

3-(5-Chlor-2-hydroxy-4-methylphenyl)-4-(3-((diethylamino)methyl)-4-hydroxyphenyl)-5-(4-methoxyphenethyl)-4,5-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-6(2H)-on **33**



Hergestellt aus 218 mg **20** (0.35 mmol, 1.0 eq) und 25 µL Hydrazin-Monohydrat (26 mg, 0.525 mmol, 1.5 eq) und katalytischen Mengen H₂SO₄ nach **AAV 5**.

Ausbeute 86 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 215 °C (Zersetzung)

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 0.94 (t, ³J_{HH} = 7.0 Hz, 6H, CH₂N(CH₂CH₃)₂), 2.18 (s, 3H, PhCH₃), 2.43-2.48 (m, 4H, CH₂N(CH₂CH₃)₂), 2.52-2.59 (m, 1H, NCH₂CH₂), 2.76-2.80 (m, 1H, NCH₂CH₂), 2.83-2.88 (m, 1H, NCH₂CH₂), 3.59-3.70 (m, 5H, OCH₃, CH₂N(CH₂CH₃)₂), 3.73-3.80 (m, 1H, NCH₂CH₂), 5.60 (s, 1H, CH), 6.64 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.82-6.83 (m, 3H, H_{Ar}), 6.88-6.90 (m, 2H, H_{Ar}), 7.03-7.06 (m, 3H, H_{Ar})

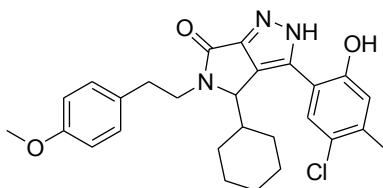
¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 10.9 (CH₂NCH₂(CH₃)₂), 19.4 (PhCH₃), 33.0 (NCH₂CH₂), 41.7 (NCH₂CH₂), 45.8 (CH₂N(CH₂CH₃)₂), 54.8, 54.9, 59.2, 113.66, 113.72, 114.7, 115.7, 118.2, 122.8, 123.1, 126.1, 127.5, 127.9, 128.3, 129.4, 130.7, 136.2, 153.1, 157.5, 157.7

C₃₂H₃₅ClN₄O₄ [575.10]

Berechnet [%] C = 66.83, H = 6.13, N = 9.74

Gefunden [%] C = 66.59, H = 6.07, N = 9.50

3-(5-Chlor-2-hydroxy-4-methylphenyl)-4-cyclohexyl-5-(4-methoxyphenethyl)-4,5-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-6(2*H*)-on **34**



Hergestellt aus 528 mg **21** (1.0 mmol, 1.0 eq) und 73 µL Hydrazin-Monohydrat (75 mg, 1.5 mmol, 1.5 eq) und katalytischen Mengen H₂SO₄ nach **AAV 5**.

Ausbeute 46 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 109 °C

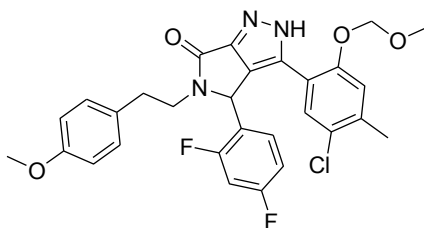
¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 0.32 (dd, *J* = 23.1, 11.3 Hz, 1H, CH₂(Cyclohexyl)), 0.64-0.74 (m, 2H, CH₂(Cyclohexyl)), 1.02-1.22 (m, 3H, CH₂(Cyclohexyl)), 1.45-1.51 (m, 3H, CH₂(Cyclohexyl)), 1.58 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H, CH₂(Cyclohexyl)), 1.90 (dt, *J* = 11.7, 2.4 Hz, 1H, CH(Cyclohexyl)), 2.82 (s, 3H, PhCH₃), 2.74-2.79 (m, 1H, NCH₂CH₂), 2.89 (ddd, *J* = 13.9, 8.6 5.6 Hz, 1H, NCH₂CH₂), 3.22-3.26 (m, 1H, NCH₂CH₂), 3.71 (s, 3H, OCH₂OCH₃), 3.95-4.00 (m, 1H, NCH₂CH₂), 4.58 (s, 1H, CH), 6.83-6.86 (m, 2H), 6.91 (s, 1H), 7.17-7.18 (m, 2H), 7.45 (s, 1H), 10.06 (br s, 0.1H, OH), 10.25 (s, 0.9H, OH), 13.42 (s, 0.9H, NH), 13.78 (br s, 0.1H, NH)

¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 19.6 (PhCH₃), 25.2, 25.4, 25.88, 25.93, 28.9, 32.9 (NCH₂CH₂), 38.8, 41.7 (NCH₂CH₂), 54.9 (OCH₃), 60.5 (CH), 113.7, 116.0, 118.2, 122.8, 124.4, 128.7, 129.5, 130.8, 132.6, 136.8, 150.8, 153.3, 157.7, 162.5

C₂₇H₃₀ClN₃O₃ [480.00]

HPLC 25 Minuten Laufzeit, isokratische Elution (100 % Acetonitril),
Flussrate: 1.0 mL/min, Retentionszeit: 4.355 min (97.3 % AUC)

3-(5-Chlor-2-(methoxymethoxy)-4-methylphenyl)-4-(2,4-difluorophenyl)-5-(4-methoxyphenethyl)-4,5-dihydropyrrolo[3,4-*c*]pyrazol-6(2*H*)-on **35**



Hergestellt aus 1.39 g **22** (2.5 mmol, 1.0 eq) und 0.18 mL Hydrazin-Monohydrat (188 mg, 3.75 mmol, 1.5 eq) nach **AAV 3**.

Ausbeute 55 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 200 °C

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 2.26 (s, 3H, PhCH₃), 2.59-2.65 (m, 1H, NCH₂CH₂), 2.81-2.90 (m, 2H, NCH₂CH₂), 3.72 (s, 3H, OCH₂OCH₃), 3.70 (s, 3H, OCH₃), 3.80-3.85 (m, 1H, NCH₂CH₂), 5.18 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H, OCH₂OCH₃), 5.28 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H, OCH₂OCH₃), 5.65 (br s, 0.1H, CH), 5.84 (s, 0.9H, CH), 6.83 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.01 (dd, *J*₁ = *J*₂ = 7.8 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.06 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.12 (br s, 1H, H_{Ar}), 7.16 (s, 1H, H_{Ar}), 7.23 (dd, *J*₁ = *J*₂ = 9.2 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.32 (s, 1H, H_{Ar}), 13.68 (s, 0.9H, NH), (br s, 0.1H, NH)

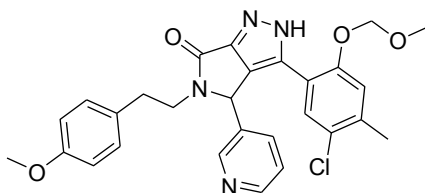
¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 19.7 (PhCH₃), 32.8 (NCH₂CH₂), 42.0 (NCH₂CH₂), 53.7 (CH), 54.8 (OCH₃), 55.7 (OCH₂OCH₃), 94.2 (OCH₂OCH₃), 104.3 (dd, *J*₁ = *J*₂ = 26.8 Hz), 112.2 (dd, *J* = 20.4, 2.6 Hz), 113.8, 116.7, 117.7, 119.8 (dd, *J* = 10.4, 2.6 Hz), 125.4, 125.8, 127.9, 129.4, 130.4, 131.2, 131.8, 137.1, 150.3, 151.6, 157.7, 160.7 (dd, *J* = 249.3, 12.1 Hz), 161.7 (C=O), 162.1 (dd, *J* = 247.6, 12.6 Hz)

C₂₉H₂₆ClF₂N₃O₄ [553.98]

Berechnet [%] C = 62.87, H = 4.73, N = 7.59

Gefunden [%] C = 62.67, H = 4.75, N = 7.42

3-(5-Chlor-2-(methoxymethoxy)-4-methylphenyl)-5-(4-methoxyphenethyl)-4-(pyridin-3-yl)-4,5-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-6(2H)-on **36**



Hergestellt aus 1.05 g **23** (2.0 mmol, 1.0 eq) und 0.15 mL Hydrazin-Monohydrat (150 mg, 3.0 mmol, 1.5 eq) nach **AAV 3**.

Ausbeute 45 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 193 °C

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.24 (s, 3H, PhCH₃), 2.60-2.64 (m, 1H, NCH₂CH₂), 2.81-2.85 (m, 2H, NCH₂CH₂), 3.26 (s, 3H, OCH₂OCH₃), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 3.80-3.89 (m, 1H, NCH₂CH₂), 5.23-5.26 (m, 2H, OCH₂OCH₃), 5.68 (s, 1H, CH), 6.85 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.09 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.14 (s, 1H, H_{Ar}), 7.26-7.29 (m, 1H, H_{Ar}), 7.36-7.38 (m, 2H, H_{Ar}), 8.46 (s, 2H, H_{Ar}), 13.72 (s, 0.9H, NH), 14.06 (s, 0.1H, NH)

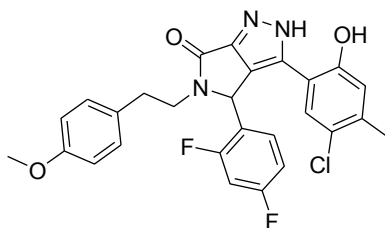
¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 19.7 (PhCH₃), 32.8 (NCH₂CH₂), 41.7 (NCH₂CH₂), 54.9 (OCH₃), 55.7 (OCH₂OCH₃), 57.3 (CH), 94.2 (OCH₂OCH₃), 113.8, 116.6, 117.6, 124.0, 125.8, 126.2, 128.0, 129.5, 130.5, 132.0, 132.5, 134.9, 137.2, 149.2, 149.7, 150.0, 151.6, 157.7, 161.6 (C=O)

C₂₈H₂₇ClN₄O₄ [518.99]

Berechnet [%] C = 64.80, H = 5.24, N = 10.80

Gefunden [%] C = 64.60, H = 5.12, N = 10.52

3-(5-Chlor-2-hydroxy-4-methylphenyl)-4-(2,4-difluorophenyl)-5-(4-methoxyphenethyl)-4,5-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-6(2H)-on **37**



Hergestellt aus 167 mg **35** (0.3 mmol, 1.0 eq) nach **AAV 4**.

Ausbeute 85 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 248 °C (Zersetzung)

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.18 (s, 3H, PhCH₃), 2.57-2.62 (m, 1H, NCH₂CH₂), 2.79-2.89 (m, 2H, NCH₂CH₂), 3.69 (s, 3H, OCH₃), 3.78-3.83 (m, 1H, NCH₂CH₂), 5.95 (s, 1H, CH), 6.81-6.83 (m, 3H, H_{Ar}), 6.99 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.04-7.11 (m, 3H, H_{Ar}), 7.25 (t, *J* = 9.4 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.29 (s, 1H, H_{Ar}), 10.29 (s, 0.2H, OH), 10.50 (s, 0.8H, OH), 13.57 (s, 0.8H, NH), 14.8 (s, 0.2H, NH)

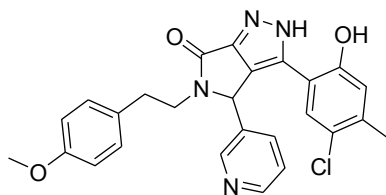
¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 19.4 (PhCH₃), 32.9 (NCH₂CH₂), 42.0 (NCH₂CH₂), 53.8 (CH), 54.9 (OCH₃), 104.2 (t, ²*J*_{CF} = 26.1 Hz), 112.2 (d, ²*J*_{CF} = 20.6 Hz), 113.8, 114.1, 118.2, 120.5, 123.0, 124.8, 127.3, 129.3, 130.4, 131.1, 132.6, 136.7, 150.4, 152.8, 157.7, 160.8 (dd, ¹*J*_{CF} = 249.8 Hz, ³*J*_{CF} = 12.7 Hz), 161.8 (C=O), 162.0 (d, ¹*J*_{CF} = 248.2 Hz, ³*J*_{CF} = 11.3 Hz)

C₂₇H₂₂ClF₂N₃O₃ [509.93]

Berechnet [%] C = 63.59, H = 4.35, N = 8.24

Gefunden [%] C = 63.54, H = 4.33, N = 8.06

3-(5-Chlor-2-hydroxy-4-methylphenyl)-5-(4-methoxyphenethyl)-4-(pyridin-3-yl)-4,5-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-6(2*H*)-on **38**



Hergestellt aus 519 mg **36** (1.0 mmol, 1.0 eq) nach **AAV 4**.

Ausbeute 43 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 249 °C (Zersetzung)

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.18 (s, 3H, PhCH₃), 2.56-2.61 (m, 1H, NCH₂CH₂), 2.78-2.85 (m, 2H, NCH₂CH₂), 3.70 (s, 3H, OCH₃), 3.80-3.87 (m, 1H, NCH₂CH₂), 5.74 (s, 1H, CH), 6.81 (s, 1H, H_{Ar}), 6.83 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.06 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.72-7.30 (m, 2H, H_{Ar}), 7.36 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, H_{Ar}), 8.47-8.48 (m, 2H, H_{Ar}), 10.29 (br s, 0.2H, OH), 10.50 (s, 0.8H, OH), 13.58 (s, 0.8H, NH), 14.17 (br s, 0.2H, NH)

¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 19.4 (PhCH₃), 32.9 (NCH₂CH₂), 41.8 (NCH₂CH₂), 54.9 (OCH₃), 57.6 (CH), 113.8, 118.2, 123.0, 123.9, 125.7, 127.4, 129.4, 130.5, 132.7, 132.9, 134.9, 136.8, 149.45, 149.53, 149.9, 152.7, 157.7, 161.8 (C=O)

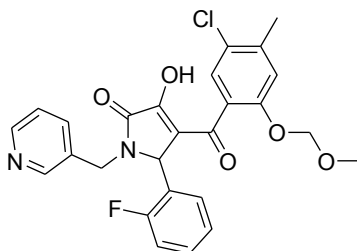
C₂₆H₂₃ClN₄O₃ [474.94]

C₂₄H₁₈ClFN₄O₂ [448.88]

HPLC 25 Minuten Laufzeit, Gradientenelution (50 % Acetonitril in H₂O bis 100 % Acetonitril in 20 Minuten), Flussrate: 1.0 mL/min, Retentionszeit: 6.147 min (95.4 % AUC)

6.5. Analytische Daten der Verbindungen aus Kapitel 3.4.5.

4-(5-Chlor-2-(methoxymethoxy)-4-methylbenzoyl)-5-(2-fluorphenyl)-3-hydroxy-1-(pyridin-3-ylmethyl)-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on **39**



Hergestellt aus 658 mg **8** (2.0 mmol, 1.0 eq), 248 mg 2-Fluorbenzaldehyd (2.0 mmol, 1.0 eq) und 216 mg 3-Picolylamin (**XXX**, 2.0 mmol, 1.0 eq) nach **AAV 2**.

Ausbeute 76 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 157 °C (Zersetzung)

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.31 (s, 3H, PhCH₃), 3.26 (s, 3H, OCH₂OCH₃), 4.04 (d, ²J_{HH} = 15.3 Hz, 1H, NCH₂), 4.75 (d, ²J_{HH} = 15.5 Hz, 1H, NCH₂), 5.08 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H, OCH₂OCH₃), 5.11 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H, OCH₂OCH₃), 5.49 (s, 1H, CH), 7.10-7.15 (m, 4H, H_{Ar}), 7.23 (br s, 1H, H_{Ar}), 7.29-7.33 (m, 2H, H_{Ar}), 7.45-7.50 (m, 1H, H_{Ar}), 8.28 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H_{Ar}), 8.44 (dd, *J* = 4.7, 1.4 Hz, 1H, H_{Ar})

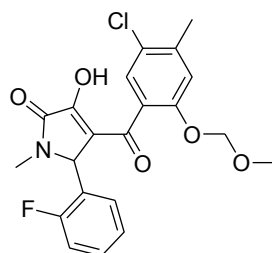
¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 19.9 (PhCH₃), 42.1 (NCH₂), 55.7 (OCH₂OCH₃), 94.4 (OCH₂OCH₃), 115.5 (d, ²J_{CF} = 21.6 Hz), 117.0, 119.0, 122.8 (d, *J* = 11.6 Hz), 123.5, 124.6, 125.1, 127.8, 130.1, 130.3 (d, ³J_{CF} = 8.3 Hz), 131.9, 135.5, 138.5, 148.4, 148.8, 152.9, 160.9 (d, ¹J_{CF} = 247.0 Hz), 165.5 (C=O)

C₂₆H₂₂ClFN₂O₅ [496.91]

Berechnet [%] C = 62.84, H = 4.46, N = 5.64

Gefunden [%] C = 62.76, H = 4.33, N = 5.60

4-(5-Chlor-2-(methoxymethoxy)-4-methylbenzoyl)-5-(2-fluorophenyl)-3-hydroxy-1-methyl-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on **40**



Hergestellt aus 986 mg **8** (3.0 mmol, 1.0 eq), 372 mg 2-Fluorbenzaldehyd (3.0 mmol, 1.0 eq) und 93 mg Methylamin (**XXXI**, 3.0 mmol, 1.0 eq) nach **AAV 2**.

Ausbeute 68 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 199 °C (Zersetzung)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.31 (s, 3H, PhCH₃), 2.71 (s, 3H, NCH₃), 3.28 (s, 3H, OCH₂OCH₃), 5.06-5.013 (m, 2H, OCH₂OCH₃), 5.55 (s, 1H, CH), 7.10-7.11 (m, 2H, H_{Ar}), 7.17-7.40 (m, 4H, H_{Ar})

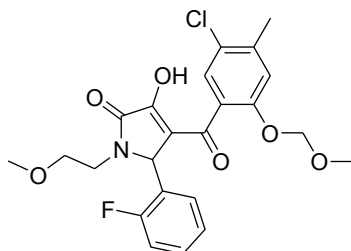
¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 19.9 (PhCH₃), 27.2 (NCH₃), 55.7 (OCH₂OCH₃), 94.4 (OCH₂OCH₃), 115.6 (d, ²J_{CF} = 21.6 Hz), 117.1, 118.2, 123.4 (d, J = 12.1 Hz), 124.6 (d, ⁴J_{CF} = 3.2 Hz), 125.1, 127.7, 129.2, 130.1 (d, ³J_{CF} = 8.5 Hz), 130.4, 138.3, 152.9, 161.0 (d, ¹J_{CF} = 247.1 Hz), 165.1 (C=O)

C₂₁H₁₉ClFNO₅ [419.83]

Berechnet [%] C = 60.08, H = 4.56, N = 3.34

Gefunden [%] C = 59.80, H = 4.55, N = 3.20

4-(5-Chlor-2-(methoxymethoxy)-4-methylbenzoyl)-5-(2-fluorophenyl)-3-hydroxy-1-(2-methoxyethyl)-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on **41**



Hergestellt aus 822 mg **8** (2.5 mmol, 1.0 eq), 310 mg 2-Fluorbenzaldehyd (2.5 mmol, 1.0 eq) und 188 mg 2-Methoxyethylamin (**XXXII**, 2.5 mmol, 1.0 eq) nach **AAV 2**.

Ausbeute 82 %, hellgelber Feststoff

Schmelzpunkt 171 °C (Zersetzung)

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.31 (s, 3H, PhCH₃), 2.76 (ddd, $J_1 = J_2 = 5.5$ Hz, $J_3 = 14.4$ Hz, 1H, NCH₂CH₂), 3.19 (s, 3H, OCH₃), 3.27 (s, 3H, OCH₂CH₃), 3.38 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H, NCH₂CH₂), 3.77 (ddd, $J_1 = J_2 = 5.5$ Hz, $J_3 = 14.4$ Hz, 1H, NCH₂CH₂), 5.08 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H, OCH₂OCH₃), 5.11 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H, OCH₂OCH₃), 5.67 (s, 1H, CH), 7.10 (s, 1H, H_{Ar}), 7.12 (s, 1H, H_{Ar}), 7.18-7.26 (m, 3H, H_{Ar}), 7.34-7.38 (m, 1H, H_{Ar})

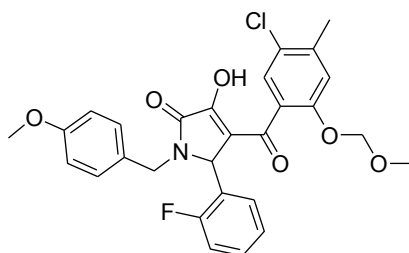
¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 19.9 (PhCH₃), 39.7 (NCH₂CH₂), 55.7 (OCH₂OCH₃), 57.8 (OCH₃), 68.9 (NCH₂CH₂), 94.3 (OCH₂OCH₃), 115.6 (d, $^2J_{CF} = 21.6$ Hz), 117.0, 119.3, 123.0 (d, $J = 12.5$ Hz), 124.5, 125.1, 127.7, 130.1 (d, $^3J_{CF} = 8.3$ Hz), 130.3, 138.5, 152.9, 153.8, 161.0 (d, $^1J_{CF} = 247.6$ Hz), 165.2 (C=O), 186.2 (C=O)

C₂₃H₂₃ClFNO₆ [463.88]

Berechnet [%] C = 59.55, H = 5.00, N = 3.02

Gefunden [%] C = 59.82, H = 4.98, N = 2.98

4-(5-Chlor-2-(methoxymethoxy)-4-methylbenzoyl)-5-(2-fluorophenyl)-3-hydroxy-1-(4-methoxybenzyl)-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on **42**



Hergestellt aus 1.18 g **8** (3.6 mmol, 1.0 eq), 447 mg 2-Fluorbenzaldehyd (3.6 mmol, 1.0 eq) und 494 mg 4-Methoxybenzylamin (**XXXIII**, 3.6 mmol, 1.0 eq) nach **AAV 2**.

Ausbeute 80 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 186 °C (Zersetzung)

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.30 (s, 3H, PhCH₃), 3.25 (s, 3H, OCH₂OCH₃), 3.64 (d, ²J_{HH} = 14.9 Hz, 1H, NCH₂), 3.73 (s, 3H, OCH₃), 4.81 (d, ²J_{HH} = 15.0 Hz, 1H, NCH₂), 5.07 (m, 2H, OCH₂OCH₃), 5.40 (br s, 1H, CH), 6.86 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.01 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.08 (s, 2H, H_{Ar}), 7.15-7.18 (m, 3H, H_{Ar}), 7.32-7.37 (m, 1H, H_{Ar})

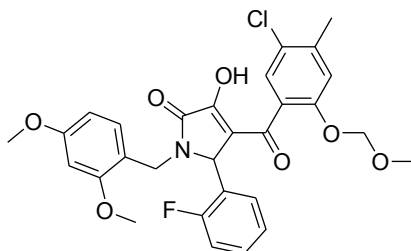
¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 19.9 (PhCH₃), 43.3 (NCH₂), 55.0 (OCH₃), 55.1 (CH), 55.7 (OCH₂OCH₃), 94.4 (OCH₂OCH₃), 113.9, 115.5 (d, ²J_{CF} = 21.4 Hz), 117.1, 124.5, 125.1, 127.7, 128.2, 129.0, 130.0 (d, ³J_{CF} = 7.1 Hz), 130.4, 138.2, 152.9, 158.5, 161.0 (d, ¹J_{CF} = 247.0 Hz)

C₂₈H₂₅ClFNO₆ [525.95]

Berechnet [%] C = 63.94, H = 4.79, N = 2.66

Gefunden [%] C = 63.90, H = 4.82, N = 2.69

4-(5-Chlor-2-(methoxymethoxy)-4-methylbenzoyl)-1-(2,4-dimethoxybenzyl)-5-(2-fluorophenyl)-3-hydroxy-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on **43**



Hergestellt aus 986 mg **8** (3.0 mmol, 1.0 eq), 372 mg 2-Fluorbenzaldehyd (3.0 mmol, 1.0 eq) und 501 mg 2,4-Dimethoxybenzoylamin (**XXXIV**, 3.0 mmol, 1.0 eq) nach **AAV 2**.

Ausbeute 74 %, hellgelber Feststoff

Schmelzpunkt 211 °C (Zersetzung)

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.30 (s, 3H, PhCH₃), 3.23 (s, 3H, OCH₂OCH₃), 3.69 (s, 3H, OCH₃), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 3.76 (d, ²J_{HH} = 15.0 Hz, 1H, NCH₂), 4.66 (d, ²J_{HH} = 14.9 Hz, 1H, NCH₂), 5.05 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H, OCH₂OCH₃), 5.07 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H, OCH₂OCH₃), 5.37 (br s, 1H, CH), 6.45 (dd, *J* = 8.3, 2.4 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.50 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.91 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.08 (s, 2H, H_{Ar}), 7.13-7.18 (m, 3H, H_{Ar}), 7.31-7.35 (m, 1H, H_{Ar})

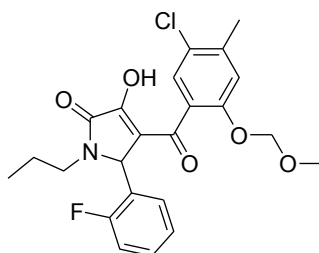
¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 19.9 (PhCH₃), 39.5 (NCH₂), 55.1 (OCH₃), 55.2 (OCH₃), 55.7 (OCH₃), 55.9 (CH), 94.3 (OCH₂OCH₃), 99.1, 104.4, 115.4 (d, ²J_{CF} = 21.8 Hz), 115.8, 117.0, 119.3, 123.0 (d, *J* = 11.0 Hz), 124.3, 125.1, 127.7, 129.9 (d, ³J_{CF} = 8.4 Hz), 130.1, 130.3, 138.5, 152.9, 153.8, 157.8, 160.2, 161.0 (d, ¹J_{CF} = 248.1 Hz), 165.1 (C=O), 186.2 (C=O)

C₂₉H₂₇ClFNO₇ [555.98]

Berechnet [%] C = 62.65, H = 4.89, N = 2.52

Gefunden [%] C = 62.76, H = 5.18, N = 2.52

4-(5-Chlor-2-(methoxymethoxy)-4-methylbenzoyl)-5-(2-fluorophenyl)-3-hydroxy-1-propyl-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on **44**



Hergestellt aus 658 mg **8** (2.0 mmol, 1.0 eq), 248 mg 2-Fluorbenzaldehyd (2.0 mmol, 1.0 eq) und 118 mg 1-Propylamin (**XXXV**, 2.0 mmol, 1.0 eq) nach **AAV 2**.

