

Präklinische Optimierung der antiinfektiven Naturstoffe Chlorflavonin und Fosmidomycin

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Talea Knak Aus Aurich

Düsseldorf, Juni 2024

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

Berichterstatter:

1. Prof. Dr. Thomas Kurz

2. Prof. Dr. Rainer Kalscheuer

Tag der mündlichen Prüfung: 19.08.2024

Erklärung zur Dissertation

Ich versichere an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der "Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf" im Zeitraum von August 2020 bis Dezember 2023 am Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Kurz angefertigt worden ist. Zusätzlich wurde diese Arbeit von Prof. Dr. Rainer Kalscheuer betreut. Die Dissertation ist in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Fakultät eingereicht worden. Bisher wurden von mir keine Promotionsversuche (weder erfolglos noch erfolgreich) unternommen.

Düsseldorf, der 05.06.2024

(Talea Knak)

Diese Arbeit wurde in Teilen bereits in Fachzeitschriften, auf wissenschaftlichen Symposien und Fachtagungen veröffentlicht.

Publikationen in Fachzeitschriften

 <u>T. Knak</u>, M. A. Abdullaziz, S. Höfmann, L. A. Alves Avelar, S. Klein, M. Martin, M. Fischer, N. Tanaka, T. Kurz. *Over 40 Years of Fosmidomycin Drug Research: A Comprehensive Review and Future Opportunities. Pharmaceuticals* **2022**, 15(12), 1553, DOI: 10.3390/ph15121553.

Dieser Artikel wurde unverändert und in englischer Sprache als Kapitel 2.4.3 "Fosmidomycin" übernommen. Zudem wurde dieser Artikel bereits in der Dissertation von DR. MONA MAHMOUD mit dem Titel "Development of reverse *N*-substituted fosmidomycin analogs as *P. falciparum* 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase inhibitors" in unveränderter Form verwendet.

PROF. DR. THOMAS KURZ hat diese Publikation betreut und inhaltlich überarbeitet. Die Niederschrift des Manusskriptes erfolgte durch DR. LEANDRO ALVES AVELAR (Kapitel 9), STEFAN HÖFMANN (Kapitel 1 und 2), DR. MONA MAHMOUD (Kapitel 4), SASKIA KLEIN (Kapitel 3.1) und PROF. DR. NOBUTADA TANAKA (Kapitel 3.2) und mich (Kapitel 5, 6, 7, 8 und Figure 3). Die inhaltlichen Überarbeitungen und das Erstellen der Schemata erfolgte durch STEFAN HÖFMANN und mich.

 A. Berger, <u>T. Knak</u>, A.-L. Kiffe-Delf, K. Mudrovcic, V. Singh, M. Njoroge, B. B. Burckhardt, M. Gopalswamy, B. Lungerich, L. Ackermann, H. Gohlke, K. Chibale, R. Kalscheuer, T. Kurz. *Total Synthesis of the Antimycobacterial Natural Product Chlorflavonin and Analogs via a Late-Stage Ruthenium(II)-Catalyzed ortho-C(sp²)-H-Hydroxylation. Pharmaceuticals* 2022, 15, 984, DOI: 10.3390/ph15080984.

Dieser Artikel wurde unverändert und in englischer Sprache als Kapitel 4.1.3 "Total Synthesis of the Antimycobacterial Natural Product Chlorflavonin and Analogs via a Late-Stage Ruthenium(II)-Catalyzed *ortho*-C(sp²)-H-Hydroxylation" übernommen.

PROF. DR. THOMAS KURZ hat den synthetischen Teil der Publikation betreut und das Konzept für die Veröffentlichung formuliert. Die synthetische Durchführung erfolgte durch DR. ALEXANDER BERGER (Verbindung 1, 1a-e, 1h, 1i, 1k-n) und mich (Verbindungen 1, 1a, 1f-g und 1j). Die erste Niederschrift des Manuskripts erfolgte durch DR. ALEXANDER BERGER, KORANA MUDROVCIC, PROF. DR. THOMAS KURZ und mich. Die biologische Evaluation erfolgte durch DR. ANNA-LENE KIFFE-DELF, PROF. DR. RAINER KALSCHEUER, DR. VINAYAK SINGH, DR. MATHEW NJOROGE und PROF. DR. KELLY CHIBALE. Die Durchführung der ¹H-NMR-Titration

erfolgte durch mich unter Anleitung von DR. MOHANRAJ GOPALSWAMY. Die Auswertung dieser Rohdaten erfolgte durch DR. MOHANRAJ GOPALSWAMY und PROF. DR. HOLGER GOHLKE. KORANA MUDROVCIC und PROF. DR. HOLGER GOHLKE haben das Modell zur Quantitativen Struktur-Wirkungs-Beziehung generiert.

Das folgende Schema wurde inhaltlich bereits in englischer Sprache veröffentlicht und für die Verwendung in dieser Arbeit in Teilen erheblich verändert und in die deutsche Sprache übersetzt:

Schema 29

Vorträge

Structural Optimization of Chlorflavonin – a natural compound with antimycobacterial activity, GRK2158 Retreat 2021, 20.09.-22.09.2021, online.

Structural Optimization of Chlorflavonin – a natural compound with antimycobacterial activity, DPhG Annual PhD & Postdoc Meeting 2022, 01.02.-02.02.2024, online.

Synthesis and evaluation of the antimycobacterial natural product chlorflavonin, GRK2158 Retreat 2022, 30.03.-01.04.2022, Radevormwald.

Poster

Total Synthesis of the Anti-mycobacterial Natural Product Chlorflavonin and Analogs via a Ruthenium(II)-Catalyzed ortho-C(sp²)-H-Hydroxylation, H3D 2022 Symposium, 25.10.-28.10 2022, Stellenbosch, Südafrika.

Total Synthesis of the Anti-mycobacterial Natural Product Chlorflavonin and Analogs via a Ruthenium(II)-Catalyzed ortho-C(sp²)-H-Hydroxylation, GRK2158 Symposium, 28.11.-29.11 2022, Düsseldorf.

Meiner Familie und engsten Freund*innen gewidmet.

Danksagungen

Zunächst möchte ich mich bei Herr Prof. Dr. Thomas Kurz für die gute Betreuung, die konstruktiven Gespräche und die damit verbundenen Erfahrungen im Rahmen meiner Promotion am Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie bedanken. Mein besonderer Dank gilt Deinem Vertrauen in mich, ein herausforderndes Thema zu bearbeiten und gleichzeitig die Möglichkeit zu haben dieses eigenständig zu gestalten. Auch dass Du mir die OC-Praktikumsleitung während der Promotionszeit zugetraut hast, ist nicht selbstverständlich und war für mich eine sehr lehrreiche Erfahrung. Zudem bedanke ich mich für die Möglichkeit am DAAD-JSPS Austauschprogramm teilzunehmen, die Zeit in Japan werde ich immer in guter Erinnerung halten.

Bei Herrn Prof. Dr. Rainer Kalscheuer bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Korreferates und die allseits zuverlässige Kooperation bei der Biotestung meiner Verbindungen.

Ohne die freundliche und zuverlässige Zusammenarbeit im Rahmen verschiedener Kooperationen wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Daher gilt mein Dank Dr. Anna-Lene Kiffe-Delf, M.Sc. Violetta Krisilia, Heike Goldbach-Gecke und Prof. Dr. Kalscheuer vom Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie, Heinrich-Heine-Universität für die Übernahme der phänotypischen *in vitro* Assays gegen Bakterien. Daneben auch Dr. Boris Illarionov und Prof. Dr. Markus Fischer vom Institut für Lebensmittelchemie, Universität Hamburg für die Durchführung der DXR-Assays und Dr. Lais Pessanha De Carvalho Und Dr. Jana Held, Institut für Tropenmedizin, Eberhard Karls Universität Tübingen für die Bestimmung der antiplasmodialen Aktivität.

Für die Evaluation präklinischer Parameter und ein unvergessliches H3D Symposium in Stellenbosch bedanke ich mich bei Dr. Vinayak Singh, Dr. Mathew Njoroge, Dr. Nashied Peton und Prof. Dr. Kelly Chibale vom Drug Discovery and Development Centre (H3D) und der Universtät Kapstadt, Südafrika. Zudem bedanke ich mich bei M.Sc. Korana Mudrovčić, Dr. Mohanraj Gopalswamy und Prof. Dr. Holger Gohlke vom Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Heinrich-Heine-Universtät für das Erstellen des QSAR-Modells und die Möglichkeit im Rahmen einer Laborration die pK_S-Werte meiner Verbindungen zu bestimmen. Bei Prof. Dr. Lutz Ackermann und Dr. Nikolaos Kaplaneris, Institut für Organische und Biomolekulare Chemie, Georg-August-Universität Göttingen möchte ich mich vielmals für den überaus lehrreichen Forschungsaufenthalt in Göttingen bedanken ohne den einige Verbindungen dieser Arbeit nicht entstanden wären.

Mein besonderer und herzlichster Dank gilt Prof. Dr. Nobutada Tanaka, Sana Takada und Dr. Shin-Ichiro Ozawa für das Aufnehmen der Kristallstrukturen unserer Verbindungen sowie

grenzenlose Gastfreundschaft, unvergesslichen Erlebnisse und einfach eine tolle Zeit während unserer gegenseitigen Forschungsaufenthalte. Diese Erfahrungen wären ohne finanzielle Unterschützung im Rahmen des Personenbezogenen Austauschprogramms (PPP) des DAAD-JSPS nicht möglich gewesen, daher bedank ich mich herzlich für die Unterstützung. Bei Prof. Dr. Adelbert Bacher und Prof. Dr. Markus Fischer bedanke ich mich zudem für intensive Zusammenarbeit und wegweisende Unterschützung bei dem Erstellen des Fosmidomycin-Reviews.

Dem *CeMSA*@*HHU* (Center for Molecular and Structural Analytics an der Heinrich-Heine Universität) danke ich für die Aufnahme der NMR-spektroskopischen und massenspektroskopischen Daten. Danke schön, Mohanad Aian und Tanja Muth, für Eure Freundlichkeit und die schnelle Aufnahme der NMR-Spektren. Ebenfalls namentlich erwähnen möchte ich PD Dr. Klaus Schaper für die Beantwortung meiner NMR-Fragen und die kleinen Aufmerksamkeiten an Feiertagen. Dr. Peter Tommes und Ralf Bürgel danke ich für die gewissenhafte Aufnahme der Massenspektren.

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an meine lieben (ehemaligen) Kollegen Christian Anzenhofer, Dr. Leandro Alves Avelar, Dr. Alexander Berger, Fabian Fischer, Stefan Höfmann, Helena Lazic, Beate Lungerich, Franziska Kinnen, Saskia Klein, Dr. Mona Mahmoud, Dr. Oliver Michel, Hendrik Pols und Petra Stahlke. Ihr hattet bei Fragen und Problemen stets ein offenes Ohr und habt mit eurer fachlichen Expertise sowie gegenseitigem wissenschaftlichen Austausch diese Arbeit ungemein bereichert (insbesondere natürlich das FFK Consulting). Danke auch für das ein oder andere Feierabend-Frust-Bier, wenn es einmal nötig war. Natürlich gilt ein extra Dankeschön meinem besten Freund, Laborkollegen, Sekretär und Reisebegleiter Stefan. Danke, dass du die Musikwünsche und das Chaos des wilden Frettchens immer gut gelaunt ertragen hast. Dir und Leandro bin ich außerdem dankbar für die unvergesslich schöne und witzige Zeit in Japan.

Meine WPPler Gülay Bozkurt und Elisabeth Britsch haben mich bei der Synthese unterstützt und Shiva Mobini-Tehrani sowie Caroline Gulba durch intensive Literaturrecherche zu neuen Tuberkulostatika während der Pandemie. Ein herzliches Dankeschön dafür.

Nicht unerwähnt bleiben dürfen die Mitglieder des AK Stark, Cramer und Müller für die immer wieder spontane Hilfe bei plötzlich auftretendem Chemikalien- und Verbrauchsmaterialnotstand.

Bei den (ehemaligen) OC-Praktikumsleitungen Dr. Leandro Alves Avelar, Dr. Markus Falkenstein, Dr. Maximilian Barth und Dr. Sonja Hinz danke ich für die stets freundliche Zusammenarbeit und lehrreiche Zeit. Auch den OC-Assistenten Reham Alajami, Jonas Dittrich, Laura Muñoz Gloder, Saskia Klein, Hendrik Pols und Sebastian Wilke danke ich für

die gute Zusammenarbeit, den ein oder anderen Spaß im Praktikum und eure große Unterstützung während meiner Zeit als Praktikumsleitung.

Ich danke dem GRK2158 für die tolle Zusammenarbeit und insbesondere Martina Holz für die gewissenhafte Organisation der Veranstaltungen und Workshops. Ohne dich hätte ich definitiv weniger Soft-Skills. Danke natürlich auch an Fabian Fischer, weil du mir zu liebe und ganz und gar freiwillig das Amt des Doktorandensprechers übernommen hast.

Für die gewissenhafte Korrektur dieser Arbeit danke ich Christian Günther Anzenhofer, Dr. Lukas Biesen, Fabian Fischer, Stefan Höfmann und Dr. Marco Kruppa.

Besonders Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Freunden, die mich im Laufe des Studiums in Kiel und Düsseldorf, während des PJs in Darmstadt und der Promotion begleitet und unterstützt haben. Insbesondere danke ich Theresa Hube und Leonie Keysberg für ihre offenen Ohren. Nicht vergessen werden dürfen zudem meine langjährigen Freunde: Justus Eberleh, Jonathan Hammoor, Juliane Glöij, Lars Pieperjohanns und Birte Rohden. Jetzt habe eine der 10-Jahres-Wetten wohl gewonnen – Chears!

Ohne den Rückhalt und die finanzielle Unterstützung meiner Familie wäre ich jetzt nicht an diesem Punkt. Wilma und Thomas Knak, Aenne und Mimke Kleemann, Inge Buss und Ingrid Knak - Ich kann nicht in Worte fassen wie sehr ich euch danke und lieb habe. Nicht zu vergessen sind meine Nichten Maila, Hilla und Enja, weil ihr mir so oft ein Lächeln ins Gesicht zaubert.

Mein letztes Dankeschön gebührt Marco Bruno Kruppa. Danke für deine fortwährende Unterstützung, fürs In-Ruhe-lassen zum richtigen Zeitpunkt, den bekloppten Schapernack mit dem du mich jeden Tag zum Lachen bringst und all die schönen gemeinsam erlebten Momente.

Inhaltsverzeichnis

AbkürzungsverzeichnisI				
1.	Zus	amn	nenfassung und Abstract	1
	1.1.	Zus	ammenfassung	1
	1.2.	Sur	nmary	1
2.	Einl	eitur	ng6	3
	2.1.	Bak	terielle Infektionserkrankungen	3
	2.2.	Tub	perkulose1	1
	2.3.	Mal	aria17	7
	2.4.	Ans	atzpunkte zur Entwicklung neuer Antiinfektiva23	3
	2.4	.1.	Naturstoffe in der Antiinfektiva-Forschung23	3
	2.4	.2.	Flavonoide als Antiinfektiva25	5
	2.4	.3.	Fosmidomycin	1
	2.4	.4.	Bakterielle Siderophore94	1
3.	Ziel	setzi	ung10′	1
	3.1.	Chl	orflavonin und Bromflavonin101	1
	3.2.	Syn	these neuartiger β-thia-isosterer Fosmidomycin-Analoga102	2
	3.3. Sidero	Syn opho	nthese von Siderophor(-fragmenten) und β-thia-isosteren Fosmidomycin pr-Konjugaten	- 1
4. Literaturübersicht		rübersicht105	5	
	4.1.	Lite	raturübersicht zur Darstellung von Flavonolen105	5
	4.1	.1.	Literaturbekannte Synthesen von Chlorflavonin und Analoga113	3
	4.1	.2.	Literaturbekannte Synthese von Ternatin	5
	4.1 Ana	.3. alogs	Total Synthesis of the Antimycobacterial Natural Product Chlorflavonin and s via a Late-Stage Ruthenium(II)-Catalyzed <i>ortho</i> -C(sp ²)-H-Hydroxylation117	t 7
	4.2.	Lite	raturübersicht zur Darstellung eta -thia-isosteren Fosmidomycin-Analoga190)
	4.3.	Lite	raturbekannte Darstellungen von Siderophoren und –fragmenten	2
	4.3	.1.	2-Chlor-3,4-dihydroxybenzoesäure LXXVIII192	2
	4.3	.2.	Azotochelin (N ² , N ⁶ -Bis(2, 3-dihydroxybenzoyl)-L-lysin) LXXXI 193	3
	4.3	.3.	Mycobactine	1

5.	Erg	ebnis	sse und Diskussion der Synthese und präklinischen Evaluation von Chlorflavonin
und Bromflavonin-Analoga			
Ę	5.1.	Dar	stellung von literaturbekannten Verbindungen
Ę	5.2.	Stru	Ikturvariation der B-Region213
	5.2	.1.	Variation des Substitutionsmusters des B-Ringes
	5.2	.2.	Bioisosterer Austausch der 2'-Hydroxygruppe216
	5.2	.3.	Derivatisierung der 2'-Hydroxygruppe217
Ę	5.3.	Stru	ukturvariationen in der 3-Position219
	5.3	.1.	Einführung von (funktionalisierten) 3-Alkoxyresten
	5.3	.2.	Darstellung von fluorierten 3-Methoxy-Bromflavonin-Analoga
Ę	5.4.	Stru	ıkturvariationen der A-Region228
	5.4	.1.	Variation des Substitutionsmusters
	5.4	.2.	Übergangsmetall-katalysierte C(sp ²)-H-Aktivierungen zur Modifikation der
	5-P	ositi	on231
Ę	5.5.	Stru	ıkturaufklärung von N-(2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4-oxo-4H-
C	hrom	nen-5	5-yl)-4-methylbenzolsulfonamid (9b)239
	5.5	.1.	Zuordnung der Wasserstoffkerne
	5.5	.2.	Zuordnung der Kohlenstoffkerne
Ę	5.6.	Prä	klinische Evaluation der Chlor- und Bromflavonin-Analoga
	5.6	.1.	Antimykobakterielle in vitro Aktivität und Zytotoxizität246
	5.6	.2.	Physikochemische Eigenschaften257
	5.6	.3.	Chemische und metabolische Stabilität263
6.	Erg	ebnis	sse und Diskussion der Synthese und präklinischen Evaluation von eta -thia-
iso	sterei	n Fo	smidomycin-Analoga266
6	6.1.	Dar	stellung β -thia-isosterer Fosmidomycin-Analoga des Strukturtyps 1267
	6.1	.1.	Darstellung der Carbonsäure 13 und O-Benzyl-N-(3-phenylpropyl)hydroxylamin
	Hyo	drocł	nlorid 17
	6.1	.2.	Versuche zur Darstellung der O-Benzyl-N-phenylpropylhydroxamsäure 18270
	6.1	.3.	Darstellung der Phosphonohydroxamsäure 20 275
6	6.2.	Dar	stellung β -thia-isosterer Fosmidomycin-Analoga des Strukturtyps 2277
	6.2	.1.	α -(Alkoxyphenyl)- β -thia-isosterer Fosmidomycin-Analoga