Ausbeute 36 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 189 °C (Zersetzung)

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 0.76 (t, ³J_{HH} = 7.4 Hz, 3H, NCH₂CH₂CH₃), 1.34-1.42 (m, 1H, NCH₂CH₂CH₃), 1.43-1.51 (m, 1H, NCH₂CH₂CH₃), 2.32 (s, 3H, PhCH₃), 2.64-2.68 (m, 1H, NCH₂CH₂CH₃), 3.28 (s, 3H, OCH₂OCH₃), 3.46-3.51 (m, 1H, NCH₂CH₂CH₃), 5.09 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H, OCH₂OCH₃), 5.12 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H, OCH₂OCH₃), 5.62 (s, 1H, CH), 7.11 (s, 1H, H_{Ar}), 7.13 (s, 1H, H_{Ar}), 7.19-7.28 (m, 3H, H_{Ar}), 7.35-7.38 (m, 1H, H_{Ar})

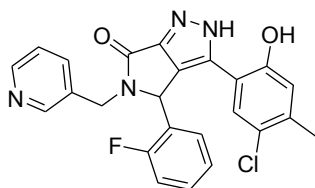
¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 11.0 (NCH₂CH₂CH₃), 19.9 (PhCH₃), 20.7 (NCH₂CH₂CH₃), 41.9 (NCH₂CH₂CH₃), 55.7 (OCH₂OCH₃), 94.3 (OCH₂OCH₃), 115.6 (d, ²J_{CF} = 21.7 Hz), 117.0, 118.8, 123.2 (d, *J* = 10.7 Hz), 124.6, 125.1, 127.7, 130.2 (d, ³J_{CF} = 8.3 Hz), 130.4, 138.5, 152.9, 154.1, 161.0 (d, ¹J_{CF} = 246.9 Hz), 165.1 (C=O), 186.2 (C=O)

C₂₃H₂₃ClFO₅ [447.88]

Berechnet [%] C = 61.68, H = 5.18, N = 3.13

Gefunden [%] C = 61.68, H = 5.09, N = 3.03

3-(5-Chlor-2-hydroxy-4-methylphenyl)-4-(2-fluorophenyl)-5-(pyridin-3-ylmethyl)-4,5-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-6(2H)-on **45**



Hergestellt aus 497 mg **39** (1.0 mmol, 1.0 eq) und Hydrazin-Monohydrat (75 mg, 1.5 mmol, 1.5 eq) und katalytischen Mengen H₂SO₄ nach **AAV 5**.

Ausbeute 36 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 247 °C (Zersetzung)

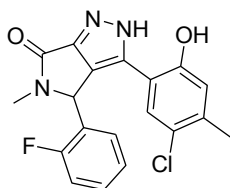
¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.15 (s, 3H, PhCH₃), 4.03 (d, ²J_{HH} = 15.7 Hz, 1H, NCH₂), 4.83 (d, ²J_{HH} = 15.7 Hz, 1H, NCH₂), 5.90 (s, 1H, CH), 6.75 (s, 1H, H_{Ar}), 7.00 (br s, 1H, H_{Ar}), 7.04-7.10 (m, 2H, H_{Ar}), 7.27-7.29 (m, 3H, H_{Ar}), 7.53 (d, J = 7.6 Hz, 1H, H_{Ar}), 8.32 (s, 1H, H_{Ar}), 8.42 (s, 1H, H_{Ar}), 12.20 (br s, 1H, NH)

¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 19.4 (PhCH₃), 41.9 (NCH₂), 54.3 (CH), 114.5, 115.6 (d, ²J_{CF} = 21.3 Hz), 118.1, 122.9, 123.37 (d, J = 12.1 Hz), 123.44, 124.8 (d, ⁴J_{CF} = 2.3 Hz), 125.8, 127.3, 129.7, 130.5 (d, ³J_{CF} = 8.1 Hz), 132.8, 135.2, 136.5, 148.4, 148.7, 153.0, 160.5 (d, ¹J_{CF} = 247.4 Hz), 161.8 (C=O)

C₂₄H₁₈ClFN₄O₂ [448.88]

HPLC 25 Minuten Laufzeit, Gradientenelution (50 % Acetonitril in H₂O bis 100 % Acetonitril in 20 Minuten), Flussrate: 1.0 mL/min, Retentionszeit: 3.328 min (96.4 % AUC)

3-(5-Chlor-2-hydroxy-4-methylphenyl)-4-(2-fluorphenyl)-5-methyl-4,5-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-6(2H)-on **46**



Hergestellt aus 232 mg **40** (0.5 mmol, 1.0 eq) und 37 μ L Hydrazin-Monohydrat (38 mg, 0.75 mmol, 1.5 eq) und katalytischen Mengen H_2SO_4 nach **AAV 5**.

Ausbeute 78 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt > 250 °C

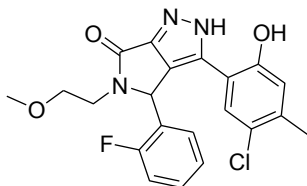
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO-d_6), δ (ppm): 2.18 (s, 3H, PhCH_3), 2.75 (s, 3H, NCH_3), 5.95 (s, 1H, CH), 6.80 (s, 1H, H_{Ar}), 7.01 (br s, 1H, H_{Ar}), 7.11 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, H_{Ar}), 7.18-7.21 (m, 1H, H_{Ar}), 7.27 (s, 1H, H_{Ar}), 7.34 (dd, $J = 12.6$, 6.3 Hz, 1H, H_{Ar}), 10.51 (br s, 1H, OH), 13.51 (br s, 1H, NH)

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO-d_6), δ (ppm): 19.4 (PhCH_3), 27.2 (NCH_3), 55.7 (CH), 115.7 (d, $^2J_{\text{CF}} = 21.4$ Hz), 118.2, 122.9, 124.9 (d, $^4J_{\text{CF}} = 2.2$ Hz), 127.3, 129.5, 130.4 (d, $^3J_{\text{CF}} = 6.1$ Hz), 136.5, 152.9, 160.6 (d, $^1J_{\text{CF}} = 247.4$ Hz)

$\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{ClFN}_3\text{O}_2$ [371.79]

HPLC 25 Minuten Laufzeit, isokratische Elution (80 % MeOH in H_2O),
Flussrate: 1.0 mL/min, Retentionszeit: 6.795 min (98.8 % AUC)

3-(5-Chlor-2-hydroxy-4-methylphenyl)-4-(2-fluorophenyl)-5-(2-methoxyethyl)-4,5-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-6(2*H*)-on **47**



Hergestellt aus 232 mg **41** (0.5 mmol, 1.0 eq) und 37 μ L Hydrazin-Monohydrat (38 mg, 0.75 mmol, 1.5 eq) und katalytischen Mengen H_2SO_4 nach **AAV 5**.

Ausbeute 85 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 234 °C (Zersetzung)

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO-d_6), δ (ppm): 2.17 (s, 3H, PhCH_3), 2.75-2.80 (m, 1H, NCH_2CH_2), 3.20 (s, 3H, OCH_3), 3.40-3.45 (m, 2H, NCH_2CH_2), 3.80-3.83 (m, 1H, NCH_2CH_2), 6.07-6.13 (m, 1H, CH), 6.77-6.80 (m, 1H, H_{Ar}), 7.04 (br s, 1H, H_{Ar}), 7.11 (dd, $J_1 = J_2 = 6.9$ Hz, 1H, H_{Ar}), 7.17 (dd, $J = 9.3, 9.0$ Hz, 1H, H_{Ar}), 7.26 (s, 1H, H_{Ar}), 7.32-7.33 (m, 1H, H_{Ar}), 10.35 (s, 0.2H, OH), 10.55 (s, 0.8H, OH), 13.53 (s, 0.8H, NH), 14.21 (s, 0.2H, NH)

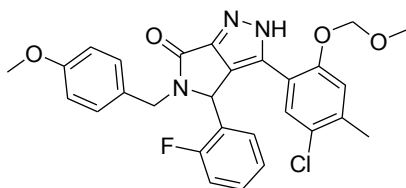
$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO-d_6), δ (ppm): 19.4 (PhCH_3), 54.7 (CH), 57.9 (OCH_3), 69.5 (NCH_2CH_2), 114.2, 115.8 (d, $^2J_{\text{CF}} = 21.4$ Hz), 118.2, 123.0, 123.9 (d, $J = 11.4$ Hz), 124.9, 125.4, 127.4, 129.7, 130.4 (d, $^3J_{\text{CF}} = 7.2$ Hz), 132.6, 136.7, 150.2, 152.8, 160.6 (d, $^1J_{\text{CF}} = 247.7$ Hz), 162.1 (C=O)
Das Kohlenstoffatom NCH_2CH_2 ist von DMSO-d_6 verdeckt.

$\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{ClFN}_3\text{O}_3$ [415.85]

Berechnet [%] C = 60.65, H = 4.61, N = 10.10

Gefunden [%] C = 60.34, H = 4.54, N = 9.99

3-(5-Chlor-2-(methoxymethoxy)-4-methylphenyl)-4-(2-fluorophenyl)-5-(4-methoxybenzyl)-4,5-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-6(2H)-on **48**



Hergestellt aus 1.05 g **42** (2.0 mmol, 1.0 eq) und 0.15 mL Hydrazin-Monohydrat (150 mg, 3.0 mmol, 1.5 eq) nach **AAV 3**.

Ausbeute 29 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 182 °C

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.23 (s, 3H, PhCH₃), 3.10 (s, 0.3H, OCH₂OCH₃), 3.21 (s, 2.7H, OCH₂OCH₃), 3.72-3.74 (m, 4H, OCH₃, NCH₂), 4.80 (d, ²J_{HH} = 14.3 Hz, 0.1H, NCH₂), 4.88 (d, ²J_{HH} = 15.3 Hz, 0.9H, NCH₂), 4.98 (d, J = 5.5 Hz, 0.1H, OCH₂OCH₃), 5.11 (d, J = 5.6 Hz, 0.1H, OCH₂OCH₃), 5.17 (d, J = 6.5 Hz, 0.9H, OCH₂OCH₃), 5.23 (d, J = 6.6 Hz, 0.9H, OCH₂OCH₃), 5.73 (s, 0.1H, CH), 5.81 (s, 0.9H, CH), 6.85 (d, J = 8.2 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.01-7.14 (m, 6H, H_{Ar}), 7.26 (s, 1H, H_{Ar}), 7.32 (d, J = 12.3, 6.3 Hz, 1H, H_{Ar}), 13.67 (s, 0.9H, NH), 14.12 (s, 0.9H, NH)

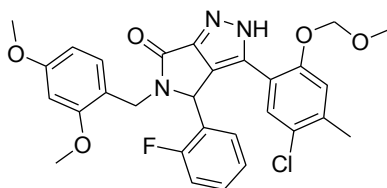
¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 19.6 (PhCH₃), 43.4 (NCH₂), 53.4 (CH), 54.9 (OCH₃), 55.8 (OCH₂OCH₃), 94.3 (OCH₂OCH₃), 113.8, 115.8 (d, ²J_{CF} = 21.5 Hz), 116.1, 117.3, 123.1 (d, J = 11.8 Hz), 124.9, 125.6, 125.9, 128.0, 128.8, 129.0, 129.6, 130.6 (d, ³J_{CF} = 8.2 Hz), 132.0, 137.0, 150.0, 151.6, 158.4, 160.6 (d, ¹J_{CF} = 247.7 Hz), 162.0 (C=O)

C₂₈H₂₅ClFN₃O₄ [521.97]

Berechnet [%] C = 64.43, H = 4.83, N = 8.05

Gefunden [%] C = 64.38, H = 4.89, N = 7.78

3-(5-Chlor-2-(methoxymethoxy)-4-methylphenyl)-5-(2,4-dimethoxybenzyl)-4-(2-fluorophenyl)-4,5-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-6(2H)-on **49**



Hergestellt aus 556 mg **43** (1.0 mmol, 1.0 eq) und 0.07 mL Hydrazin-Monohydrat (75 mg, 1.5 mmol, 1.5 eq) nach **AAV 3**.

Ausbeute 46 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 166 °C

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.24 (s, 3H, PhCH₃), 3.23 (s, 3H, OCH₂OCH₃), 3.70 (s, 3H, OCH₃), 3.73 (s, 3H, OCH₃), 3.84 (d, ²J_{HH} = 15.3 Hz, 1H, NCH₂), 4.71 (d, ²J_{HH} = 15.3 Hz, 1H, NCH₂), 5.01 (d, J = 6.1 Hz, 0.1 H, OCH₂OCH₃), 5.15 (d, J = 6.1 Hz, 0.1 H, OCH₂OCH₃), 5.18 (d, J = 6.7 Hz, 0.9 H, OCH₂OCH₃), 5.25 (d, J = 6.7 Hz, 0.9 H, OCH₂OCH₃), 5.75 (s, 0.1H, CH), 5.81 (s, 0.9H, CH), 6.44 (dd, J = 8.4, 2.3 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.50 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.98 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.02 (dd, J₁ = J₂ = 7.2 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.09-7.13 (m, 3H, H_{Ar}), 7.24 (s, 1H, H_{Ar}), 7.29-7.32 (m, 1H, H_{Ar}), 13.61 (s, 0.9H, NH), 14.05 (s, 0.1H, NH)

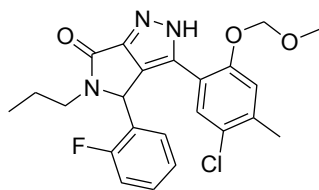
¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 19.6 (PhCH₃), 39.2 (NCH₂), 53.7 (CH), 55.1 (OCH₃), 55.2 (OCH₃), 55.9 (OCH₃), 94.3 (OCH₂OCH₃), 99.0, 104.5, 115.6 (d, ²J_{CF} = 21.2 Hz), 116.6, 116.8, 117.4, 123.0 (d, J = 11.9 Hz), 124.7, 125.6, 126.1, 128.1, 129.5, 129.7, 130.4 (d, ³J_{CF} = 8.0 Hz), 131.9, 137.0, 149.9, 151.6, 157.7, 159.9, 160.5 (d, ¹J_{CF} = 247.7 Hz), 162.1 (C=O)

C₂₉H₂₇ClFN₃O₅ [551.99]

Berechnet [%] C = 63.10, H = 4.93, N = 7.61

Gefunden [%] C = 62.82, H = 5.15, N = 7.33

3-(5-Chlor-2-(methoxymethoxy)-4-methylphenyl)-4-(2-difluorophenyl)-5-propyl-4,5-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-6(2H)-on **50**



Hergestellt aus 672 mg **44** (1.5 mmol, 1.0 eq) und 0.11 mL Hydrazin-Monohydrat (113 mg, 2.25 mmol, 1.5 eq) nach **AAV 3**.

Ausbeute 53 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 180 °C (Zersetzung)

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 0.79 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, NCH₂CH₂CH₃), 1.37-1.43 (m, 1H, NCH₂CH₂CH₃), 1.48-1.54 (m, 1H, NCH₂CH₂CH₃), 2.24 (s, 0.4H, PhCH₃), 2.25 (s, 2.5H, PhCH₃), 2.68-2.73 (m, 1H, NCH₂CH₂CH₃), 3.26 (s, 0.4H, OCH₂OCH₃), 3.30 (s, 2.6H, OCH₂OCH₃), 3.47-3.51 (m, 0.2H, NCH₂CH₂CH₃), 3.54-3.56 (m, 0.8H, NCH₂CH₂CH₃), 5.15 (d, *J* = 6.5 Hz, 0.1H, OCH₂OCH₃), 5.20 (d, *J* = 6.5 Hz, 0.1H, OCH₂OCH₃), 5.27 (d, *J* = 6.7 Hz, 0.9H, OCH₂OCH₃), 5.29 (d, *J* = 6.8 Hz, 0.9H, OCH₂OCH₃), 5.91 (s, 0.1H, CH), 6.04 (s, 0.9H, CH), 7.06-7.20 (m, 4H, H_{Ar}), 7.28-7.36 (m, 2H, H_{Ar}), 13.63 (s, 0.9H, NH), 14.04 (s, 0.1H, NH)

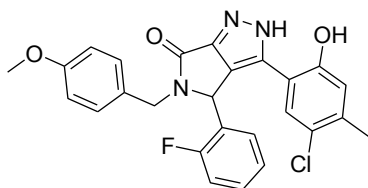
¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 11.1 (NCH₂CH₂CH₃), 19.6 (minor PhCH₃), 19.7 (major PhCH₃), 20.9 (major NCH₂CH₂CH₃), 21.1 (minor NCH₂CH₂CH₃), 41.9 (major NCH₂CH₂CH₃), 42.0 (minor NCH₂CH₂CH₃), 53.6 (CH), 55.6 (minor OCH₂OCH₃), 55.8 (major OCH₂OCH₃), 94.3 (major OCH₂OCH₃), 94.5 (minor OCH₂OCH₃), 115.8 (d, ²*J*_{CF} = 21.4 Hz), 116.7, 117.5 (major), 117.7 (minor), 123.5 (d, *J* = 11.9 Hz), 125.0 (d, *J* = 2.5 Hz), 125.6 (d, *J* = 3.0 Hz), 128.0 (major), 128.1 (minor), 129.7, 129.8, 130.6 (d, ³*J*_{CF} = 8.1 Hz), 131.9, 137.9, 150.3, 151.7, 158.0, 160.7 (d, ¹*J*_{CF} = 247.2 Hz), 161.9 (C=O)

C₂₃H₂₃ClFN₃O₃ [443.90]

Berechnet [%] C = 63.23, H = 5.22, N = 9.47

Gefunden [%] C = 62.43, H = 5.39, N = 9.21

3-(5-Chlor-2-hydroxy-4-methylphenyl)-4-(2-fluorophenyl)-5-(4-methoxybenzyl)-4,5-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-6(2H)-on **51**



Hergestellt aus 1.05 g **48** (2.0 mmol, 1.0 eq) nach **AAV 4**.

Ausbeute 72 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 182 °C

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.15 (s, 3H, PhCH₃), 3.62 (d, ²J_{HH} = 15.1 Hz, 1H, NCH₂), 3.72 (s, 3H, OCH₃), 4.91 (d, ²J_{HH} = 15.0 Hz, 1H, NCH₂), 5.77 (s, 1H, CH), 6.75 (s, 1H, H_{Ar}), 6.87 (d, J = 7.9 Hz, 2H, H_{Ar}), 6.94 (br s, 1H, H_{Ar}), 7.07-7.10 (m, 3H, H_{Ar}), 7.14 (t, J = 9.1 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.28-7.31 (m, 2H, H_{Ar}), 10.23 (br s, 0.1H, OH), 10.44 (s, 0.9H, OH), 13.60 (s, 0.9H, NH), 14.24 (br s, 0.1H, NH)

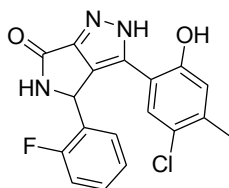
¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 19.4 (PhCH₃), 43.2 (NCH₂), 53.4 (CH), 55.0 (OCH₃), 113.8, 114.1, 115.7 (d, ²J_{CF} = 21.7 Hz), 118.1, 123.0, 123.7, 124.8, 125.3, 127.3, 128.7, 129.1, 129.5, 130.4, 132.7, 136.7, 150.1, 152.7, 158.4, 160.6 (d, ¹J_{CF} = 247.1 Hz), 162.1 (C=O)

C₂₆H₂₁ClFN₃O₃ [477.91]

Berechnet [%] C = 65.34, H = 4.43, N = 8.79

Gefunden [%] C = 65.07, H = 4.60, N = 8.52

3-(5-Chlor-2-hydroxy-4-methylphenyl)-4-(2-fluorophenyl)-4,5-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-6(2H)-on **52**



Hergestellt aus 276 mg **49** (0.5 mmol, 1.0 eq) nach **AAV 4**.

Ausbeute 73 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 166 °C

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.18 (s, 3H, PhCH₃), 6.00 (s, 1H, CH), 6.79 (s, 1H, H_{Ar}), 7.03 (m, 1H, H_{Ar}), 7.07 (m, 1H, H_{Ar}), 7.15-7.18 (m, 1H, H_{Ar}), 7.27 (s, 1H, H_{Ar}), 7.28-7.31 (m, 1H, H_{Ar}), 8.85 (s, 1H, NH), 10.63 (br s, 0.3H, OH), 13.43 (s, 0.3H, NH)

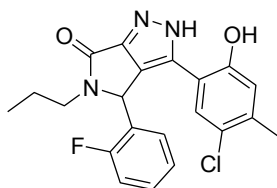
¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 19.4 (PhCH₃), 50.0 (CH), 114.8, 115.6 (d, ²J_{CF} = 21.4 Hz), 118.2, 122.9, 124.6 (d, ⁴J_{CF} = 2.5 Hz), 125.8 (d, J = 12.2 Hz), 127.4, 128.9 (d, J = 3.1 Hz), 129.8 (d, ³J_{CF} = 8.2 Hz), 126.4, 153.0, 160.3 (d, ¹J_{CF} = 247.2 Hz)

C₁₈H₁₃ClFN₃O₂ [357.77]

C₂₄H₁₈ClFN₄O₂ [448.88]

HPLC 25 Minuten Laufzeit, Gradientenelution (50 % Acetonitril in H₂O bis 100 % Acetonitril in 20 Minuten), Flussrate: 1.0 mL/min, Retentionszeit: 7.029 min (96.2 % AUC)

3-(5-Chlor-2-hydroxy-4-methylphenyl)-4-(2-fluorphenyl)-5-propyl-4,5-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-6(2H)-on **53**



Hergestellt aus 222 mg **50** (0.5 mmol, 1.0 eq) nach **AAV 4**.

Ausbeute 40 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 180 °C (Zersetzung)

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 0.79 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, NCH₂CH₂CH₃), 1.35-1.44 (m, 1H, NCH₂CH₂CH₃), 1.46-1.54 (m, 1H, NCH₂CH₂CH₃), 2.18 (s, 3H, PhCH₃), 2.65-2.69 (m, 1H, NCH₂CH₂CH₃), 3.53-3.57 (m, 1H, NCH₂CH₂CH₃), 6.03 (s, 1H, CH), 6.80 (s, 1H, H_{Ar}), 7.03 (br s, 1H, H_{Ar}), 7.11 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.19 (t, *J* = 9.3 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.27 (s, 1H, H_{Ar}), 7.33 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 10.35 (br s, 0.2H, OH), 10.52 (s, 0.8H, OH), 13.51 (s, 0.8H, NH), 14.20 (s, 0.2H, NH)

¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 11.1 (NCH₂CH₂CH₃), 19.4 (PhCH₃), 21.0 (NCH₂CH₂CH₃), 41.8 (NCH₂CH₂CH₃), 53.7 (CH), 114.2, 115.7 (d, ²*J*_{CF} = 21.7 Hz), 118.1, 123.0, 124.0 (d, *J* = 12.3 Hz), 124.9, 125.0, 127.4, 129.6, 130.4 (d, ³*J*_{CF} = 8.1 Hz), 132.6, 136.6, 150.4, 152.8, 160.6 (d, ¹*J*_{CF} = 247.1 Hz), 162.0 (C=O)

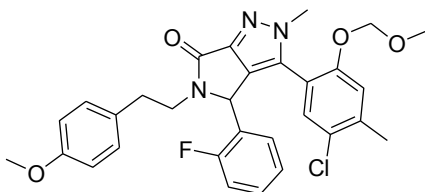
C₂₁H₁₉ClFN₃O₂ [399.85]

Berechnet [%] C = 65.75, H = 4.88, N = 11.80

Gefunden [%] C = 65.48, H = 5.13, N = 11.50

6.6. Analytische Daten der Verbindungen aus Kapitel 3.4.6.

3-(5-Chlor-2-(methoxymethoxy)-4-methylphenyl)-4-(2-fluorphenyl)-5-(4-methoxyphenethyl)-1-methyl-4,5-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-6(2H)-on **54**



540 mg Edukt **10** (1.0 mmol, 1.0 eq) wurden unter Schutzgasatmosphäre in 10 mL abs. DMF gelöst und mit 152 mg K₂CO₃ (1.1 mmol, 1.1 eq) versetzt. Anschließend wurden 75 µL Mel (170 mg, 1.2 mmol, 1.2 eq) zugetropft und 12 h refluxiert. Nach Abkühlung auf RT wurde filtriert, das Filtrat mit H₂O versetzt und die wässrige Phase 3x mit jeweils 30 mL EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer eingedunstet. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel mit einem Elutionsgradienten von EtOAc/*n*-Hexan (0:1 → 1:0) gereinigt.