	6.2	.2.	α -(Amidophenyl)- β -thia-isosterer Fosmidomycin-Analoga	.291
6	6.3.	Stru	ikturaufklärung der α-Hydroxyphosphonate 22c und 22b	.299
	6.3	.1.	Zuordnung der Wasserstoffkerne	.299
	6.3	.2.	Zuordnung der Kohlenstoffkerne von Verbindung 22c und 22b	.301
6	6.4.	Präl	klinische Evaluation der eta -thia-isosteren Fosmidomycin-Analoga	.306
	6.4 phä	.1. inoty	Target-basiertes <i>in vitro</i> Screening gegenüber DXR-Ortologen pische <i>in vitro</i> Aktivität	und .307
	6.4 der	.2. Vert	Ergebnisse des Target-basierten <i>in vitro</i> Screening gegenüber DXR-Ortholo bindungen 28a-f	ogen .310
	6.4	.3.	Ergebnisse der phänotypischen in vitro Aktivitäten von Verbindung 28a-f	.311
	6.4	.4.	Kristallstrukturanalysen	.315
	6.4	.5.	Chemische Stabilität von CL1	.318
7.	Syn	thes	e der Siderophore und Siderophorfragmente	.321
7	7.1.	Dar	stellung der 2-Chlor-3,4-dihydroxybenzoesäure 32	.321
7	7.2.	Dar	stellung von Azotochelin	.322
7	7.3.	Dar	stellung von Mycobactin-Fragmenten	.323
	7.3	.1.	Syntheseplanung	.323
	7.3	.2.	Synthese der Mycobactin-Fragmente	.327
7 F	7.4. Fosmi	Etat idom	olierung einer Synthesestrategie zur Darstellung von β-thia-isost ycin-Analoga-Siderophor-Konjugaten	eren 333
8.	Aus	blick		.338
9.	Exp	erim	entalteil	.343
ç	9.1.	Allg	emeine Informationen	.343
ç	9.2.	Prä	parative Methoden	.344
ç	9.3.	Cha	rakterisierungsmethoden	.345
ç	9.4.	Kon	kordanzliste	.346
ç	9.5.	Allg	emeine Arbeitsvorschriften	.354
	9.5	.1.	Darstellung der MOM-geschützten Aldehyde (AAV 1)	.354
	9.5	.2.	Darstellung der Flavonole mittels Algar-Flynn-Oyamada-Reaktion (AAV 2).	.354
	9.5	.3.	Darstellung der 3-Alkylflavonoide (AAV 3)	.355

9.5.4.	Acidolytisches Entfernen der MOM-Schutzgruppe (AAV 4)355
9.5.5.	Darstellung der 5-Hydroxyflavonoide mittels Ruthenium-katalysierter ortho-
C(sp²)	-H-Hydroxylierung (AAV 5)355
9.5.6.	Darstellung der Alkoxybenzaldehyde (AAV 6)
9.5.7.	Darstellung der α -Hydroxyphosphonate mittels PUDOVIC-Reaktion (AAV 7)356
9.5.8.	Tosylierung oder Chlorierung der <i>a</i> -Hydroxyphosphonate (AAV 8)357
9.5.9.	Nukleophile Substitution der α -Chlor- und α -Tosylphosphonate (AAV 9)357
9.5.10	CDI-vermittelte Kupplungsreaktion (AAV 10)
9.5.11	TMSBr-Spaltung des Phosphonsäurediethylesters (AAV 11)358
9.6. An	alytische Daten
9.6.1.	Darstellung der Chlor- und Bromflavonin Analoga359
9.6.2.	Darstellung von (((2-(Hydroxy(3-phenylpropyl)amino)-2-oxoethyl)thio)-
(pheny	l)methyl)phosphonsäure (20)429
9.6.3.	Darstellung der α -(Alkoxyphenyl)- β -thia-isosteren Fosmidomycin Analoga439
9.6.4.	Darstellung der α -(Amidophenyl)- β -thia-isosteren Fosmidomycin Analoga469
9.6.4. 9.6.5.	Darstellung der α -(Amidophenyl)- β -thia-isosteren Fosmidomycin Analoga469 Darstellung von Siderophoren und Siderophorfragmenten
9.6.4. 9.6.5. 9.6.6.	Darstellung der α-(Amidophenyl)-β-thia-isosteren Fosmidomycin Analoga469 Darstellung von Siderophoren und Siderophorfragmenten

Abkürzungsverzeichnis

[18]Krone-6	1,4,7,10,13,16-Hexaoxacyclooctadecan
4-DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin
μm	Mikrometer
μΜ	Mikromolar [10 ⁻⁶ mol/L]
Å	Ångström (10 ⁻¹⁰ m)
A. baumanii	Acinetobacter baumannii
AAC	Antikörper-Antibiotika-Konjugate
ABC	ATP binding cassette = ATP-bindende Kassette
Ac	Acetyl
AcOH	Essigsäure
ACN	Acetonitril
ACT	Artemisinin-basierte Kombinationstherapie
ADME	Adsorption, Verteilung, Metabolismus und Eliminierung
AFO	ALGAR-FLYNN-OYAMADA-Reaktion
AHAS	Acetohydroxysäure Synthase
AHAO	(<i>S</i>)-3-Amino-1-hydroxyazepan-2-on
AMP	Antimikrobielles Peptid
APT	Attached proton test (NMR-Experiment)
Äq.	Äquivalent
ARK	ALLAN-ROBINSON-Kondensation
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area under the curve = Fläche unterhalb der Kurve
BCAA	Verzweigtkettige Aminosäuren
BCG	Bacillus CALMETTE-GUÉRIN
ber.	Berechnet
BF	Bromflavonin
Bn	Benzyl-Schutzgruppe
Boc	Tert-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe
BocO ₂	Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat
BOP	Benzotriazoly loxy tris (dimethy lamino) phosphonium hexa fluorophosphat
Bz	Benzoyl-Schutzgruppe
Cas	CRISPR-assoziiertes Protein
Cbz	Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe
CDI	1,1'-Carbonyldiimidazol
CF	Chlorflavonin
CL _{int, app}	Vorhergesagte in vivo intrinsische Clearance [mL/min/mg]

cLogP	berechneter Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
СМВ	Carboxymycobactin
COSY	Correlation spectroscopy (2D NMR-Experiment)
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
CSK	CLAISEN-SCHMIDT-Kondensation
CYP	Cytochrom P450
d	Dublett
Da	Dalton (etwa 1.6605655•10 ⁻²⁷ kg)
DAST	Diethylaminoschwefeltrifluorid
DBPO	Dibenzoylperoxid
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	<i>N,N</i> ′-Dicyclohexylcarbodiimid
DCE	Dichlorethan
dd	Dublett vom Dublett
DDQ	2,3-Dichlor-5,6-dicyano-1,4-benzochinon
DEAD	Diethylazodicarboxylat
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer (NMR-Experiment)
DIAD	Diisopropylazodicarboxylat
DIC	<i>N</i> , <i>N</i> '-Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
DMDO	Dimethyldioxiran
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DprE1	Decaprenylphosphoryl-β-D-ribose 2'-Epimerase
DXR	1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase
E. coli, Ec	Escherichia coli
EDC•HCI	3-(Ethyliminomethylidenamino)- <i>N,N</i> -dimethyl-propan-1-amin
	Hydrochlorid
EDG	<i>Electron donating group</i> = elektronenschiebende Gruppe
EEDQ	2-Ethoxy-1-ethoxycarbonyl-1,2-dihydrochinolin
Ен	Hepatisches Extraktionsverhältnis
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur
EMB	Ethambutol
ESI	Elektronenspray-Ionisation

Et	Ethyl
et al.	<i>Et alii, et aliae, et alia (latein)</i> = und andere
EtOAc	Essigsäureethylester
EtOH	Ethanol
EWG	<i>Electron withdrawing group</i> = elektronenziehende Gruppe
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FDA	Food and Drug Administration
FGI	<i>Functional group interconversion</i> = Umwandlung einer funktionellen
	Gruppe
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl-Schutzgruppe
Fos	Fosmidomycin
gef.	Gefunden
GlpT	Glycerin-3-phosphat-Shuttlesystem
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluor-
	phosphat
HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophos-
	phat
HEK293	<i>Human embryonic kidney</i> 293 <i>cells</i> = humane embryonale Nierenzellen
HeLa	Humane Epithelzellenlinie eines Zervixkarzinoms
hept.	Heptett
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HMPT	Hexamethylphosphorsäuretriamid
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation (2D NMR-Experiment)
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> = Hochleistungsflüssig- chromatographie
HPOC	(S)-2-(2-Hydroxyphenyl)-4,5-dihydrooxazole-4-carbonsäure
HR	<i>High resolution</i> = hochauflösend
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence (2D NMR-Experiment)
Hz	Hertz
i	Iso (verzweigte Kohlenwasserstoffkette, chemischer Deskriptor)
IC ₅₀	<i>Half maximal inhibitory concentration</i> = mittlere inhibitorische
	Konzentration
IGRA	<i>Interferon-γ release assay</i> = Interferon-γ-Freisetzungstest
llvB1	Katalytische Untereinheit der Acetohydroxysäure Synthase
llvN	Regulatorische Untereinheit der Acetohydroxysäure Synthase

IMM	Interstitielle, von Monozyten abgeleitete Makrophagen
IPP	Isopentenyldiphosphat
ⁿ J	Kopplungskonstante über n Bindungen
K. pneumoniae	Klebsiella pneumoniae
K _A	Affinitätskonstante [M ⁻¹]
kat.	Katalytisch
Kat.	Katalysator
KBE	Koloniebildende Einheit
konz.	Konzentriert
KZN	KwaZulu-Natal
L	Links-konfiguriert (Stereodeskriptor in der FISCHER-Projektion)
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification = Schleifen-vermittelte
	isotherm-ale Amplifikation
LC	<i>Liquid chromatography</i> = Flüssigchromatographie
LDA	Lithiumdiisopropylamid
Lf	Lactoferrin
Lit.	Literatur
logP	Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
LPA	Line probe assay = Streifenhybridisierungstests
Μ	Molar [mol/L]
m	Multiplett
т	<i>Meta</i> (chemischer Deskriptor)
<i>m</i> -CBPA	Meta-Chlorperbenzoesäure
M. bovis	Mycobacterium bovis
M. canetti	Mycobacterium canetti
M. microti	Mycobacterium microti
M. mungi	Mycobacterium mungi
M. pinnipedii	Mycobacterium pinnipedii
M. tuberculosis, Mt	Mycobacterium tuberculosis
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
mAPG	Mycolyl-Arabinogalactan-Peptidoglykan
MB	Mycobactin
MBG	Metall-bindende Gruppe
MDR	<i>Multi drug resistant</i> = mehrfach resistente
Ме	Methyl
MeOH	Methanol
MEP	Methylerythritolphosphat

MHK ₉₀	Minimale Hemmkonzentration einer Substanz, welche die Vermehrung
	der getesteten Stämme um mindestens 90 % reduziert
MmpL	Mycobacterial membrane protein large = großes mykobakterielles
	Membranprotein
MmpS	Mycobacterial membrane protein small = kleines mykobakterielles
	Membranprotein
mol%	Molprozent
MOM	Methoxymethylether
MRC-5	Medical research council cell strain 5 = Fibroblastenzelllinie
MS	Massenspektrometrie
n	Normal (unverzweigte Kohlenwasserstoffkette, chemischer Deskriptor)
n.b.	Nicht bestimmt
NFSI	<i>N</i> -Fluorbenzenesulfonimid
nm	Nanometer [10 ⁻⁹ m]
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i> = Kernspinresonanzspektroskopie
NOESY	Nuclear OVERHAUSER enhancement spectroscopy (2D NMR-
	Experiment)
NP	Natural product = Naturstoff
NTD	<i>N</i> -terminale Domäne
0	ortho (chemischer Deskriptor)
OTf	Triflat
OTs	Tosylat
p	Para (chemischer Deskriptor)
P. aeruginosa	Pseudomonas aeruginosa
P. curtisi	Plasmodium curtisi
P. falciparum, Pf	Plasmodium falciparum
P. knowlesi	Plasmodium knowlesi
P. malariae	Plasmodium malariae
P. ovale	Plasmodium ovale
P. ovale wallikeri	Plasmodium ovale wallikeri
P. vivax	P. vivax
<i>p</i> -TsOH	Para-Toluolsulfonsäure
<i>p</i> -TsCl	Para-Toluolsulfonsäurechlorid
PBP	Penicillin-bindendes Protein
PPBP	Periplasmatische Bindungsproteine
Pd/C	Palladium auf Aktivkohle
<i>Pf</i> ATP4	Plasmodiale ATPase 4

<i>Pf</i> CRT	P. falciparum Chloroquin-Resistenz-Transporter
<i>Pf</i> DHODH	Plasmodiale Dihydroorotatdehydrogenase
<i>Pf</i> EF2	P. falciparum elongation factor 2
PFOSF	Perfluor-1-octansulfonylfluorid
Ph	Phenyl
Ph. Eur. 10.1	Europäisches Arzneibuch 10. Ausgabe, 1. Nachtrag
pKs	Säurekonstante
PPARγ	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren gamma
ppm	Parts per million
PPM	Periplastidmembran
PSAC	Plasmodialer Oberflächen-Anionenkanal
PVM	Parasitophore Vakuole
q	Quartett
quin	Quintett
R	Rest
R _f	Retentionsfaktor
RNA	Ribonukleinsäure
RR	Rifampicin-resistent
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur [20 °C]
R _t	Retentionszeit
RT-PCR	Real time polymerase chain reaction = Echtzeit-Polymeraseketten-
	reaktion
S	Singulett
SAR	Structure activity relationship = Struktur-Aktivitäts-Beziehungen
SARS-CoV-2	Schweres akutes respiratorisches Syndrom durch das Coronavirus-2
S _E Ar	Elektrophile aromatische Substitution
Selectfluor®	1-Chlormethyl-4-fluor-1,4-diazonia bicyclo[2.2.2]octanebis(tetrafluor-
	borat)
SI	Selektivitätsindex
SID	Siderophor-Interaktion-Domäne
SG	Schutzgruppe
S _N 2	Nukleophile Substitution 2. Ordnung
S _N 2t	Nukleophile Substitution 2. Ordnung mit tetraedrischem Zwischen-
	produkt
spp.	Mehrere Arten der Gattung
t	Triplett

ТВ	Tuberkulose
TBAF	Tetra- <i>N</i> -butylammoniumfluorid
TBDMS	Tert-Butyldimethylsilyl-Schutzgruppe
TBDPS	Tert-Butyldiphenylsilyl-Schutzgruppe
TCP	<i>Target candidate profiles</i> = Profile für Arzneistoffe
Temp.	Temperatur [°C]
tert.	Tertiär
^t Bu	<i>Tertiär</i> -Butyl
TIPS	Triisopropylsilyl-Schutzgruppe
Tf	Transferrin
TFA	Trifluoressigsäure
TFAA	Trifluoressigsäureanhydrid
THF	Tetrahydrofuran
THP	Tetrahydropyranyl-Schutzgruppe
THP-1	<i>Tohoku hospital pediatrics-1</i> = Humane akute monocytische
	Leukämiezelllinie
ТНТ	Tuberkulin-Hauttest
TMS	Trimethylsilyl-Schutzgruppe
TMSBr	Bromtrimethylsilan
TPP	Target product profiles = Profile für Arzneimittel
TPSA	<i>Topological polar surface area</i> = topologische polare Oberfläche
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
Tri	Triphenylmethyl (Trityl)-Schutzgruppe
TrpAB	Heterodimere Tryptophansynthase
UDP	Uridindiphosphat
UGT	UDP-Glucuronosyltransferase
UV	Ultraviolett
v/v	Volumenprozent
VdW	VAN-DER-WAALS
VE	Verbindungseinheit
WHO	World health organization = Weltgesundheitsorganisation
XDR	Extensively drug resistent = extensiv resistente
δ	Chemische Verschiebung [ppm]

1. Zusammenfassung und Abstract

1.1.Zusammenfassung

Infektionserkrankungen stellen trotz moderner Gesundheitsstandards und einem Arsenal an Antibiotika aufgrund des zunehmenden Auftretens von Arzneimittel-resistenten Humanpathogenen wie *Mycobacterium tuberculosis*, *Plasmodium falciparum* und *Escherichia coli* eine starke Bedrohung für die globale Gesundheit dar. Verschiedene Organisationen wie die Weltgesundheitsorganisation (WHO) und nicht gewinnorientierte öffentlich-private Partnerschaften appellieren, die Bemühungen in der Erforschung und Entwicklung neuer Antibiotika zu unterstützen.¹⁻⁵

Diese Promotionsarbeit beschäftigte sich mit den Synthesen und präklinischen Strukturoptimierungen zweier Leitstrukturen, den Naturstoffen Chlorflavonin (I) und dessen bromierten Analogon Bromflavonin (II) (Schema 1) sowie Fosmidomycin (Schema 4).

Chlor- und Bromflavonin



Schema 1: Die Leitstrukturen Chlor- und Bromflavonin mit Flavonoid-Ring-Nomenklatur und Lokantensatz.

Im ersten Teil dieser Arbeit dienten die Flavonoide Chlorflavonin (**CF**) und Bromflavonin (**BF**) als Leitstrukturen (Schema 1) mit potenter *in vitro* Aktivität gegen *M. tuberculosis* H37Rv und gegenüber Arzneimittel-resistenten klinischen Isolaten von *M. tuberculosis*. Beide Leitstrukturen inhibieren die katalytische Untereinheit IIvB1 der Acetolactat-Synthase (AHAS) und damit die *de novo*-Synthese der verzweigtkettigen Aminosäuren und Pantothensäure.⁶



Schema 2: Synthese der Chlor- und Bromflavonin-Analoga mittels late-stage Funktionalisierung.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten 17 Chlor- und Bromflavonin-Analoga unter Anwendung moderner Synthesemethoden wie Funktionalisierung im letzten Schritt (*late stage*) dargestellt werden (Schema 2). Die in dieser Arbeit und die von DR. ALEXANDER BERGER dargestellten Analoga konnten zur Erweiterung der initialen Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (SAR)

basierend auf phänotypischer Aktivitätsassays und ergänzenden qualitativen Enzymassays beitragen (Schema 3). Die Strukturmodifikationen am A- und B-Ring sowie dem Substituenten in 3-Position des 4*H*-Chromen-4-on-Grundgerüstes wurden basierend auf einem Homologie-Modell und *Molecular Docking*-Experimenten⁶ entwickelt, um die inhibitorischen Aktivität, Wasserlöslichkeit und (metabolische) Stabilität zu verbessern.



Schema 3: Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von Chlor- (I) und Bromflavonin (III) auf enzymatischer und zellulärer Ebene.

Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (SAR)

Es zeigte sich, dass von den 35 dargestellten Analoga nur CF und BF potente Wachstumsinhibitoren von *M. tuberculosis* (MHK₉₀ < 2 µM) darstellen, während drei weitere Inhibitoren schwache Aktivität mit MHK₉₀-Werten bis 50 µM zeigten (Schema 3). In einem qualitativen IIvB1 Assay konnten 26 ausgewählte Analoga bezüglich ihrer Enzyminhibition untersucht werden und neben CF und BF zeigten sechs Inhibitoren mit geringen strukturellen Modifikationen eine IIvB1-Inhibition von über 90 %. Um die Disparität zwischen potenter IIvB1 Inhibition fehlender Wachstumshemmung aufzuklären, und sind tiefergehende mikrobiologische Untersuchungen über mögliche Aufnahmewege und Efflux der Inhibitoren zielgerichtete sowie deren chemische und metabolische Stabilität weitere für Strukturoptimierung notwendig.

Untersuchung präklinischer Parameter

Die Leitstrukturen **CF** und **BF** sind im wässrigen Medium bei pH-Werten von pH 2 und 7.4 über 24 Stunden sowie in *M. tuberculosis* Zellen über 8 Tage stabil. Die metabolische Stabilität in humanen Lebermikrosomen ist moderat und die Verbindungen sind gemäß der Klassifikation des Europäischen Arzneibuch (Ph.Eur.) in Wasser "praktisch unlöslich".