Ausbeute 75 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 68 °C

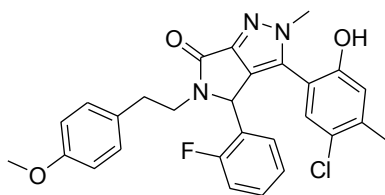
¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.22 (s, 3H, PhCH₃), 2.55-2.60 (m, 1H, NCH₂CH₂), 2.81-2.88 (m, 2H, NCH₂CH₂), 3.22 (s, 3H, OCH₂OCH₃), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 3.73-3.78 (m, 1H, NCH₂CH₂), 4.05 (s, 3H, NCH₃), 5.01 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H, OCH₂OCH₃), 5.17 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H, OCH₂OCH₃), 5.63 (s, 1H, CH), 6.86 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H_{Ar}), 6.92 (dd, *J*₁ = *J*₂ = 7.1 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.05-7.07 (m, 4H, H_{Ar}), 7.15-7.18 (m, 1H, H_{Ar}), 7.28-7.32 (m, 1H, H_{Ar}), 7.57 (s, 1H, H_{Ar})

¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 19.6 (PhCH₃), 32.9 (NCH₂CH₂), 36.7 (NCH₃), 42.1 (NCH₂CH₂), 54.5 (CH), 54.9 (OCH₃), 55.5 (OCH₂OCH₃), 94.2 (OCH₂OCH₃), 113.8, 115.7 (d, ²*J*_{CF} = 21.3 Hz), 117.7, 120.7, 122.9 (d, *J* = 12.3 Hz), 124.9 (d, ⁴*J*_{CF} = 2.8 Hz), 125.8, 127.9, 129.45, 129.52, 129.8, 130.3, 130.5 (d, ³*J*_{CF} = 8.2 Hz), 136.3, 138.4, 140.4, 151.9, 157.6, 157.7, 160.6 (d, ¹*J*_{CF} = 247.1 Hz)

C₃₀H₂₉ClFN₃O₄ [550.02]

HPLC 25 Minuten Laufzeit, Gradientenelution (50 % Acetonitril in H₂O bis 100 % Acetonitril in 20 Minuten), Flussrate: 1.0 mL/min, Retentionszeit: 18.075 min (99.6 % AUC)

3-(5-Chlor-2-hydroxy-4-methylphenyl)-4-(2-fluorophenyl)-5-(4-methoxyphenethyl)-1-methyl-4,5-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-6(2*H*)-on **66**



Hergestellt aus 72 mg **65** (0.13 mmol, 1.0 eq) nach **AAV 4**.

Ausbeute 82 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 138 °C

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.17 (s, 3H, PhCH₃), 2.53-2.59 (m, 1H, NCH₂CH₂), 2.78-2.87 (m, 2H, NCH₂CH₂), 3.70 (s, 3H, OCH₃), 3.72-3.77 (m, 1H, NCH₂CH₂), 4.05 (s, 3H, NCH₃), 5.96 (s, 1H, CH), 6.78 (s, 1H, H_{Ar}), 6.83 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.03 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.06 (br s, 1H, H_{Ar}), 7.12 (dd, *J*₁ = *J*₂ = 7.4 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.21-7.24 (m, 1H, H_{Ar}), 7.33 (s, 1H, H_{Ar}), 7.34-7.38 (m, 1H, H_{Ar}), 10.11 (s, 1H, OH)

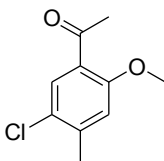
¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 19.3 (PhCH₃), 32.9 (NCH₂CH₂), 36.7 (NCH₃), 42.2 (NCH₂CH₂), 54.0 (CH), 54.9 (OCH₃), 113.8, 115.7 (d, ²*J*_{CF} = 21.4 Hz), 116.4, 118.4, 122.9 (d, *J* = 11.4 Hz), 123.0, 124.9 (d, ⁴*J*_{CF} = 1.7 Hz), 127.0, 128.8, 129.3, 129.8, 130.2, 130.7 (d, ³*J*_{CF} = 8.2 Hz), 136.2, 139.9, 140.5, 153.2, 157.6, 157.7, 160.7 (d, ¹*J*_{CF} = 247.0 Hz)

C₂₈H₂₅ClFN₃O₃ [505.97]

HPLC 25 Minuten Laufzeit, Gradientenelution (50 % Acetonitril in H₂O bis 100 % Acetonitril in 20 Minuten), Flussrate: 1.0 mL/min, Retentionszeit: 19.688 min (99.7 % AUC)

6.7. Analytische Daten der Verbindungen aus Kapitel 3.4.7.

1-(5-Chlor-2-methoxy-4-methylphenyl)ethanon **56**



In Anlehnung an eine Literaturvorschrift¹²⁸ wurden 1.85 g 1-(5-Chlor-2-hydroxy-4-methylphenyl)ethanon **III** (10.0 mmol, 1.0 eq) unter Schutzgasatmosphäre in 100 mL abs. Aceton gelöst und mit 8.29 g K₂CO₃ (60.0 mmol, 6.0 eq) versetzt. Anschließend wurden 0.75 mL MeI (1.70 g, 12.0 mmol, 1.2 eq) zugetropft und 12 h refluxiert. Nach Abkühlung auf RT wurde filtriert, das Filtrat über Na₂SO₄ getrocknet, erneut filtriert und anschließend am Rotationsverdampfer eingeeengt. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel mit einem Elutionsgradienten von EtOAc/*n*-Hexan (0:1 → 1:0) gereinigt.

Ausbeute 82 %, farblose Kristalle

Schmelzpunkt 76 °C

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 2.38 (s, 3H, PhCH₃), 2.57 (s, 3H, C(O)CH₃), 3.89 (s, 3H, OCH₃), 6.82 (s, 1H, H_{Ar}), 7.72 (s, 1H, H_{Ar})

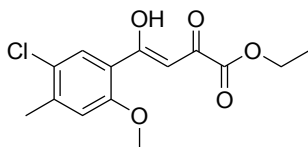
¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 20.7 (PhCH₃), 31.7 (C(O)CH₃), 55.8 (OCH₃), 114.2, 126.2, 126.8, 130.6, 142.1, 157.4, 197.7 (C(O)CH₃)

C₁₀H₁₁ClO₂ [198.65]

Berechnet [%] C = 60.46, H = 5.58

Gefunden [%] C = 60.58, H = 5.72

(Z)-Ethyl-4-(5-chlor-2-methoxy-4-methylphenyl)-4-hydroxy-2-oxobut-3-enoat **57**



Hergestellt aus 993 mg **56** (5.0 mmol, 1.0 eq) und 1.32 g Diethyloxalat (9.0 mmol, 1.8 eq) nach **AAV 1**.

Ausbeute 54 %, orangene Kristalle

Schmelzpunkt 124 °C

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 1.22-1.31 (m, 3H, OCH₂CH₃), 2.36-2.40 (m, 3H, PhCH₃), 3.82 (s, 0.3H, OCH₃), 3.93 (s, 2.7H, OCH₃), 4.25-4.31 (m, 2H, OCH₂CH₃), 7.19-7.28 (m, 2H, CH & H_{Ar}), 7.66 (s, 0.1H, H_{Ar}), 7.76 (s, 0.9H, H_{Ar})

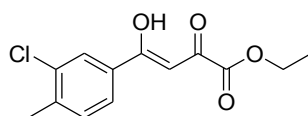
¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 13.7 (OCH₂CH₃), 20.1 (PhCH₃), 56.1 (minor OCH₃), 56.4 (major OCH₃), 62.1 (OCH₂CH₃), 102.4 (minor CH), 102.5 (major CH), 115.7 (minor), 115.8 (major), 122.5, 125.2, 129.3, 143.3, 157.5, 161.6 (C=O), 168.8 (C=O), 187.2 (C=O)

C₁₄H₁₅ClO₅ [298.72]

Berechnet [%] C = 56.29, H = 5.06

Gefunden [%] C = 56.35, H = 4.98

(Z)-Ethyl-4-(3-chlor-4-methylphenyl)-4-hydroxy-2-oxobut-3-enoat **58**



Hergestellt aus 1.69 g 1-(3-Chlor-4-methylphenyl)ethanon (**XXXVII**, 10.0 mmol, 1.0 eq) und 2.63 g Diethyloxalat (18.0 mmol, 1.8 eq) nach **AAV 1**.

Ausbeute 70 %, hellgelbe Kristalle

Schmelzpunkt 56 °C

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 1.23 (t, ³J_{HH} = 7.1 Hz, 0.4H, OCH₂CH₃), 1.31 (t, ³J_{HH} = 7.1 Hz, 2.6H, OCH₂CH₃), 2.29 (s, 0.4H, PhCH₃), 2.40 (s, 2.6H, PhCH₃), 4.22 (q, ³J_{HH} = 7.1 Hz, 0.2H, OCH₂CH₃), 4.31 (q, ³J_{HH} = 7.1 Hz, 1.8H, OCH₂CH₃), 7.06 (s, 0.1H, CH), 7.09 (s, 0.9H, CH), 7.31 (d, J = 7.9 Hz, 0.1H, H_{Ar}), 7.52 (d, J = 8.0 Hz, 0.9H, H_{Ar}), 7.73-7.84 (m, 0.3H, H_{Ar}), 7.90-8.01 (m, 1.7H, H_{Ar})

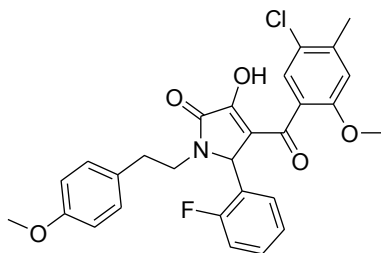
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 13.6 (minor OCH₂CH₃), 13.7 (major OCH₂CH₃), 19.1 (minor PhCH₃), 19.6 (minor PhCH₃), 19.8 (major PhCH₃), 62.0 (minor OCH₂CH₃), 62.05 (minor OCH₂CH₃), 62.13 (major OCH₂CH₃), 97.6 (minor CH), 98.0 (major CH), 125.5 (minor), 126.5 (major), 127.0 (minor), 127.8 (major), 128.6 (minor), 130.1 (minor), 131.5 (minor), 131.8 (major), 131.9 (minor), 133.8 (major), 134.1 (major), 135.3 (minor), 137.2 (minor), 141.9 (minor), 142.2 (major), 143.8 (minor), 161.4 (major), 161.6 (minor), 168.56 (minor), 168.63 (major), 188.7 (major), 188.9 (minor), 190.3 (minor)

C₁₃H₁₃ClO₄ [268.69]

Berechnet [%] C = 58.11, H = 4.88

Gefunden [%] C = 58.12, H = 5.02

4-(5-Chlor-2-methoxy-4-methylbenzoyl)-5-(2-fluorophenyl)-3-hydroxy-1-(4-methoxyphenethyl)-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on **59**



Hergestellt aus 747 mg **57** (2.5 mmol, 1.0 eq), 310 mg 2-Fluorbenzaldehyd (**VI**, 2.5 mmol, 1.0 eq) und 378 mg 2-(4-Methoxyphenyl)ethylamin (**VII**, 2.5 mmol, 1.0 eq) nach **AAV 2**.

Ausbeute 78 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 197 °C (Zersetzung)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.33 (s, 3H, PhCH₃), 2.54-2.60 (m, 1H, NCH₂CH₂), 2.73-2.83 (m, 2H, NCH₂CH₂), 3.70-3.79 (m, 7H, 2xOCH₃, NCH₂CH₂), 5.50 (s, 1H, CH), 6.83 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.01 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.06 (d, *J* = 4.3 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.17-7.23 (m, 3H, H_{Ar}), 7.34-7.39 (m, 1H, H_{Ar})

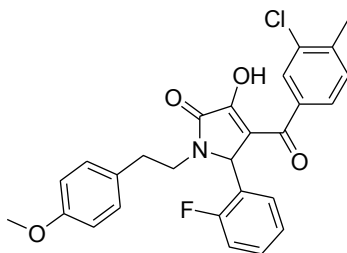
¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 19.9 (PhCH₃), 32.4 (NCH₂CH₂), 41.8 (NCH₂CH₂), 54.9 (OCH₃), 55.9 (OCH₃), 113.8, 114.4, 115.5 (d, ²*J*_{CF} = 21.6 Hz), 118.5, 123.2, 123.9, 124.6, 127.7, 129.3, 130.2 (d, ³*J*_{CF} = 8.0 Hz), 138.7, 155.6, 157.8, 161.0 (d, ¹*J*_{CF} = 247.0 Hz), 165.0 (C=O), 186.1 (C=O)

C₂₈H₂₅ClFNO₅ [509.95]

Berechnet [%] C = 65.95, H = 4.94, N = 2.75

Gefunden [%] C = 66.15, H = 5.20, N = 2.86

4-(3-Chlor-4-methylbenzoyl)-5-(2-fluorophenyl)-3-hydroxy-1-(4-methoxyphenethyl)-1*H*-pyrrol-
(2(5*H*))-on **60**



Hergestellt aus 403 mg **58** (1.5 mmol, 1.0 eq), 186 mg 2-Fluorbenzaldehyd (**VI**, 1.5 mmol, 1.0 eq) und 227 mg 4-Methoxybenzylamin (**VII**, 1.5 mmol, 1.0 eq) nach **AAV 2**.

Ausbeute 86 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 252 °C (Zersetzung)

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.37 (s, 3H, PhCH₃), 2.57-2.62 (m, 1H, NCH₂CH₂), 2.75-2.80 (m, 1H, NCH₂CH₂), 2.82-2.87 (m, 1H, NCH₂CH₂), 3.70 (s, 3H, OCH₃), 3.77-3.82 (m, 1H, NCH₂CH₂), 5.60 (s, 1H, CH), 6.83 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.02 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.16-7.22 (m, 2H, H_{Ar}), 7.32-7.37 (m, 2H, H_{Ar}), 7.42-7.45 (m, 1H, H_{Ar}), 7.54 (dd, *J* = 7.8, 1.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.66 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, H_{Ar}), 11.70-12.50 (m, 1H, OH)

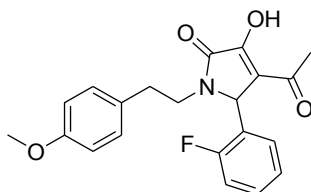
¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 19.7 (PhCH₃), 32.5 (NCH₂CH₂), 42.0 (NCH₂CH₂), 54.9 (OCH₃), 113.8, 115.7 (d, ²*J*_{CF} = 21.7 Hz), 117.6, 122.8 (d, *J* = 11.8 Hz), 124.8, 127.2, 128.7, 129.3, 130.0, 130.4 (d, ³*J*_{CF} = 8.2 Hz), 130.9, 133.0, 137.4, 140.2, 157.8, 161.0 (d, ¹*J*_{CF} = 247.3 Hz), 164.8 (C=O), 187.0 (C=O)

C₂₇H₂₃ClFNO₄ [479.93]

Berechnet [%] C = 67.57, H = 4.83, N = 2.92

Gefunden [%] C = 67.81, H = 5.00, N = 2.72

4-Acetyl-5-(2-fluorophenyl)-3-hydroxy-1-(4-methoxyphenethyl)-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on **61**



Hergestellt aus 395 mg **XLI** (2.5 mmol, 1.0 eq), 310 mg 2-Fluorbenzaldehyd (**VI**, 2.5 mmol, 1.0 eq) und 378 mg 2-(4-Methoxyphenyl)ethylamin (**VII**, 2.5 mmol, 1.0 eq) nach **AAV 2**.

Ausbeute 65 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 216 °C (Zersetzung)

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.28 (s, 3H, C(O)CH₃), 2.53-2.58 (m, 1H, NCH₂CH₂), 2.70-2.78 (m, 2H, NCH₂CH₂), 3.70 (s, 3H, OCH₃), 3.71-3.76 (m, 1H, NCH₂CH₂), 5.32 (s, 1H, CH), 6.82 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.00 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.09-7.21 (m, 3H, H_{Ar}), 7.35 (ddd, *J* = 8.4, 5.4, 1.9 Hz, 1H, H_{Ar}), 12.35 (br s, 0.5H, OH)

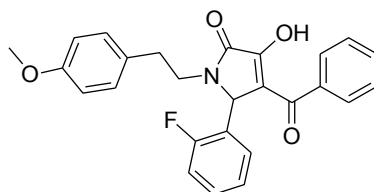
¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 29.7 (C(O)CH₃), 32.4 (NCH₂CH₂), 41.8 (NCH₂CH₂), 54.9 (OCH₃), 113.9, 115.7 (d, ²*J*_{CF} = 21.7 Hz), 123.4 (d, *J* = 11.1 Hz), 124.7, 129.4, 130.08, 130.12, 154.4, 157.8, 160.9 (d, ¹*J*_{CF} = 246.9 Hz), 165.0 (C=O), 191.6 (C=O)

C₂₁H₂₀FNO₄ [369.39]

Berechnet [%] C = 68.28, H = 5.46, N = 3.79

Gefunden [%] C = 68.23, H = 5.41, N = 3.76

4-(Benzoyl-5-(2-fluorophenyl)-3-hydroxy-1-(4-methoxyphenethyl)-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on **62**



Hergestellt aus 1.1 g **XLII** (5.0 mmol, 1.0 eq), 621 mg 2-Fluorbenzaldehyd (**VI**, 5.0 mmol, 1.0 eq) und 756 mg 2-(4-Methoxyphenyl)ethylamin (**VII**, 5.0 mmol, 1.0 eq) nach **AAV 2**.

Ausbeute 62 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 247 °C (Zersetzung)

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.59-2.63 (m, 1H, NCH₂CH₂), 2.76-2.87 (m, 2H, NCH₂CH₂), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 3.78-3.83 (m, 1H, NCH₂CH₂), 5.62 (s, 1H, CH), 6.84 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.03 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.15-7.22 (m, 2H, H_{Ar}), 7.35 (dd, *J* = 12.3, 6.9 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.44 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.55 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.66-7.68 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, H_{Ar}), 11.83 (br s, 0.7H, OH)

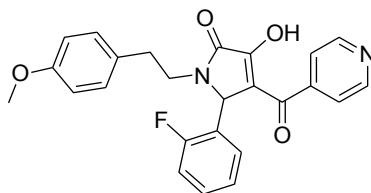
¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 32.5 (NCH₂CH₂), 42.0 (NCH₂CH₂), 54.9 (OCH₃), 113.8, 115.8 (d, ²*J*_{CF} = 21.4 Hz), 118.0, 122.8 (d, *J* = 11.4 Hz), 124.8 (d, ⁴*J*_{CF} = 1.5 Hz), 128.0, 128.5, 129.4, 130.1, 130.4 (d, ³*J*_{CF} = 8.2 Hz), 132.4, 138.0, 151.9, 157.8, 161.0 (d, ¹*J*_{CF} = 247.5 Hz), 164.9 (C=O), 188.9 (C=O)

C₂₆H₂₂FNO₄ [431.46]

Berechnet [%] C = 72.38, H = 5.14, N = 3.25

Gefunden [%] C = 72.10, H = 5.09, N = 3.06

5-(2-Fluorphenyl)-3-hydroxy-4-hydroxy-4-isonicotinoyl-1-(4-methoxyphenethyl)-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on **63**



Hergestellt aus 442 mg **XLIII** (2.0 mmol, 1.0 eq), 248 mg 2-Fluorbenzaldehyd (**VI**, 2.0 mmol, 1.0 eq) und 302 mg 2-(4-Methoxyphenyl)ethylamin (**VII**, 2.0 mmol, 1.0 eq) nach **AAV 2**.

Ausbeute 64 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 239 °C (Zersetzung)

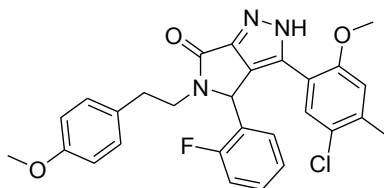
¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.57-2.61 (m, 1H, NCH₂CH₂), 2.75-2.80 (m, 1H, NCH₂CH₂), 2.82-2.87 (m, 1H, NCH₂CH₂), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 3.75-3.80 (m, 1H, NCH₂CH₂), 5.92 (s, 1H, CH), 6.83 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.02 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.14 (dd, *J*₁ = *J*₂ = 7.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.22 (dd, *J*₁ = *J*₂ = 9.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.35-7.38 (m, 2H, H_{Ar}), 7.53 (d, *J* = 4.9 Hz, 2H, H_{Ar}), 8.70 (d, *J* = 5.2 Hz, 2H, H_{Ar})

¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 32.4 (NCH₂CH₂), 42.0 (NCH₂CH₂), 54.9 (OCH₃), 113.8, 115.7 (d, ²*J*_{CF} = 21.6 Hz), 116.4, 121.7, 123.1 (d, *J* = 11.3 Hz), 124.8, 129.4, 130.0, 130.4 (d, ³*J*_{CF} = 8.5 Hz), 145.6, 149.5, 154.4, 157.8, 161.0 (d, ¹*J*_{CF} = 247.2 Hz), 164.8 (C=O), 187.1 (C=O)

C₂₅H₂₁FN₂O₄ [432.44]

HPLC 25 Minuten Laufzeit, Gradientenelution (25 % Acetonitril in H₂O bis 100 % Acetonitril in 20 Minuten), Flussrate: 1.0 mL/min, Retentionszeit: 4.331 min (95.4 % AUC)

3-(5-Chlor-2-methoxy-4-methylphenyl)-4-(2-fluorophenyl)-5-(4-methoxyphenethyl)-4,5-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-6(2*H*)-on **64**



Hergestellt aus 286 mg **59** (0.56 mmol, 1.0 eq) und 41 μ L Hydrazin-Monohydrat (42 mg, 0.84 mmol, 1.5 eq) nach **AAV 3**.

Ausbeute 55 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 224 °C

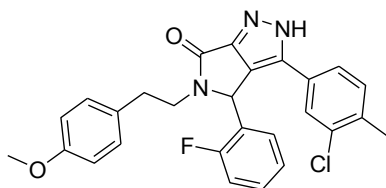
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 2.26 (s, 3H, PhCH₃), 2.56-2.61 (m, 1H, NCH₂CH₂), 2.83-2.86 (m, 2H, NCH₂CH₂), 3.70 (s, 3H, OCH₃), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 3.80-3.82 (m, 1H, NCH₂CH₂), 5.65 (br s, 0.1H, CH), 5.79 (s, 0.9H, CH), 6.84 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H_{Ar}), 6.96-7.02 (m, 2H, H_{Ar}), 7.05 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.10 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.17 (t, *J* = 9.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.32 (dd, *J* = 13.4, 7.9 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.37 (s, 1H, H_{Ar}), 13.65 (s, 0.9H, NH), 13.99 (s, 0.1H, NH)

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 19.7 (PhCH₃), 32.9 (NCH₂CH₂), 42.1 (NCH₂CH₂), 54.2 (CH), 54.9 (OCH₃), 55.6 (OCH₃), 113.8, 114.2, 115.6, 115.7 (d, ²*J*_{CF} = 20.8 Hz), 123.5 (d, *J* = 12.3 Hz), 124.4, 124.9, 125.7, 127.5, 129.4, 129.6, 129.7, 130.5, 130.6, 131.8, 137.3, 150.4, 153.9, 157.7, 160.6 (d, ¹*J*_{CF} = 247.4 Hz), 161.7 (C=O)

C₂₈H₂₅ClFN₃O₃ [505.97]

HPLC 25 Minuten Laufzeit, Gradientenelution (50 % Acetonitril in H₂O bis 100 % Acetonitril in 20 Minuten), Flussrate: 1.0 mL/min, Retentionszeit: 10.715 min (99.8 % AUC)

3-(3-Chlor-4-methylphenyl)-4-(2-fluorophenyl)-5-(4-methoxyphenethyl)-4,5-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-6(2H)-on **65**



Hergestellt aus 480 mg **60** (1.0 mmol, 1.0 eq) und 73 μ L Hydrazin-Monohydrat (75 mg, 1.5 mmol, 1.5 eq) nach **AAV 3**.

Ausbeute 11 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 227 °C

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 2.24-2.26 (m, 3H, PhCH₃), 2.59-2.64 (m, 1H, NCH₂CH₂), 2.84 (m, 2H, NCH₂CH₂), 3.69 (s, 3H, OCH₃), 3.78-3.88 (m, 1H, NCH₂CH₂), 6.08 (s, 1H, CH), 6.81-6.83 (m, 2H, H_{Ar}), 7.05 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H_{Ar}), 7.19-7.42 (m, 7H, H_{Ar}), 14.02 (s, 1H, NH)

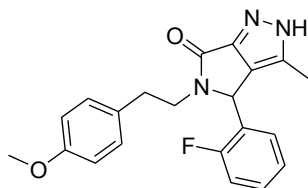
$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 19.1 (PhCH₃), 32.8 (major NCH₂CH₂), 32.9 (minor NCH₂CH₂), 42.0 (major NCH₂CH₂), 42.2 (minor NCH₂CH₂), 53.2 (CH), 54.8 (OCH₃), 113.8, 116.0 (d, $^2J_{\text{CF}} = 21.3$ Hz), 122.8 (d, $J = 11.4$ Hz), 123.8 (major), 123.9 (minor), 124.5, 125.2, 125.6 (major), 125.7 (minor), 127.1 (major), 128.4 (minor), 129.3, 130.0, 130.26 (major), 130.34 (minor), 131.0 (d, $^3J_{\text{CF}} = 8.3$ Hz), 131.4 (minor), 131.7 (major), 133.4 (minor), 133.8 (major), 134.6 (major), 134.9 (minor), 135.8, 142.1 (d, $J = 42.5$ Hz), 151.0, 157.7 (major), 157.8 (minor), 160.8 (d, $^1J_{\text{CF}} = 247.8$ Hz), 161.6 (C=O)

C₂₇H₂₃ClFN₃O₂ [475.94]

Berechnet [%] C = 68.14, H = 4.87, N = 8.83

Gefunden [%] C = 67.87, H = 4.71, N = 8.59

4-(2-Fluorophenyl)-5-(4-methoxyphenethyl)-3-methyl-4,5-dihydropyrrolo[3,4-c]-pyrazol-6(2H)-on **66**



Hergestellt aus 443 mg **61** (1.2 mmol, 1.0 eq) und 87 μ L Hydrazin-Monohydrat (90 mg, 1.8 mmol, 1.5 eq) nach **AAV 3**.

Ausbeute 97 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 215 °C

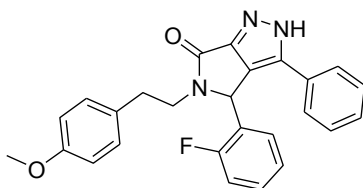
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 2.02 (s, 3H, CH_3), 2.59-2.63 (m, 1H, NCH_2CH_2), 2.77-2.81 (m, 1H, NCH_2CH_2), 2.85-2.90 (m, 1H, NCH_2CH_2), 3.69 (s, 3H, OCH_3), 3.86-3.90 (m, 1H, NCH_2CH_2), 5.66 (s, 1H, CH), 6.81 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H_{Ar}), 7.03 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H_{Ar}), 7.07 (t, $J = 6.7$ Hz, 1H, H_{Ar}), 7.19 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, H_{Ar}), 7.27 (m, 1H, H_{Ar}), 7.40 (dd, $J = 13.4$, 6.9 Hz, 1H, H_{Ar}), 13.18 (s, 0.9H, NH), 13.38 (br s, 0.1H, NH)

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 9.1 (CH_3), 32.8 (NCH_2CH_2), 42.1 (NCH_2CH_2), 52.3 (CH), 54.9 (OCH_3), 113.8, 115.9 (d, $^2J_{\text{CF}} = 21.2$ Hz), 123.7 (d, $J = 12.3$ Hz), 125.1, 125.2 (d, $^4J_{\text{CF}} = 2.8$ Hz), 128.6, 129.4, 130.4 (d, $^3J_{\text{CF}} = 8.1$ Hz), 130.5, 132.4, 149.6, 157.7, 160.5 (d, $^1J_{\text{CF}} = 246.3$ Hz), 162.5 (C=O)

$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{FN}_3\text{O}_2$ [365.40]

HPLC 25 Minuten Laufzeit, Gradientenelution (50 % Acetonitril in H_2O bis 100 % Acetonitril in 20 Minuten), Flussrate: 1.0 mL/min, Retentionszeit: 6.800 min (99.7 % AUC)

4-(2-Fluorphenyl)-5-(4-methoxyphenethyl)-3-phenyl-4,5-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-6(2H)-on **67**



Hergestellt aus 431 mg **62** (1.0 mmol, 1.0 eq) und 73 µL Hydrazin-Monohydrat (75 mg, 1.5 mmol, 1.5 eq) nach **AAV 3**.

Ausbeute 93 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 226 °C

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.57-2.63 (m, 1H, NCH₂CH₂), 2.80-2.87 (m, 2H, NCH₂CH₂), 3.69 (s, 3H, OCH₃), 3.80-3.88 (m, 1H, NCH₂CH₂), 6.07 (s, 1H, CH), 6.82 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.05 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.18-7.48 (m, 9H, H_{Ar}), 13.97 (s, 0.2H, NH), 14.01 (s, 0.8H, NH)

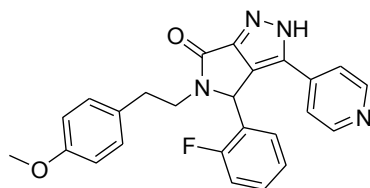
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 32.8 (NCH₂CH₂), 42.0 (NCH₂CH₂), 54.9 (OCH₃), 61.3 (CH), 113.8, 116.0 (d, ²*J*_{CF} = 21.1 Hz), 123.0 (d, *J*_{CF} = 11.8 Hz), 124.2, 125.2, 125.4, 127.7, 128.5, 128.9, 129.4, 130.4, 131.0 (d, ³*J*_{CF} = 8.1 Hz), 136.0, 151.0, 157.7, 160.8 (d, ¹*J*_{CF} = 247.3 Hz), 161.7 (C=O)

C₂₆H₂₂FN₃O₂ [427.47]

Berechnet [%] C = 73.05, H = 5.19, N = 9.83

Gefunden [%] C = 73.26, H = 5.29, N = 9.76

4-(2-Fluorphenyl)-5-(4-methoxyphenethyl)-3-(pyridin-4-yl)-4,5-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-6(2H)-on **68**



Hergestellt aus 432 mg **63** (1.0 mmol, 1.0 eq) und 73 μ L Hydrazin-Monohydrat (75 mg, 1.5 mmol, 1.5 eq) nach **AAV 3**.

Ausbeute 35 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt > 250 °C

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.58-2.63 (m, 1H, NCH₂CH₂), 2.80-2.89 (m, 2H, NCH₂CH₂), 3.69 (s, 3H, OCH₃), 3.81-3.87 (m, 1H, NCH₂CH₂), 6.16 (s, 1H, CH), 6.82 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.05 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.20-7.26 (m, 2H, H_{Ar}), 7.37-7.43 (m, 4H, H_{Ar}), 8.48-8.55 (m, 2H, H_{Ar}), 14.30 (s, 0.4H, NH), 14.36 (s, 0.6H, NH)

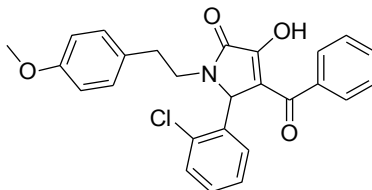
¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 32.8 (major NCH₂CH₂), 32.9 (minor NCH₂CH₂), 42.0 (major NCH₂CH₂), 42.3 (minor NCH₂CH₂), 53.5 (CH), 54.9 (OCH₃), 113.8, 116.1 (d, $^2J_{CF}$ = 21.1 Hz), 119.4, 119.9, 122.5 (d, J = 11.1 Hz), 125.2, 126.2, 129.4, 130.3, 131.2 (d, $^3J_{CF}$ = 7.4 Hz), 133.6, 134.5, 150.0, 153.3, 151.4, 157.7, 160.8 (d, $^1J_{CF}$ = 247.9 Hz), 161.3 (C=O)

C₂₅H₂₁FN₄O₂ [428.46]

HPLC 25 Minuten Laufzeit, Gradientenelution (50 % Acetonitril in H₂O bis 100 % Acetonitril in 20 Minuten), Flussrate: 1.0 mL/min, Retentionszeit: 6.908 min (99.8 % AUC)

6.8. Analytische Daten der Verbindungen aus Kapitel 3.4.8.

4-Benzoyl-5-(2-chlorphenyl)-3-hydroxy-1-(4-methoxyphenethyl)-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on **69**



Hergestellt aus 1.1 g **XLII** (5.0 mmol, 1.0 eq), 703 mg 2-Chlorbenzaldehyd (**XLV**, 5.0 mmol, 1.0 eq) und 756 mg 2-(4-Methoxyphenyl)ethylamin (**VII**, 5.0 mmol, 1.0 eq) nach **AAV 2**.

Ausbeute 45 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 241 °C (Zersetzung)

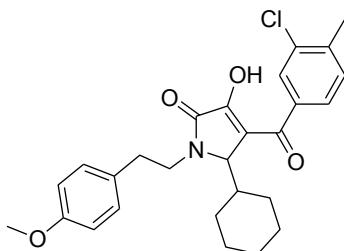
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.61 (br s, 1H, NCH₂CH₂), 2.79 (br s, 2H, NCH₂CH₂), 3.70-3.89 (m, 4H, NCH₂CH₂ & OCH₃), 5.49 (s, 0.2H, CH), 5.95 (s, 0.8H, CH), 6.84 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.03 (d, *J* = 4.7 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.27-7.70 (m, 9H, H_{Ar}), 11.96 (br s, 1H, OH)

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 32.6 (NCH₂CH₂), 42.1 (NCH₂CH₂), 54.9 (OCH₃), 56.3 (CH), 113.8, 127.2, 127.7, 127.9, 128.0, 128.5, 129.3, 129.5, 129.91, 129.94, 130.2, 130.3, 132.3, 132.4, 133.7, 134.4, 134.9, 138.0, 152.1, 157.8, 165.1 (C=O), 188.8 (C=O)

C₂₆H₂₂ClNO₄ [447.91]

HPLC 25 Minuten Laufzeit, Gradientenelution (50 % Acetonitril in H₂O bis 100 % Acetonitril in 20 Minuten), Flussrate: 1.0 mL/min, Retentionszeit: 15.419 min (99.9 % AUC)

4-(3-Chlor-4-methylbenzoyl)-5-cyclohexyl-3-hydroxy-1-(4-methoxyphenethyl)-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on **70**



Hergestellt aus 1.34 g **58** (5.0 mmol, 1.0 eq), 561 mg Cyclohexancarbaldehyd (**XLVI**, 5.0 mmol, 1.0 eq) und 756 mg 2-(4-Methoxyphenyl)ethylamin (**VII**, 5.0 mmol, 1.0 eq) nach **AAV 2**.

Ausbeute 35 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 234 °C (Zersetzung)

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 0.72 (m, 1H, CH₂(Cyclohexyl)), 0.85-0.99 (m, 2H, CH₂(Cyclohexyl)), 1.10-1.18 (m, 2H, CH₂(Cyclohexyl)), 1.40 (d, ³J_{HH} = 12.3 Hz, 1H, CH₂(Cyclohexyl)), 1.54-1.61 (m, 3H, CH₂(Cyclohexyl)), 1.67 (d, ³J_{HH} = 12.4 Hz, 1H, CH₂(Cyclohexyl)), 1.88 (dt, *J* = 12.3, 2.3 Hz, 1H, CH(Cyclohexyl)), 2.40 (s, 3H, PhCH₃), 2.76-2.81 (m, 1H, NCH₂CH₂), 2.86-2.90 (m, 1H, NCH₂CH₂), 3.26-3.30 (m, 1H, NCH₂CH₂), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 3.96-4.01 (m, 1H, NCH₂CH₂), 4.45 (d, ³J_{HH} = 2.5 Hz, 1H, CH), 6.85 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.15 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.50 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.61 (dd, *J* = 7.8, 1.3 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.69 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, H_{Ar}), 10.94 (s, 0.1H, OH), 11.36 (s, 0.9H, OH)

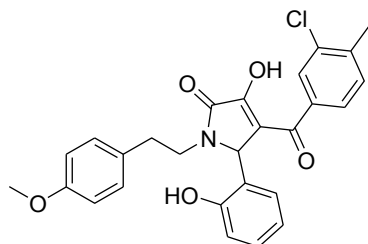
¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 19.7 (PhCH₃), 25.7, 26.0, 26.2, 26.6, 32.5 (NCH₂CH₂), 41.9 (NCH₂CH₂), 54.9 (OCH₃), 60.6 (CH), 113.7, 117.6, 119.8, 127.8, 128.9, 129.5, 130.4, 131.3, 133.3, 136.9, 140.8, 150.7, 157.7

C₂₇H₃₀ClNO₄ [467.98]

Berechnet [%] C = 69.29, H = 6.46, N = 2.99

Gefunden [%] C = 69.43, H = 6.47, N = 2.82

4-(3-Chlor-4-methylbenzoyl)-3-hydroxy-5-(2-hydroxyphenyl)-1-(4-methoxyphenethyl)-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on **71**



Hergestellt aus 134 mg **58** (0.5 mmol, 1.0 eq), 61 mg Salicylaldehyd (**XLVII**, 0.5 mmol, 1.0 eq) und 76 mg 2-(4-Methoxyphenyl)ethylamin (**VII**, 0.5 mmol, 1.0 eq) nach **AAV 2**.

Ausbeute 40 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 230 °C (Zersetzung)

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.37 (s, 3H, PhCH₃), 2.56-2.61 (m, 1H, CH₂), 2.78-2.84 (m, 2H, CH₂), 3.70 (s, 3H, OCH₃), 3.73-3.77 (m, 1H, CH₂), 5.86 (br s, 1H, CH), 6.74 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.82 (m, 3H, H_{Ar}), 7.02 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.08-7.11 (m, 2H, H_{Ar}), 7.43 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.58 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.67 (s, 1H, H_{Ar}), 9.82 (br s, 1H, OH), 11.67 (br s, 1H, OH)

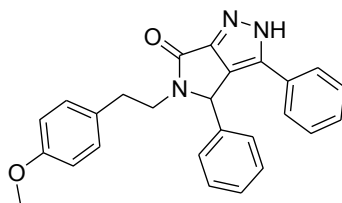
¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 19.7 (PhCH₃), 32.6 (NCH₂CH₂), 41.8 (NCH₂CH₂), 54.9 (OCH₃), 113.7, 115.7, 118.3, 119.2, 127.3, 128.8, 129.2, 129.4, 130.4, 130.9, 132.9, 137.6, 140.1, 156.2, 157.7, 164.7 (C=O), 187.4 (C=O)

C₂₇H₂₄ClNO₅ [477.94]

Berechnet [%] C = 67.85, H = 5.06, N = 2.93

Gefunden [%] C = 68.08, H = 5.15, N = 2.81

5-(4-Methoxyphenethyl)-3,4-diphenyl-4,5-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-6(2H)-on **72**



Hergestellt aus 413 mg **XLVIII** (1.0 mmol, 1.0 eq) und 73 μ L Hydrazin-Monohydrat (75 mg, 1.5 mmol, 1.5 eq) nach **AAV 3**.

Ausbeute 76 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 214 °C

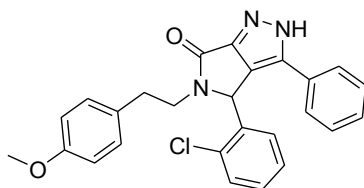
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 2.55-2.60 (m, 1H, NCH_2CH_2), 2.76-2.83 (m, 2H, NCH_2CH_2), 3.69 (s, 3H, OCH_3), 3.77-3.86 (m, 1H, NCH_2CH_2), 5.85 (s, 1H, CH), 6.82 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H_{Ar}), 7.06 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H_{Ar}), 7.20-7.50 (m, 10H, H_{Ar}), 13.94 (s, 0.2H, NH), 13.99 (s, 0.8H, NH)

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 32.8 (NCH_2CH_2), 41.7 (NCH_2CH_2), 54.9 (OCH_3), 58.6 (CH), 113.8, 125.3, 125.5, 125.7, 127.7, 127.9, 128.36, 128.41, 128.6, 128.8, 128.9, 129.4, 130.5, 136.1, 136.6, 150.9, 157.7, 161.5 (C=O)

$\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_2$ [409.48]

HPLC 25 Minuten Laufzeit, isokratische Elution (90 % MeOH in H_2O), Flussrate 1.0 mL/min: Retentionszeit: 44.515 min (99.7 % AUC)

4-(2-Chlorphenyl)-5-(4-methoxyphenethyl)-3-phenyl-4,5-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-6(2H)-on **73**



Hergestellt aus 447 mg **69** (1.0 mmol, 1.0 eq) und 73 μ L Hydrazin-Monohydrat (75 mg, 1.5 mmol, 1.5 eq) nach **AAV 3**.

Ausbeute 76 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 213 °C

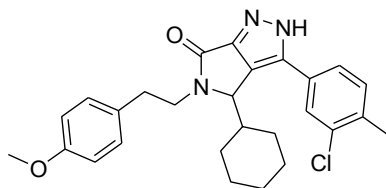
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 2.55-2.65 (m, 1H, NCH_2CH_2), 2.75-2.88 (m, 2H, NCH_2CH_2), 3.68 (s, 3H, OCH_3), 3.76-3.92 (m, 1H, NCH_2CH_2), 6.02 (s, 0.2H, CH), 6.25 (s, 0.8H, CH), 6.80-6.83 (m, 3H, H_{Ar}), 7.05 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H_{Ar}), 7.22-7.61 (m, 8H, H_{Ar}), 13.91 (br s, 0.2H, NH), 14.08 (br s, 0.8H, NH)

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 32.9 (NCH_2CH_2), 42.2 (NCH_2CH_2), 54.5 (CH), 54.8 (OCH_3), 113.8, 124.9, 125.3, 127.6, 128.4, 128.5, 128.7, 128.9, 129.3, 129.5, 130.2, 130.5, 133.5, 136.1, 150.9, 157.7, 161.7 (C=O)

$\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{ClN}_3\text{O}_2$ [443.92]

HPLC 25 Minuten Laufzeit, isokratische Elution (80 % MeOH in H_2O),
Flussrate: 1.0 mL/min, Retentionszeit: 12.696 min (98.8 % AUC)

3-(3-Chlor-4-methylphenyl)-4-cyclohexyl-5-(4-methoxyphenethyl)-4,5-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-6(2H)-on **74**



Hergestellt aus 468 mg **70** (1.0 mmol, 1.0 eq) und 73 μ L Hydrazin-Monohydrat (75 mg, 1.5 mmol, 1.5 eq) nach **AAV 3**.

Ausbeute 30 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 213 °C

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 0.31-0.46 (m, 1H, CH₂(Cyclohexyl)), 0.66-0.78 (m, 2H, CH₂(Cyclohexyl)), 1.03-1.14 (m, 2H, CH₂(Cyclohexyl)), 1.21 (d, ³J_{HH} = 12.1 Hz, 0.8H, CH₂(Cyclohexyl)), 1.26 (d, ³J_{HH} = 12.3 Hz, 0.2 Hz, CH₂(Cyclohexyl)), 1.45-1.51 (m, 3H, CH₂(Cyclohexyl)), 1.59 (d, ³J_{HH} = 11.8 Hz, 1H, CH₂(Cyclohexyl)), 1.95 (dt, *J* = 11.9, 2.6 Hz, 1H, CH₂(Cyclohexyl)), 2.36 (s, 0.4H, PhCH₃), 2.37 (s, 2.6H, PhCH₃), 2.75-2.82 (m, 1H, NCH₂CH₂), 2.88-2.93 (m, 1H, NCH₂CH₂), 3.20-3.24 (m, 1H, NCH₂CH₂), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 3.93-4.02 (m, 1H, NCH₂CH₂), 4.90 (d, ³J_{HH} = 3.1 Hz, 1H, CH), 6.85 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.19 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.40 (d, *J* = 7.8 Hz, 0.2H, H_{Ar}), 7.46 (d, *J* = 7.9 Hz, 0.8H, H_{Ar}), 7.50 (dd, *J* = 7.9, 1.5 Hz, 0.8H, H_{Ar}), 7.54 (d, *J* = 7.6 Hz, 0.2H, H_{Ar}), 7.68 (s, 0.2H, H_{Ar}), 7.70 (d, *J* = 1.3 Hz, 0.8H, H_{Ar}), 13.73 (s, 0.8H, NH), 13.84 (s, 0.2H, NH)

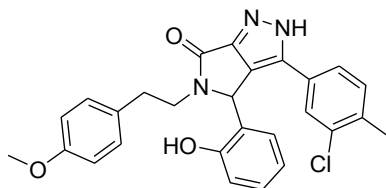
¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 19.29 (minor PhCH₃), 19.32 (major PhCH₃), 25.2 (major CH₂), 25.3 (minor CH₂), 25.4 (major CH₂), 25.81 (major CH₂), 25.86 (minor CH₂), 25.92 (major CH₂), 25.96 (minor CH₂), 30.15 (minor CH), 30.24 (major CH), 32.8 (major NCH₂CH₂), 32.9 (minor NCH₂CH₂), 41.8 (major NCH₂CH₂), 42.1 (minor NCH₂CH₂), 54.9 (OCH₃), 59.2 (major CH), 59.5 (minor CH), 113.7, 122.9, 127.1 (minor), 127.2 (major), 127.3 (minor), 128.5 (major), 129.5, 130.7 (minor), 130.8 (major), 131.1 (minor), 131.5 (major), 132.6 (minor), 133.2 (minor), 133.5 (major), 134.9 (minor), 135.4 (major), 135.8 (major), 142.5 (minor), 143.2 (minor), 151.7 (major), 157.7 (major), 158.3 (minor C=O), 162.1 (major C=O)

C₂₇H₃₀ClN₃O₂ [464.00]

Berechnet [%] C = 69.89, H = 6.52, N = 9.06

Gefunden [%] C = 69.95, H = 6.45, N = 8.97

3-(3-Chlor-4-methylphenyl)-4-(2-hydroxyphenyl)-5-(4-methoxyphenethyl)-4,5-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-6(2H)-on **75**



Hergestellt aus 239 mg **71** (0.5 mmol, 1.0 eq) und 37 μ L Hydrazin-Monohydrat (38 mg, 0.75 mmol, 1.5 eq) nach **AAV 3**.

Ausbeute 62 %, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt 239 °C (Zersetzung)

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.26 (s, 3H, PhCH₃), 2.59-2.64 (m, 1H, NCH₂CH₂), 2.79-2.86 (m, 2H, NCH₂CH₂), 3.69 (s, 3H, OCH₃), 3.84 (br s, 1H, NCH₂CH₂), 6.20 (br s, 1H, CH), 6.46-6.72 (m, 2H, H_{Ar}), 6.80-6.83 (m, 2H, H_{Ar}), 6.91-7.05 (m, 3H, H_{Ar}), 7.15 (t, 1H, J = 8.3 Hz, 1H H_{Ar}), 7.30 (br s, 1H, H_{Ar}), 7.36 (br s, 1H, H_{Ar}), 7.47 (s, 1H, H_{Ar}), 10.26 (br s, 1H, OH), 13.93 (s, 1H, NH)

¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 19.2 (PhCH₃), 32.8 (NCH₂CH₂), 41.8 (NCH₂CH₂), 54.9 (OCH₃), 113.8, 115.8, 119.7, 121.2, 123.8, 125.7, 127.5, 129.4, 129.7, 130.6, 131.6, 133.9, 134.3, 135.5, 156.0, 157.7

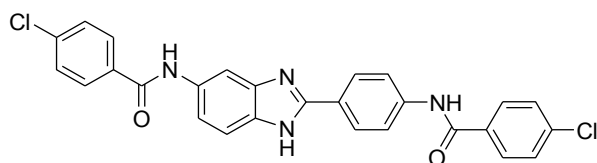
C₂₇H₂₄ClN₃O₃ [473.95]

HPLC 25 Minuten Laufzeit, Gradientenelution (50 % Acetonitril in H₂O bis 100 % Acetonitril in 20 Minuten), Flussrate: 1.0 mL/min, Retentionszeit: 10.293 min (95.7 % AUC)

6.9. Analytische Daten der Verbindungen aus Kapitel 3.5.3.

4-Chlor-*N*-(4-(5-(4-chlorbenzamid)-1*H*-benz[*d*]imidazol-2-yl)phenyl)benzamid

II (MMV006962)



Hergestellt aus 224 mg **LVI** (1.0 mmol, 1.0 eq) und 438 mg 4-Chlorbenzoylchlorid (2.5 mmol, 2.5 eq) nach **AAV 6**.

Ausbeute 83 %, beiger Feststoff

Schmelzpunkt > 250 °C

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 7.61-7.64 (m, 6H, H_{Ar}), 8.00-8.04 (m, 6H, H_{Ar}), 8.19 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H_{Ar}), 8.26 (s, 1H, H_{Ar}), 10.45 (s, 1H, NHCO), 10.62 (s, 1H, NHCO)

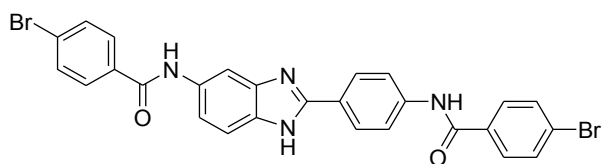
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 105.2, 115.0, 116.9, 120.7, 123.3, 127.2, 128.3, 128.4, 129.6, 129.7, 133.2, 133.7, 134.7, 136.2, 136.6, 141.1, 150.5, 164.3 (C=O), 164.6 (C=O)

C₂₇H₁₈Cl₂N₄O₂ [501.36]

HRMS [M + H]⁺ berechnet: 501.0880
[M + H]⁺ gefunden: 501.0880

HPLC 25 Minuten Laufzeit, Gradientenelution (50 % Acetonitril in H₂O bis 100 % Acetonitril in 20 Minuten), Flussrate: 1.0 mL/min,
Retentionszeit: 10.019 min (95.8 % AUC)

4-Brom-*N*-(4-(5-(4-brombenzamid)-1*H*-benz[*d*]imidazol-2-yl)phenyl)benzamid **LXIII**



Hergestellt aus 224 mg **LVI** (1.0 mmol, 1.0 eq) und 729 mg 4-Brombenzoylchlorid (2.5 mmol, 2.5 eq) nach **AAV 6**.

Ausbeute 81 %, beiger Feststoff

Schmelzpunkt > 250 °C

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 7.51-7.56 (m, 2H, H_{Ar}), 7.77 (m, 4H, H_{Ar}), 7.94-7.97 (m, 6H, H_{Ar}), 8.14-8.17 (m, 3H, H_{Ar}), 10.35 (s, 1H, NHCO), 10.53 (s, 1H, NHCO), 12.82 (br s, 1H, NH)

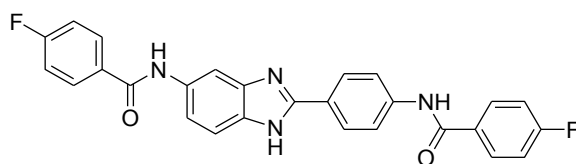
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 125.0, 125.4, 125.5, 129.7, 129.8, 131.3, 131.4, 133.7, 134.2, 140.3, 164.3 (C=O), 164.7 (C=O)

C₂₇H₁₈NBr₂N₄O₂ [590.27]

HRMS [M + H]⁺ berechnet: 588.9869
[M + H]⁺ gefunden: 588.9872

HPLC 25 Minuten Laufzeit, isokratische Elution (100% Acetonitril),
Flussrate: 1.0 mL/min, Retentionszeit: 3.899 min (92.3 % AUC)

4-Fluor-*N*-(4-(5-(4-fluorbenzamid)-1*H*-benz[d]imidazol-2-yl)phenyl)benzamid **LXIV**



Hergestellt aus 224 mg **LVI** (1.0 mmol, 1.0 eq) und 396 mg 4-Fluorbenzoylchlorid (2.5 mmol, 2.5 eq) nach **AAV 6**.