Fosmidomycin

Der zweite Teil dieser Arbeit fokussierte sich auf das Antiinfektivum Fosmidomycin (**Fos**), welches zur Behandlung von Harnwegsinfekten und Malaria bereits in klinischen Phase II-Studien untersucht worden ist (Schema 4). Fosmidomycin konnte aufgrund geringer Wirksamkeit in der Monotherapie in diesen Studien nicht überzeugen, welches auf dessen schlechte pharmakokinetischen Eigenschaften sowie geringer oraler Bioverfügbarkeit und Plasmahalbwertszeit zurückzuführen ist. Fosmidomycin inhibiert 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase (DXR), ein Enzym zur Generierung von Isoprenoid-Vorstufen, zahlreicher Humanpathogene wie zum Beispiel *Mycobacterium tuberculosis*, *Plasmodium falciparum*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli*. Dieses Enzym wird von zugelassenen Antiinfektiva bisher nicht adressiert, sodass keine Kreuzresistenzen zu diesen Arzneistoffen zu erwarten sind und Fosmidomycin ein vielversprechender, klinisch validierter, nicht zytotoxischer Arzneistoff ist, der zur Behandlung von bakteriellen Infektionen und Malaria optimiert werden kann.



Schema 4: Die Leitstrukturen Fosmidomycin und CL1.

Im Zuge der präklinischen Optimierung von Fosmidomycin konnte mit dem α -Phenyl- β -thiaisosteren Fosmidomycin-Analogon **CL1** eine Verbesserung der (myko-)bakteriellen und plasmodialen DXR-Inhibition erzielt werden (Schema 4). Darüber hinaus konnte die antiplasmodiale Aktivität ebenfalls verbessert werden, allerdings zeigten alle Fosmidomycin-Analoga, unter anderem **CL1**, keine bakterielle Wachstumshemmung.

Zur weiteren präklinischen Strukturoptimierung und Untersuchung der SAR konnte in dieser Arbeit die Synthese zweier neuartiger Strukturtypen von Fosmidomycin-Analoga etabliert werden. Für die Synthese des Strukturtyps 1 konnte die Darstellung des Schlüsselintermediates **13** im konsekutiven Ein-Topf-Verfahren innerhalb von 4 Stunden im Multi-Gramm-Maßstab optimiert werden (Schema 5). Dieses Intermediat erlaubt die Diversifikation von (Aryl-)Alkylresten am Hydroxamsäure-Stickstoff im vorletzten Schritt, welche anhand des Beispiels **20** demonstriert werden konnte (Schema 5).



Schema 5: Darstellung eines neuen Fosmidomycin-analogen Strukturtyps.

Des Weiteren konnte ein zweiter neuer Syntheseweg zur Darstellung α -Phenyl-substituierter β-thia-isosterer Fosmidomycin-Analoga (28a-f) ausgehend von kostengünstigen Benzaldehyden (**21d-g**) und Diethylphosphonsäureestern ohne Verwendung von Organometallverbindungen und Tiefkühlbedingungen etabliert werden (Schema 6). Zunächst wurden α -funktionalisierte Diethylbenzylphosphonate (**23a-f**, **24a-d**) dargestellt, die durch Methylthioglykolat zu den entsprechenden Thioethern (25a-g) nukleophil substituiert und nach drei weiteren Stufen zu α -Phenyl-substituierten β -thia-isosteren Fosmidomycin-Analoga (28a-f) umgesetzt werden konnten.



Schema 6: Darstellung eines zweiten neuen Fosmidomycin-analogen Strukturtypen. R = Rest, S_N = nukleophile Substitution

Die biologische Evaluation ergab, dass das *N*-Phenylpropyl-Analogon **20** und das α -(3-Hexoxyphenyl)-Analogon **28a** potentere DXR-Inhibitoren sind als **CL1**, allerdings schlechtere

plasmodiale Wachstumsinhibitoren. Außerdem zeigte keine der drei Verbindungen (myko)bakterielle Wachstumshemmung.



Schema 7: Inhibitorische Aktivität gegenüber DXR-Orthologen von den Leitstrukturen und neuen Analoga 20 und 28a.

Die fehlende Wachstumshemmung der Fosmidomycin-Analoga gegenüber (Myko)Bakterien ist vermutlich auf die schlechte Permeabilität der stark hydrophilen Verbindungen und damit eingeschränkten passiven Diffusion über die Zellwand der Bakterien zurückzuführen. Eine Möglichkeit zur aktiven Aufnahme von Antibiotika ist die Konjugation an eisenbindende Siderophore, welche Bakterien herstellen, sezernieren und als Siderophor-Fe³⁺-Komplexe aktiv aufnehmen. In dieser Arbeit wurden fünf Siderophore und (geschützte) Siderophorfragmente dargestellt, die über eine Carboxylgruppe an α -Phenyl-substituierte β -thia-isostere Fosmidomycin-Analoga konjugiert werden können (Schema 8).



Schema 8: Strukturen der dargestellte Siderophore 45, 49 und 40 sowie der Siderophorfragmente 32 und 55.

Um eine Kupplung der Siderophor-Carbonsäuren an die α -Phenyl-substituierten β -thiaisosteren Fosmidomycin-Analoga zu ermöglichen, konnten die Intermediate **27c-d** mittels Hydrazinolyse entschützt werden. Die Kupplungsreaktion zwischen zwei Siderophorfragmenten und **67a-b** konnte anhand von drei Beispielen erprobt werden (Schema 9).



Schema 9: Eine Möglichkeit zur Synthese von β-thia-isosteren Fosmidomycin-Analoga-Siderophor-Konjugaten.

Die Konjugate **68a-c** sollen in weiterführenden Projekten entschützt und einer biologischen Evaluation unterzogen werden.

1.2. Summary

Infectious diseases pose a threat to global health despite modern health standards and an arsenal of antibiotics due to the increasing emergence of drug-resistant human pathogens such as *Mycobacterium tuberculosis*, *Plasmodium falciparum* and *Escherichia coli*. Various organizations like the World Health Organization (WHO) and non-profit public-private partnerships are calling to intensify research and development of new antibiotics.¹⁻⁵

This PhD thesis focused on the synthesis and preclinical structural optimization of two lead structures, the natural products chlorflavonin (I) and its brominated analog bromflavonin (II) (Scheme 1) as well as fosmidomycin (Scheme 4).

Chlor- und Bromflavonin



Scheme 1: Nomenclature of the lead structures chlor- und bromflavonin and their locants.

In the first part of this work, the flavonoids chlorflavonin (**CF**) and bromflavonin (**BF**) served as lead structures (Schema 1) with potent *in vitro* activity against *M. tuberculosis* H37Rv and against drug-resistant clinical isolates of *M. tuberculosis*. Both lead structures inhibit the large catalytic subunit IIvB1 of acetohydroxyacid synthase (AHAS) and thus the *de novo* synthesis of branched-chain amino acids as well as pantothenic acid.⁶



Scheme 2: Synthesis of chlor- and bromflavonin analogs via late-stage functionalization.

In course of this work, 17 chlor- and bromflavonin analogs were synthesized using modern synthesic methods such as late-stage functionalization (Scheme 2). On the basis of the results presented in this work and those of DR. ALEXANDER BERGER, the initial structure-activity relationship (SAR) could be extended using phenotypic activity assays and supplemented by qualitative enzyme assays (Scheme 3). The structural modifications of the A- and B-ring as well as the substituent in 3-position of the 4*H*-chromen-4-one scaffold were developed based on a homology model and molecular docking experiments⁶ in order to improve the inhibitory activity, water solubility and (metabolic) stability.



Scheme 3: Structure activity relationship of CF and BF analogs on a enzymatic and whole-cell level.

Structure activity relationship SAR)

Of the in total synthesized 35 analogs, only **CF** and **BF** were found to be potent growth inhibitors of *M. tuberculosis* (MIC₉₀ < 2 μ M), while three other inhibitors showed weak activity with MIC₉₀ values up to 50 μ M. In a qualitative IIvB1 assay, 26 selected analogs could be analyzed regarding their enzyme inhibition. This analysis revealed that besides **CF** and **BF**, six inhibitors with minor structural modifications showed IIvB1 inhibition of more than 90 %. In order to elucidate the disparity between potent IIvB1 inhibition and lack of growth inhibition, indepth microbiological studies on possible uptake pathways and efflux of the inhibitors as well as their chemical and metabolic stability are necessary for further targeted structural optimization.

Evaluation of preclinial properties

The lead structures **CF** and **BF** are stable in the aqueous medium at pH values of pH 2 and 7.4 for 24 hours and in *M. tuberculosis* cells for 8 days. The metabolic stability in human liver microsomes is moderate and the compounds are "practically insoluble" in water according to the classification of the European Pharmacopoeia (Ph.Eur.).

Fosmidomycin

The second part of this work focused on the anti-infective drug fosmidomycin (**Fos**), which has been investigated in phase II clinical trials for the treatment of urinary tract infections and malaria. Fosmidomycin was not convincing in these studies due to its low efficacy in monotherapy, which is probably due to its poor pharmacokinetic properties such as low oral

bioavailability and plasma half-life. Fosmidomycin inhibits 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (DXR), an enzyme involved in the synthesis of isoprenoid precursors, of several human pathogens such as *Mycobacterium tuberculosis*, *Plasmodium falciparum*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. This enzyme is not yet addressed by approved anti-infectives, so that no cross-resistance to these drugs is to be expected and fosmidomycin is a promising, clinically validated drug that can be optimized for the treatment of bacterial infections and malaria.



Scheme 4: The lead structures fosmidomycin and CL1.

During the long journey of the preclinical development of **Fos** analogs, the α -phenyl β -thia isosteric fosmidomycin analog **CL1** was able to exceed the (myco)bacterial and plasmodial DXR inhibition of fosmidomycin. In addition, antiplasmodial activity was also improved, but all **Fos** analogs, including **CL1**, showed no bacterial growth inhibition.

For further preclinical structural optimization and investigation of the SAR, the synthesis of two novel structural types of fosmidomycin analogs was established in this work. To obtain a novel inhibitor class of type 1, the synthesis of the key intermediate **13** was optimized in a one-pot synthesis within 4 hours on a multi gram scale. The intermediate **13** allows the diversification of alkyl or arylalkyl residues on the hydroxamic acid nitrogen in the penultimate step, which was demonstrated by the synthesis of compound **20**.



Scheme 5: Synthesis of a novel type of fosmidomycin analogs.

Furthermore, a second new synthesis of α -phenyl-substituted β -thia isosteric fosmidomycin analogs (**28a-f**) was established starting from inexpensive benzaldehydes **21d-g** and diethylphosphite without the need for organometallic reagents and deep-freezing conditions

(Scheme 6). First, α -functionalized diethyl benzylphosphonates (**23a-f**, **24a-d**) were prepared, which could be converted with methyl thioglycolate to the corresponding sulfides (**25a-g**). These sulfides (**25a-g**) were converted after three further steps to the α -phenyl-substituted β -thia isosteric fosmidomycin analogs (**28a-f**).



Scheme 6: Synthetic approach towards of novel fosmidomycin analogs. R = residue, S_N = nucleophilic substitution.

The biological evaluation revealed that the *N*-phenylpropyl analog **20** and the α -(3-hexoxyphenyl) analog **28a** were more potent DXR inhibitors than **CL1** and fosmidomycin, but less active against *P. falciparum* growth (Scheme 7). None of the fosmidomycin analogs showed (myco)bacterial growth inhibition.



Scheme 7: Activity against DXR orthologs of fosmidomycin, CL1, and the novel compounds 20 and 28a.
A plausible reason for the lack of (myco)bacterial growth inhibition of fosmidomycin analogs is the poor permeability due their high hydrophilicity and thus limited passive diffusion across the bacterial cell wall. One possibility for active uptake of antibiotics is conjugation to iron-binding siderophores, which are produced, secreted and actively up taken as siderophore-Fe³⁺ complexes by bacteria. In this work, five siderophores and (protected) siderophore fragments were synthesized which can be conjugated to α -phenyl-substituted β -thia isosteric fosmidomycin analogs via their carboxylic acid functionality (Scheme 8).



Scheme 8: Synthesized siderophores 45, 49 and 40 as well as siderophor fragments 32 and 55.

In order to enable coupling between siderophores and α -phenyl-substituted β -thia isosteric fosmidomycin analogs, the intermediates **27c-d** were deprotected *via* hydrazinolysis. The feasibility of the coupling reaction between two siderophore fragments and **67a-b** was demonstrated with three examples (Scheme 9).



Scheme 9: Synthesis of β -thia isosteric fosmidomycin analog-siderophore-conjugates.

These fosmidomycin analog-siderophore-conjugates **68a-c** can be deprotected in further projects and afterwards investigated regarding their antibiotic properties.

2. Einleitung

Infektionskrankheiten werden vor allem durch Pilze, Helminthen, Viren, Protozoen und Bakterien ausgelöst und prägten die Geschichte und sogar die Evolution der Menschheit.^{7,8} Obwohl der medizinische Fortschritt, niedrigschwelliger Zugang zu medizinischer Versorgung und verbesserte sanitäre Bedingungen die Gesamtmortalität und -morbidität im Zusammenhang mit Infektionskrankheiten in den letzten Jahrzehnten reduzieren konnten, stellen Infektionserkrankungen die Gesundheitssysteme vor große Herausforderungen.⁹ Zu Beginn des 21. Jahrhunderts erschütterten einiae schweren Wellen von Infektionserkrankungen, darunter die schwere akute respiratorische Syndrom-Coronavirus-2 (SARS-CoV-2) Pandemie ab 2019, das öffentliche, politische und ökonomische Geschehen nachhaltig.⁹ Neben saisonal und in Wellen auftretenden Infektionserkrankungen, ist die infektionsassoziierte Morbidität und Mortalität durch persistierende Infektionskrankheiten wie Humanes Immundefizienz-Virus (HIV)-Infektionen, Tuberkulose (Tb) und Malaria in Ländern mit niedrigem bis mittlerem Einkommen nach wie vor alarmierend. In den Industrienationen reduziert das zunehmende Auftreten (multi-)resistenter Pathogene nachhaltig den Therapieerfolg und die Zahl der Todesfälle mit oder durch resistente Pathogene steigt kontinuierlich.^{10,11}

Bei der Entwicklung neuer Antiinfektiva hat die medizinalchemische Entwicklung eine Schlüsselfunktion inne. Beginnend mit der Entdeckung des Naturstoffs Penicillins als Antibiotikum im Jahr 1929,¹² über die Totalsynthese des Antimalariamittels Chinin 1944¹³ bis hin zu modernen großtechnischen Verfahren bei der Entwicklung verschiedener SARS-CoV-2-Impf- und Wirkstoffe¹⁴ unterstreicht die medizinische Chemie ihre Schlüsselfunktion bei der Bekämpfung von neu auftretenden Krankheitserreger.^{15,16} Das globale Infektionsgeschehen und die sich verschlimmernde Resistenzlage fordern stetige Bemühung zur Bewältigung und Eindämmung der Infektionserkrankungen, zu denen akademische und industrielle medizinalchemische Forschung einen entscheidenden Beitrag leistet.

2.1. Bakterielle Infektionserkrankungen

Bakterien sind ubiquitär vorhanden, essentiell zur Aufrechterhaltung der Ökosysteme und tragen zur Gesundheit des Menschen bei.¹⁷⁻²⁰ Körperfremde Bakterien können allerdings in den Menschen eindringen, welches meist zu einer Eliminierung der Bakterien durch das humane Immunsystem führt. Einige Bakterien sind aber in der Lage die humane Immunantwort zu umgehen und avirulent im Körper zu verbleiben oder Infektionen auszulösen. Diese Bakterien werden als Humanpathogene klassifiziert.^{19,21} Im Jahr 2021 waren rund 1500 humanpathogene Bakterien bekannt, von denen 73 % als gesichert humanpathogen gelten, während 23 % nur potentiell Infektionen beim Menschen auslösen.⁸

Die Behandlung von bakteriellen Infektionen ist komplex und kann in Abhängigkeit des Krankheitsbildes und Komorbiditäten als Mono- oder Kombinationstherapie mit einem Antibiotikum aus einer der neun Wirkstoffklassen erfolgen (Schema 10).



Schema 10: Beispiele von zugelassenen Arzneistoffen aus den neun Wirkstoffklassen zur Behandlung von bakteriellen Infektionserkrankungen. Blau = Naturstoffe unter Angabe der *isolierten Spezies*, rot = synthetische Arzneistoffe.

Zunehmender Übergebrauch, Antibiotikagabe bei unzureichender oder falscher Indikation und Noncompliance eines Therapieregimens führten in den vergangenen Jahren zur rapiden Entwicklung Antibiotika-resistenter Bakterien, sodass Antibiotika-resistente Bakterien eine wachsende Bedrohung für die globale Gesundheit darstellen.^{10,11}

Antimikrobielle Resistenzen waren im Jahr 2019 für rund 1.27 Millionen Todesfälle weltweit direkt verantwortlich und wurden mit insgesamt 4.95 Millionen Todesfällen assoziiert.¹⁰ Etwa 79 % dieser Todesfälle gehen auf Infektionen der unteren Atemwegwege und des Thorax zurück, gefolgt von Bakteriämien des Blutes und intraabdominalen Infektionen.¹⁰

Zusammen mit *E. coli* sind fünf weitere pathogene Bakterien für etwa 70 % der Resistenzassoziierten Todesfälle verantwortlich (Abbildung 1). Zu diesen Pathogenen zählen die GRAMpositiven Bakterien *Staphylocyccus aureus* und *Streptococcus pneumoniae* sowie die GRAMnegativen Bakterien *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumanii* und *Pseudomonas aeruginosa*.



Abbildung 1: Anzahl der weltweiten Todesfälle in Zusammenhang mit resistenten Bakterien außer *M. tuberculosis* aufgeschlüsselt nach Pathogenen im Jahr 2019. Mit Einverständnis entnommen, übersetzt und modifiziert von The Lancet (2022), Volume 399, Seite 629–655.¹⁰ © 2022 Die Autoren. Publiziert von Elsevier Ltd. Open Access Artikel mit Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz (CC-BY-4.0-DEED, siehe https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Seit etwa 50 Jahren wurden Veränderungen der Permeabilitätsbarriere wie der Reduktion von transmembranären Porinen zur passiven Aufnahme von Antibiotika, eine Erhöhung des Efflux oder eine synergistische Kombination beider Prozesse als Grundlage für Resistenzen

beschrieben (Abbildung 2).²²⁻²⁴ Zudem können eine Reihe von Enzymen das Antibiotikum durch verschiedene Reaktionen inaktivieren (Abbildung 2).^{25,26}



Abbildung 2: Schematische Darstellung der Antibiotika-Resistenzen. Abbildung verwendet mit der Genehmigung von © 2022, Springer Nature Limited, aus Nature Reviews Microbiology (2023), Volume 21, Seite 280–295²⁷; die Genehmigung mit der Lizenznummer 5794811408503 wurde am 23.05.2024 über das Copyright Clearance Center, Inc. erteilt.

Zudem gibt es Resistenzmechanismen, die auf Mutationen des Targets zurückzuführen sind. Zum einen kann das Target überexprimiert werden, sodass die applizierte Antibiotikamenge für eine wirksame Wachstumshemmung nicht mehr ausreicht.²⁷ Außerdem kann lateraler Transfer von Resistenzgenen zur Expression eines mutierten Targets führen, sodass die Bindung des Antibiotikums nicht mehr möglich ist. Ebenso führen diese Resistenzgene zur Expression eines alternativen Enzyms mit gleicher katalytischer Aktivität wie das Target, sodass dieses nicht mehr essentiell für das bakterielle Wachstum ist und das Antibiotikum seine antibakteriellen Eigenschaften verliert.²⁷⁻²⁹ Zudem können Schutzproteine für das Target exprimiert werden, die die Bindungsstelle durch sterische Hinderung vor Bindung eines Antibiotikums schützen, eine Konformationsänderung der Bindungsstelle induzieren oder durch Bindung an eine allosterische Bindungsstelle zur Dissoziation des Antibiotikums vom Target führen.^{27,30}

Die Entwicklung von Resistenzen begleitet die Evolution der Bakterien seit ihrer Existenz und wurde durch den Einsatz von Antibiotika nur verstärkt.^{31,32} Folglich ist das Auftreten neuer

Resistenzmechanismen ein natürlicher Prozess, der eine stetige Erforschung der Bakterien und die Entwicklung neuer Antibiotika mit neuen Wirkmechanismen erfordert.³³ Ein Blick auf die seit der Jahrtausendwende zugelassenen 46 Antibiotika zeigt, dass nur sieben der 46 Antibiotika aus neuen Stoffklassen stammen (Abbildung 3).



Abbildung 3: Neu zugelassene niedermolekulare Antibiotika und Antibiotika-Kombinationen von 2000 bis 2022 aufgeschlüsselt nach bekannten und neuen Stoffklassen. Abbildung modifiziert nach The Journal of Antibiotics (2023), Volume 76, Seite 431–473.³⁴ © Die Autoren 2023. Open Access Artikel mit Creative Commons CC-BY DEED Namensnennung 4.0 International (CC-BY-4.0-DEED, siehe http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.)

Zudem zeigte die Auswertung der zwölf neu-zugelassenen Antibiotika zwischen 2017 und 2022, dass die meisten nur einen geringen Zusatznutzen gegenüber den bestehenden Therapieoptionen haben. Dabei gehören zehn Arzneistoffe zu bekannten Antibiotikaklassen mit bestehenden Resistenzen.³⁴ Im Jahr 2022 umfasste die Antibiotika-Pipeline 77 Arzneistoffe und Arzneistoffkombinationen, die mindestens einen neuen, noch nicht zugelassenen Arzneistoff enthielten. Neben 45 traditionellen Antibiotika befinden sich 32 neuartige Arzneistoffe, von denen elf Mikrobiom- oder immunmodulierend, neun Bakteriophagen oder von Phagen abgeleitete Enzyme, sechs Antikörper, und sechs Arzneistoffe, die als "verschiedene" klassifiziert werden, sind.⁵ Die WHO stuft die aktuelle Pipeline als nicht ausreichend ein, um das Problem der zunehmenden und sich ausbreitenden antimikrobiellen Resistenzen zu adressieren.⁵ Dies könnte dazu führen könne, dass ab dem

Jahr 2050 rund 10 Millionen Menschen jährlich an der Folgen einer arzneimittelresistenten Infektion sterben.³⁵

2.2. Tuberkulose

Tuberkulose (Tb) ist eine ansteckende Krankheit, die beim Menschen vor allem durch *Mycobacterium tuberculosis (Mt)* verursacht wird. Die Mykobakterien befallen in erster Linie die Lunge und verursachen eine pulmonale Tuberkulose, allerdings kann beim Befall anderer Körperregionen auch eine extrapulmonale Tuberkulose induziert werden.^{1,36} Häufig persistiert *Mt* über Jahre im menschlichen Körper, ohne Krankheitssymptome auszulösen. Bei Ausbruch der aktiven Erkrankung ist Tuberkulose sehr tödlich. Im Jahr 2021 war Tuberkulose nach dem SARS-CoV-2 die zweithäufigste Todesursache durch einen einzelnen infektiösen Krankheitserreger und hat schätzungsweise 1.6 Millionen Menschenleben gefordert, welches einen Anstieg gegenüber 2020 bedeutet.¹ Berechnungen aus dem Jahr 2016 zufolge sind etwa 25 % der Weltbevölkerung mit *M. tuberculosis* infiziert.³⁷

Erreger der Tuberkulose

Die Tb-verursachenden Mykobakterien werden als *Mt*-Komplex zusammengefasst. Darunter fallen *Mt* als Haupterreger der humanen Tuberkulose sowie *M. africanum*, der in bestimmten Regionen Afrikas auftritt.³⁸ Für Tuberkulose bei wilden und domestizierten Säugetieren sind *M. bovis, M. caprae, M. canetti, M. mungi, M. pinnipedii* und *M. microti* verantwortlich. Die Koevolution dieser Stämme mit erhöhter Virulenz, Übertragbarkeit und Selektivität für bestimmte Wirte kann auf die Einführung der Landwirtschaft, die Zivilisation und Urbanisierung zurückgeführt werden.³⁹

Im Gegensatz zu anderen intrazellulären auxotrophen Krankheitserregern, die für die Nährstoffversorgung auf Suppline der Wirtszellen angewiesen sind, verfügt *Mt* als Prototroph über eine metabolische Flexibilität von ana- und katabolischen Stoffwechselprozessen zur Gewinnung lebensnotwendiger Ressourcen. Diese metabolische Flexibilität bedingt die Persistenz und Anpassungsfähigkeit von *Mt*.⁴⁰

Inkubation, Infektion und Pathophysiologie

Eine *M. tuberculosis* Infektion kann zu zwei klinisch definierten Zuständen führen: eine asymptomatische latente Tb-Infektion oder aktive Tb-Erkrankung. *Mt* wird mittels Tröpfchen (1-5 µm Durchmesser) übertragen, die beim Husten oder Niesen eines Patienten mit pulmonaler Tb entstehen. Für eine Infektion muss das *Mt*-enthaltende Aerosol eingeatmet werden. Gelangt *Mt* auf diese Weise über die oberen Atemwege in die Lunge, werden die Mykobakterien in der frühen Infektionsphase von sessilen Alveolarmakrophagen phagozytiert (Abbildung 4, links).⁴¹ Rekrutierte, interstitielle, von Monozyten abgeleitete Makrophagen

EINLEITUNG



Abbildung 4: Ablauf einer Tuberkulose-Infektion und Rolle des humanen Immunsystems während einer Tuberkulose-Infektion. Abbildung verwendet und übersetzt mit der Genehmigung von © 2020 John Wiley & Sons Ltd., aus Immunology (2020), Volume 162, Seite 145–159.⁴²; die Genehmigung mit der Lizenznummer 5794810313200 wurde am 23.05.2024 über das Copyright Clearance Center, Inc. erteilt.

(IMM) induzieren ein proinflammatorisches Geschehen, um die Beseitigung der Mykobakterien zu fördern.^{42,43}

Das Eindringen der Mykobakterien in das interstitielle Lungengewebe führt zur Bildung von Granulomen, was zur Infektionstoleranz des Wirts führt. In dieser Phase soll die Infektion durch aktivierte T-Zellen, B-Zellen, neutrophile Granulozyten, phagozytische Zellen wie dendritische Zellen und interstitielle Makrophagen eingedämmt und Gewebeschäden begrenzt werden (Abbildung 4, rechts).^{44,45} Während der Granulombildung versuchen proinflammatorische Makrophagen, das Wachstum der Mykobakterien im Zentrum des Granuloms einzudämmen, während antiinflammatorische interstitielle Makrophagen die Entzündungsreaktion ausgleichen und die Verbreitung der Mykobakterien begrenzen.⁴² Sogenannte Schaumzellen,

EINLEITUNG

die sich aus Makrophagen entwickeln und in denen der Lipidstoffwechsel remobilisiert ist, wurden ebenfalls sowohl mit Bakterienwachstum als auch mit proinflammatorischen antimikrobiellen Aktivitäten in Verbindung gebracht. Die Bildung von Entzündungsmediatoren durch die humanen Immunzellen ist essentiell, um eine Exazerbation der *Mt*-Infektion in der frühen Phase zu verhindern. Die Überexpression dieser Entzündungsmediatoren kann im Krankheitsverlauf aber auch Granulome durch Nekrose zerstören, das Lungenparenchyms schädigen und die Lunge karvitieren, sodass diese Prozesse die Entstehung der aktiven Tb-Erkrankung einleiten.⁴⁵⁻⁴⁹ Die Entwicklung der aktiven Tb findet in 5 % der Fälle innerhalb der ersten zwei Jahre nach Erstinfektion statt. Zu den Leitsymptomen der pulmonalen Tuberkulose zählen Husten mit oder ohne Auswurf, Dyspnoe und thorakale Schmerzen mit unspezifischen Symptomen wie Abgeschlagenheit, subfebrile Körpertemperatur, Gewichtsverlust und Nachtschweiß.

Diagnostik

In den Industrienationen gehört die radiologische Röntgenthorax-Untersuchung zur Leitliniengerechten Diagnosestellung einer Lungentuberkulose.^{50,51} Daneben haben bakteriologische Diagnostiken einen immensen Stellwert, insbesondere wenn teure radiologische Untersuchungen nicht möglich sind. Mittlerweile sind mehrere molekulare Schnelltests mittels Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) zur Erstdiagnose der Tb verfügbar.⁵² Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) empfiehlt bei Patienten mit fortgeschrittener HIV-Erkrankung zusätzlich einen Point-of-Care Test (Lateral-Flow-Test) für den Urin ergänzend zum molekularen Schnelltest. Die von mehr als 100 Jahren entwickelte Sputumabstrich-Mikroskopie zur Tb-Diagnose mittels ZIEHL-NEELSEN-Färbung oder Fluoreszenzmikroskopie findet in Ländern mit niedrigem und mittlerem Einkommen immer noch häufig Anwendung, wird aber zunehmend durch die zuvor erwähnten Schnelltests ersetzt.⁵⁰

Immunologische Methoden wie der Tuberkulose-Haut-Test (THT) und Interferon-γ-Release-Assay (IGRA) können die mykobakteriologische Diagnostik ergänzen, da beide Methoden nur den immunologischen Kontakt mit diesem Erreger nachweisen, nicht aber ein akutes Infektionsgeschehen.⁵⁰

Der Referenzstandard für die Tb-Diagnose bleibt nach wie vor die kulturelle Isolierung, weil diese um etwa Faktor 10 sensitiver als mikroskopische Methoden ist⁵³ und einen phänotypischen Resistenznachweis ermöglicht. Zudem eignet sich diese Methode, um ausreichende Mengen DNA für eine Typisierung oder Genomsequenzierung zur Identifikation der genotypischen Resistenz zu gewinnen sowie zum Monitoring des Therapieansprechens.⁵⁰ Für den spezifischen Nachweis von Wirkstoffresistenzen gegen die Erst- und Zweitleitlinien-Medikation stehen weitere molekulare Streifenhybridisierungstests (LPA) zur Verfügung.

13

Sequenzierungstechnologien können zum Aufstellen eines umfassenden Arzneimittelresistenzprofils angewendet werden.⁵⁰

Therapie der Tuberkulose

Die Todesrate infolge einer Tuberkulose ohne medikamentöse Behandlung ist mit etwa 50 % sehr hoch.⁵⁴ Prinzipiell ist die nicht-resistente Tuberkulose heilbar, allerdings beinhaltet das Therapieregime eine sechsmonatige Standardbehandlung mit vier Arzneistoffen, die sich in eine zweimonatige intensive Phase mit Isoniazid, Rifampicin, Pyrazinamid und Ethambutol, gefolgt von einer viermonatigen Kontinuitätsphase mit Isoniazid und Rifampicin aufteilt (Schema 11).⁵⁵ Ein striktes Befolgen dieses Therapieregimes führt laut WHO zu einer Heilungsrate von 85 %.¹



Schema 11: Strukturformeln der in der Standardtherapie eingesetzten Arzneistoffe.

Resistenzen

Einen wesentlichen Beitrag zum Therapieversagen haben, neben langer Behandlungsdauer, schlechter Patientencompliance und erheblichen Nebenwirkungen, zunehmende Antibiotikaresistenzen. Eine Resistenz gegen Isoniazid und Rifampicin wird als multiresistente Tuberkulose (MDR) bezeichnet. Laut Schätzungen der WHO zufolge waren 2022 etwa 410 000 Menschen an Rifampicin-resistenter (RR)-Tb oder MDR-Tb erkrankt, wobei die Zahl der diagnostizierten und behandelten Patienten bei nur rund 175 000 lag.¹ Besonders betroffen von der Ausbreitung der RR- und MDR-Tb sind Indien, Russland, Indonesien, China und die Philippinen (Abbildung 5).



Abbildung 5: Geschätzte Anzahl der Patienten, die eine Rifampicin-resistente (RR)- oder mehrfach-resistente (MDR)-Tuberkulose im Jahr 2022 entwickelt haben. Abbildung entnommen aus dem WHO *Global tuberculosis report 2023.*¹ Open Access Report mit Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 IGO Lizenz (CC BY-NC-SA 3.0 IGO, siehe https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/igo).

Zur Behandlung der RR- und MDR-Tb stehen Mittel der zweiten Wahl wie die Fluorchinolone Moxiflaxacin oder Levoflaxacin, injizierbare Aminoglykoside wie Capreomycin, Kanamycin und Amikacin, und/oder die Chemotherapeutika Ethionamid, Pretomanid, Cycloserin, Linezolid, Bedaquilin und Delamanid zur Verfügung.⁵⁵ Die Heilungsrate durch entsprechende, angepasste Therapieregimen lag im Jahr 2020 bei 63 %.¹

Mit steigender Inzidenz treten jedoch auch extensiv resistente (XDR) Tb-Stämme auf, die neben Isoniazid und Rifampicin gegen alle Fluorchinolone und mindestens ein Aminoglykosid resistent sind. Nach über 20 Jahren ohne neu-zugelassene Tb-Arzneistoffe, wurde mit Bedaguilin 2012 ein Medikament zur Behandlung von MDR-Tb zugelassen. Allerdings traten bereits Resistenzen gegen Bedaquilin auf, welche die prekäre Lage der verstärken.56-58 Arzneimittelresistenzen nochmals Dies unterstreicht die dringende Notwendigkeit, neue Wirkstoffe und Wirkmechanismen für die Behandlung von MDR-Tb und XDR-Tb zu entwickeln.

Pipeline

Neben einigen neuen und repositionierten Wirkstoffklassen wie Oxazolidinone, Fluorchinolone und Ansamycine befinden sich eine Reihe von Arzneimitteln aus neuen Wirkstoffklassen und mit innovativen Wirkmechanismen in klinischer Entwicklung (Abbildung 6).

Präklinik	Phase 1	Phase 2 +	Phase 3	Therapieregime
OTB-658ª	TBAJ-587₫	Sudapyridin ^d	TBA-7371₫	Delamanid ^c
GSK-839 ^b Tryptophan Synthase (TrpAB)	TBI-223 ^d rRNA	TBAJ-876d	Quabodepistat ^d	Pretomanid ^c
	TBD09 (MK-7762) ^d rRNA/Ribosom	Sanfetrinem ^d	Ganfeborol ^d Leucyl-tRNA Synthase	Sutezolid°
	Macozinon ^c	BTZ-043d	Pyrifazimin ^c Wirkmechanismus unklar	Bedaquilin ^c
	GSK-286 ^d Cholesterol Katabosmus	Delpazolid ^d	Telabec ^d Cytochrome bc1 Komplex	Rifapentin ^c
<u>Wirkstoffklasse</u> ■ Diarylchinolin ■ Beta-Lactam	Target	SQ-109 ^d MmpL3	Alpibectir ^d Transkriptionsfaktor-Inhibitor	Rifampicin ^c
	 ATP Synthase Zellwand (PBP2 + P 	BP4)	SPR720 ^d DNA Gyrase	
 Benzothiazinon Oxazolidinon Rifamycin Nitroimidazol 	 Zellwandsynthese (I Proteinbiosynthese DNA-abhängige RN, Mehrere / Mycolsäul 			

Neue chem. Klasse

Abbildung 6: Übersicht neuer Tuberkulose-Arzneistoffe in präklinischer und klinischer Entwicklung. Stand 11/2023. Die molekularen Zielstrukturen (Targets) sind folgenden Quellen entnommen: ^a YUAN *et al.*⁵⁹, ^b https://www.newtbdrugs.org/ pipeline/compound/gsk839, aufgerufen am 22.02.2024, ^c SINGH und CHIBALE⁶⁰ und ^d KUMAR *et al.*⁶¹ DprE1 = Decaprenylphosphoryl-β-D-ribose 2'-Epimerase, MmpL3 = *mycobacterial membrane protein Large* 3, PBP = Penicillin-bindendes Protein, rRNA = ribosomale Ribonukleinsäure, tRNA = Transfer- Ribonukleinsäure,

In den weit vorangeschrittenen Studien befinden sich hauptsächlich neue Therapieregime, die auf eine Verkürzung der Therapiedauer und bessere Verträglichkeit abzielen.⁶² Nach Bedaquilin befindet sich Sudapyridin als weiterer ATP-Synthase-Inhibitor in Phase III-Studien und TBAJ-876 sowie TBAJ-587 sind ebenfalls in Phase I/II-Studien.

Mit Quabodepistat, Macozinon, BTZ-043 und TBA-7371 befinden sich gleich vier Wirkstoffe in klinischer Entwicklung, die die Decaprenylphosphoryl-β-D-ribose 2'-Epimerase (DprE1) als neue molekulare Zielstruktur adressieren. DprE1 ist essentiell für die Synthese von D-Arabinofuranose, welches ein wichtiger Baustein für die Zellwandkomponenten Arabinogalactan und Arabinomannan ist. Der MmpL3-Inhibitor SQ109 konnte bereits in klinischen Phase II-Studien erprobt werden. MmpL3 ist in den Export von Mykolsäure-Vorläufern involviert, sodass dessen Hemmung die Biosynthese der Zellwand stört. Zu den weiteren Wirkstoffen mit neuem Wirkmechanismus zählen Telacebec (Q203) als Cytochrom bd1-Komplex Inhibitor, Alpibectir (BVL-GSK098), welches Transkriptionsfaktoren reguliert und die Bioaktivierung von Ethambutol verbessert, SPR720 als Gyrasehemmer und Pyrifazimin mit ungeklärtem Wirkmechanismus.

Bisher ist zur Tuberkulose-Prävention nur der vor 100 Jahren entwickelten Bacille CALMETTE-GUÉRIN-Impfstoff (BCG) zugelassen, welcher weltweit verwendet wird und die Wahrscheinlichkeit eines schweren Krankheitsverlaufs bei Kindern senkt.⁶³ Ein vielversprechendes Vakzin (M72/AS01_E) zur Prävention der Tb bei Erwachsenen befindet sich in einer Phase II-Studie.⁶⁴

2.3. Malaria

In den vergangenen Jahrhunderten zählte die durch *Plasmodium falciparum* ausgelöste Malaria tropica nach wie vor zu einer der lebensbedrohlichsten Infektionserkrankungen auf der Welt.⁶⁵⁻⁶⁷ Im Jahr 2022 nahm die Anzahl der Malariafälle mit 249 Millionen Erkrankungen im Vergleich zum Vorjahr um etwa 2 % zu, wobei Malaria in 85 endemischen Gebieten und Ländern auftrat. Auf 29 vorwiegend afrikanische Ländern sind etwa 95 % der weltweiten Malariafälle zurückzuführen. Insbesondere Nigeria, die Demokratische Republik Kongo, Uganda und Mosambik sind betroffen, da diese Länder fast die Hälfte der Malariafälle im Jahr 2022 zählten.² Die Zahl der Malaria-bedingten Todesfälle geht seit dem Jahr 2000 fast kontinuierlich zurück und lag 2022 bei schätzungsweise 608 000. Alarmierend ist jedoch die Tatsache, dass 76 % der Verstorbenen Kinder unter 5 Jahren waren.