Ausbeute 59 %, beiger Feststoff

Schmelzpunkt > 250 °C

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 7.36-7.41 (m, 4H, H_{Ar}), 7.52 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.57 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.97 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 8.08 (dd, *J* = 8.2, 5.7 Hz, 2H, H_{Ar}), 8.15-8.19 (m, 3H, H_{Ar}), 10.31 (s, 1H, NHCO), 10.50 (s, 1H, NHCO)

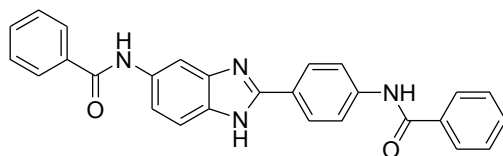
¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 115.7 (d, ²*J*_{CF} = 18.5 Hz), 115.9 (d, ²*J*_{CF} = 18.7 Hz), 116.2, 120.3, 125.2, 126.8, 130.8 (d, ³*J*_{CF} = 9.0 Hz), 131.0 (d, ³*J*_{CF} = 8.9 Hz), 131.7 (d, ⁴*J*_{CF} = 2.8 Hz), 132.1 (d, ⁴*J*_{CF} = 2.3 Hz), 134.0, 140.5, 151.3, 164.2 (C=O), 164.4 (d, ¹*J*_{CF} = 248.8 Hz), 164.6 (C=O), 164.7 (d, ¹*J*_{CF} = 249.8 Hz)

C₂₇H₁₈F₂N₄O₂ [468.45]

HRMS [M + H]⁺ berechnet: 469.1471
[M + H]⁺ gefunden: 469.1470

HPLC 25 Minuten Laufzeit, isokratische Elution (70 % MeOH in H₂O),
Flussrate: 1.0 mL/min, Retentionszeit: 16.437 min (97.1 % AUC)

N-(4-(5-benzamid-1*H*-benz[*d*]imidazol-2-yl)phenyl)benzamid **LXV**



Hergestellt aus 112 mg **LVI** (0.5 mmol, 1.0 eq) und 176 mg Benzoylchlorid (1.25 mmol, 2.5 eq) nach **AAV 6**.

Ausbeute 74 %, beiger Feststoff

Schmelzpunkt > 250 °C

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 7.55-7.62 (m, 8H, H_{Ar}), 8.00-8.01 (m, 6H, H_{Ar}), 8.17 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H_{Ar}), 8.12 (s, 1H, H_{Ar}), 10.33 (s, 1H, NHCO), 10.52 (s, 1H, NHCO)

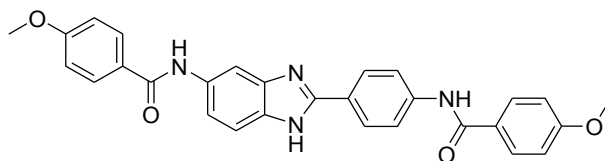
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 116.3, 120.2, 124.7, 126.9, 127.6, 127.7, 128.3, 128.4, 131.3, 131.7, 134.3, 134.7, 135.2, 140.8, 151.1, 165.4 (C=O), 165.7 (C=O)

C₂₇H₂₀N₄O₂ [432.47]

HRMS [M + H]⁺ berechnet: 433.1659
[M + H]⁺ gefunden: 433.1662

HPLC 25 Minuten Laufzeit, Gradientenelution (50 % Acetonitril in H₂O bis 100 % Acetonitril in 20 Minuten), Flussrate: 1.0 mL/min,
Retentionszeit: 6.696 min (96.3 % AUC)

4-Methoxy-*N*-(4-(5-(4-methoxybenzamid)-1*H*-benz[*d*]imidazol-2-yl)phenyl)benzamid **LXVI**



Hergestellt aus 224 mg **LVI** (1.0 mmol, 1.0 eq) und 426 mg 4-Methoxybenzoylchlorid (2.5 mmol, 2.5 eq) nach **AAV 6**.

Ausbeute 66 %, beiger Feststoff

Schmelzpunkt > 250 °C

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 3.848 (s, 3H, OCH₃), 3.852 (s, 3H, OCH₃), 7.07-7.10 (m, 4H, H_{Ar}), 7.51-7.57 (m, 2H, H_{Ar}), 7.97-8.01 (m, 6H, H_{Ar}), 8.13-8.15 (m, 2H, H_{Ar}), 8.18 (s, 1H, H_{Ar}), 10.14 (s, 1H, NHCO), 10.33 (s, 1H, NHCO)

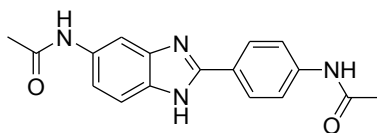
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 55.3 (OCH₃), 55.4 (OCH₃), 113.5, 113.6, 120.1, 124.8, 126.7, 126.8, 127.2, 129.9, 130.1, 141.2, 151.6, 162.1, 162.4, 165.1 (C=O), 165.5 (C=O)

C₂₉H₂₄N₄O₄ [492.53]

HRMS [M + H]⁺ berechnet: 493.1870
[M + H]⁺ gefunden: 493.1870

HPLC 25 Minuten Laufzeit, Gradientenelution (50 % Acetonitril in H₂O bis 100 % Acetonitril in 20 Minuten), Flussrate: 1.0 mL/min,
Retentionszeit: 6.941 min (91.2 % AUC)

N-(4-(5-Acetamid-1*H*-benz[*d*]imidazol-2-yl)phenyl)acetamid **LXVII**



Hergestellt aus 168 mg **LVI** (0.75 mmol, 1.0 eq) und 147 mg Acetylchlorid (1.875 mmol, 2.5 eq) nach **AAV 6**.

Ausbeute 81 %, beiger Feststoff

Schmelzpunkt > 250 °C

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 2.08 (s, 3H, CH₃), 2.10 (s, 3H, CH₃), 7.32 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.54 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.78 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 8.09 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H_{Ar}), 8.13 (s, 1H, H_{Ar}), 10.10 (s, 1H, NHCO), 10.31 (s, 1H, NHCO)

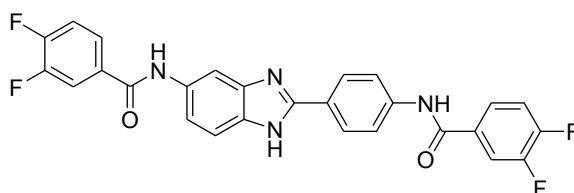
¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 24.5 (CH₃), 24.6 (CH₃), 104.1, 115.7, 116.1, 119.4, 123.0, 127.9, 134.6, 135.8, 136.7, 142.0, 150.8, 168.7 (C=O), 169.3 (C=O)

C₁₇H₁₆N₄O₂ [308.33]

HRMS [M + H]⁺ berechnet: 309.1346
[M + H]⁺ gefunden: 309.1344

HPLC 25 Minuten Laufzeit, isokratische Elution (70 % MeOH in H₂O),
Flussrate: 1.0 mL/min, Retentionszeit: 16.437 min (99.7 % AUC)

N-(4-(5-(3,4-Difluorbenzamid)-1*H*-benz[*d*]imidazol-2-yl)phenyl)-3,4-difluorbenzamid **76**



Hergestellt aus 224 mg **LVI** (1.0 mmol, 1.0 eq) und 441 mg 3,4-Difluorbenzoylchlorid (2.5 mmol, 2.5 eq) nach **AAV 6**.

Ausbeute 65 %, beiger Feststoff

Schmelzpunkt > 250 °C

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 7.51 (dd, *J* = 8.6, 1.7 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.57-7.66 (m, 3H, H_{Ar}), 7.90-7.91 (m, 2H, H_{Ar}), 7.96 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H_{Ar}), 8.07 (ddd, *J* = 11.0, 7.8, 2.1 Hz, 2H, H_{Ar}), 8.16 (d, *J* = 8.8 Hz, 3H, H_{Ar}), 10.36 (s, 1H, NHCO), 10.54 (s, 1H, NHCO)

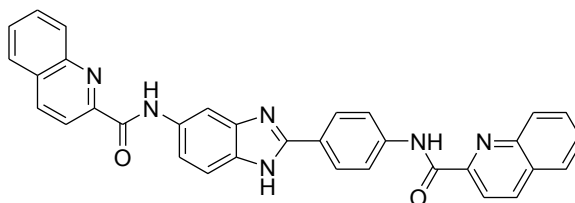
¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 116.2, 117.1 (dd, *J* = 22.1, 18.6 Hz), 117.6 (dd, *J*₁ = *J*₂ = 17.9 Hz), 120.3, 125.1 (dd, *J* = 7.3, 3.2 Hz), 125.3 (dd, *J* = 7.6, 3.0 Hz), 126.8, 132.0 (dd, *J* = 4.5, 3.6 Hz), 132.5 (dd, *J* = 4.0, 3.6 Hz), 133.8, 140.2, 149.0 (dd, *J* = 246.7, 2.7 Hz), 149.1 (dd, *J* = 246.7, 3.0 Hz), 151.3, 151.4 (dd, *J* = 251.2, 13.0 Hz), 151.6 (dd, *J* = 251.7, 12.5 Hz), 163.0 (C=O), 163.3 (C=O)

C₂₇H₁₆F₄N₄O₂ [504.44]

HRMS [M + H]⁺ berechnet: 505.1282
[M + H]⁺ gefunden: 505.1281

HPLC 25 Minuten Laufzeit, Gradientenelution (50 % Acetonitril in H₂O bis 100 % Acetonitril in 20 Minuten), Flussrate: 1.0 mL/min,
Retentionszeit: 9.299 min (97.1 % AUC)

N-(4-(5-(Chinolin-2-carboxamid)-1*H*-benz[d]imidazol-2-yl)phenyl)chinolin-2-carboxamid **77**



Hergestellt aus 112 mg **LVI** (0.5 mmol, 1.0 eq) und 240 mg Chinolin-2-carbonsäurechlorid (1.25 mmol, 2.5 eq) nach **AAV 6**.

Ausbeute 53 %, orangener Feststoff

Schmelzpunkt > 250 °C

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 7.63 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.71 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.75-7.79 (m, 2H, H_{Ar}), 7.92-7.96 (m, 2H, H_{Ar}), 8.13-8.15 (m, 2H, H_{Ar}), 8.17 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 8.22 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 8.27-8.30 (m, 4H, H_{Ar}), 8.38 (s, 1H, H_{Ar}), 8.64-8.67 (m, 2H, H_{Ar}), 10.80 (s, 1H, NHCO), 10.97 (s, 1H, NHCO), 12.90 (br s, 1H, NH)

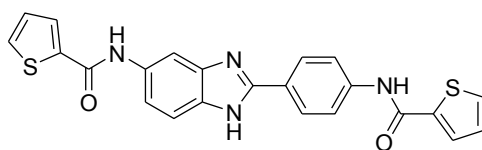
¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 118.7, 120.3, 125.6, 126.9, 128.06, 128.09, 128.2, 128.4, 128.8, 128.9, 129.3, 130.6, 130.7, 138.1, 138.2, 139.6, 145.8, 149.8, 150.3, 162.4 (C=O), 162.9 (C=O)

C₃₃H₂₂N₆O₂ [534.57]

HRMS [M + H]⁺ berechnet: 535.1877
[M + H]⁺ gefunden: 535.1867

HPLC 25 Minuten Laufzeit, isokratische Elution (75 % Acetonitril in H₂O),
Flussrate: 1.0 mL/min, Retentionszeit: 7.717 min (93.3 % AUC)

N-(4-(5-(Thiophen-2-carboxamid)-1*H*-benz[*d*]imidazol-2-yl)phenyl)thiophen-2-carboxamid **78**



Hergestellt aus 224 mg **LVI** (1.0 mmol, 1.0 eq) und 366 mg Thiophen-2-carbonsäurechlorid (2.5 mmol, 2.5 eq) nach **AAV 6**.

Ausbeute 76 %, beiger Feststoff

Schmelzpunkt > 250 °C

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 7.24 (dd, *J* = 4.9, 3.8 Hz, 1H, H_{Thienyl}), 7.25 (dd, *J* = 4.9, 3.8 Hz, 1H, H_{Thienyl}), 7.63-7.67 (m, 2H, H_{Ar}), 7.86 (dd, *J* = 5.0, 1.0 Hz, 1H, H_{Thienyl}), 7.90 (dd, 1H, *J* = 5.0, 1.0 Hz, H_{Thienyl}), 8.01 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H_{Ar}), 8.11 (dd, *J* = 3.7, 0.8 Hz, 1H, H_{Thienyl}), 8.14 (dd, *J* = 3.8, 0.9 Hz, 1H, H_{Thienyl}), 8.21 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H_{Ar}), 8.24 (s, 1H, H_{Ar}), 10.44 (s, 1H, NHCO), 10.61 (s, 1H, NHCO)

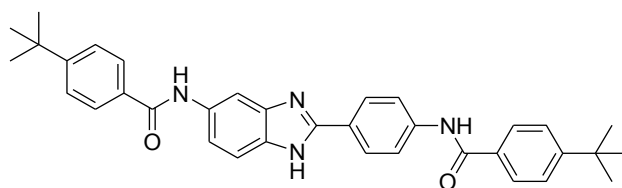
¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 105.1, 114.9, 117.3, 120.2, 122.2, 127.6, 128.0, 128.1, 129.1, 129.7, 131.7, 132.4, 134.9, 139.5, 140.0, 141.4, 150.2, 159.9 (C=O), 160.1 (C=O)

C₂₃H₁₆N₄O₂S₂ [444.53]

HRMS [M + H]⁺ berechnet: 445.0787
[M + H]⁺ gefunden: 445.0790

HPLC 25 Minuten Laufzeit, isokratische Elution (70 % MeOH in H₂O),
Flussrate: 1.0 mL/min, Retentionszeit: 8.984 min (97.2 % AUC)

4-*Tert*-butyl-*N*-(4-(5-(4-*tert*-butylbenzamid)-1*H*-benz[*d*]imidazol-2-yl)phenyl)benzamid **79**



Hergestellt aus 112 mg **LVI** (0.5 mmol, 1.0 eq) und 246 mg 4-*tert*-Butylbenzoylchlorid (1.25 mmol, 2.5 eq) nach **AAV 6**.

Ausbeute 64 %, beiger Feststoff

Schmelzpunkt 139 °C (Zersetzung)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.29 (s, 6H, C(CH₃)₃), 1.33 (s, 12H, C(CH₃)₃), 7.50-7.58 (m, 6H, H_{Ar}), 7.87-7.99 (m, 7H, H_{Ar}), 8.14-8.20 (m, 2H, H_{Ar}) 10.22 (s, 0.7H, NHCO), 10.41 (s, 0.7H, NHCO), 12.80 (br s, 1H, NH)

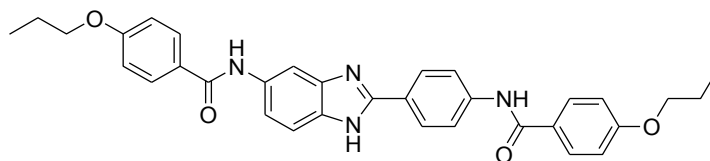
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 30.8 (m, C(CH₃)₃), 34.7 (m, C(CH₃)₃), 120.1, 125.0, 125.1, 125.3, 125.5, 126.7, 126.8, 127.4, 127.5, 128.0, 129.0, 129.1, 132.0, 132.5, 140.7, 154.1, 154.5, 155.7, 156.2, 165.3, 165.6, 167.2

C₃₅H₃₆N₄O₂ [544.69]

HRMS [M + H]⁺ berechnet: 545.2911
[M + H]⁺ gefunden: 545.2917

HPLC 25 Minuten Laufzeit, isokratische Elution (70 % MeOH in H₂O),
Flussrate: 1.0 mL/min, Retentionszeit: 7.795 min (91.0 % AUC)

4-Propoxy-*N*-(4-(5-(4-propoxybenzamid)-1*H*-benz[*d*]imidazol-2-yl)phenyl)benzamid **80**



Hergestellt aus 224 mg **LVI** (1.0 mmol, 1.0 eq) und 497 mg 4-Propoxybenzoylchlorid (2.5 mmol, 2.5 eq) nach **AAV 6**.

Ausbeute 58 %, beiger Feststoff

Schmelzpunkt > 250 °C

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 0.97-1.04 (m, 6H, OCH₂CH₂CH₃), 1.71-1.78 (m, 4H, OCH₂CH₂CH₃), 3.98-4.00 (m, 4H, OCH₂CH₂CH₃), 7.04 (d, *J* = 8.7 Hz, 4H, H_{Ar}), 7.75 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.87-7.91 (m, 1H, H_{Ar}), 8.00 (m, 4H, H_{Ar}), 8.12 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H_{Ar}), 8.33 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H_{Ar}), 8.48 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H_{Ar}), 10.44 (s, 1H, NHCO), 10.56 (s, 1H, NHCO), 15.42 (br s, 1H, NH)

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 10.2 (2xOCH₂CH₂CH₃), 21.85 (OCH₂CH₂CH₃), 21.87 (OCH₂CH₂CH₃), 69.11 (OCH₂CH₂CH₃), 69.14 (OCH₂CH₂CH₃), 103.8, 113.5, 113.9, 114.0, 114.1, 117.2, 119.1, 120.0, 122.7, 126.0, 126.3, 127.7, 128.5, 129.6, 129.8, 131.2, 131.9, 137.5, 143.8, 148.1, 161.4, 161.6, 165.0 (C=O), 165.3 (C=O)

C₃₃H₃₂N₄O₄ [548.63]

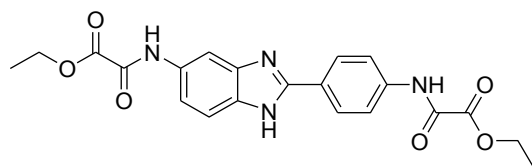
HRMS [M + H]⁺ berechnet: 549.2496

[M + H]⁺ gefunden: 549.2497

HPLC 25 Minuten Laufzeit, Gradientenelution (50 % Acetonitril in H₂O bis 100 % Acetonitril in 20 Minuten), Flussrate: 1.0 mL/min, Retentionszeit: 12.413 min (91.8 % AUC)

Ethyl-2-(4-(5-(2-ethoxy-2-oxoacetamid)-1*H*-benz[*d*]imidazol-2-yl)phenylamino)-2-oxoacetat

81



Hergestellt aus 112 mg **LVI** (0.5 mmol, 1.0 eq) und 171 mg Ethylchloro-oxoacetat (1.25 mmol, 2.5 eq) nach **AAV 6**.

Ausbeute 62 %, beiger Feststoff

Schmelzpunkt 204 °C (Zersetzung)

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.32-1.34 (m, 6H, OCH₂CH₃), 4.30-4.34 (m, 4H, OCH₂CH₃), 7.52-7.58 (m, 2H, H_{Ar}), 7.93 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H_{Ar}), 8.13-8.14 (m, 3H, H_{Ar}), 10.82 (s, 1H, NHCO), 11.00 (s, 1H, NHCO)

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 13.80 (OCH₂CH₃), 13.83 (OCH₂CH₃), 62.3 (OCH₂CH₂CH₃), 62.5 (OCH₂CH₂CH₃), 116.0, 120.5, 126.0, 126.9, 132.5, 138.9, 151.4 (C=O), 155.3 (C=O), 160.4 (C=O), 160.9 (C=O)

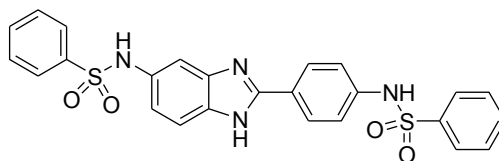
C₂₁H₂₀N₄O₆ [424.41]

HRMS [M + H]⁺ berechnet: 425.1456
[M + H]⁺ gefunden: 425.1456

HPLC 25 Minuten Laufzeit, Gradientenelution (50 % Acetonitril in H₂O bis 100 % Acetonitril in 20 Minuten), Flussrate: 1.0 mL/min, Retentionszeit: 4.645 min (96.4 % AUC)

N-(2-(4-(cyclohexa-2,4-diensulfonamid)phenyl)-1*H*-benz[*d*]imidazol-5-yl)benzensulfonamid

82



Hergestellt aus 112 mg **LVI** (0.5 mmol, 1.0 eq) und 221 mg Benzolsulfonylchlorid (1.25 mmol, 2.5 eq) nach **AAV 6**.

Ausbeute 34 %, beige Kristalle

Schmelzpunkt 155 °C

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 6.92 (br s, 1H, H_{Ar}), 7.22-7.23 (m, 3H, H_{Ar}), 7.34-7.44 (m, 1H, H_{Ar}), 7.49-7.51 (m, 2H, H_{Ar}), 7.54-7.57 (m, 3H, H_{Ar}), 7.59-7.62 (m, 1H, H_{Ar}), 7.72 (m, 2H, H_{Ar}), 7.82-7.83 (m, 2H, H_{Ar}), 7.95 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, H_{Ar}), 10.05-10.15 (m, 1H, NHSO₂), 10.64 (s, 1H, NHSO₂), 12.67-12.73 (m, 1H, NH)

¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 103.7, 111.3, 111.7, 116.4, 117.7, 118.8, 119.5, 125.4, 126.6, 127.3, 129.0, 129.3, 132.4, 132.6, 133.0, 139.1, 139.3, 139.4, 151.0

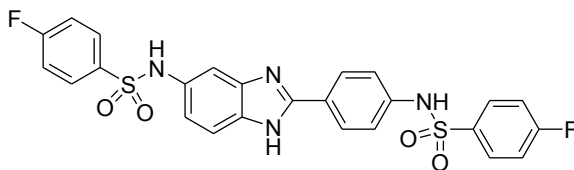
C₂₅H₂₀N₄O₄S₂ [504.58]

HRMS [M + H]⁺ berechnet: 505.0999

[M + H]⁺ gefunden: 505.0997

HPLC 25 Minuten Laufzeit, isokratische Elution (70 % MeOH in H₂O),
Flussrate: 1.0 mL/min, Retentionszeit: 5.496 min (98.4 % AUC)

4-Fluor-*N*-(4-(5-(4-fluorophenylsulfonamid)-1*H*-benz[*d*]imidazol-2-yl)phenyl)benzensulfonamid
83



Hergestellt aus 112 mg **LVI** (0.5 mmol, 1.0 eq) und 4-Fluorbenzolsulfonylchlorid (1.25 mmol, 2.5 eq) nach **AAV 6**.

Ausbeute 38 %, beiger Feststoff

Schmelzpunkt 145 °C (Zersetzung)

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 6.91 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.23-7.25 (m, 3H, H_{Ar}), 7.34-7.42 (m, 5H, H_{Ar}), 7.75-7.77 (m, 2H, H_{Ar}), 7.86-7.89 (m, 2H, H_{Ar}), 7.96 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H_{Ar}), 10.12 (br s, 1H, NHSO₂), 10.65 (s, 1H, NHSO₂), 12.72 (br s, 1H, NH)

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 116.2 (d, ²*J*_{CF} = 22.6 Hz), 116.5 (d, ²*J*_{CF} = 22.6 Hz), 119.5, 119.7, 125.6, 126.6, 127.4, 129.0, 129.3, 129.65 (d, ³*J*_{CF} = 8.7 Hz), 129.71 (d, ³*J*_{CF} = 9.1 Hz), 135.6 (d, ⁴*J*_{CF} = 2.6 Hz), 135.7 (d, ⁴*J*_{CF} = 3.0 Hz), 138.9, 151.3, 164.1 (d, ¹*J*_{CF} = 251.5 Hz), 164.3 (d, ¹*J*_{CF} = 251.9 Hz)

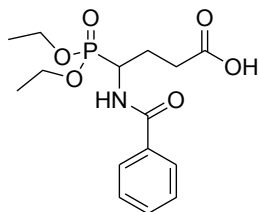
C₂₅H₁₈F₂N₄O₄S₂ [540.56]

HRMS [M + H]⁺ berechnet: 541.0810
[M + H]⁺ gefunden: 541.0810

HPLC 25 Minuten Laufzeit, Gradientenelution (50 % Acetonitril in H₂O bis 100 % Acetonitril in 20 Minuten), Flussrate: 1.0 mL/min, Retentionszeit: 5.232 min (90.5 % AUC)

6.10. Analytische Daten der Verbindungen aus Kapitel 4.4.

4-Benzamid-4-diethoxyphosphoryl-butansäure **84**



842 mg Kaliumhydroxid (15.0 mmol, 1.5 eq) wurden in 20 mL eines MeOH/H₂O-Gemisches (3:1) gelöst und zu in 4 mL MeOH gelöstem Carbonsäureester ***26** (3.71 g, 10.0 mmol, 1.0 eq) gegeben. Nach 12 h Rühren bei RT wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in 30 mL H₂O gelöst und 2x mit jeweils 50 mL EtOAc gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit 2M HCl-Lösung angesäuert und anschließend 3x mit jeweils 50 mL EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wurde aus EtOAc als farbloser Feststoff kristallisiert.