Erreger der Malaria

Neben Plasmodium falciparum sind auch P. vivax, P. ovale curtisi, P. ovale wallikeri und P. malariae und P. knowlesi als humanpathogene Arten der Gattung Plasmodium spp. bekannt. Die Protozoen der Gattung Plasmodium spp. sind einzellige eukaryotische Organismen, die zum Phylum Apicomplexa gehören. Die Plasmodien durchlaufen einen charakteristischen Generationswechsel mit Bildung infektiöser Sporozoiten.⁶⁷ P. falciparum und P. vivax befallen nur den Menschen und stellen gleichzeitig die größte Krankheitsbelastung dar. Insbesondere Infektionen mit P. falciparum sind mit hoher Morbidität und Mortalität sowie Komplikationen in der Schwangerschaft assoziiert.⁶⁸ Allein auf diese Spezies sind täglich etwa 1200 Todesfälle von afrikanischen Kindern unter 5 Jahren zurückzuführen.⁶⁹ Daneben hat das weltweit verbreitete *P. vivax* bei schweren Infektionsverläufen und Todesfällen in den vergangenen Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen.⁷⁰ Eine Besonderheit von *P. vivax* und *P. ovale* ist, dass diese in Form von Hypnozoiten jahrelang in der menschlichen Leber persistieren und dadurch auch Jahre nach einer Erstinfektion zu einem Rezidiv der Malaria führen können.^{70,71} Die Spezies P. ovale curtisi, P. ovale wallikeri und P. malariae führen dagegen zu milden Verlaufsformen der Malaria. Zudem wurden in Malaysia und Südostasien zunehmend schwerwiegende Malariafälle beobachtet, die durch den Affenparasiten P. knowlesi, verursacht wurden, allerdings scheint es sich überwiegend um eine Zoonose zu handeln und die humane Transmission eine untergeordnete Rolle zu spielen.⁷²

17

Transmission, Infektion und Pathophysiologie

Die *Plasmodien* werden über Stiche der weiblichen Anopheles-Stechmücke übertragen, wobei nur etwa 40 der insgesamt 420 *Anopheles*-Arten als Vektor fungieren.^{65-67,73} Bei der Blutmahlzeit einer mit Plasmodien infizierte Mücke injiziert diese zusammen mit gerinnungshemmendem Speichel das mobile und infektiöse Stadium von *Plasmodium spp.*, die Sporozoiten. Diese Sporozoiten gelangen durch die Haut über Lymphgefäße zu den Hepatozyten der Leber, wo ein einziger Sporozoit durch ungeschlechtliche Teilung bzw. Schizogenie tausende Merozoiten bildet. Die Merozoiten werden nach Ruptur der Hepatozyten in den Blutkreislauf freigesetzt, befallen Erythrozyten und können sich in diesen durch erythrozytäre Schizogenie vermehren. Die geschlechtsreifen Merozoiten differenzieren sich zu männlichen und weiblichen Gametozyten, welche bei einer weiteren Blutmahlzeit einer *Anopheles*-Mücke aufgenommen werden, wobei die sexuelle Reproduktion innerhalb des Vektors stattfindet.^{74,75}



 Abbildung 7: Der Lebenszyklus von Plasmodium spp. Abbildung verwendet mit der Genehmigung von © 2017 Macmillan Publishers Limited, Teil von Springer Nature, aus Nature Disease Primers (2017), Volume 3(1), Artikelnummer 17050⁶⁸; die Genehmigung mit der Lizenznummer 5794821387425 wurde am 23.05.2024 über das Copyright Clearance Center, Inc. erteilt.

EINLEITUNG

Das Krankheitsbild der Malaria unterscheidet sich je nach zugrundeliegender Spezies, Adaptation des humanen Immunsystems durch vorangegangen Infektionen und Koinfektionen.^{76,77} Der Krankheitsverlauf wird als asymptomatische, unkomplizierte oder schwere (komplizierte) Malaria eingestuft.⁷⁸ Zu den Anfangssymptomen etwa 7-10 Tagen nach Mückenbiss zählen leichtes Fieber, Schüttelfrost, Muskelschmerzen und bei Kindern zusätzlich Verdauungsbeschwerden. Zudem können paroxysmale auftretende Schweißausbrüche, Fieber und Erschöpfung, die nach Hämolyse der von Plasmodien befallenen Erythrozyten auftreten, als charakteristische Symptome hinzukommen. Die schwere Malaria endet nach Anämien, Multiorganversagen, zerebraler Malaria oder mikrovaskulärer Obstruktion oft tödlich.^{77,79 80}

Diagnostik

Die Diagnosekriterien der WHO beinhalten zwei zentrale Aspekte: Fieber und das Vorhandensein von Parasiten. Die Parasiten können durch lichtmikroskopische Untersuchungen eines Blutabstriches oder einen diagnostischen Schnelltest nachgewiesen werden.³ Diese Testung ist insbesondere indiziert, wenn sich der Patient vor Symptombeginn in Endemiegebieten aufgehalten hat. Zudem empfiehlt sich der Einsatz von Nukleinsäurebasierten Methoden wie Schleifen-vermittelte isothermale Amplifikation (LAMP) oder PCR, da Koinfektionen und ggf. Arzneimittelresistenzen simultan identifiziert werden können.^{81,82}

Prävention, Prophylaxe und Therapie

Zur Reduktion der Malaria-Inzidenz spielt die Vektorkontrolle und Prävention eine besondere Rolle. Der bevorzugte Ansatz beruht auf der Verwendung feinmaschiger, robuster und Insektizid-behandelter Bettnetze.⁸³ Zudem wird versucht über gentechnische Methoden zum Schneiden und Verändern der DNA wie die CRISPR/Cas-Methode das Genom der *Anopheles*-Mücken so zu verändern, dass die Nachkommen steril oder gegen eine *Plasmodium spp.*-Infektion resistent sind.⁸⁴⁻⁸⁸ Zudem kann eine Chemoprophylaxe für Bewohner von Endemiegebieten oder Touristen mit täglichen Dosen von Atovaquon-Proguanil oder Doxycyclin oder einer wöchentlichen Gabe von Mefloquin erfolgen.⁶⁸ Seit 2018 ist für diesen Zweck auch Tafenoquin in den Vereinigten Staaten von Amerika und Australien zugelassen. ⁸⁹ Zudem kann die Chemoprävention bei Kindern unter 5 Jahren bei saisonal auftretender Malaria durch Gabe einer Kombination von Sulfadoxin-Pyrimethamin plus Amodiaquin die Inzidenz und Morbidität stark reduzieren.⁹⁰⁻⁹³

Die Therapie der Malaria erfolgt unter Berücksichtigung des Erregers, Resistenzstatus des Erregers, vorheriger Chemoprophylaxe und klinischem Krankheitsbild.^{68,94} Bei der durch *P. falciparum* ausgelösten Malaria tropica sowie bei Infektion mit *P. knowlesi* erfolgt die Therapie in Abhängigkeit vom klinischen Bild mit dem Goldstandard Artemisinin-

19

Kombinations-Therapie (ACT). Die ACT beinhaltet eine Kombination aus Artesunat mit Amodiaquin oder Mefloquin, Artemether mit Lumefantrin, Dihydroartemisinin mit Piperaquin oder Artesunat mit Pyronaridin. Bei Infektionen mit *P. vivax* und *P. ovale* erfolgt die Initialtherapie mit Artemether-Lumefantrin oder Atovaquon-Proguanil und eine Folgebehandlung nach Abklingen der Symptome mit Primaquin zur Eradikation der Hypnozoiten. Für eine unkomplizierte Malaria durch *P. malariae* ist Chloroquin Mittel der Wahl.⁹⁴

Resistenzen

In vielen Endemiegebieten stellt die ACT den Goldstandard zur Behandlung von *P. falciparum* induzierter Malaria dar, da viele Stämme bereits resistent gegen Chloroquin sind (Abbildung 8, rot). Daneben steigt vor allem in Afrika und Südostasien die Zahl der Resistenzen durch Genmutationen der Dihydrofolatreduktase *(dhfr)* und der Dihydropteroatsynthase *(dhps)* gegen die Sulfadoxin und Pyrimethamin, die zusammen mit Artesunat im Rahmen der ACT oder zur Chemoprävention eingesetzt werden (Abbildung 8, blau).



Abbildung 8: Verteilung der *P. falciparum* Resistenzen gegenüber Chloroquin (rot), Sulfadoxin-Pyrimethamin (blau) und Artemisinin (grün) in Afrika und Südostasien. Abbildung verwendet mit der Genehmigung von © 2018 Macmillan Publishers Limited, Teil von Springer Nature, aus Nature Reviews Microbiology (2018), Volume 16, Seite 156-170⁹⁵; die Genehmigung mit der Lizenznummer 5794830422412 wurde am 23.05.2024 über das Copyright Clearance Center, Inc. erteilt.

In Afrika sind bisher keine Artemisinin-Resistenzen von *P. falciparum* bekannt, allerdings häufen sich Berichte über das Versagen einer Artemisinin- oder Artemisinin-Kombinationstherapie (Abbildung 8, links).^{96,97} Mutation von *P. falciparum Kelch13* (*PfKelch13*) werden mit einer verspäteten Eradikation der Parasiten nach einer Artemisinin-haltigen Behandlung assoziiert. Dies wird als partielle oder Teilresistenz gegen Artemisinin

bezeichnet und konnte in vier afrikanischen Ländern, Teilen Südostasiens, Südamerika und Papua-Neuguinea identifiziert werden (Abbildung 8, rot).

Daneben wurden in Südostasien Resistenzen gegen Piperaquin durch einen Anstieg *Pf*-Plasmepsin-2/3-Kopienzahlen sowie Mutationen im *P. falciparum* Chloroquin-Resistenz-Transporter (*Pf*CRT) identifiziert, ebenso wie weltweit auftretende Resistenzen gegen Mefloquin und Amodiaquin durch Anstieg der *Pfmdr1*-Kopienzahlen.^{2,98,99}

Neben zunehmenden Problemen bei der Behandlung von *P. falciparum* induzierter Malaria treten in Südamerika zunehmend Chloroquin-resistente *P. vivax* Stämme auf.¹⁰⁰

Somit sind gegen alle bisher zugelassenen Arzneimittel zur Behandlung der Malaria Resistenzen bekannt.

Neben therapieresistenten *Plasmodien*, ist auch die Resistenz der *Anopheles*-Mücken gegen Insektizide, insbesondere Pyrethroide ein zunehmendes Problem.¹⁰¹ Von insgesamt 88 Ländern, die das Auftreten von Insektizid-resistenten Stechmücken überwachen, berichteten 78 bereits das Auftreten einer oder mehrerer Resistenzen seit 2010.

Artemisinin-resistente *Plasmodien* und Insektizid-resistente *Anopheles*-Mücken gefährden die Eradikation der Malaria, sodass kontinuierliche Erforschung und Entwicklung neuer Wirkstoffe notwendig sind.

Pipeline

Aktuell konzentriert sich die Entwicklung neuer Malariawirkstoffe auf die Eliminierung und Ausrottung der Malaria anstatt auf die Kontrolle des Infektionsgeschehens.¹⁰² Aufgrund des komplexen Lebenszyklus und des Wirtswechsels stehen verschiedene Strategien zur Ausrottung der Malaria im Fokus, welche die Definition von Eigenschaften für einzelne Wirkstoffe (TCP: *target candidate profiles*) und Arzneimittel (TPP: *target product profiles*) erforderte.¹⁰³ Neue Formulierungen sowie verschiedene Therapieregimen zugelassener Mehrfachkombinationen von Malaria-Wirkstoffen, die diese TPPs adressieren machen einen Großteil der derzeitigen fortgeschrittenen klinischen Studien aus.

Um neue Wirkstoffmoleküle gemäß TCPs zu entwickeln, gewinnen hypothesengesteuertes Design und Target-basiertes Screening in Verbindung mit rationalem Design, vor allem phänotypische Screenings an Bedeutung. Die phänotypischen Screenings erlauben die Identifikation neuer Targets durch Sequenzierung spontan resistenter Mutanten.¹⁰⁴ Die Pipeline füllte sich in den vergangenen Jahren mit Wirkstoffkandidaten, die neue und zum Teil noch unklaren Wirkmechanismen besitzen und aus strukturell diversen chemischen Stoffklassen stammen (Abbildung 9).¹⁰⁵

21



Abbildung 9: Pipeline der in (prä-)klinischen Studien befindlichen noch nicht zugelassenen Malariawirkstoffe.
 Die Übersicht beinhaltet keine Biologicals. DXR = 1 Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase, *Pf*ATP4
 = Plasmodiale ATPase 4, *Pf*DHODH = plasmodiale Dihydroorotatdehydrogenase, *Pf*EF2 = *P. falciparum* elongation factor 2, PPARγ = Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren gamma.

In Phase II-Studien befindet sich Ferroquin in Kombination mit ZY19489, einem Kandidaten mit neuem und ungeklärten Wirkmechanismus.¹⁰⁶ Ferroquin ist ein 4-Aminochinolin, das keine Kreuzresistenz zu Chloroquin, Amodiaquin und Piperaquin zeigt.^{107,108} AQ-13 gehört ebenfalls zu den 4-Aminochinolinen und weist keine Kreuzresistenz zu Chloroquin auf.¹⁰⁹Artefenomel (OZ439) ist ein vollsynthetisches Ozonid mit ähnlichem oder gleichem Wirkmechanismus wie die Artemisinin-Analoga, welches durch verbesserte Pharmakokinetik die dreimalige Gabe von Artemisinin-Analoga ablösen könnte.¹¹⁰

Das Dihydroisochinolin (+)-SJ733 und das Spiroindolon Cipargarmin (KAE609) befinden sich als Monotherapie in Phase II-Studien und wirken über einen neuen Mechanismus.^{111,112} Die Hemmung des plasmodialen ATP4-Kanals (*Pf*ATP4) in der Plasmamembran des Parasiten erhöht die intrazelluläre Na⁺-Konzentration und den pH-Wert, was zum Anschwellen und einer Rigidität des Parasiten und damit zur Eryptose oder Zellseneszenz führt.¹¹³

Für einen weiteren Phase II-Kandidaten, das Imidazolopiperazin Ganaplacid (KAF156), ist der Wirkmechanismus noch nicht vollständig geklärt. Möglicherweise beeinflusst Ganaplacid einen Transporter auf der Membran des endoplasmatischen Retikulums und damit die Proteinsekretion. Ganaplacid wirkt auf Merozoiten und die sexuellen Gametozyten, sodass es auch einen Einfluss auf die Übertragung haben könnte.^{114,115} Das Triazolopyrimidin DSM265 wirkt antiplasmodial im Blutstadium und Leberstadium, indem es die plasmodiale Dihydroorotatdehydrogenase (*Pf*DHODH) und damit die *de novo*-Pyrimidinbiosynthese

selektiv hemmt.^{116,117} Die Wirksamkeit der Phosphonohydroxamsäure Fosmidomycin, ein Inhibitor von Isoprenoid-Vorläufermolekülen sollte in Phase II-Studien in Kombination mit Clindamycin, Azithromycin oder Piperaquin untersucht werden, allerdings pausieren die Studien nach deren Ankündigung zwischen 2011 und 2015.¹¹⁸⁻¹²⁰ Zudem wurden die mit anderen Indikationen zugelassen Wirkstoffe Imatinib, ein plasmodialer Tyrosinkinase-Hemmer^{121,122}, und Rosiglitazon, ein Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren gamma (PPARγ) Agonist¹²³, in Phase II als Kombinationspartner zur Reduktion der Therapiedauer und besseren Verträglichkeit erprobt, jedoch scheinen die Studien nicht fortgesetzt zu werden. Trotz der vielversprechenden Malariakandidaten in der klinischen Entwicklung steht die Wirkstoffentwicklung vor großen Herausforderungen: die multiresistente Malaria in Südostasien und der Notwendigkeit, vereinfachte Therapieoptionen bereitzustellen. Zudem soll die Transmission durch neue Arzneistoffe zur Chemoprotektion mit lang wirkenden Molekülen, parenteralen Formulierungen oder Endectoziden, die zum Tod der Stechmücke nach Biss eines behandelten Menschen führen, gezielt unterbunden werden. Zudem muss bei der (prä-)klinischen Entwicklung ein ausgesprochener Wert auf Sicherheit und Verträglichkeit

gelegt werden, damit die Therapie von vulnerablen Patientengruppen wie Schwangeren, Kindern, unterernährten und komorbiden Patienten erfolgreich ist.

2.4. Ansatzpunkte zur Entwicklung neuer Antiinfektiva

In den vergangen Jahren konnten innovative Ansätze wie Bakteriophagen^{124,125}, antimikrobielle Peptide (AMP)^{126,127}, Antisense-Oligonukleotide¹²⁸, Antikörper-Antibiotika-Konjugate (AAC)¹²⁹, antibiotische Adjuvantien¹³⁰, Mikrobiom-basierte Therapien¹³¹ und Avirulenz-Strategien¹³² neue Perspektiven in die Antibiotika-Forschung bringen. Allerdings haben die neuen Optionen jeweils eigene Limitationen, sodass deren Anwendung noch eingeschränkt ist und die "klassische" Antibiotikaforschung und Entwicklung von niedermolekularen Wirkstoffen natürlichen oder synthetischen Ursprungs, weiterhin notwendig ist.¹³³⁻¹³⁵

2.4.1. Naturstoffe in der Antiinfektiva-Forschung

In der Vergangenheit haben Naturstoffe eine Schlüsselrolle bei der Entdeckung von Arzneimitteln gespielt, insbesondere bei Infektions- und Krebserkrankungen.^{136,137} Seit der Entdeckung, Herstellung und medizinischen Anwendung von Penicillin als Antibiotikum vor über 80 Jahren,¹³⁸ wurden über 23 000 Naturstoffe isoliert und charakterisiert, die überwiegend von Bakterien der Familie *Actinomycetaceae* stammen.¹³⁹ Naturstoffe weisen im Vergleich zu synthetisch gewonnen Wirkstoffen meist ein hohes Molekulargewicht, eine größere Anzahl von sp³-hybridisierten Kohlenstoff- und Sauerstoffatomen bei weniger Stickstoff- und

Halogenatomen, eine höhere Anzahl von Wasserstoffbrückenakzeptoren und -donatoren, niedrigere berechnete Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten (cLogP-Werte) und eine größere Rigidität auf.^{136,140-144} Zudem können Naturstoffe Substitutionsmuster aufweisen, die aufgrund von Reaktivität und/oder sterischer Hinderung synthetisch nicht oder nur schwer zugänglich sind.¹⁴⁵

Naturstoffe sind für die Entwicklung von Arzneistoffen im Bereich der Antiinfektiva insbesondere wichtig, weil diese von Mikrobiota produzierten Naturstoffe im Verlauf der Evolution strukturell optimiert wurden, um eine bestimmte biologische Funktion, wie beispielsweise die Abwehr von invasiven Mikroorganismen auszuüben.^{136,146} Der Erfolg der Naturstoffe in der Antibiotika-Entwicklung zeigt sich anhand der zugelassenen Antibiotikaklassen (Schema 10). Von diesen Klassen sind sechs natürlichen Ursprunges und nur die Sulfonamide, Fluorchinolone und Oxazolidinone wurden vollständig durch synthetische Chemie entwickelt.