Ausbeute 67 %, farblose Kristalle

Schmelzpunkt 92 °C

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 1.18 (t, ³J_{HH} = 7.0 Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.23 (t, ³J_{HH} = 7.0 Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.90-2.08 (m, 2H, PCHCH₂CH₂), 2.23-2.36 (m, 2H, PCHCH₂CH₂), 3.97-4.08 (m, 4H, POCH₂CH₃), 4.47-4.55 (m, 1H, PCH), 7.46-7.49 (m, 2H, H_{Ar}), 7.53-7.56 (m, 1H, H_{Ar}), 7.85-7.87 (m, 2H, H_{Ar}), 8.53 (d, ³J_{HH} = 9.3 Hz, 1H, NH), 12.12 (s, 1H, COOH)

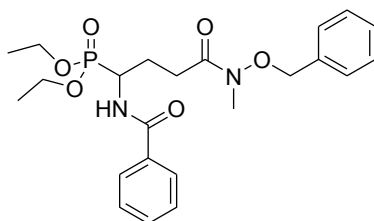
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 16.3 (d, ³J_{CP} = 5.6 Hz, POCH₂CH₃), 16.4 (d, ³J_{CP} = 5.1 Hz, POCH₂CH₃), 23.8 (s, PCHCH₂CH₂), 30.0 (d, ³J_{CP} = 14.2 Hz, PCHCH₂CH₂), 44.9 (d, ¹J_{CP} = 156.8 Hz, PCH), 61.7 (d, ²J_{CP} = 6.5 Hz, POCH₂CH₃), 62.0 (d, ²J_{CP} = 6.5 Hz, POCH₂CH₃), 127.5, 128.3, 131.4, 133.9, 166.4 (d, ³J_{CP} = 3.8 Hz, NHCO), 173.7 (COOH)

C₁₅H₂₂NO₆P [343.31]

Berechnet [%] C = 52.48, H = 6.46, N = 4.08

Gefunden [%] C = 52.35, H = 6.35, N = 4.06

Diethyl-1-benzamid-4-(benzyloxy(methyl)amino)-4-oxobutylphosphonat **85**



Hergestellt aus **84** (1.72 g, 5.0 mmol) und *N*-Methyl-*O*-benzylhydroxylamin (686 mg, 5.0 mmol) nach **AAV 7**.

Ausbeute 76 %, farblose Kristalle

Schmelzpunkt 66 °C

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 1.18 (t, ³J_{HH} = 7.0 Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.23 (t, ³J_{HH} = 7.0 Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.89-1.99 (m, 1H, PCHCH₂CH₂), 2.02-2.10 (m, 1H, PCHCH₂CH₂), 2.48 (m, 2H, PCHCH₂CH₂), 3.11 (s, 3H, NCH₃), 3.96-4.08 (m, 4H, POCH₂CH₃), 4.46-4.54 (m, 1H, PCH), 4.75 (d, ²J_{HH} = 9.9 Hz, 1H, OCH₂Ph), 4.79 (d, ²J_{HH} = 9.9 Hz, 1H, OCH₂Ph), 7.22-7.31 (m, 5H, H_{Ar}), 7.47 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.54 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.88 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, H_{Ar}), 8.55 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, NH)

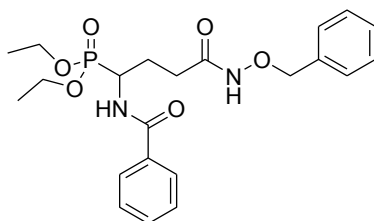
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 16.3 (d, ³J_{CP} = 5.6 Hz, POCH₂CH₃), 16.4 (d, ³J_{CP} = 5.2 Hz, POCH₂CH₃), 23.8 (d, ²J_{CP} = 3.1 Hz, PCHCH₂CH₂), 27.9 (d, ³J_{CP} = 13.5 Hz, PCHCH₂CH₂), 32.9 (NCH₃), 45.1 (d, ¹J_{CP} = 156.1 Hz, PCH), 61.7 (d, ²J_{CP} = 6.6 Hz, POCH₂CH₃), 62.0 (d, ²J_{CP} = 6.9 Hz, POCH₂CH₃), 75.3 (OCH₂Ph), 127.5, 128.3, 128.4, 128.6, 129.3, 131.4, 133.9, 166.4 (C=O), 166.4 (C=O)

C₂₃H₃₁N₂O₆P [462.48]

Berechnet [%] C = 59.73, H = 6.76, N = 6.06

Gefunden [%] C = 59.42, H = 6.90, N = 6.06

Diethyl-1-benzamid-4-(benzylamino)-4-oxobutylphosphonat **86**



Hergestellt aus **84** (1.72 g, 5.0 mmol) und *O*-Benzylhydroxylamin (616 mg, 5.0 mmol) nach **AAV 7**.

Ausbeute 65 %, farblose Kristalle

Schmelzpunkt 54 °C

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 1.18 (t, ³J_{HH} = 7.0 Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.23 (t, ³J_{HH} = 7.0 Hz, 3H, POCH₂CH₃), 1.94-2.09 (m, 4H, PCHCH₂CH₂), 3.96-4.10 (m, 4H, POCH₂CH₃), 4.43-4.50 (m, 1H, PCH), 4.66-4.77 (m, 2H, OCH₂Ph), 7.23-7.36 (m, 5H, H_{Ar}), 7.47 (t, *J* = 7.49 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.54 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.88 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H_{Ar}), 8.56 (d, ³J_{HH} = 9.2 Hz, 1H, NH), 10.56 (s, 0.1H, *E*-Isomer, NH), 10.96 (s, 0.9H, *Z*-Isomer, NH)

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 16.3 (d, ³J_{CP} = 5.6 Hz, POCH₂CH₃), 16.4 (d, ³J_{CP} = 5.5 Hz, POCH₂CH₃), 24.0 (d, ²J_{CP} = 3.8 Hz, PCHCH₂CH₂), 27.9 (d, ³J_{CP} = 15.5 Hz, PCHCH₂CH₂), 45.1 (d, ¹J_{CP} = 156.7 Hz, PCH), 61.7 (d, ²J_{CP} = 6.6 Hz, POCH₂CH₃), 62.0 (d, ²J_{CP} = 6.7 Hz, POCH₂CH₃), 76.9 (OCH₂Ph), 127.6, 128.2, 128.3, 128.8, 131.4, 134.0, 136.1, 166.3 (C=O), 168.5 (C=O)

C₂₂H₂₉N₂O₆P [448.45]

Berechnet [%] C = 58.92, H = 6.52, N = 6.25

Gefunden [%] C = 58.81, H = 6.66, N = 6.19

7. Untersuchung der biologischen Aktivität

7.1. Untersuchung der antiplasmodialen *in vitro*-Aktivität gegenüber den *P. falciparum*-Stämmen 3D7 und Dd2

Die Untersuchung der antiplasmodialen *in vitro*-Aktivität gegenüber dem Chloroquin-sensitiven *P. falciparum*-Stamm 3D7 und dem multiresistenten *P. falciparum*-Stamm Dd2 erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von *Benjamin Mordmüller* am Institut für Tropenmedizin des Universitätsklinikums Tübingen.

Die *P. falciparum*-Laborstämme 3D7 und Dd2 wurden in Dauerkultur gehalten.²¹¹⁻²¹² Durch Lösen der Testsubstanzen in DMSO wurden Stammlösungen mit einer Konzentration von 25-100 mM hergestellt. Die weiteren Verdünnungsschritte erfolgten mit Nährmedium (RPMI 1640^{*****}, 25 mM HEPES^{††††}, 2 mM L-Glutamin, 50 µg/mL Gentamycin und 0.5% w/v AlbuMAX®). Die Untersuchungslösungen wurden in 96-Well-Mikrotiterplatten vorgelegt und bis zur Untersuchung bei einer Temperatur von -20 °C gelagert. Die Zugabe von *P. falciparum*-Ringstadien erfolgte im kompletten Kulturmedium (1,5 % Hämatokrit, 0,05 % Parasitämie). Um das Wachstum zu kontrollieren, wurden Ringstadien zudem in Abwesenheit einer Testverbindung kultiviert.

Nach dreitägiger Inkubation unter sauerstoffarmen Bedingungen (5 % O₂, 5 % CO₂, 90 % N₂) bei 37 °C wurden die Kulturen bei -20 °C bis zur Auswertung mittels HRP2-ELISA^{††††} wieder eingefroren.²¹³ Die IC₅₀-Werte wurden mittels nichtlinearer Regressionsanalyse der halblogarithmischen Konzentrations-Effekt-Kurven bestimmt.²¹⁴ Als interne Kontrolle wurde bei jedem Assay der IC₅₀-Wert von Chloroquin bestimmt. Die IC₅₀-Werte der Testverbindungen wurden mittels mindestens zwei unabhängiger Doppelbestimmungen ermittelt.

7.2. Bestimmung von IC₅₀-Werten mittels photometrischem Assay

Die Untersuchung an dem rekombinanten PfDxr-Protein wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von *Markus Fischer* am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hamburg durchgeführt.

Methode

Rekombinante PfDxr wurde nach einer Methode gewonnen, die 2013 von *Kunfermann* et al. beschrieben wurde.¹⁹⁷

^{*****} RPMI 1640 ist ein Zellkulturmedium, welches in den 1960er Jahren am Roswell Park Memorial Institute entwickelt wurde.

^{††††} HEPES = 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure, Puffersubstanz für den pH-Bereich 6,8–8,2.

^{††††} HRP2 = histidine rich protein 2; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay.

Photometrisches Assay zur Bestimmung von IC_{50} -Werten

Die photometrischen Assays wurden in 384-Well-Mikrotiterplatten mit flachem transparentem Boden durchgeführt (Nunc, Wiesbaden, Deutschland). Die Assay-Lösungen mit einem Gesamtvolumen von 60 μ L enthielten 100 mM Tris-Hydrochlorid^{§§§§§} (pH 7.6), 5 mM $MnCl_2$, 5 mM DTT, 0.5 mM NADPH und 0.02 U rekombinantes *PfDxr*-Protein. Die Testverbindungen wurden in Konzentrationen von 200 – 0.003 μ M zugegeben. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat in 100 mM Tris-Hydrochlorid (pH 8.0) mit einer Gesamtkonzentration von 0.5 – 5 mM gestartet. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur (Wellenlänge = 340 nm) photometrisch in einem Mikroplattenleser verfolgt (SpectraMax M5, Molecular Devices, Biberach an der Riss, Deutschland). Die IC_{50} -Werte (Mittelwert $\pm$ anhand 3 oder mehr Messpunkten berechnete Standardabweichung) wurden aus den initialen Umsetzungsdaten durch nichtlineare Regression mit Hilfe des Programms DYNAFIT berechnet.⁴⁵

7.3. Untersuchung der antiplasmodialen *in vitro*-Aktivität gegenüber *P. berghei*-Leberstadien

Die Untersuchung der antiplasmodialen *in vitro*-Aktivität gegenüber Leberstadien von *P. berghei* erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von *Elizabeth Winzeler* am Genomics Institute of the Novartis Research Foundation in San Diego, Kalifornien. Um Sporozoitien von *P. berghei* zu gewinnen, wurden Speicheldrüsen von infizierten *A. stephensi*-Stechmücken homogenisiert, zweimal durch ein Nylonzellsieb (Porengröße 40 μ M) filtriert und die erhaltenen Sporozoitien mit einem Hämozytometer gezählt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die gewonnenen Sporozoitien auf Eis gelagert.

Bei 37 °C und einem CO_2 -Gehalt von 4 % wurden HepG2-A16-CD81EGFP-Zellen in DMEM^{*****}, ergänzt durch 10 % fetales Kälberserum, 0,29 mg/mL L-Glutamin, 100 Einheiten Penicillin und 100 μ g/mL Streptomycin, kultiviert.

20 - 26 h vor der Infektion wurden 50 μ L Nährmedium ($7,5 \cdot 10^3$ HepG2-A16-CD81EGFP-Zellen) in 384-Well-Mikrotiterplatten überführt. 2 h vor der Infektion wurden 50 nL von der in DMSO gelösten Testverbindung zugegeben, sodass die Testkonzentration 10 μ M betrug. Als Positiv- bzw. Negativkontrolle dienten Atovaquon (10 μ M) und DMSO (0,1 %). Bei 37 °C wurden die HepG2-Zellen mit $8 \cdot 10^3$ Sporozoitien pro Well infiziert und anschließend 2 h inkubiert. Zu den gewaschenen Kulturen wurde frische Substanz und frisches Nährmedium gegeben und mit einer 5-fach erhöhten Konzentration beider Antibiotika bei 37 °C für weitere 48 h inkubiert. Die infizierten Zellen konnten anschließend durch Immunofluoreszenz

§§§§§ Tris = Tris(hydroxymethyl)-aminomethan.

***** DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) ist ein Nährmedium, welches nach *Renato Dulbecco* und *Harry Eagle* benannt wurde.

detektiert werden.²¹⁵ Von Testverbindungen, die eine Aktivität zeigten, wurden Verdünnungsreihen hergestellt, die nach analogem Verfahren untersucht wurden.

Um die Zytotoxizität der Verbindungen gegenüber HepG2-Zellen zu untersuchen, wurde das Experiment in Abwesenheit infektiöser Sporozoiten durchgeführt.

7.4. Untersuchung der Zytotoxizität an HeLa-Zellen

Die Untersuchung der Zytotoxizität gegenüber HeLa-Zellen erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von *Benjamin Mordmüller* am Institut für Tropenmedizin des Universitätsklinikums Tübingen.

Zur Untersuchung der Zytotoxizität gegenüber HeLa-Zellen nach einer Methode von *Borenfreund et al.*²¹⁶ wurden die entsprechenden Testsubstanzen in einer Konzentration von 1 mM in DMEM-Komplettmedium⁺⁺⁺⁺⁺ gelöst. Aus dieser Stammlösung wurde eine Verdünnungsreihe in einem Konzentrationsbereich 1 mM-3·10⁻⁵ mM hergestellt. Anschließend wurden die entsprechend verdünnten Testsubstanzen zu einer Zellsuspension von 200 000 Zellen pro mL in DMEM-Komplettmedium in 96-Well-Mikrotiterplatten gegeben. Die Zellen wurden mit der Testsubstanz für 24 h bei 37 °C in einer Atmosphäre von 5 % CO₂ und 5 % O₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen von dem Medium befreit und stattdessen mit Neutralrot-Medium (0.05 g Neutralrot/L DMEM-Medium) versetzt. Nach Inkubation der Zellkultur mit dem Neutralrot-Medium in einer Atmosphäre von 5 % CO₂ und 5 % O₂ für 3h bei 37 °C wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS-Lösung⁺⁺⁺⁺⁺ gewaschen. Die Zellkultur wurde anschließend mit einer Lösung, die 50 % Ethanol (96 %ig) und 1 % Eisessig enthielt, versetzt und die Mikrotiterplatte geschüttelt. Schließlich wurde die Absorption bei 540 nm mittels eines Mikrotiterplattenlesers ermittelt und so die Aufnahme von Nautralrot in die Zellen bestimmt.

7.5. Untersuchung der antiplasmodialen *in vivo*-Aktivität

Die Untersuchung der *in vivo*-Aktivität erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von *Sergio Wittlin* am Swiss Tropical and Public Health Institute in Basel.

An Tag 0 wurden vier weibliche Labormäuse vom Stamm NMRI^{§§§§§} (20 bis 22 g) intravenös mit dem *P. berghei*-Stamm ANKA infiziert (2·10⁷ parasitierte Erythrozyten / mL). Von Tag 0 bis Tag 4 wurden die Testverbindungen in einer Dosis von jeweils 50 mg/kg Körpergewicht täglich oral appliziert.

Die Testverbindungen wurden in einer Mischung aus Tween 80 und Ethanol (70/30) gelöst oder suspendiert und mit dem zehnfachen Volumen an Wasser verdünnt. Nach der

⁺⁺⁺⁺⁺DMEM = Dulbecco's Minimum Essential Medium

⁺⁺⁺⁺⁺PBS = Phosphate Buffered Saline

^{§§§§§} NMRI = Naval Medical Research Institute, Herkunft des Stammes

durchflusszytometrische Bestimmung der Parasitämie an Tag 4 wurden die Mäuse der Kontrollgruppe eingeschläfert. Sobald eine Maus einer Versuchsgruppe verstarb, wurden die übrigen Mäuse dieser Gruppe ebenfalls eingeschläfert.

8. Literaturverzeichnis

1. Murray, C. J. L.; Rosenfeld, L. C.; Lim, S. S.; Andrews, K. G.; Foreman, K. J.; Haring, D.; Fullman, N.; Naghavi, M.; Lozano, R.; Lopez, A. D., Global malaria mortality between 1980 and 2010: A systematic analysis. *The Lancet* **2012**, 379, 413-431.
2. World Malaria Report 2015; World Health Organisation: Geneva, Switzerland, 2015. <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/report/en/> (WHO, 2016).
3. Singh, B.; Daneshvar, C., Human Infections and Detection of *Plasmodium knowlesi*. *Clin. Microbiol. Rev.* **2013**, 26 (2), 165-184.
4. Tuteja, R., Malaria – an overview. *FEBS Journal* **2007**, 274 (18), 4670-4679.
5. Stich, A.; Schlitzer, M., Wirkstoffe zur Therapie und Prophylaxe der Malaria. *Chemother. J.* **2008**, 17, 37-56.
6. Snow, R. W.; Korenromp, E. L.; Gows, E., Pediatric mortality in Africa: *Plasmodium falciparum* malaria as a cause or risk? *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2004**, 70 (Suppl. 2), 16-24.
7. Lee, K.-S.; Divis, P.; Zakaria, S. K.; Matusop, A.; Julin, R. A.; Conway, D. J.; Cox-Singh, J.; Singh, B., *Plasmodium knowlesi*: reservoir hosts and tracking the emergence in humans and macaques. *PLoS Pathog* **2011**, 7 (4), e1002015.
8. Singh, B.; Sung, L. K.; Matusop, A.; Radhakrishnan, A.; Shamsul, S. S. G.; Cox-Singh, J.; Thomas, A.; Conway, D. J., A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *The Lancet* **2004**, 363 (9414), 1017-1024.
9. Cox-Singh, J.; Singh, B., *Knowlesi* malaria: Newly emergent and of public health importance? *Trends Parasitol.* **2008**, 24 (9), 406-410.
10. White, N., *Plasmodium knowlesi*: The fifth human malaria parasite. *Clin. Infect. Dis.* **2008**, 46 (2), 172-173.
11. MMV, malaria parasite life cycle. <http://www.mmv.org/malaria-medicines/parasite-lifecycle> (MMV, 2016).
12. Beier, J. C.; Davis, J. R.; Vaughan, J. A.; Noden, B. H.; Beier, M. S., Quantitation of *Plasmodium falciparum* sporozoites transmitted *in vitro* by experimentally infected *Anopheles gambiae* and *Anopheles stephensi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1991**, 44 (5), 564-570.
13. Sturm, A.; Amino, R.; Van de Sand, C.; Regen, T.; Retzlaff, S.; Rennenberg, A.; Krueger, A.; Pollok, J.-M.; Menard, R.; Heussler, V. T., Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science* **2006**, 313 (5791), 1287-1290.
14. Schlitzer, M., Malaria, lebensrettende Prophylaxe und Therapie. *Pharmazeutische Zeitung* **2010**, 12, 16-23.
15. <https://www.gsk.com/en-gb/media/press-releases/2015/gsk-s-malaria-candidate-vaccine-mosquirix-rtss-receives-positive-opinion-from-european-regulators-for-the-prevention-of-malaria-in-young-children-in-sub-saharan-africa/> (GSK, 2016).
16. Vaughan, A.; Wang, R.; Kappe, S. H., Genetically engineered, attenuated whole-cell vaccine approaches for malaria. *Hum. Vaccin.* **2010**, 6 (1), 107-113.
17. Theander, T. G.; Lusingu, J. P. A., 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. *Lancet* **2015**, 386 (9988), 31-45.

18. http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/news_and_events/news/2015/07/news_detail_002376.jsp&mid=WC0b01ac058004d5c1 (EMA, 2016).
19. *International Travel and Health 2015*, World Health Organization: Geneva 2015. <http://www.who.int/ith/2015-ith-chapter7.pdf?ua=1> (WHO, 2016).
20. Nwaka, S., Drug discovery and beyond: The role of public-private partnerships in improving access to new malaria medicines. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2005**, 99S, 20-29.
21. Tu, Y., The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. *Nat. Med.* **2011**, 17 (10), 1217-1220.
22. Guidelines for the treatment of malaria - 3rd edition. World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2010.
<http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241549127/en/> (WHO, 2016).
23. Taylor, W. R. J.; White, N. J., Antimalarial drug toxicity: A review. *Drug Savety* **2004**, 24, 25-61.
24. Nkhoma, E. T.; Poole, C.; Vannappagari, V.; Hall, S. A.; Beutler, E., The global prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: A systematic review and meta-analysis. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* **2009**, 42 (3), 267-278.
25. Noedl, H.; Se, Y.; Schaecher, K.; Smith, B. L.; Socheat, D.; Fukuda, M. M., Evidence of Artemisinin-resistant malaria in Western Cambodia. *New Engl. J. Med.* **2008**, 359 (24), 2619-2620.
26. Ashley, E. A.; Dhorda, M.; Fairhurst, R. M.; Amaratunga, C.; Lim, P.; Suon, S.; Sreng, S.; Anderson, J. M.; Mao, S.; Sam, B.; Sopha, C.; Chuor, C. M.; Nguon, C.; Sovannaroeth, S.; Pukrittayakamee, S.; Jittamala, P.; Chotivanich, K.; Chutasmit, K.; Suchatsoonthorn, C.; Runchaoen, R.; Hien, T. T.; Thuy-Nhien, N. T.; Thanh, N. V.; Phu, N. H.; Htut, Y.; Han, K.-T.; Aye, K. H.; Mokuolu, O. A.; Olaosebikan, R. R.; Folaranmi, O. O.; Mayxay, M.; Khanthavong, M.; Hongvanthong, B.; Newton, P. N.; Onyamboko, M. A.; Fanello, C. I.; Tshefu, A. K.; Mishra, N.; Valecha, N.; Phyo, A. P.; Nosten, F.; Yi, P.; Tripura, R.; Borrmann, S.; Bashraheil, M.; Peshu, J.; Faiz, M. A.; Ghose, A.; Hossain, M. A.; Samad, R.; Rahman, M. R.; Hasan, M. M.; Islam, A.; Miotto, O.; Amato, R.; MacInnis, B.; Stalker, J.; Kwiatkowski, D. P.; Bozdech, Z.; Jeeyapant, A.; Cheah, P. Y.; Sakulthaew, T.; Chalk, J.; Intharabut, B.; Silamut, K.; Lee, S. J.; Vihokhern, B.; Kunasol, C.; Imwong, M.; Tarning, J.; Taylor, W. J.; Yeung, S.; Woodrow, C. J.; Flegg, J. A.; Das, D.; Smith, J.; Venkatesan, M.; Plowe, C. V.; Stepniewska, K.; Guerin, P. J.; Dondorp, A. M.; Day, N. P.; White, N. J., Spread of Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria. *New Engl. J. Med.* **2014**, 371 (5), 411-423.
27. World Malaria Report 2014; World Health Organisation: Geneva, Switzerland, 2014. http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/report/en/ (WHO, 2016).
28. Eichner, M.; Diebner, H. H.; Molineaux, L.; Collins, W. E.; Jeffery, G. M.; Dietz, K., Genesis, sequestration and survival of *Plasmodium falciparum* gametocytes: parameter estimates from fitting a model to malariatherapy data. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2001**, 95 (5), 497-501.
29. Flannery, E. L.; Chatterjee, A. K.; Winzeler, E. A., Antimalarial drug discovery - approaches and progress towards new medicines. *Nat. Rev. Microbiol.* **2013**, 11 (12), 849-862.
30. MMV, global portfolio of antimalarial medicines, 4Q 2015. <http://www.mmv.org/research-development/interactive-rd-portfolio> (MMV, 2016).