Naturstoff (NP) NP-Analog Biologisches Makromolekül
 Synthetisch mit NP-Pharmakophor oder NP-Mimetikum Synthetisch

Abbildung 10: Anzahl der neu zugelassenen Arzneimittel 1981 bis 2019 gegen bakterielle Infektionen (**A**) und Malaria (**B**) aufgeschlüsselt nach Herkunft. Mit Einverständnis entnommen, übersetzt und modifiziert von Journal of Natural Products (2003), Volume 83, Ausgabe 3, Seite 770-803¹⁴⁷. © 2020 American Chemical Society and American Society of Pharmacognosy. Open Access Artikel mit Creative Commons DEED Namensnennung-Nicht kommerziell 4.0 International Lizenz (CC-BY-NC-4.0 DEED, siehe https://www.creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/deed.de)

Zudem waren in den vergangenen 40 Jahren nur 38 % der 130 zugelassenen Antibiotika rein synthetischen Ursprunges (Abbildung 10, **A**).¹⁴⁷ Ein ähnliches Bild zeigt sich bei den Antimalariawirkstoffen, von denen sogar 82 % als Naturstoff(-analoga) klassifiziert werden (Abbildung 10, **B**).¹⁴⁷

Die antiinfektiv wirksamen Naturstoffe stammen vor allem aus Pflanzen, Bakterien, Algen, Pilzen und Schwämmen.¹⁴⁸ Insbesondere die aus Pflanzen stammenden Flavonoide erlangten

wachsendes Interesse für die Antiinfektivaforschung aufgrund der antimikrobiellen Aktivität einiger Vertreter dieser Stoffklasse.¹⁴⁹

2.4.2. Flavonoide als Antiinfektiva

Flavonoide sind Sekundärmetabolite, die von photosynthetischen Lebewesen produziert werden und eine Vielzahl pharmakologischer Eigenschaften aufweisen.¹⁵⁰ Zu diesen zählen insbesondere fungizide, antivirale und antibakterielle Eigenschaften,¹⁴⁹ sodass Flavonoidhaltige Zubereitungen wie Propolis schon seit über 2000 Jahren in der Volksmedizin als Antiinfektiva eingesetzt werden.^{151,152} Die Flavonoide haben ein 3,4-Dihydro-2*H*-chromen Grundgerüst mit einem Phenylrest in 2-Position, welches auch als Flavon bezeichnet wird (Schema 12).¹⁵³



Schema 12: Allgemeiner Aufbau der Flavonoide mit Ring-Nomenklatur.

Diese Stoffklasse zeichnet sich durch eine typische Nomenklatur aus. Der A-Ring leitet sich biosynthetisch vermutlich von Phloroglucin aus dem Polyketidstoffwechsel ab. Der B- und die C₃-Brücke, welche nach Ringschluss den C-Ring bilden, stammen aus Phenylalanin als Produkt des Shikimisäurewegs.^{154,155} Verschiedene Oxidationsstufen des C-Rings führen zur weiteren Unterteilung in Flavanole, Flavanone, Flavanonole, Flavone und Flavanole. ¹⁵³ Forschungsgruppen sind zunehmend in der Lage, die pharmakologisch aktiven Bestandteile aus Rohextrakten pflanzlichen, marinen und mikrobiellen Ursprungs zu isolieren, identifizieren und charakterisieren, sodass die antiinfektiven Wirkstoffe der Extrakte bestimmt werden können.¹⁴⁹ Auf diesem Weg wurden die Naturstoffe Chlorflavonin, Bromflavonin und Ternatin entdeckt, die in den folgenden Kapiteln besprochen werden.

2.4.2.1. Entdeckung von Chlor- und Bromflavonin

Zuerst wurde Chlorflavonin (CF, I) 1967 in dem Patent GB1139041A "Chlorflavonin" durch RICHARDS und MUNDEN beschrieben.¹⁵⁶ Sie isolierten Chlorflavonin (**CF**) aus *Aspergillus candidus*-Stämmen, bestimmten dessen physikochemische Eigenschaften und klärten dessen Flavonon Struktur auf (Schema 13).¹⁵⁷



Schema 13: Struktur der Naturstoffe Chlorflavonin (I), Dechlorflavonin (II) und Bromflavonin (III)

Im Jahr 2001 isolierten WATANABE *et al.*¹⁵⁸ neben Dechlorflavonin (**II**) und CF die Substanz CJ-19,784 als Fermentationsprodukt des Pilzes *Acanthostigmella sp.* (Schema 13). Erstmals wurden umfangreichere Strukturuntersuchungen mittels ¹H- und ¹³C-NMR-Spektroskopie sowie Massenspektrometrie durchgeführt. Diese bestätigten die Struktur von Chlorflavonin und identifizierten das neu entdeckte Analogon als Bromflavonin (BF, **III**) oder auch 2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4*H*-chromen-4-on.

Die drei Flavonoide wurden vor allem auf ihre antimykotischen Eigenschaften hin untersucht. Chlorflavonin zeigt Aktivität gegenüber den Schimmelpilzen der Gattung *Aspergillus* (MHK₉₀ 0.08 µg/mL), *Paecilomyces variotii* (MHK₉₀ 2.5 µg/mL) und *Botrytis cinerea* (MHK₉₀ 5.0 µg/mL)^{157,159} sowie eine schwache Wachstumshemmung gegenüber *Candida*-Arten und *Saccharomyces cerevisae* (MHK₉₀ 50-100 µg/mL)¹⁶⁰

Später wurden die drei Verbindungen gegen die pathogenen Pilze *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* und *Aspergillus fumigatus* getestet, welches einen direkten Vergleich der Flavonoide ermöglicht. (Tabelle 1).¹⁵⁸

	IC₅₀ (μg/mL)				
	C. albicans	C. neoformans	A. fumigatus	HeLa Zellen	
Chlorflavonin	0.035	12	0.10	20	
Dechlorflavonin	0.42	16	0.93	79	
Bromflavonin	0.11	20	0.54	81	
Amphotericin B	0.076	0.57	0.14	50	

Tabelle 1: Antimykotische Eigenschaften von Chlorflavonin (I), Dechlorflavonin (II) und Bromflavonin (III).

Dechlorflavonin (**II**) ist weniger potent als seine halogenierten Analoga, was vermuten lässt, dass ein Halogen in 3'-Position essentiell für die antimykotische Aktivität ist. Brom- und Chlorflavonin zeigten Aktivität gegen *Candida albicans* und *Aspergillus fumigatus* (IC₅₀ 0.04-0.93 μg/mL) ohne zytotoxisch auf HeLa-Zellen zu wirken.

2.4.2.2. Chlorflavonin als Leitstruktur mit antimykobakteriellen Eigenschaften

REHBERG *et al.* ⁶ führten eine bioaktivitätsbasierte Untersuchung verschiedener Extrakte von endophytischen Pilzen durch, unter der Prämisse neue Naturstoffe mit antimykobakterieller Aktivität zu identifizieren. Ein solcher Naturstoff konnte von *Mucor irregularis*, der von der Moraginaceae *Moringa stenopetala* in Kamerun gesammelt wurde, isoliert werden. NMR-spektroskopische sowie massenspektrometrische Untersuchungen zeigten, dass es sich bei dieser Substanz um das bereits 1969 von BIRD und MARSHALL¹⁶¹ beschriebene Flavonoid Chlorflavonin handelt. Im Rahmen der Arbeit von REHBERG *et al.* konnte gezeigt werden, dass Chlorflavonin ausgeprägte antimykobakterielle und selektive *in vitro* Aktivität aufweist, da es neben dem *Mt*-Wildtyp H37Rv (MHK₉₀ = 1.56 µM) die XDR-Stämme KZN07, KZN13, KZN14 und KZN17 aus der südafrikanischen Provinz KwaZulu-Natal (KZN) mit vergleichbarer Potenz inhibiert.

Daneben zeigt Chlorflavonin keine Zytotoxizität im getesteten Bereich (IC₅₀ > 100 μ M) gegen die humanen Monozyten-Zelllinie THP-1, fetale Lungenfibroblasten-Zelllinie MRC-5 und human embryonale Nierenzelllinie HEK-293, sodass Chlorflavonin präferenziell das Wachstum von *Mt* mit einem Selektivitätsindex (SI = IC₅₀/ MHK₉₀) von mindestens 64 inhibiert.⁶ In einer früheren Untersuchung der Zytotoxizität gegen HeLa-Zellen zeigt sich Chlorflavonin mit einem IC₅₀ = 20 μ g/mL, bzw. 53 μ M schwach zytotoxisch. Außerdem zeigt Chlorflavonin potente intrazellulare mykobakterielle Wachstumsinhibition im humanen Makrophagen (THP-1)-Modell und in der Monotherapie einen über drei Wochen anhaltenden bakteriostatischen Effekt gegen *Mt* mit einer hohen Resistenzbarriere. Die Kombination von Isoniazid oder Delamid mit Chlorflavonin wirkt bakterizid gegen klinische XDR-*Mt*-Stämme, die gegen neun zugelassene Antituberkulotika resistent sind.

Als molekulare Zielstruktur von Chlorflavonin konnte die katalytische Untereinheit IIvB1 der Acetohydroxysäure Synthase (AHAS) mit Hilfe von Resistenz-induzierenden Mutationen, Genomsequenzierung, Supplementations-*Assays* und *Molecular-Docking*-Experimenten identifiziert werden.⁶

Die katalytisch-aktive Untereinheit IIvB1 katalysiert zusammen mit der regulatorischen Untereinheit IIvN zwei initiale Schritte der *de novo*-Biosynthesekaskade der verzweigtkettigen Aminosäuren ¹⁶²⁻¹⁶⁶ Zum einen werden zwei Moleküle Pyruvat unter oxidativer Decarboxylierung zu (*S*)-2-Acetolactat kondensiert (Schema 14). Nach weiteren enzymatisch katalysierten Reaktionen entstehen die Aminosäuren L-Valin und L-Leucin sowie

27

Pantothensäure (2,4-Dihydroxy-3,3-dimethylbuttersäure). Die zweite katalytische Funktion besteht in der Kondensation von Pyruvat und α -Ketobutyrat zu (*S*)-Aceto-2-hydroxybutyrat, welches eine Vorstufe von L-Isoleucin darstellt.¹⁶²⁻¹⁶⁶



Schema 14: Biosyntheseweg der verzweigtkettigen Aminosäure (BCAAs) und Pantothensäure. Abbildung modifiziert mit Genehmigung von ACS Infectious Diseases (2018), Volume 4, Ausgabe 2, Seite 123–134.⁶ Copyright © 2018, American Chemical Society.

Die Inhibition der AHAS führt folglich zu einer kombinierten Auxotrophie der verzweigtkettigen Aminosäuren Val, Leu, IIe sowie Panthothensäure.⁶ Leucin- und Pantothensäure-auxotrophe *Mt*-Mutanten waren in verschiedenen Tiermodellen stark abgeschwächt,^{163,167-169} was darauf hindeutet, dass *Mt* nicht in der Lage ist, Leucin und Pantothensäure exogen aufzunehmen. Dementsprechend ist die Inhibition der Biosynthese dieser essentiellen Bausteine durch die Inhibition der AHAS ein vielversprechender Ansatz, das *in vivo* Wachstum von *Mt* zu hemmen. Im Gegensatz zu Bakterien, Pilzen, Algen und Pflanzen, stellen die verzweigtkettigen Aminosäuren und Pantothensäure für den Menschen essentielle Nahrungsbestandteile dar.^{170,171} Dementsprechend gibt es kein homologes humanes AHAS-Enzym, welches die Selektivität gegenüber *Mt* bedingt.⁶ Da die über 50 als Herbi- und Fungizide zugelassenen AHAS-Inhibitoren (Schema 15) keine bis wenig Toxizität gegenüber Säugetieren zeigen^{172,173}, ist bei neuen antibiotisch wirkenden AHAS-Inhibitoren keine Target-vermittelte Toxizität zu erwarten.

AHAS-Inhibitoren aus der Stoffklasse der Sulfonylharnstoffe¹⁷⁴ wie Sulfometuron-methyl und 2-Imidazolinone¹⁷⁵ wie Imazaquin sind bisher nur als Herbizide zugelassen, wobei einige dieser AHAS-Inhibitoren auch einen wachstumshemmenden Effekt gegen *Mt* aufwiesen.^{166,173,176-180} Beispielsweise inhibierte Pyrazosulfuron-ethyl die mykobakterielle AHAS mit einem IC₅₀ = 0.87 μ M und das Wachstum von *Mt* H37Rv mit einer MHK₉₀ = 30 μ M.¹⁷⁸



Schema 15: Ausgewählte Beispiele zugelassener Herbizide, die die Acetohydroxysäure Synthase (AHAS) inhibieren. Blau = Wirkstoffklasse, schwarz = Wirkstoffname.

Für Sulfometuron-methyl konnte darüber hinaus im *in vivo* Mausinfektionsmodell eine signifikante Reduktion der mykobakteriellen Belastung in der Lunge nach Infektion mit einem XDR-Stamm nachgewiesen werden. Zwar ist die *ex vivo* Effektivität von Sulfometuron-methyl im Vergleich zu Isoniazid etwa drei bis sechsmal reduziert, dennoch unterstreichen diese Ergebnisse das therapeutische Potential der AHAS-Inihibitoren.¹⁷⁸

Chlorflavonin (I) zeigt keine strukturelle Ähnlichkeit zu den bisher untersuchten AHAS-Inhibitoren und repräsentiert somit eine neue Stoffklasse innerhalb der AHAS-Inhibitoren. Zudem zeigte **CF** in einem kolorimetrischen AHAS-Assay eine stärkere Enzyminhibition als der bekannte AHAS-Inhibitor Pyrazosulfuron-ethyl.⁶ Folglich ist Chlorflavonin (I) eine vielversprechende Leitstruktur für weitere präklinische Strukturoptimierung und *in vivo* Effektivitätsstudien im Mausmodell zur Behandlung der Tuberkulose.

2.4.2.3. Das Flavonoid Ternatin

Neben Chlor- und Bromflavonin weist das Flavonoid Ternatin (**IV**) (5-Hydroxy-2-(4-hydroxy-3methoxyphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4*H*-chromen-4-on) ein ähnliches Substitutionsmuster auf (Schema 16). Während **CF** und **BF** am B-Ring einen 2'-Hydroxy-3'-Halogen-Substitutionsmuster aufweisen, trägt Ternatin die Hydroxygruppe in 4'-Position und eine Methoxygruppe in 3'-Position.



Schema 16: Struktur des Naturstoffs Ternatin (IV) aus der Melicope ternata mit Lokantensatz.

1949 isolierten BRIGGS und LOCKER Ternatin (**IV**) aus der Rutaceae *Melicope ternata*.¹⁸¹ Ternatin (**IV**) zeigt keine Aktivität gegen *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* und *Enterobacter cloacae* bis zu einer Konzentration von 50 μg/mL. Zudem weist Ternatin keine Aktivität gegenüber *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv auf, allerdings inhibiert es das Wachstum eines multiresistenten *Mt*-Stammes mit einem MHK₉₀-Wert von 12.5 μg/mL.¹⁸² Darüber hinaus wurden entzündungshemmende¹⁸³, fiebersenkende und antivirale¹⁸⁴ Eigenschaften des Naturstoffs beschrieben.

Eine weitere Untersuchung von Ternatin (**IV**) bezüglich seiner Fähigkeit AHAS zu inhibieren, kann zur Untersuchung der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen beitragen.

2.4.3. Fosmidomycin

Um der anhaltenden Zunahme multiresistenter Mikroorganismen entgegenzuwirken, ist die Entwicklung neuartiger Arzneimittel mit neuen Wirkmechanismen dringend erforderlich. Während Menschen die essentiellen Isoprenoid-Vorstufen Isopentenvldiphosphat (IPP) und Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) über den Mevalonat-Weg biosynthetisieren, nutzen pathogene Protozoen und bestimmte pathogene Eukaryoten den Methylerythritolphosphatweg (MEP). Wichtige Krankheitserreger, die den MEP-Weg nutzen, sind beispielsweise Plasmodium falciparum. Mycobacterium tuberculosis. Pseudomonas aeruginosa und Escherichia coli. Da der MEP-Weg nicht im Menschen vorkommt, sollten Antiinfektiva, die Enzyme des MEP-Weges inhibieren, keine Target-vermittelte Toxizität gegen humane Zellen aufweisen. Fosmidomycin stellt ein solches Antiinfektivum dar, welches die 1-Deoxy-Dxylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase (DXR), das zweite Enzym des MEP-Weges inhibiert. Neben einer umfassenden Einführung in die Thematik, beschreibt dieser Übersichtsartikel die Entwicklung und antiinfektiven Eigenschaften einer breiten Palette von Fosmidomycin-Analoga, die in den letzten vier Jahrzehnten synthetisiert wurden. Es wird das Pharmakophor eines DXR-Inhibitors besprochen, welches als metallbindende Gruppe eine Hydroxamat- oder Retro-Hydroxamat-Gruppe, eine Monoalkylphosphat- oder Phosphonsäure-Funktionalität und einen verbindenden Linker umfasst. Darüber hinaus werden DXR-Inhibitoren, die nicht das typische Pharmakophor aufweisen, Bisubstrat-Inhibitoren und verschiedene Prodrug-Konzepte beschrieben. Es werden umfassende Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (SAR) vorgestellt und neue Möglichkeiten für weitere Arzneimittelentwicklungen aufgezeigt.





Review

Over 40 Years of Fosmidomycin Drug Research: A Comprehensive Review and Future Opportunities

Talea Knak, Mona A. Abdullaziz, Stefan Höfmann, Leandro A. Alves Avelar, Saskia Klein, Matthew Martin, Markus Fischer, Nobutada Tanaka and Thomas Kurz

Special Issue Drug Discovery and Evaluation for the Treatment of Parasitic Infections Edited by Dr. Gabriela Hrckova and Prof. Dr. Gustavo Henrique Goulart Trossini





https://doi.org/10.3390/ph15121553





Over 40 Years of Fosmidomycin Drug Research: A Comprehensive Review and Future Opportunities

Talea Knak ^{1,†}, Mona A. Abdullaziz ^{1,†}, Stefan Höfmann ^{1,†}, Leandro A. Alves Avelar ¹, Saskia Klein ¹, Matthew Martin ², Markus Fischer ³, Nobutada Tanaka ⁴ and Thomas Kurz ^{1,*}

- ¹ Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Heinrich Heine University Düsseldorf, Universitätsstraße 1, 40225 Düsseldorf, Germany
- ² Initiative for Science & Society, Duke University, 140 Science Drive, Durham, NC 27708, USA
- ³ Institut für Pharmazie, Universität Hamburg, Bundesstrasse 45, 20146 Hamburg, Germany
- ⁴ School of Pharmacy, Kitasato University, 5-9-1 Shirokane, Minato-ku, Tokyo 108-8641, Japan
- * Correspondence: thomas.kurz@hhu.de
- + These authors contributed equally to this work.

Abstract: To address the continued rise of multi-drug-resistant microorganisms, the development of novel drugs with new modes of action is urgently required. While humans biosynthesize the essential isoprenoid precursors isopentenyl diphosphate (IPP) and dimethylallyl diphosphate (DMAPP) via the established mevalonate pathway, pathogenic protozoa and certain pathogenic eubacteria use the less well-known methylerythritol phosphate pathway for this purpose. Important pathogens using the MEP pathway are, for example, Plasmodium falciparum, Mycobacterium tuberculosis, Pseudomonas aeruginosa and Escherichia coli. The enzymes of that pathway are targets for antiinfective drugs that are exempt from target-related toxicity. 2C-Methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP), the second enzyme of the non-mevalonate pathway, has been established as the molecular target of fosmidomycin, an antibiotic that has so far failed to be approved as an anti-infective drug. This review describes the development and anti-infective properties of a wide range of fosmidomycin derivatives synthesized over the last four decades. Here we discuss the DXR inhibitor pharmacophore, which comprises a metal-binding group, a phosphate or phosphonate moiety and a connecting linker. Furthermore, non-fosmidomycin-based DXRi, bisubstrate inhibitors and several prodrug concepts are described. A comprehensive structure-activity relationship (SAR) of nearly all inhibitor types is presented and some novel opportunities for further drug development of DXR inhibitors are discussed.

Keywords: DXR/IspC inhibitor; fosmidomycin; malaria; *Plasmodium falciparum; Mycobacterium tuberculosis*; PfDXR

1. Introduction

The rapid spread of multi-drug-resistant (MDR) strains of pathogenic bacteria and parasites poses a global threat to human health. Thus, new drugs addressing unique therapeutic targets are urgently needed. Since its discovery in the early 1990s [1] by Rohmer et al., the 2C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) pathway is accepted as an attractive, and for the treatment of malaria validated, target for the development of new anti-infective drugs. The MEP pathway is essential in several clinically relevant pathogens such as *Mycobacterium tuberculosis, Escherichia coli* (*E. coli*) and apicomplexan parasites including *Plasmodium* spp., and *Toxoplasma* spp., but is absent in mammals, fungi, archaebacteria and most Gram-positive bacteria such as *Streptococci* and some *Staphylococci* [1–6]. Over the course of seven enzymatic reactions, the MEP pathway leads to isopentenyl diphosphate (IPP) and dimethylallyl diphosphate (DMAPP), precursors to the isoprenoids. Since the enzymes of the MEP pathway have no human orthologs, target-related toxicity is not to be expected [7,8]. However, no MEP inhibitor has so far been approved as an anti-infective drug.



Citation: Knak, T.; Abdullaziz, M.A.; Höfmann, S.; Alves Avelar, L.A.; Klein, S.; Martin, M.; Fischer, M.; Tanaka, N.; Kurz, T. Over 40 Years of Fosmidomycin Drug Research: A Comprehensive Review and Future Opportunities. *Pharmaceuticals* 2022, *15*, 1553. https://doi.org/10.3390/ ph15121553

Academic Editors: Gabriela Hrckova and Gustavo Henrique Goulart Trossini

Received: 28 October 2022 Accepted: 5 December 2022 Published: 14 December 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https:// creativecommons.org/licenses/by/ 4.0/). Fosmidomycin (1) and FR9000098 (2) were first described in 1978 as antibiotics and herbicides (Figure 1) [9–11]. Twenty years later, they were identified as inhibitors of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (DXR), the second and rate-limiting enzyme of the MEP pathway [12–14].



Figure 1. Structural formula of the natural product fosmidomycin (1) and its acetyl analog FR900098 (2).

The phosphono-hydroxamic acids **1** and **2** possess potent antibacterial and antiparasitic properties. Unfortunately, the main shortcoming of both lead structures **1** and **2** are their unfavorable pharmacokinetic properties, mainly insufficient membrane permeability due to the charged phosphonate and the polar hydroxamate moiety and the short half-life time [15,16].

Over more than 40 years, significant efforts to improve the anti-infective properties have led to hundreds of novel DXR inhibitors based on the lead structures fosmidomycin (1) and FR900098 (2). In this review, we outline the physicochemical, pharmacokinetic and anti-infective properties of the parent compounds 1 and 2 as well as their efficacy spectra against various bacterial and parasitic pathogens. A short section of this review is dedicated to recent results of fosmidomycin (1) in human clinical trials. In addition, an overview of both the historical and recent development of novel DXR inhibitors with a particular focus on their activity against various pathogenic organisms and their structure–activity relationships (SARs) are also included.

2. Discovery and Evaluation of Fosmidomycin (1) and Related Natural Products

In 1978, fosmidomycin (1, FR-31564) and FR900098 (2) were first described as a new class of antibiotics isolated from *Streptomyces lavendulae* and *Streptomyces rubellomurinus* [9,17]. The biosynthesis of FR900098 (2) has been completely elucidated, whereas, for fosmidomycin (1), only the biosynthesis of the putative precursor FR32863 (IV, Figure 2) is known [18–20]. Over the past four decades, the antiparasitic and antibacterial activities of **1** and **2** were determined, analyzed, and improved by various research groups. Alongside **1** and **2**, additional phosphono-hydroxamic acids were discovered by the Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd. (Figure 2) [21].



Figure 2. Additional phosphono-hydroxamic acids published by the Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd. [21].

In a 1978 patent, Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd. described the first synthesis of both **1** and **2** as shown in Scheme 1 [10]. The four-step synthesis consists of the alkylation of an *N*,*O*-diprotected hydroxylamine (**VI**) with 1,3-dibromopropane, followed by a Michaelis-Becker reaction of propyl bromide **VII** with dibutyl phosphonate to give the protected phosphonic ester (**VIII**). After the removal of the protecting groups, the free hydroxylamine (**IX**) was formylated and acetylated producing the natural compounds (**1**) and (**2**).



Scheme 1. (i) 1. Na, EtOH, 70 °C, 1.5 h, 2. 1,3-dibromopropane, 2 h, rt to reflux, (ii) 1. NaH, benzene, dibutyl phosphonate, reflux, 3.5 h, 2. **VII**, reflux, 5.6 h (iii) 6 N HCl, acetic acid, 20 h, reflux (iva) 1. formic acid, acetic anhydride, 1.1 h, 0 to 5 °C, 2. NH₃ (28 % aq. sol.), (ivb) acetic anhydride, water, rt, 1.5 h, Ts = tosyl, PMB = p-methoxybenzyl.

In 1989, Shigi identified fosmidomycin as an antibiotic inhibiting isoprenoid biosynthesis [22]. Towards the end of the millennium, in 1998, fosmidomycin (1) and FR900098 (2) were identified as selective inhibitors of *EcDXR* by Kuzuyama et al. [12]. Additionally, in a Science publication in 1999 Jomaa and coworkers described fosmidomycin (1) as a *PfDXR* inhibitor, inhibiting the growth of *P. falciparum* and also possessing curative properties in mice infected with *Plasmodium vinckei* [13]. In 2002, Kremsner and coworkers conducted a small-scale clinical trial of fosmidomycin for the treatment of uncomplicated malaria in adults, laying the foundation for further clinical trials [23].

2.1. Anti-Infective Activity of Fosmidomycin

Fosmidomycin inhibits a broad spectrum of pathogens which rely on the MEP pathway for the biosynthesis of DMAPP IPP. These pathogens include the apicomplexans *P. falciparum* (*Pf*) and *Toxoplasma gondii* (*Tg*) as well as bacteria [24]. The majority of pathogens use the MEP pathway, which includes Gram-negative bacteria such as *E. coli* (*Ec*) [25], *Acinetobacter baumannii* [26], *Klebsiella pneumonia* [26], *Pseudomonas aeruginosa* [27] and Gram-positive bacteria, including certain species of *Staphylococcus* [28]. Some bacteria use both, the MEP and the mevalonate pathway, for the synthesis of DMAPP and IPP, with the mevalonate pathway being a more recent addition to some species [29]. Pathogens that feature both pathways include *Listeria monocytogenes* and some species of *Streptomyces* [28]. In contrast, examples of pathogenic bacteria that exclusively use the mevalonate pathway includes Gram-positive genus of *Streptococcus* and the Gram-negative genus of *Borrelia* [28,30]. The application of fosmidomycin is limited to species that solely rely on the non-mevalonate pathway for isoprenoid synthesis.

To date, the DXRs of *P. falciparum*, *E. coli* and *M. tuberculosis* (*Mt*) are the best-studied enzymes. As a result, most synthesized fosmidomycin analogs have been tested against at

least one of these enzymes, in addition to cellular assays. Additional information about the efficacies of **1** and **2** against these pathogens can be found in the Supplementary Materials (Table S1).

Although the enzyme catalytic sites are highly conserved across pathogens [31,32], whole-cell activities for inhibitors differ greatly due to significant distinctions among the organisms as a whole, including different localization of the DXR enzymes. In bacteria, the enzyme resides in the cytosol, whereas the homologs in parasites are located in the apicoplast, a plastid-like cell organelle accommodating a variety of biosynthetic pathways [24]. Uptake mechanisms of fosmidomycin also differ among pathogens. In *E. coli*, a cAMP-dependent glycerol 3-phosphate transporter facilitates an effective drug uptake resulting in bacterial death.

In contrast, *M. tuberculosis* lacks a similar transporter, making the bacteria intrinsically resistant to fosmidomycin as the inhibitor cannot penetrate the cell wall via passive diffusion [33]. Additionally, the cell wall of *Mt* contains highly lipophilic mycolic acids, which prevent cell wall penetration of polar drugs, including fosmidomycin, in typically used concentrations [33]. For human erythrocytes infected with *Pf*, a parasite-induced pathway known as the new permeability pathway was proposed to be most likely responsible for drug uptake [15]. Treatment of *Pf* with fosmidomycin resulted in reduced amounts of MEP pathways metabolites and their resulting isoprenoids [34]. Parasite growth is inhibited in the first cell cycle after haemoglobin digestion and DNA replication has been initiated [35].

2.1.1. Parasites

In vitro and in vivo, the *Pf* parasites infect human erythrocytes for asexual reproduction. Besides the erythrocyte membrane, the parasitophorous vacuole membrane (PVM) and the plasmodium cell membrane must also be overcome. Inside the *Plasmodium* parasite, DXR is localized in the apicoplast which contains additional four membrane layers (Figure 3) [36].



Figure 3. Passage of DXR inhibitors across seven membranes in *Plasmodium*-infected erythrocytes. Adapted with permission from *J. Med. Chem.* 2015, 58, 4, 2025–2035 [37]. Copyright 2022 American Chemical Society.

Fosmidomycin is able to kill *Pf* pathogens (IC₅₀ = 0.81μ M) [37], but not *Toxoplasma gondii*. In both pathogens, the DXR enzyme is located in the Apicoplast. Nevertheless, fosmidomycin seems to be unable to penetrate the membranes of *T. gondii* while penetration

through *Pf* membranes is possible [15]. A likely cause for fosmidomycin's inability to act upon *T. gondii* is the lack of the glycerol-3-phosphate transporter (*GlpT*), which is known to be responsible for fosmidomycin uptake in *E. coli* and other pathogens [34]. Interestingly, strains of *T. gondii* engineered to express GlpT are susceptible to fosmidomycin. Enzyme assays performed on *T. gondii* DXR have shown, that both fosmidomycin (K_i = 90 nM) and FR900098 (K_i = 48 nM) are potent inhibitors [34], paving the way for fosmidomycin-based treatments if the permeability issues can be overcome by structural modification [15].

Babesia orientalis is a tick-borne apicomplexan parasite and the cause of water buffalo babesiosis. While humans are not affected by this pathogen, its eradication is of interest as it causes considerable economic loss, especially in China. Fosmidomycin was able to limit the growth of *B. orientalis*, with the treatment of the pathogen leading to a significant reduction in relative growth [38]. Similar results were reported in *B. bigemina* and *B. bovis*, with clearance achievable in 3 days and 4 days, respectively. Both parasite species were incapable of growth after in vitro treatment with fosmidomycin, suggesting that fosmidomycin may be an effective drug for the treatment of bovine babesiosis [39].

Eimeria tenella causes eimeriosis in poultry and poses a major threat to food security. Impairment of parasitic growth required higher concentrations of fosmidomycin compared to *P. falciparum* to be statistically significant [40]. The poor efficacy of fosmidomycin was attributed to different factors, including inactivation of the active drug, poor permeability, and/or efflux of the drug. Taking similar results from *T. gondii* and the absence of the MEP pathway in the *Cryptosporidium* genus altogether into consideration these findings imply heterogeneity among apicomplexan parasites [40].

2.1.2. Gram-Positive Bacteria

The *Staphylococcus* genus is unique in that it features species that rely on either pathway for isoprenoid synthesis. Fosmidomycin inhibited the growth of *S. schleiferi* (MIC = $0.5-8 \mu g/mL$) and *S. pseudintermedius* (MIC = $0.5-1 \mu g/mL$) which are associated with household animal infections and both possess all enzymes of the non-mevalonate pathway. However, fosmidomycin could not cure infections with *S. aureus*, *S. epidermidis* and *S. lugdenensis*, which lack the *dxr* gene [28,41]. These findings contradicted earlier reports of fosmidomycin and FR900098 having shown activity against *S. aureus* [42]. A recent publication by Edwards et al. showed that fosmidomycin is indeed inactive against *S. aureus*. Edwards et al. also laid out a resistance mechanism towards fosmidomycin in *S. schleiferi* and *S. peudintermedius*, mediated by mutations lowering the function of GlpT and leading to decreased drug uptake into the aforementioned pathogens [43].

2.1.3. Gram-Negative Bacteria

The Gram-negative bacterium *E. coli* is often considered to be a model organism for anti-bacterial drug research, but a survey conducted on clinical isolates in 2018 showed that 58% of samples were resistant to current treatment options [44]. Fosmidomycin is a moderate agent against the K12 strain of *E. coli* (MIC = 12.5 μ M) [45]. While fosmidomycin showed potent enzyme inhibitory activity against the wild type of *Ec*DXR (IC₅₀ = 0.03 μ M), several mutations have been observed that decreased activity by up to 10-fold [25]. A fosmidomycin resistance gene (*fsr*) was also originally discovered in *Ec*, most likely encoding for an efflux pump that increased resistance by more than 30-fold. This efflux pump seems to be specific for fosmidomycin and does not act upon other antibiotics apart from trimethoprim [46,47]. It could be shown that *E. coli* can grow even after the deletion of the genes encoding for DXS and DXR. Rodríguez-Concepción and coworkers described that in the case of *dxs* deletion, mutations in the *ribB* and *aceE* genes lead to enzymes capable of supplying DXP. A mechanism for survival of DXR deletion has yet to be postulated and is of great interest to elucidate a new possible way of fosmidomycin resistance [48,49].

Strains of the *Burkholderia* genus, pathogens related to opportunistic infections of the respiratory tract in cystic fibrosis patients, were mostly resistant to both fosmidomycin and FR900098 as well as other conventional antibiotics [50]. Resistance was mostly attributed to

insufficient retention of inhibitors within bacterial cells, caused by the upregulation of *fsr*. This resistance could be partially circumvented by the addition of glucose-6-phosphate to the medium, prompting an increase of genes related to glycerol-3-phosphate uptake into bacterial cells, thus facilitating FR900098 (2) uptake [50]. A combination of fosmidomycin and colistin reduced the MIC of colistin by up to 64-fold in clinical isolates of *B. multivorans*, an effect that could be attributed to increased membrane permeability [51].

Francisella tularensis is a Gram-negative bacterium and the cause of tularemia, a zoonotic disease transmitted by rodents and lagomorphs [52]. Jawaid et al. showed that fosmidomycin reduced in vitro growth of *F. tularensis* subspecies *novicida* by inhibition of *F. tularensis* DXR (MIC = 136 μ M) [53]. Clinical isolates of *Francisella* were resistant to β -lactam antibiotics due to the expression of β -lactamases and spontaneously occurring resistance to fosmidomycin has also been described. Similar to *S. schleiferi* and *S. pseudintermedius*, this resistance was mediated by mutations in the GlpT gene [52].

The causative agent of the plague, *Yersinia pestis*, garnered attention over its potential applications for bioterrorism [54] and the 2017 plague outbreak in Madagascar [55]. The disease mostly manifests in two forms: the bubonic and pneumonic plague [55]. Both fosmidomycin ($IC_{50} = 0.71 \mu M$) and FR900098 ($IC_{50} = 0.23 \mu M$) showed submicromolar inhibitory activity [56]. Both agents lacked the ability to inhibit the growth of *Y. pestis*, even though uptake of fosmidomycin was likely mediated by a transport protein homologous to the *E. coli* GlpT transporter [57].

Acinetobacter baumannii is a Gram-negative bacterium and the cause of a plethora of nosocomial infections, including soft-tissue infections, pneumonia, septicemia, and urinary tract infections [58]. Treatment of emerging multidrug-resistant *A. baumannii* infections often requires reserve antibiotics such as carbapenems in combination with colistin or an aminoglycoside. Fosmidomycin (IC₅₀ = 47 nM) and FR900098 (IC₅₀ = 24 nM) both exhibited nanomolar activity against *Ab*DXR but only FR900098 showed activity against selected *A. baumannii* strains in a whole-cell assay [26]. Resistance to fosmidomycin and FR900098 in certain *A. baumannii* strains was theorized to be based on a lack of GlpT uptake or poor permeability.

The Gram-negative bacterium *Klebsiella pneumoniae* naturally resides on the skin as well as in the nasopharyngeal and intestinal tracts of both humans and mammals. *K. pneumoniae* is opportunistically pathogenic and a leading cause of nosocomial infections. The pathogen is not inherently resistant to antibiotics but is known for its ability to acquire multidrug resistance plastids [59]. Both fosmidomycin ($IC_{50} = 20$ nM) and FR900098 ($IC_{50} = 23$ nM) showed equal nanomolar activity in an enzyme assay, with fosmidomycin also exhibiting weak activity in a whole-cell assay (MIC = 64–128 mg/L). The superior activity of fosmidomycin over its acetyl derivate (MIC = 256 mg/L) may be attributed to a more facile uptake via the GlpT [26].

In addition to the above-listed pathogens, fosmidomycin and FR900098 have been tested against other bacteria listed in Table S1 of the Supplementary Materials. Information on those pathogens is limited, though noteworthy examples include *Bacillus anthracis* and *Pseudomonas aeruginosa*.

2.2. Pharmacokinetic Profile of Fosmidomycin

Fosmidomycin and FR900098 both contain a phosphonic acid group, which is connected via a propyl linker to *N*-formylated (1) or *N*-acetylated (2) hydroxylamine moieties, leading to highly polar, water-soluble and stable compounds. Due to its dianionic structure in a physiological medium, the phosphonate group ($pK_{a1} = 2.2$, $pK_{a2} = 6.7$) [60], is mainly responsible for the excellent aqueous solubility of both compounds. The high water solubility on the other hand results in unfavorable permeability [61,62], as well as a comparatively short plasma half-life of approximately 1.87 h due to rapid renal excretion [63]. The absorption half-life of fosmidomycin via a one-compartment model was determined at 0.4 to 1.1 h [64]. No metabolites of **1** are known and the active agent is excreted renally [65]. An advantageous trait of **1** and **2** is their low cytotoxicity as determined in a mouse model.

In addition to these early findings more recent clinical trials have confirmed the generally low toxicity of fosmidomycin paving the way for further clinical trials in humans [66,67].

In vivo studies in humans best fit with a one-compartment model and first-order absorption and elimination of fosmidomycin [67]. Plasma protein binding is typically low for a hydrophilic therapeutic agent at about 1% [67]. No mutagenic potential has been reported for fosmidomycin, although the formation of an *N*-substituted hydroxylamine upon hydrolysis is theoretically possible [68]. Hydroxylamines have been reported to have mutagenic potential [69]. Fosmidomycin is typically administered two to four times per day with an upper daily dose of 3600 mg per day [67]. Expectedly, the fluctuation of fosmidomycin's plasma concentrations is lower if smaller doses are administered more frequently compared to larger doses over a larger interval. More frequent applications of smaller doses also result in higher minimum plasma concentrations at a steady state. The mode of action of fosmidomycin seems to be time-dependent rather than concentration-dependent [64]. This finding suggests more frequent applications are required to maintain consistently high plasma concentrations of the drug.