31. Alonso, P. L.; Brown, G.; Arevalo-Herrera, M.; Binka, F.; Chitnis, C.; Collins, F.; Doumbo, O. K.; Greenwood, B.; Hall, B. F.; Levine, M. M.; Mendis, K.; Newman, R. D.; Plowe, C. V.; Rodríguez, M. H.; Sinden, R.; Slutsker, L.; Tanner, M., A research agenda to underpin malaria eradication. *PLoS Med.* **2011**, 8 (1), e1000406.
32. Van Pelt-Koops, J.; Pett, H.; Graumans, W.; Van der Vegte-Bolmer, M.; Van Gemert, G.; Rottmann, M.; Yeung, B.; Diagana, T.; Sauerwein, R., The spiroindolone drug candidate NITD609 potently inhibits gametocytogenesis and blocks *Plasmodium falciparum* transmission to anopheles mosquito vector. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, 56 (7), 3544-3548.
33. Rottmann, M.; McNamara, C.; Yeung, B. K.; Lee, M. C.; Zou, B.; Russell, B.; Seitz, P.; Plouffe, D. M.; Dharia, N. V.; Tan, J., Spiroindolones, a potent compound class for the treatment of malaria. *science* **2010**, 329 (5996), 1175-1180.
34. Yeung, B. K.; Zou, B.; Rottmann, M.; Lakshminarayana, S. B.; Ang, S. H.; Leong, S. Y.; Tan, J.; Wong, J.; Keller-Maerki, S.; Fischli, C., Spirotetrahydro β -carbolines (spiroindolones): A new class of potent and orally efficacious compounds for the treatment of malaria. *J. Med. Chem.* **2010**, 53 (14), 5155-5164.
35. Nagle, A.; Wu, T.; Kuhen, K.; Gagaring, K.; Borboa, R.; Francek, C.; Chen, Z.; Plouffe, D.; Lin, X.; Caldwell, C., Imidazolopiperazines: lead optimization of the second-generation antimalarial agents. *J. Med. Chem.* **2012**, 55 (9), 4244-4273.
36. Spangenberg, T.; Burrows, J. N.; Kowalczyk, P.; McDonald, S.; Wells, T. N. C.; Willis, P., The Open Access Malaria Box: A drug discovery catalyst for neglected diseases. *PLoS One* **2013**, 8 (6), e62906.
37. Meister, S.; Plouffe, D. M.; Kuhen, K. L.; Bonamy, G. M. C.; Wu, T.; Barnes, S. W.; Bopp, S. E.; Borboa, R.; Bright, A. T.; Che, J.; Cohen, S.; Dharia, N. V.; Gagaring, K.; Gettayacamin, M.; Gordon, P.; Groessl, T.; Kato, N.; Lee, M. C. S.; McNamara, C. W.; Fidock, D. A.; Nagle, A.; Nam, T.-g.; Richmond, W.; Roland, J.; Rottmann, M.; Zhou, B.; Froissard, P.; Glynn, R. J.; Mazier, D.; Sattabongkot, J.; Schultz, P. G.; Tuntland, T.; Walker, J. R.; Zhou, Y.; Chatterjee, A.; Diagana, T. T.; Winzeler, E. A., Imaging of *Plasmodium* liver stages to drive next-generation antimalarial drug discovery. *Science* **2011**, 334 (6061), 1372-1377.
38. Gamo, F.-J.; Sanz, L. M.; Vidal, J.; de Cozar, C.; Alvarez, E.; Lavandera, J.-L.; Vanderwall, D. E.; Green, D. V. S.; Kumar, V.; Hasan, S.; Brown, J. R.; Peishoff, C. E.; Cardon, L. R.; Garcia-Bustos, J. F., Thousands of chemical starting points for antimalarial lead identification. *Nature* **2010**, 465 (7296), 305-310.
39. Guiguemde, W. A.; Shelat, A. A.; Bouck, D.; Duffy, S.; Crowther, G. J.; Davis, P. H.; Smithson, D. C.; Connelly, M.; Clark, J.; Zhu, F.; Jiménez-Díaz, M. B.; Martinez, M. S.; Wilson, E. B.; Tripathi, A. K.; Gut, J.; Sharlow, E. R.; Bathurst, I.; Mazouni, F. E.; Fowble, J. W.; Forquer, I.; McGinley, P. L.; Castro, S.; Angulo-Barturen, I.; Ferrer, S.; Rosenthal, P. J.; DeRisi, J. L.; Sullivan, D. J.; Lazo, J. S.; Roos, D. S.; Riscoe, M. K.; Phillips, M. A.; Rathod, P. K.; Van Voorhis, W. C.; Avery, V. M.; Guy, R. K., Chemical genetics of *Plasmodium falciparum*. *Nature* **2010**, 465 (7296), 311-315.
40. MMV, selection process of the Malaria Box.
http://www.mmv.org/sites/default/files/uploads/images/RandD/Selection_Process_Malaria_Box.png (MMV, 2016).
41. Walters, W. P.; Namchuk, M., Designing screens: How to make your hits a hit. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, 2 (4), 259-266.
42. Baell, J. B.; Holloway, G. A., New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays. *J. Med. Chem.* **2010**, 53 (7), 2719-2740.

43. Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J., Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, *46*, 3-26.
44. Richards, M. L.; Lio, S. C.; Sinha, A.; Banie, H.; Thomas, R. J.; Major, M.; Tanji, M.; Sircar, J. C., Substituted 2-phenyl-benzimidazole derivatives: Novel compounds that suppress key markers of allergy. *Eur. J. Med. Chem.* **2006**, *41* (8), 950-969.
45. Kuzmič, P., Program DYNAFIT for the analysis of enzyme kinetic data: Application to HIV proteinase. *Analytical Biochemistry* **1996**, *237* (2), 260-273.
46. Press, W. H., *Numerical recipes 3rd edition: The art of scientific computing*. Cambridge university press: 2007.
47. Ghose, A. K.; Viswanadhan, V. N.; Wendoloski, J. J., Prediction of hydrophobic (lipophilic) properties of small organic molecules using fragmental methods: An analysis of AlogP and ClogP methods. *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102* (21), 3762-3772.
48. Benfenati, E.; Manganaro, A.; Gini, G. C., VEGA-QSAR: AI Inside a Platform for Predictive Toxicology, PAI@ AI* IA, **2013**, 21-28.
49. Southwick, P. L.; Crouch, R. T., The condensation of oxalic esters with esters of β -alanine and *N*-substituted β -aminopropionic acids. Synthesis of some derivatives of 2,3-dioxopyrrolidine and 2-oxo-3-methoxy-3-pyrroline. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75* (14), 3413-3417.
50. Vaughan, W. R.; Covey, I. S., 1,5-Diaryl-2,3-pyrrolidinediones. XI. Observations on synthetic methods and the effect of 4-substituents on chemical properties. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80* (9), 2197-2201.
51. Vaughan, W. R.; Tripp, R. C., 1,5-Diaryl-2,3-pyrrolidinediones. XII. Enamines and the pseudo-pyrrolidinediones. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82* (16), 4370-4376.
52. Büchel, K. H.; Falbe, J.; Hagemann, H.; Hanack, M.; Kirschke, K.; Klamann, D.; Kreher, R. P.; Kropf, C.; Liebscher, J.; Regitz, M., Houben-Weyl Methods of Organic Chemistry Vol. E 8b, 4th Edition Supplement: Hetarenes III (five-membered rings with two and more heteroatoms in the ring system). Thieme: 2014.
53. Elguero, J.; Marzin, C.; Katritzky, A.; Linda, P., The Tautomerism of Heterocycles. *Advances in Heterocycl. Chem., Suppl. 1*. Katritzky, A.; Boulton, A. J., Academic Press, New York **1976**, 87-102.
54. Alkorta, I.; Elguero, J.; Liebman, J. F., The annular tautomerism of imidazoles and pyrazoles: The possible existence of nonaromatic forms. *Struct. Chem.* **2006**, *17* (4), 439-444.
55. Bensaude, O.; Chevrier, M.; Dubois, J.-E., Equilibre tautomere du phenyl-methyl-pyrazole en solution aqueuse: Mecanisme de l'interconversion. *Tetrahedron* **1978**, *34* (15), 2259-2262.
56. Elguero, J.; Fruchier, A.; Pellegrin, V., Annular tautomerism in the solid state: A high resolution n.m.r. study. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1981**, (23), 1207-1208.
57. Gonzalez, E.; Faure, R.; Vincent, E.-J.; Espada, M.; Elguero, J., Etude en résonance magnétique nucléaire du carbone-13 de quelques aminopyrazoles. Sur le problème de la détermination des constantes d'équilibre tautomère. *Org. Magn. Reson.* **1979**, *12* (10), 587-592.
58. Schiff, R.; Bertini, C., Synthese substituierter Bihydrobiketopyrrolcarbonsäureester mittels Oxalessigester und Aldehydoaminbasen. *Berichte d. D. chem. Gesellschaft* **1897**, *30* (1), 601-604.
59. Borsche, W., Neue Cinchoninsäure-Synthesen. *Berichte d. D. chem. Gesellschaft* **1909**, *42* (3), 4072-4088.

60. Southwick, P. L.; Seivard, L. L., The ring closure of *N*-alkoxalyl- β -anilinopropionic acids. *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, 71 (7), 2532-2538.
61. Andreichikov, Y. S.; Maslivets, A. N.; Ivanenko, O. I., Recyclization of 5-phenyl-2,3-dihydro-2,3-furandione with the formation of 4-benzoyl-3-hydroxy-1-*p*-tolyl-5-phenyl-2,5-dihydro-2-pyrrolone. *J. Org. Chem. USSR (English Translation)* **1986**, 22 (8), 1608-1609.
62. Gein, V. L.; Popov, A. V.; Kolla, V. É.; Popova, N. A.; Potemkin, K. D., Synthesis and biological activity of 1,5-diaryl-3-arylamino-4-carboxymethyl-2,5-dihydro-2-pyrrolones and 1,5-diaryl-4-carboxymethyltetrahydropyrrole-2, 3-diones. *Pharm. Chem. J.* **1993**, 27 (5), 343-346.
63. Zimmerman, S. S.; Khatri, A.; Garnier-Amblard, E. C.; Mullasseril, P.; Kurtkaya, N. L.; Gyoneva, S.; Hansen, K. B.; Traynelis, S. F.; Liotta, D. C., Design, Synthesis, and structure-activity relationship of a novel series of GluN2C-selective potentiators. *J. Med. Chem.* **2014**, 57 (6), 2334-2356.
64. Andreichikov, Y. S.; Gein, V. L.; Shumilovskikh, E. V., Five-membered 2,3-dioxoheterocycles: Synthesis and [1,3]-sigmatropic rearrangement of 1,5-diaryl-3-diphenylmethoxy-4-ethoxycarbonyl-2,5-dihydropyrrol-2-ones. *Chem. Heterocycl. Compd.* **1990**, 26 (6), 627-630.
65. Gein, V. L.; Shumilovskikh, E. V.; Andreichikov, Y. S.; Saraeva, R. F.; Korobchenko, L. V.; Vladoiko, G. V.; Boreko, E. I., Synthesis of 4-substituted 1-methyl-5-aryl- and 1,5-diaryltetrahydropyrrole-2,3-diones and their antiviral action. *Pharm. Chem. J.* **1991**, 25 (12), 884-887.
66. Henkel, B.; Lis, M.; Illgen, K.; Eckl, R., Macrocycles via Doebner Reaction followed by macrolactonization. *Synlett* **2006**, (9), 1315-1318.
67. Ma, K.; Wang, P.; Fu, W.; Wan, X.; Zhou, L.; Chu, Y.; Ye, D., Rational design of 2-pyrrolinones as inhibitors of HIV-1 integrase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21 (22), 6724-6727.
68. Ciapetti, P.; Trouche, N.; Venkata Pithani, S.; Guedat, P.; Berecibar, A., 1-(6-Membered azo-heterocyclic)-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-2-one derivatives as anti-hepatitis C virus, the pharmaceutical composition thereof and their therapeutic use. WO 2012/093174 A1, 2012-07-12.
69. Sturm, H.; Ongania, K.-H.; Daly, J. J.; Klötzer, W., Intramolekulare 1,3-dipolare Cycloadditionen von *N*-Allyldiazoacetamiden und *N*-Allyldiazomalonamidestern. *Chem. Ber.* **1981**, 114 (1), 190-200.
70. Andreichikov, Y. S.; Gein, V. L.; Anikina, I. N., Chemistry of oxalyl derivatives of methyl ketones. XLIV. Synthesis of 4-aro-yl-1,5-diphenyltetrahydropyrrole-2,3-diones and their reaction with amines and hydrazine. *J. Org. Chem. USSR (English Translation)* **1986**, 22 (8), 1572-1577.
71. Gein, V. L.; Kasimova, N. N., Three-component condensation of methyl acylpyruvates with aromatic aldehydes and ethylenediamine. Chemical properties of the products. *Russ. J. Gen. Chem.* **2005**, 75 (2), 254-260.
72. Gein, V. L.; Kasimova, N. N.; Aliev, Z. G.; Vakhrin, M. I., Three-component reaction of methyl 2,4-dioxo-4-phenylbutanoate and methyl 2,4-dioxopentanoate with aromatic aldehydes and propane-1,2-diamine and chemical properties of the products. *Russ. J. Org. Chem.* **2010**, 46 (6), 875-883.
73. Gein, V. L.; Fedorova, N. L.; Levandovskaya, E. B.; Vakhrin, M. I., Reactions of 4-acyl-1-alkoxyaryl-5-aryl-3-hydroxy-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-2-ones with nucleophilic reagents. *Russ. J. Org. Chem.* **2011**, 47 (1), 95-99.

74. Gein, V. L.; Bobrovskaya, O. V.; Tkachenko, K. A.; Gein, L. F., Reactions of 1-(4-aminosulfonylphenyl)-5-aryl-4-aryl-3-hydroxy-3-pyrrolin-2-ones with arylamines and hydrazine hydrate. *Russ. J. Gen. Chem.* **2014**, *84* (7), 1349-1352.
75. Kai, H.; Taoda, Y.; Endoh, T.; Horiguchi, T.; Asahi, K.; Tobinaga, H., Novel pyrrolinone derivative and medicinal composition containing same. EP 2336109 A1, 2011-06-22.
76. Kai, H.; Shinohara, S.; Kameyama, T., Novel pyrrolinone derivative and medicinal composition containing the same. EP2143713 A1, 2010-01-13.
77. Zhuang, C.; Miao, Z.; Wu, Y.; Guo, Z.; Li, J.; Yao, J.; Xing, C.; Sheng, C.; Zhang, W., Double-edged swords as cancer therapeutics: Novel, orally active, small molecules simultaneously inhibit p53–MDM2 interaction and the NF- κ B pathway. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (3), 567-577.
78. Richter, A.; Rose, R.; Hedberg, C.; Waldmann, H.; Ottmann, C., An optimised small-molecule stabiliser of the 14-3-3–PMA2 protein–protein interaction. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18* (21), 6520-6527.
79. Gomez Bateman, S.; Jurkiewicz, I.; Hermann, G. J.; Matthews, I. T. W.; Kirby, J. P.; López, E. H.; Kulkarni, M. S.; Edwards, P.; King, W. R.; Thomas, H. C.; Thursz, M. R.; Lerma, I. C., Phosphodiesterase inhibitors. WO 2012/046030 A2, 2012-04-12.
80. Furet, P.; Guagnano, V.; Holzer, P.; Kallen, J.; Mah, R.; Masuya, K.; Schlapbach, A.; Vaupel, A., Pyrazolo[3,4-d]pyrimidione compounds as inhibitors of the p53/MDM2 interaction. WO 2014/115080 A1, 2014-07-31.
81. Lepage, O.; Bhardwaj, P. K.; Faucher, A.-M.; Grand-Maitre, C.; Lacoste, J.-E.; Lamorte, L.; Mercier, J.-F., Inhibitors of HIV replication. WO 2011/143772 A1, 2011-11-24.
82. Blank, J.; Bordas, V.; Cotesta, S.; Guagnano, V.; Rueeger, H.; Vaupel, A., Pyrazolopyrrolidine derivatives and their use in the treatment of disease. WO 2014/191896 A1, 2014-12-04.
83. Furet, P.; Guagnano, V.; Holzer, P.; Mah, R.; Masuya, K.; Schlapbach, A.; Stutz, S.; Vaupel, A., Pyrazolopyrrolidine compounds. WO 2013/080141 A1, 2013-06-06.
84. Zhuang, C.; Miao, Z.; Zhu, L.; Dong, G.; Guo, Z.; Wang, S.; Zhang, Y.; Wu, Y.; Yao, J.; Sheng, C.; Zhang, W., Discovery, synthesis, and biological evaluation of orally active pyrrolidone derivatives as novel inhibitors of p53–MDM2 protein–protein Interaction. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (22), 9630-9642.
85. Barakat, K. J.; Guo, L.; Liu, J.; Nargund, R. P.; Sebhat, I. K.; Ye, Z., Acylated piperidine derivatives as melancortin-4 receptor agonists. WO 2006/019787 A3, 2006-02-23.
86. Akamanchi, K. G.; Padmawar, P. A.; Thatte, U. M.; Rege, N. N.; Dahanukar, S. A., Synthesis and *in-vitro* evaluation of platelet aggregation inhibitory activity of paeonol and its analogues. *Pharm. Pharmacol. Commun.* **1999**, *5* (5), 323-329.
87. Raposo, C.; Luengo, A.; Almaraz, M.; Martín, M.; Mussons, M.; Caballero, M.; Morán, J. R., Malonic acid receptors with decarboxylative activity. *Tetrahedron* **1996**, *52* (37), 12323-12332.
88. Weber, V.; Coudert, P.; Rubat, C.; Duroux, E.; Leal, F.; Couquelet, J., Antioxidant properties of novel lipophilic ascorbic acid analogues. *J. Pharm. Pharmacol.* **2000**, *52* (5), 523-530.
89. Walenzyk, T.; Carola, C.; Buchholz, H.; König, B., Chromone derivatives which bind to human hair. *Tetrahedron* **2005**, *61* (31), 7366-7377.
90. Grenier, J. L.; Cotellet, N.; Catteau, J. P.; Cotellet, P., Synthesis and physico-chemical properties of nitrocaffeic acids. *J. Phys. Org. Chem.* **2000**, *13* (9), 511-517.

91. Pettit, G. R.; Grealish, M. P.; Herald, D. L.; Boyd, M. R.; Hamel, E.; Pettit, R. K., Antineoplastic Agents. 443. Synthesis of the cancer cell growth inhibitor hydroxyphenstatin and its sodium diphosphate prodrug. *J. Med. Chem.* **2000**, *43* (14), 2731-2737.
92. Yang, D.; Wong, M.-K.; Yan, Z., Regioselective Intramolecular oxidation of phenols and anisoles by dioxiranes generated *in situ*. *J. Org. Chem.* **2000**, *65* (13), 4179-4184.
93. Menzler, S.; Bikker, J. A.; Suman-Chauhan, N.; Horwell, D. C., Design and biological evaluation of non-peptide analogues of omega-conotoxin MVIIA. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10* (4), 345-347.
94. White, D. E.; Tadross, P. M.; Lu, Z.; Jacobsen, E. N., A broadly applicable and practical oligomeric (salen)Co catalyst for enantioselective epoxide ring-opening reactions. *Tetrahedron* **2014**, *70* (27-28), 4165-4180.
95. Xiao, B.; Fu, Y.; Xu, J.; Gong, T.-J.; Dai, J.-J.; Yi, J.; Liu, L., Pd(II)-catalyzed C-H activation/aryl-aryl coupling of phenol esters. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (2), 468-469.
96. Leon, J. W.; Whitten, D. G., Photofragmentation in linked donor-acceptor molecules. Intramolecular single electron transfer induced cleavage of a 1,2-diamine. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115* (18), 8038-8043.
97. Rose, N. R.; Ng, S. S.; Mecinović, J.; Liénard, B. M. R.; Bello, S. H.; Sun, Z.; McDonough, M. A.; Oppermann, U.; Schofield, C. J., Inhibitor scaffolds for 2-oxoglutarate-dependent histone lysine demethylases. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (22), 7053-7056.
98. Nomura, E.; Hosoda, A.; Taniguchi, H., Synthesis, structure, and complexing property of *p*-tert-butylcalix[4]arene 1,3-digallate. *Org. Lett.* **2000**, *2* (6), 779-781.
99. Hosoda, A.; Nomura, E.; Murakami, A.; Koshimizu, K.; Ohigashi, H.; Mizuno, K.; Taniguchi, H., Synthesis of feruloyl-myo-inositols and their inhibitory effects on superoxide generation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10* (13), 1439-1442.
100. Grese, T. A.; Pennington, L. D.; Sluka, J. P.; Adrian, M. D.; Cole, H. W.; Fuson, T. R.; Magee, D. E.; Phillips, D. L.; Rowley, E. R.; Shetler, P. K.; Short, L. L.; Venugopalan, M.; Yang, N. N.; Sato, M.; Glasebrook, A. L.; Bryant, H. U., Synthesis and pharmacology of conformationally restricted raloxifene analogues: Highly potent selective estrogen receptor modulators. *J. Med. Chem.* **1998**, *41* (8), 1272-1283.
101. Seebach, D.; Chow, H.-F.; Jackson, R. F. W.; Sutter, M. A.; Thaisrivongs, S.; Zimmermann, J., (+)-11,11'-di-*o*-methylelaiohyllidene – preparation from elaiophyllin and total synthesis from (*R*)-3-hydroxybutyrate and (*S*)-malate. *Liebigs Ann. Chem.* **1986**, *1986* (7), 1281-1308.
102. Jones, T. K.; Reamer, R. A.; Desmond, R.; Mills, S. G., Chemistry of tricarbonyl hemiketals and application of Evans technology to the total synthesis of the immunosuppressant (-)-FK-506. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112* (8), 2998-3017.
103. Robins, M. J.; Samano, V.; Johnson, M. D., Periodinane oxidation, selective primary deprotection, and remarkably stereoselective reduction of *tert*-butyldimethylsilyl-protected ribonucleosides. Synthesis of 9-(β -D-xylofuranosyl)adenine or 3'-deuterioadenosine from adenosine. *J. Org. Chem.* **1990**, *55* (2), 410-412.
104. Marshall, J. A.; Sedrani, R., A convergent, highly stereoselective synthesis of a C-11-C-21 subunit of the macbecins. *J. Org. Chem.* **1991**, *56* (19), 5496-5498.
105. Parker, K. A.; Mindt, T. L., Electrocyclic ring closure of the enols of vinyl quinones. A 2*H*-Chromene Synthesis. *Org. Lett.* **2001**, *3* (24), 3875-3878.
106. Trader, D. J.; Carlson, E. E., Taming of a superbases for selective phenol desilylation and natural product isolation. *J. Org. Chem.* **2013**, *78* (14), 7349-7355.

107. Ashimori, A.; Bachand, B.; Calter, M. A.; Govek, S. P.; Overman, L. E.; Poon, D. J., Catalytic asymmetric synthesis of quaternary carbon centers. Exploratory studies of intramolecular Heck reactions of (Z)- α,β -unsaturated anilides and mechanistic investigations of asymmetric Heck reactions proceeding via neutral intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (26), 6488-6499.
108. Hassan, A. Q.; Koh, J. T., Selective chemical rescue of a thyroid-hormone-receptor mutant, TR β (H435Y), identified in pituitary carcinoma and resistance to thyroid hormone. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47* (38), 7280-7283.
109. Génisson, Y.; Tyler, P. C.; Ball, R. G.; Young, R. N., Stereoselective total synthesis of ($\pm$)-Thielocin A1 β . *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (46), 11381-11387.
110. Kang, D. W.; Lee, J. W.; Kim, Y. H.; Kim, H.; Ha, H. J.; Nam, E. J.; Joung, C. M., Novel benzofuran type derivatives, a composition comprising the same for treating or preventing cognitive dysfunction and the use thereof. WO 2008/041826 A1 (2008-04-10).
111. Wong, N. C. W.; Tucker, J. E. L.; HHansen, H. C.; Chiacchia, F. S.; McCaffrey, D., Compounds for the prevention and treatment of cardiovascular diseases. US 2008/0188467 A1 (2008-08-07).
112. Daly, A. M.; Gilheany, D. G., The synthesis and use in asymmetric epoxidation of metal salen complexes derived from enantiopure *trans*-cyclopentane- and cyclobutane-1,2-diamine. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14* (1), 127-137.
113. Kaiser, F.; Schwink, L.; Velder, J.; Schmalz, H.-G., Studies towards the total synthesis of mumbaistatin: Synthesis of highly substituted benzophenone and anthraquinone building blocks. *Tetrahedron* **2003**, *59* (18), 3201-3217.
114. Cheung, W.-H.; Zheng, S.-L.; Yu, W.-Y.; Zhou, G.-C.; Che, C.-M., Ruthenium porphyrin catalyzed intramolecular carbenoid C-H insertion. Stereoselective synthesis of *cis*-disubstituted oxygen and nitrogen heterocycles. *Org. Lett.* **2003**, *5* (14), 2535-2538.
115. Collin, D. T.; Hartley, D.; Jack, D.; Lunts, L. H. C.; Press, J. C.; Ritchie, A. C.; Toon, P., Saligenin analogs of sympathomimetic catechol amines. *J. Med. Chem.* **1970**, *13* (4), 674-680.
116. Hardouin, C.; Kelso, M. J.; Romero, F. A.; Rayl, T. J.; Leung, D.; Hwang, I.; Cravatt, B. F.; Boger, D. L., Structure-activity relationships of α -ketooxazole inhibitors of fatty acid amide hydrolase. *J. Med. Chem.* **2007**, *50* (14), 3359-3368.
117. Yamada, K.; Fujita, H.; Kunishima, M., A novel acid-catalyzed *o*-benzylating reagent with the smallest unit of imidate structure. *Org. Lett.* **2012**, *14* (19), 5026-5029.
118. Poon, K. W. C.; Dudley, G. B., Mix-and-heat benzylation of alcohols using a bench-stable pyridinium salt. *J. Org. Chem.* **2006**, *71* (10), 3923-3927.
119. Skaanderup, P. R.; Poulsen, C. S.; Hyldtoft, L.; Jørgensen, M. R.; Madsen, R., Regioselective conversion of primary alcohols into iodides in unprotected methyl furanosides and pyranosides. *Synthesis* **2002**, *12*, 1721-1727.
120. Bhalerao, U. T.; Raju, B. C.; Neelakantan, P., A simple debenylation of *o*-substituted phenol ethers using hydrobromic acid in presence of phase transfer catalyst. *Synth. Commun.* **1995**, *25* (10), 1433-1439.
121. Andreichikov, Y. S.; Gein, V. L.; Anikina, I. N., Five-membered 2,3-dioxoheterocycles. VII. Synthesis of 4-aryl-5-phenyltetrahydropyrrole-2,3-diones and their reaction with amino compounds and hydrazine. *Zh. Org. Khim.* **1988**, *24* (4), 875-881.
122. Gawley, R. E.; Mao, H.; Haque, M. M.; Thorne, J. B.; Pharr, J. S., Visible fluorescence chemosensor for saxitoxin. *J. Org. Chem.* **2007**, *72* (6), 2187-2191.

123. Hall, M. J.; McDonnell, S. O.; Killoran, J.; O'Shea, D. F., A modular synthesis of unsymmetrical tetraarylazadipyrromethenes. *J. Org. Chem.* **2005**, 70 (14), 5571-5578.
124. Tuley, A.; Lee, Y.-J.; Wu, B.; Wang, Z. U.; Liu, W. R., A genetically encoded aldehyde for rapid protein labelling. *Chem. Commun.* **2014**, 50 (56), 7424-7426.
125. Hao, X.-Q.; Wang, Y.-N.; Liu, J.-R.; Wang, K.-L.; Gong, J.-F.; Song, M.-P., Unsymmetrical, oxazolinyll-containing achiral and chiral NCN pincer ligand precursors and their complexes with palladium(II). *J. Organomet. Chem.* **2010**, 695 (1), 82-89.
126. Sheng, R.; Xu, Y.; Hu, C.; Zhang, J.; Lin, X.; Li, J.; Yang, B.; He, Q.; Hu, Y., Design, synthesis and AChE inhibitory activity of indanone and aurone derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, 44 (1), 7-17.
127. Cromwell, N. H., The Mannich Reaction with p-hydroxybenzaldehyde and N-(p-hydroxybenzyl)-acetamide. *J. Am. Chem. Soc.* **1946**, 68 (12), 2634-2636.
128. Fang, X.; Fang, L.; Gou, S.; Cheng, L., Design and synthesis of dimethylaminomethyl-substituted curcumin derivatives/analogues: Potent antitumor and antioxidant activity, improved stability and aqueous solubility compared with curcumin. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, 23 (5), 1297-1301.
129. Vogl, M.; Kratzer, R.; Nidetzky, B.; Brecker, L., *Candida tenuis* xylose reductase catalysed reduction of acetophenones: The effect of ring-substituents on catalytic efficiency. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, 9 (16), 5863-5870.
130. Rubottom, G. M.; Kim, C., Preparation of methyl ketones by the sequential treatment of carboxylic acids with methyllithium and chlorotrimethylsilane. *J. Org. Chem.* **1983**, 48 (9), 1550-1552.
131. Becht, J.-M.; Marin, S. D. L.; Maruani, M.; Wagner, A.; Mioskowski, C., Short and efficient preparations of isoxazole-3-carboxylic acid and imino-oxopentanoic acid potent precursors of 4-hydroxyisoleucine. *Tetrahedron* **2006**, 62 (18), 4430-4434.
132. Butterfoss, G. L.; Yoo, B.; Jaworski, J. N.; Chorny, I.; Dill, K. A.; Zuckermann, R. N.; Bonneau, R.; Kirshenbaum, K.; Voelz, V. A., De novo structure prediction and experimental characterization of folded peptoid oligomers. *PNAS* **2012**, 109 (36), 14320-14325.
133. Brücher, K.; Illarionov, B.; Held, J.; Tschan, S.; Kunfermann, A.; Pein, M. K.; Bacher, A.; Gräwert, T.; Maes, L.; Mordmüller, B.; Fischer, M.; Kurz, T., α -substituted β -oxa isosteres of Fosmidomycin: Synthesis and biological evaluation. *J. Med. Chem.* **2012**, 55 (14), 6566-6575.
134. Peters, W., The chemotherapy of rodent malaria, XXII. The value of drug-resistant strains of *P. berghei* in screening for blood schizontocidal activity. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **1975**, 69 (2), 155-171.
135. Büchi, J., *Grundlagen der Arzneimittelforschung und der synthetischen Arzneimittel*. Springer-Verlag: 2013; Vol. 15.
136. Diao, X.; Wang, Y.; Jiang, Y.; Ma, D., Assembly of substituted 1*H*-benzimidazoles and 1,3-dihydrobenzimidazol-2-ones via CuI/I-proline catalyzed coupling of aqueous ammonia with 2-iodoacetanilides and 2-iodophenylcarbamates. *J. Org. Chem.* **2009**, 74 (20), 7974-7977.
137. Minkin, V. I.; Garnovskii, A. D.; Elguero, J.; Katritzky, A. R.; Denisko, O. V., Tautomerism of heterocycles: Five-membered rings with two or more heteroatoms. *Advances in Heterocyclic Chemistry* **2000**, 76, 1.
138. Zheng, N.; Buchwald, S. L., Copper-catalyzed regiospecific synthesis of N-alkylbenzimidazoles. *Org. Lett.* **2007**, 9 (23), 4749-4751.
139. Wright, J. B., The chemistry of the benzimidazoles. *Chem. Rev.* **1951**, 48 (3), 397-541.

140. Hobrecker, F., Über Reduktionsprodukte der Nitracetamidverbindungen. *Berichte d. D. chem. Gesellschaft* **1872**, 5 (2), 920-924.
141. Yadav, G.; Ganguly, S., Structure activity relationship (SAR) study of benzimidazole scaffold for different biological activities: A mini-review. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, 97, 419-443.
142. Shen, M.; Driver, T. G., Iron(II) bromide-catalyzed synthesis of benzimidazoles from aryl azides. *Org. Lett.* **2008**, 10 (15), 3367-3370.
143. Nguyen, T. B.; Ermolenko, L.; Dean, W. A.; Al-Mourabit, A., Benzazoles from aliphatic amines and *o*-amino/mercaptan/hydroxyanilines: Elemental sulfur as a highly efficient and traceless oxidizing agent. *Org. Lett.* **2012**, 14 (23), 5948-5951.
144. Hanan, E. J.; Chan, B. K.; Estrada, A. A.; Shore, D. G.; Lyssikatos, J. P., Mild and general one-pot reduction and cyclization of aromatic and heteroaromatic 2-nitroamines to bicyclic 2*H*-imidazoles. *Synlett* **2010**, 2010 (18), 2759-2764.
145. Yang, D.; Fokas, D.; Li, J.; Yu, L.; Baldino, C. M., A versatile method for the synthesis of benzimidazoles from *o*-nitroanilines and aldehydes in one step via a reductive cyclization. *Synthesis* **2005**, 1, 47-56.
146. Cui, W.; Kargbo, R. B.; Sajjadi-Hashemi, Z.; Ahmed, F.; Gauuan, J. F., Efficient one-pot synthesis of 2-substituted benzimidazoles from triacyloxyborane intermediates. *Synlett* **2012**, 2, 247-250.
147. Sluiter, J.; Christoffers, J., Synthesis of 1-methylbenzimidazoles from carbonitriles. *Synlett* **2009**, 1, 63-66.
148. Wray, B. C.; Stambuli, J. P., Synthesis of N-arylindazoles and benzimidazoles from a common intermediate. *Org. Lett.* **2010**, 12 (20), 4576-4579.
149. Saha, P.; Ramana, T.; Purkait, N.; Ali, M. A.; Paul, R.; Punniyamurthy, T., Ligand-free copper-catalyzed synthesis of substituted benzimidazoles, 2-aminobenzimidazoles, 2-aminobenzothiazoles, and benzoxazoles. *J. Org. Chem.* **2009**, 74 (22), 8719-8725.
150. Peng, J.; Ye, M.; Zong, C.; Hu, F.; Feng, L.; Wang, X.; Wang, Y.; Chen, C., Copper-catalyzed intramolecular C–N bond formation: A straightforward synthesis of benzimidazole derivatives in water. *J. Org. Chem.* **2011**, 76 (2), 716-719.
151. Kim, Y.; Kumar, M. R.; Park, N.; Heo, Y.; Lee, S., Copper-catalyzed, one-pot, three-component synthesis of benzimidazoles by condensation and C–N bond formation. *J. Org. Chem.* **2011**, 76 (23), 9577-9583.
152. Kym, O., Zur Kenntniss einiger amidierter α -Phenyl-Benzimidazolderivate. *Berichte d. D. chem. Gesellschaft* **1899**, 32 (2), 2178-2180.
153. Feitelson, B. N.; Mamalis, P.; Moualim, R. J.; Petrow, V.; Stephenson, O.; Sturgeon, B., 448. Some benziminazole derivatives. *J. Chem. Soc. (Resumed)* **1952**, 2389-2398.
154. Wolkenberg, S. E.; Zhao, Z.; Kapitskaya, M.; Webber, A. L.; Petrukhin, K.; Tang, Y. S.; Dean, D. C.; Hartman, G. D.; Lindsley, C. W., Identification of potent agonists of photoreceptor-specific nuclear receptor (NR2E3) and preparation of a radioligand. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16 (19), 5001-5004.
155. Janupally, R.; Jeankumar, V. U.; Bobesh, K. A.; Soni, V.; Devi, P. B.; Pulla, V. K.; Suryadevara, P.; Chennubhotla, K. S.; Kulkarni, P.; Yogeewari, P.; Sriram, D., Structure-guided design and development of novel benzimidazole class of compounds targeting DNA gyraseB enzyme of *Staphylococcus aureus*. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, 22 (21), 5970-5987.
156. Joshi, D.; Parikh, K., Synthesis and evaluation of novel benzimidazole derivatives as antimicrobial agents. *Med. Chem. Res.* **2014**, 23 (3), 1290-1299.

157. Seenaiiah, D.; Reddy, P. R.; Reddy, G. M.; Padmaja, A.; Padmavathi, V.; Siva krishna, N., Synthesis, antimicrobial and cytotoxic activities of pyrimidinyl benzoxazole, benzothiazole and benzimidazole. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *77*, 1-7.
158. Garudachari, B.; Satyanarayana, M. N.; Thippeswamy, B.; Shivakumar, C. K.; Shivananda, K. N.; Hegde, G.; Isloor, A. M., Synthesis, characterization and antimicrobial studies of some new quinoline incorporated benzimidazole derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *54*, 900-906.
159. Özkay, Y.; Tunalı, Y.; Karaca, H.; Işıkdag, İ., Antimicrobial activity and a SAR study of some novel benzimidazole derivatives bearing hydrazone moiety. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45* (8), 3293-3298.
160. Zhang, D.; Wang, Z.; Xu, W.; Sun, F.; Tang, L.; Wang, J., Design, synthesis and antibacterial activity of novel actinonin derivatives containing benzimidazole heterocycles. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44* (5), 2202-2210.
161. Jardosh, H. H.; Sangani, C. B.; Patel, M. P.; Patel, R. G., One step synthesis of pyrido[1,2-a]benzimidazole derivatives of aryloxy pyrazole and their antimicrobial evaluation. *Chin. Chem. Lett.* **2013**, *24* (2), 123-126.
162. Ranjith, P. K.; Rajeesh, P.; Haridas, K. R.; Susanta, N. K.; Guru Row, T. N.; Rishikesan, R.; Suchetha Kumari, N., Design and synthesis of positional isomers of 5 and 6-bromo-1-[(phenyl)sulfonyl]-2-[(4-nitrophenoxy)methyl]-1H-benzimidazoles as possible antimicrobial and antitubercular agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23* (18), 5228-5234.
163. Gobis, K.; Foks, H.; Bojanowski, K.; Augustynowicz-Kopeć, E.; Napiórkowska, A., Synthesis of novel 3-cyclohexylpropanoic acid-derived nitrogen heterocyclic compounds and their evaluation for tuberculostatic activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20* (1), 137-144.
164. Keng Yoon, Y.; Ashraf Ali, M.; Choon, T. S.; Ismail, R.; Chee Wei, A.; Suresh Kumar, R.; Osman, H.; Beevi, F., Antituberculosis: Synthesis and antimycobacterial activity of novel benzimidazole derivatives. *Biomed. Res. Inter.* **2013**, *2013*, 6.
165. Luo, Y.; Yao, J.-P.; Yang, L.; Feng, C.-L.; Tang, W.; Wang, G.-F.; Zuo, J.-P.; Lu, W., Design and synthesis of novel benzimidazole derivatives as inhibitors of hepatitis B virus. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18* (14), 5048-5055.
166. Gudmundsson, K. S.; Sebahar, P. R.; Richardson, L. D. A.; Miller, J. F.; Turner, E. M.; Catalano, J. G.; Spaltenstein, A.; Lawrence, W.; Thomson, M.; Jenkinson, S., Amine substituted N-(1H-benzimidazol-2-ylmethyl)-5,6,7,8-tetrahydro-8-quinolinamines as CXCR4 antagonists with potent activity against HIV-1. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19* (17), 5048-5052.
167. Tonelli, M.; Simone, M.; Tasso, B.; Novelli, F.; Boido, V.; Sparatore, F.; Paglietti, G.; Priol, S.; Giliberti, G.; Blois, S.; Ibba, C.; Sanna, G.; Loddo, R.; La Colla, P., Antiviral activity of benzimidazole derivatives. II. Antiviral activity of 2-phenylbenzimidazole derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18* (8), 2937-2953.
168. Xiang, P.; Zhou, T.; Wang, L.; Sun, C.-Y.; Hu, J.; Zhao, Y.-L.; Yang, L., Novel benzothiazole, benzimidazole and benzoxazole derivatives as potential antitumor agents: Synthesis and preliminary in vitro biological evaluation. *Molecules* **2012**, *17* (1), 873.
169. Karthikeyan, C.; Solomon, V. R.; Lee, H.; Trivedi, P., Synthesis and biological evaluation of 2-(phenyl)-3H-benzo[d]imidazole-5-carboxylic acids and its methyl esters as potent anti-breast cancer agents. *Arab. J. Chem.* **2013**, xxx, xxx-xxx Article in press.
170. Yoon, Y. K.; Ali, M. A.; Wei, A. C.; Choon, T. S.; Osman, H.; Parang, K.; Shirazi, A. N., Synthesis and evaluation of novel benzimidazole derivatives as sirtuin inhibitors with antitumor activities. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22* (2), 703-710.

171. El-Nassan, H. B., Synthesis, antitumor activity and SAR study of novel [1,2,4]triazino[4,5-*a*]benzimidazole derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, 53, 22-27.
172. Liu, T.; Sun, C.; Xing, X.; Jing, L.; Tan, R.; Luo, Y.; Huang, W.; Song, H.; Li, Z.; Zhao, Y., Synthesis and evaluation of 2-[2-(phenylthiomethyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-yl]acetohydrazide derivatives as antitumor agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22 (9), 3122-3125.
173. Omar, M. A.; Shaker, Y. M.; Galal, S. A.; Ali, M. M.; Kerwin, S. M.; Li, J.; Tokuda, H.; Ramadan, R. A.; El Diwani, H. I., Synthesis and docking studies of novel antitumor benzimidazoles. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, 20 (24), 6989-7001.
174. El-Nezhawy, A. O. H.; Biuomy, A. R.; Hassan, F. S.; Ismaiel, A. K.; Omar, H. A., Design, synthesis and pharmacological evaluation of omeprazole-like agents with anti-inflammatory activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, 21 (7), 1661-1670.
175. Achar, K. C. S.; Hosamani, K. M.; Seetharamareddy, H. R., In-vivo analgesic and anti-inflammatory activities of newly synthesized benzimidazole derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45 (5), 2048-2054.
176. Ishikawa, M.; Nonoshita, K.; Ogino, Y.; Nagae, Y.; Tsukahara, D.; Hosaka, H.; Maruki, H.; Ohyama, S.; Yoshimoto, R.; Sasaki, K.; Nagata, Y.; Eiki, J.-i.; Nishimura, T., Discovery of novel 2-(pyridine-2-yl)-1*H*-benzimidazole derivatives as potent glucokinase activators. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19 (15), 4450-4454.
177. Kwak, H. J.; Pyun, Y. M.; Kim, J. Y.; Pagire, H. S.; Kim, K. Y.; Kim, K. R.; Rhee, S. D.; Jung, W. H.; Song, J. S.; Bae, M. A.; Lee, D. H.; Ahn, J. H., Synthesis and biological evaluation of aminobenzimidazole derivatives with a phenylcyclohexyl acetic acid group as anti-obesity and anti-diabetic agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, 23 (16), 4713-4718.
178. Nakano, H.; Inoue, T.; Kawasaki, N.; Miyataka, H.; Matsumoto, H.; Taguchi, T.; Inagaki, N.; Nagai, H.; Satoh, T., Synthesis of benzimidazole derivatives as antiallergic agents with 5-lipoxygenase inhibiting action. *Chem. Pharm. Bull.* **1999**, 47 (11), 1573-1578.
179. Ayhan-Kilcigil, G.; Kus, C.; Çoban, T.; Can-Eke, B.; Iscan, M., Synthesis and antioxidant properties of novel benzimidazole derivatives. *J. Enz. Inhib. Med. Chem.* **2004**, 19 (2), 129-135.
180. Saify, Z. S.; Azim, M. K.; Ahmad, W.; Nisa, M.; Goldberg, D. E.; Hussain, S. A.; Akhtar, S.; Akram, A.; Arayne, A.; Oksman, A.; Khan, I. A., New benzimidazole derivatives as antiplasmodial agents and plasmepsin inhibitors: Synthesis and analysis of structure-activity relationships. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22 (2), 1282-1286.
181. Valdez-Padilla, D.; Rodríguez-Morales, S.; Hernández-Campos, A.; Hernández-Luis, F.; Yépez-Mulia, L.; Tapia-Contreras, A.; Castillo, R., Synthesis and antiprotozoal activity of novel 1-methylbenzimidazole derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17 (4), 1724-1730.
182. Aguayo-Ortiz, R.; Pérez-Villanueva, J.; Hernández-Campos, A.; Castillo, R.; Meurice, N.; Medina-Franco, J. L., Chemoinformatic characterization of activity and selectivity switches of antiprotocol compounds. *Future Med. Chem.* **2014**, 6, 281-294.
183. Pérez-Villanueva, J.; Hernández-Campos, A.; Yépez-Mulia, L.; Méndez-Cuesta, C.; Méndez-Lucio, O.; Hernández-Luis, F.; Castillo, R., Synthesis and antiprotozoal activity of novel 2-[[2-(1*H*-imidazol-1-yl)ethyl]sulfanyl]-1*H*-benzimidazole derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, 23 (14), 4221-4224.
184. Lau, J.; Behrens, C.; Sidemann, U. G.; Knudsen, L. B.; Lundt, B.; Sams, C.; Ynddal, L.; Brand, C. L.; Pridal, L.; Ling, A.; Kiel, D.; Plewe, M.; Shi, S.; Madsen, P., New β -

- alanine derivatives are orally available glucagon receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **2007**, 50 (1), 113-128.
185. 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. *J. Antibiot.* **1980**, 33, 29-35.
 186. Okuhara, M.; Kuroda, Y.; Goto, T.; Okamoto, M.; Terano, H.; Kohsaka, M.; Aoki, H.; Imanaka, H., Studies on new phosphonic acid antibiotics. III. Isolation and characterization of FR-31564, FR-32863 and FR-33289. *J. Antibiot.* **1980**, 33, 24-28.
 187. Kuzuyama, T.; Shimizu, T.; Takahashi, S.; Seto, H., Fosmidomycin, a specific inhibitor of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase in the nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39 (43), 7913-7916.
 188. Jomaa, H.; Wiesner, J.; Sanderbrand, S.; Altincicek, B.; Weidemeyer, C.; Hintz, M.; Türbachova, I.; Eberl, M.; Zeidler, J.; Lichtenthaler, H. K.; Soldati, D.; Beck, E., Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. *Science* **1999**, 285 (5433), 1573-1576.
 189. Murakawa, T.; Sakamoto, H.; Fukada, S.; Konishi, T.; Nishida, M., Pharmacokinetics of fosmidomycin, a new phosphonic acid antibiotic. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1982**, 21, 224-230.
 190. 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.
 191. Kuntz, L.; Tritsch, D.; Grosdemange-Billiard, C.; Hemmerlin, A.; Willem, A.; Bach, T. J.; Rohmer, M., Isoprenoid biosynthesis as a target for antibacterial and antiparasitic drugs: Phosphonohydroxamic acids as inhibitors of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase. *Biochem. J.* **2005**, 386, 127-135.
 192. 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. *J. Org. Chem.* **2010**, 75 (10), 3203-3207.
 193. Verbruggen, T.; Cos, P.; Maes, L.; Van Calenbergh, S., Synthesis and evaluation of α -halogenated analogues of 3-(acetylhydroxyamino)propylphosphonic acid (FR900098) as antimalarials. *J. Med. Chem.* **2010**, 53 (14), 5342-5346.
 194. Haemers, T.; Wiesner, J.; Gießmann, D.; Verbruggen, T.; Hillaert, U.; Ortmann, R.; Jomaa, H.; Link, A.; Schlitzer, M.; Van Calenbergh, S., Synthesis of β - and γ -oxa isosteres of fosmidomycin and FR900098 as antimalarial candidates. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16 (6), 3361-3371.
 195. Behrendt, C. T.; Kunfermann, A.; Illarionova, V.; Matheeussen, A.; Gräwert, T.; Groll, M.; Rohdich, F.; Bacher, A.; Eisenreich, W.; Fischer, M.; Maes, L.; Kurz, T., Synthesis and antiparasitic activity of highly active reverse analogues of the antimalarial drug candidate fosmidomycin. *ChemMedChem* **2010**, 5 (10), 1673-1676.
 196. Behrendt, C. T.; Kunfermann, A.; Illarionova, V.; Matheeussen, A.; Pein, M. K.; Gräwert, T.; Kaiser, J.; Bacher, A.; Eisenreich, W.; Illarionov, B.; Fischer, M.; Maes, L.; Groll, M.; Kurz, T., Reverse fosmidomycin derivatives against the antimalarial drug target IspC (Dxr). *J. Med. Chem.* **2011**, 54 (19), 6796-6802.
 197. Kunfermann, A.; Lienau, C.; Illarionov, B.; Held, J.; Gräwert, T.; Behrendt, C. T.; Werner, P.; Hähn, S.; Eisenreich, W.; Riederer, U.; Mordmüller, B.; Bacher, A.; Fischer, M.; Groll, M.; Kurz, T., IspC as target for anti-infective drug discovery: Synthesis, enantiomeric separation, and structural biology of fosmidomycin thia isosters. *J. Med. Chem.* **2013**, 56 (20), 8151-8162.

198. Konzuch, S.; Umeda, T.; Held, J.; Hähn, S.; Brücher, K.; Lienau, C.; Behrendt, C. T.; 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. *J. Med. Chem.* **2014**, 57 (21), 8827-8838.
199. Diel, P. J.; Maier, L., Organic phosphorus compounds 79¹ preparations and properties of α -amino- ω -carboxyalkylphosphon- and phosphinic acids. *Phosphorus Sulfur Relat. Elem.* **1987**, 29 (2-4), 201-209.
200. Botté, C. Y.; Dubar, F.; McFadden, G. I.; Maréchal, E.; Biot, C., *Plasmodium falciparum* apicoplast drugs: Targets or off-targets? *Chem. Rev.* **2011**, 112 (3), 1269-1283.
201. Reuter, K.; Sanderbrand, S.; Jomaa, H.; Wiesner, J.; Steinbrecher, I.; Beck, E.; Hintz, M.; Klebe, G.; Stubbs, M. T., Crystal structure of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase, a crucial enzyme in the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277 (7), 5378-5384.
202. Yajima, S.; Nonaka, T.; Kuzuyama, T.; Seto, H.; Ohsawa, K., Crystal structure of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase complexed with cofactors: Implications of a flexible loop movement upon substrate binding. *J. Biochem.* **2002**, 131 (3), 313-317.
203. Steinbacher, S.; Kaiser, J.; Eisenreich, W.; Huber, R.; Bacher, A.; Rohdich, F., Structural basis of fosmidomycin action revealed by the complex with 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate synthase (IspC) implications for the catalytic mechanism and anti-malaria drug development. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278 (20), 18401-18407.
204. Mac Sweeney, A.; Lange, R.; Fernandes, R. P.; Schulz, H.; Dale, G. E.; Douangamath, A.; Proteau, P. J.; Oefner, C., The crystal structure of *E. coli* 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase in a ternary complex with the antimalarial compound fosmidomycin and NADPH reveals a tight-binding closed enzyme conformation. *J. Mol. Biol.* **2005**, 345 (1), 115-127.
205. Yajima, S.; Hara, K.; Iino, D.; Sasaki, Y.; Kuzuyama, T.; Ohsawa, K.; Seto, H., Structure of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase in a quaternary complex with a magnesium ion, NADPH and the antimalarial drug fosmidomycin. *Acta Crystallogr., Sect. F: Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2007**, 63 (6), 466-470.
206. Ricagno, S.; Grolle, S.; Bringer-Meyer, S.; Sahm, H.; Lindqvist, Y.; Schneider, G., Crystal structure of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from *Zymomonas mobilis* at 1.9-Å resolution. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, 1698 (1), 37-44.
207. Henriksson, L. M.; Unge, T.; Carlsson, J.; Åqvist, J.; Mowbray, S. L.; Jones, T. A., Structures of *Mycobacterium tuberculosis* 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase provide new insights into catalysis. *J. Biol. Chem.* **2007**, 282 (27), 19905-19916.
208. Takenoya, M.; Ohtaki, A.; Noguchi, K.; Endo, K.; Sasaki, Y.; Ohsawa, K.; Yajima, S.; Yohda, M., Crystal structure of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase from the hyperthermophile *Thermotoga maritima* for insights into the coordination of conformational changes and an inhibitor binding. *J. Struct. Biol.* **2010**, 170 (3), 532-539.
209. Henriksson, L. M.; Björkelid, C.; Mowbray, S. L.; Unge, T., The 1.9 Å resolution structure of *Mycobacterium tuberculosis* 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, a potential drug target. *Acta Crystallogr. Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2006**, 62 (7), 807-813.
210. Gottlieb, H. E.; Kotlyar, V.; Nudelman, A., NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities. *J. Org. Chem.* **1997**, 62 (21), 7512-7515.

211. Trager, W.; Jensen, J. B., Human malaria parasites in continuous culture. *Science* **1976**, *193* (4254), 673-675.
212. Lambros, C.; Vanderberg, J. P., Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J. Parasitol.* **1979**, 418-420.
213. Noedl, H.; Bronnert, J.; Yingyuen, K.; Attlmayr, B.; Kollaritsch, H.; Fukuda, M., Simple histidine-rich protein 2 double-site sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for use in malaria drug sensitivity testing. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49* (8), 3575-3577.
214. Ritz, C.; Streibig, J. C., Bioassay analysis using R. *J. Stat. Softw.* **2005**, *12* (5), 1-22.
215. Delves, M.; Plouffe, D.; Scheurer, C.; Meister, S.; Wittlin, S.; Winzeler, E. A.; Sinden, R. E.; Leroy, D., The activities of current antimalarial drugs on the life cycle stages of *Plasmodium*: A comparative study with human and rodent parasites. *PLoS Med.* **2012**, *9* (2), 227.
216. Borenfreund, E.; Puerner, J. A., A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). *Journal of Tissue Culture Methods* **1985**, *9* (1), 7-9.