2.3. Clinical Trials from 1985 to 2018

Since its discovery, fosmidomycin has been the subject of several clinical trials, both as a standalone therapeutic and in combination with other approved antimalarials or antibiotics. In 1985, fosmidomycin phase I and phase II clinical trials for the treatment of urinary tract infections were conducted [70,71]. However, the study was discontinued for unknown reasons. In their third edition of the guidelines of malaria treatment, the WHO classifies treatments with a cure rate of 90% as acceptable [72]. A 2015 meta-analysis by Fernandes et al. pooled the data of ten clinical trials studying fosmidomycin, of which six were pediatric studies and the remaining four were involving adults [73]. Trials employing 1 as a single therapeutic agent failed to produce acceptable cure rates by the WHO's standards [73]. More recent trials are focused on fosmidomycin combinations, for example with the antibiotic clindamycin for which Wiesner et al. showed a synergistic effect [66]. While most studies involved this combination, an approach that made use of artesunate instead of clindamycin is also included [73]. The meta-analysis showed that the combination of fosmidomycin with a second antimalarial led to a cure rate of 85% (95% CI: 71–98%) on day 28 in children and 70% (95% CI: 40–100%) respectively in adults. 1 proved to be a safe antimalarial, with adverse events mainly limited to gastrointestinal disturbance [73]. However, isolated cases of haematological changes such as neutropenia have been reported by Borrmann et al. [74]. A temporary hiatus in the clinical evaluation of fosmidomycin may be attributed to a 2012 trial by Lanaspa et al. that only produced a 43% cure rate on day 28 (95% CI: 27–59%) for children under the age of three [75]. In 2018; Mombo-Ngoma et al. published the results of a Gambon-based study involving fosmidomycin in combination with piperaquine [76]. The aim of this phase II study was to demonstrate the efficacy, tolerability and safety of the combination as a treatment of *P. falciparum* infections in both children and adults. The cure rate on day 28 across all age groups was reported to be 83.8% (95% CI: 75.1–90.5%). In addition to adverse effects concerning the gastrointestinal and respiratory tract, two out of the 100 enrolled patients showed a prolonged QT interval of >500 msec [76]. None of the completed trials produced cure rates that can be considered acceptable by the WHO's standards, although the cure rate of 85% in children as determined in the meta-analysis by Fernandes et al. comes close [73]. Because the dosage of fosmidomycin is already high, further increasing the dose for fosmidomycin alone may not be feasible and may not result in better cure rates. In vitro, a decrease in $V\gamma 9/V\delta 2$ T cell response, which can detect (*E*)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl pyrophosphate (HMB-PP) as a key intermediary of the MEP pathway, has been observed. The significance of this observation has not yet been assessed in vivo [77]. Fosmidomycin's shortfall in efficacy underlines the necessity of either inclusion of an additional antimalarial into existing fosmidomycin-based combination therapies or the introduction of structural modifications to fosmidomycin to improve cure rates.

As of February 2022, there are no ongoing fosmidomycin clinical trials listed on ClinicalTrial.gov, though the Deutsche Malaria GmbH recently announced a trial of triple therapy using fosmidomycin, clindamycin and artesunate. The trial will be supported by the EU Malaria Fund and aims to enroll more than 5000 patients, making it the largest single trial of fosmidomycin in humans [78]. No timeline or further updates regarding this study have been published.

3. 1 Targeting the Deoxy-D-xylulose-5-phosphate Reductoisomerase (DXR)

The MEP pathway begins with the synthesis of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) from two glycolytic intermediates, pyruvate (**X**) and glyceraldehyde 3-phosphate (**XI**) catalyzed by DXP synthase (DXS), concluding with the production of IPP and DMAPP after six catalytic steps (Figure 4) [79].



Figure 4. The MEP pathway leading to the isoprenoid precursors isopentenyl diphosphate (**XVII**, **IPP**) and dimethylallyl diphosphate (**XIX**, **DMAPP**) via an IspC/DXR-catalysed conversion of 1deoxy-D-xylulose 5-phosphate (**XII**, **DXP**) to 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (**XIII**, **MEP**).

In the second step 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR/IspC), a homodimer catalyzes the intramolecular rearrangement and reduction of DXP (XII) to MEP (XIII) [80]. The complex conversion of DXP to MEP requires the presence of the cofactor NADPH and a bivalent metal ion, e.g., Mg²⁺ or Mn²⁺ [81].

At least two possible reaction mechanisms (Figure 5) have been proposed for the DXRcatalyzed isomerization of **XII** to 2-C-methyl-D-erythrose 4-phosphate (**XII c**). One reaction mechanism for the formation of intermediate **XIIc** is based on an α -ketol-rearrangement, in which the C3 hydroxyl group of **XII** is deprotonated, followed by a subsequent 1,2-alkyl shift. The C3-C4 carbon-carbon bond is cleaved in a way that C4 can thereafter attack the carbonyl C2. The 1-hydroxy 2-ethyl phosphate translocates to the C2 position, forming **XIIc** [82,83].
An alternative approach is a stepwise retro-aldol/aldol-mechanism [82–84]. In the retro-aldol step, the oxidation of the C4 carbon atom of **XII** causes a C-C bond break between C3 and C4, whereby a hydroxyacetone enolate **XIIa** and an aldehyde phosphate **XIIb** are formed as intermediates [85,86]. In the following aldolization step, the hydroxyacetone enolate **XIIa** attacks the aldehyde phosphate **XIIb**, forming **XIIc** in an electrophilic attack. A new bond is formed between the C2 carbon atom of the enolate and the C1 atom of the aldehyde phosphate **XIIb**. In the last step, **XIIc** is reduced to MEP **XIII** by NADPH.

MEP is the substrate of IspD, which catalyzes the reaction with cytidine 5'-triphosphate (CTP) to give methylerythritol cytidyl diphosphate (**XIV**). Subsequently, the C2 hydroxyl group of **XIV** is phosphorylated by IspE using ATP as a phosphate donor. The resulting phosphate ester 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol-2-phosphate (**XV**) is then cyclized by IspF to 2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphate (**XVI**). In the following step, IspG catalyzes the reductive dehydratisation and ring opening to yield 4-hydroxy-3-methyl-butenyl 1-diphosphate (**XVII**). Finally, the reductive dehydroxylation of **XVII** provides both isopentenyl diphosphate (IPP, **XVIII**) and dimethylallyl diphosphate (DMAPP, **XIX**) [79].



Figure 5. Two conceivable mechanisms for the enzymatic mode of action of DXR involving a divalent metal cation M²⁺ (grey sphere) and NADPH [87]. Used with permission of EUREKA SCIENCE, from Targeting the MethylErythritol Phosphate(MEP) Pathway for Novel Antimalarial, Antibacterial and Herbicidal Drug Discovery: Inhibition of 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase (DXR) Enzyme, Nidhi Singh, Volume 13, Issue 11, 2007; permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc.

3.1. Crystal Structures of DXR

1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR) is present in more than 400-annotated (Swiss-Prot) entries in the Uniprot database. These entries consist primarily of bacteria with some examples of eucaryota. The length of the amino acid (aa) sequence varies from 356 aa in *Campylobacter jejuni* to 488 in *Plasmodium falciparum* (Figure 6A) [88]. Presently, the DXR structures of *E. coli* (*EcDXR*), *P. falciparum* (*PfDXR*), and *M. tuberculosis* (*MtDXR*) have been more thoroughly characterized and studied [89,90].

	Α		
	P. falciparum	MKKYIYIYFFFITITINDLVINNTSKCVSIERRKNNAYINYGIGYNGPDN	50
	E. coli		
	M. tuberculosis		
	Z. modilis T. maritima		
	P. falciparum	KITKSRRCKRIKLCKKDLIDIGAIKKPINVAIFGSTGSIGTNALNIIREC	100
	E. coli M. tubaraulania		24
	m. tuberculosis 7 mohilis	VTVI GATGSIGHSTIDI FRN	35
	T. maritima	NEERTUILGATGSIGTQTLDVLKKV	26
	P. falciparum E coli	NKIENVENVKALYVNKSVNELYEQAREFLPEYLCIHDKSVYEELKELVKN	150
	M. tuberculosis	PDRFEVVGLAAGGAHLDTLLRORAQTGVTNIAVADEHAAQRVGDIPY-	82
	Z. mobilis	LDRYQVIALTANRNVKDLADAAKRTNAKRAVIADPSLYNDLKEALA-	73
	T. maritima	KG-IRLIGISFHSNLELAFKIVKEFNVKNVAITGDVEFEDSSINVW-	71
	D folgingrum		200
	F. raiciparum E. coli	Q-GSRTEVLSGQQAACDMAALEDVDQVMAAIVGAAGLLPTLAAIRAGKTI	120
	M. tuberculosis	HGSDAATRLVEQTEADVVLNALVGALGLRPTLAALKTGARL	123
	Z. mobilis	GSSVEAAAGADALVEAAMMG-ADWTMAAIIGCAGLKATLAAIRKGKTV	120
	T. maritima	KGSHSIEEMLEALKPDITMVAVSGFSGLRAVLASLEHSKRV	112
	P. falciparum	ALANKESIVSAGFFLKKLLNIHKNAKIIPVDSEHSAIFQCLDNNKVLKTK	250
	E. COTT M tuberculosis	ALANKESLVTGGRLFMDAVKGSK-AGLLPVDSENNATEGSLPGPTGHNGG ALANKESLVAGGSLVLRAARPGOTVPVDSENNATEGSLPGPTGHNGG	167
	Z. mobilis	ALANKESLVSAGGLMIDAVREHG-TTLLPVDSEHNAIFQCFPHHNRD	166
	T. maritima	CLANKESLVCGGFLVKKKLKEKG-TELIPV DSEH SAIFQVMEP	154
	D. f. l. in		200
	P. Talciparum E. coli	CLQDINF SKI NN I NKI FLGS SGOPF GNL I MDELKNV I SENALK FPK IK MGK YADI FONGVVSTI I TO SOGOPERETPI RDI ATMTPDO ACR HPN II SUGR	216
	M. tuberculosis	EVAKUVLTASGGPFRGWSAADLEHVTPEQAGAHPTWSMGP	207
	Z. mobilis	YVRRIIIITASGGPFRTTSLAEMATVTPERAVQHPNWSWGA	206
	T. maritima	EVEKVVLTASGGALRDWKISKIDRARPEDVLKHPVWNMGA	194
0	falainanum		250
P. F	coli		266
M	tuberculosis	MNTI NSASI VNKGI EVIETHI I EGIPYDRIDVVVHPQSIIHSMVTEDGS	257
Ζ.	mobilis	KISIDSATMMNKGLELIEAFHLFQIPLEKFEILVHPQSVIHSMVEYLDGS	256
Т.	maritima	RITVDSATMVNKAF <mark>E</mark> VLEAMELFELPFEKIEVKIHREGLVHGAVVLPDGN	244
~			100
Р.	talciparum	VISQMYYPDMQIPILYSLTWPDRIKTNLKPLDLAQVSTLTFHKPSLEHFP	400
E. M	coll tuberculosis		310
7	mohilis		306
Τ.	maritima	VKMVVSPPDMRIPISYALFYPRRVALEPFFLRTISLSFEDPDPEKYP	291
2410			(000000 ***
Р.	falciparum	CIKLAYQAGIKGNFYPTVLNASNEIANNLFLNNKIKYFDISSIISQVLES	450
E.	coli	CLKLAMEAFEQGQAATTALNAANEITVAAFLAQQIRFTDIAALNLSVLEK	366
M. 7	tuberculosis	AVELARUAGVAGGCMI AVYNAANEEAAAAFLAGKI GFPAIVGI I ADVLHA	357
2. T	maritima		340
1.	mai i cima		040
Р.	falciparum	FNSQKVSENSEDLMKQILQIHSWAKDKATDIYNKHNSS	488
E.	coli	MDMREPQCVDDVLSVDANAREVARKEVMRLAS	398
М.	tuberculosis	ADQWAVEPATVDDVLDAQRWARERAQRAVSGMASVAIASTAKPGAAG	404
Ζ.	mobilis		388
1.	mar' i l'ima	FWGIFWFKILDUVEKINFEAIKKAEKVIEWLSSISI	376
Р.	falciparum	488	
E.	coli	398	
M.	tuberculosis	RHASTLERS 413	

M.	tuberculosis	RHASTLERS	413
Ζ.	mobilis		388
Т.	maritima		376

Figure 6. Cont.



Figure 6. (**A**): Amino acid sequence alignment of bacterial and parasitic DXRs. Residues involved in phosphate/phosphonate-, linker-, and metal and hydroxamate-binding are highlighted in blue, green, and red, respectively. The colored ribbons above the sequence alignment represent the respective domains in *Pf*DXR: the NADPH-binding (blue), catalytic (green), and C-terminal (red) domains. The linker region and flexible loop in the catalytic domain are colored yellow and orange, respectively. The pink bars and cyan arrows represent the secondary structure elements, namely, α -helices and β -strands, respectively; (**B**): The overall structure of the quaternary (enzyme-NADPH-metal-inhibitor) complex of *Pf*DXR (PDB 3AU9) [91]. Three domains, a linker region, and a flexible loop in the catalytic domain of one subunit are colored as in (**A**). The other subunit is colored grey. The bound fosmidomycin (FOS) and NADPH molecules are shown as ball-and-stick (cyan) and stick (grey) models, respectively. The bound magnesium ions are shown as sphere models (pink).

DXRs are homodimers. The subunit of DXR consists of two large domains separated by a cleft containing a deep pocket, a linker region, and a C-terminal domain (Figure 6B). One of the large domains is the N-terminal NADPH binding domain and the other is the catalytic domain which provides the groups necessary for catalysis (metal and substrate binding). The N-terminal NADPH-binding domain is connected to a catalytic domain. The N-terminal domain (NTD) comprises the first 150 amino acids. The structural organization of the NTD resembles the Rossman fold, which is found in proteins showing interactions with dinucleotides. This region shows high similarity among orthologues *EcDXR*, *MtDXR* and *PfDXR*.

The central catalytic domain comprises 125 amino acids and due to the metal-based mechanism of catalysis, acidic amino acids responsible for the binding of the divalent metal are found in this domain (Figure 6A). Another important characteristic of the substratebinding site is the flexibility of the domains, a feature necessary for the complex enzymatic process involving both a divalent cation and NADPH. In DXR crystals, the relative position of the NADPH-binding and catalytic domains exhibits different conformations depending on the presence of co-crystallized ligands, cofactors, and substrates. These conformations are highly dependent on the position of a flexible loop located at the entrance of the substrate-binding site, causing the catalytic site to be in a closed, open, or super-open state [31,91,92]. The connection between the catalytic domain and the C-terminal domain is made via a sequence of around 30 amino acids known as the linker region. In the crystal structures of DXR, the linker region as well as a β -strand of the catalytic domain from each subunit are involved in the dimer interface. The C-terminal domain of DXR is formed by a four-helix bundle motif, showing a high degree of flexibility and no interface of contact between the dimer subunits [31,92,93].

An analysis of the similarity between the orthologues *Ec*DXR, *Mt*DXR, and *Pf*DXR using BLAST revealed that *Ec*DXR shares 40% amino acid sequence identity with *Mt*DXR and 37% with *Pf*DXR, while *Mt*DXR and *Pf*DXR share 34% identity [89]. Despite the sequence identity of the proteins ranging from 34% to 40%, the overall three-dimensional arrangement of the enzymes co-crystalized with both cofactors is similar [31]. The major part of the dissimilar regions occupies solvent-exposed areas.

The first *Ec*DXR crystal structure was independently determined in 2002 by the Stubbs group (PDB 1K5H) [31] and the Ohsawa group (PDB 1JVS) [94]. The structure of *Mt*DXR was first solved in 2006 [95] and *Pf*DXR in 2011 [91]. Since then, solid efforts by several groups led to the obtention of crystal structures of DXR from different organisms. Currently, 77 DXR crystal structures from twelve organisms, with or without cofactors and/or substrates/inhibitors, are deposited in the Protein Data Bank (PDB) (Table S2, Supplementary Materials). The crystal structures of DXR co-crystallized with inhibitors in the catalytic site provided key information on both the active site architecture and the binding mode of NADPH, DXP, and inhibitors.

Active Site

Since DXR from *P. falciparum* is an attractive target for inhibitor design, we have used it for our analysis of both the active site and binding mode of fosmidomycin (1, Figure 6B). However, due to the N-terminal insertion of ca. 70 amino acids in *Pf*DXR (Figure 6A), the residue number of *Pf*DXR significantly differs from other DXRs. So, in the following description, *Ec*DXR numbering is shown in parentheses.

The substrate-binding cavity of DXR is highly conserved in all organisms and consists mainly of three regions: a positively charged phosphate/phosphonate binding pocket, a hydrophobic region around the linker backbone, and a metal binding pocket [31,32]. Note that the residues involved in inhibitor binding described below are conserved among DXRs (Figure 6A). The substrate and substrate-analogous inhibitors bind to the cleft of the catalytic domain and induce a conformational change that tether the N-terminal and the catalytic domains in the closed conformation. Concomitantly with the movement of the catalytic domain, the C-terminal domain also shows a closed conformation. In addition, the flexible loop (residues 291–299 in PfDXR, colored orange in Figure 6) in the catalytic domain adopts a conformation that allows it to function as a lid over the active site. The highly conserved residues Trp296 (212), Met298 (214), and Met360 (276) form a barrier between the active site and the solvent. The indole ring of Trp296 (212) provides the key hydrophobic interaction with the alkyl chain of the substrate and the backbone of fosmidomycin, which lies parallel within a distance of 4 Å. The acidic residues Asp231 (150), Glu233 (152), and Glu315 (231) are conserved at the active site and coordinate the divalent metal cation essential for enzyme activity. Met298 (214), Met360 (276), and the nicotinamide ring of NADPH also contribute to the formation of the hydrophobic binding pocket. The phosphonic acid moiety of fosmidomycin is bound similarly to the phosphate group of DXP in EcDXR, forming hydrogen bonds with Ser270 (186) and Asn311 (227). The phosphonate group also forms a hydrogen bond with His293 (209). The hydroxamic acid moiety of fosmidomycin coordinates the divalent metal cation that is bound by the side chains of Asp231 (150), Glu233 (152), and Glu315 (231). The hydroxamate group also interacts with Ser232 (151) and Asn311 (227) (Figure 7).



Figure 7. The binding mode of fosmidomycin in the active site of *Pf*DXR. Residues involved in the inhibitor binding are colored as in Figure 6A. The number in the parentheses indicates the residue number for the equivalent residue of *Ec*DXR.

The hydroxamic acid moiety of fosmidomycin (1) mimics the hydroxyl ketone structure and the phosphonic acid the monoalkyl phosphonate structure of DXP (XII, Figure 8A). Therefore, the substrate analog fosmidomycin binds in the active site with a comparable binding mode. Fosmidomycin acts as a slow, tight-binding competitive inhibitor with the substrate while acting uncompetitively towards the cofactor NADPH [84]. Based on the structure and interaction of fosmidomycin and its analogs with the binding site of DXR, this class of inhibitors can be described by a pharmacophore model presented in Figure 8B.



Figure 8. (**A**) Binding of **1** and natural substrate DXP (**III**) to a metal ion, represented by a grey sphere. (**B**) Simplified pharmacophore model of fosmidomycin-based DXR inhibitors MGB: Metalbinding group.

4. Structural Modifications of Fosmidomycin and FR900098

Based on the pharmacophore model defined in the previous section (Figure 8B), modifications of fosmidomycin and FR900098 will be discussed. These structural changes to both lead structures were introduced to overcome their poor pharmacokinetic properties and to especially improve the permeability. To assess structure–activity relationships (SAR), a wide array of structural modifications will be presented as well as their impact on the anti-infective activity. Docking studies and co-crystal structures are included to further illustrate this SAR.

4.1. Modifications of the Retro-Hydroxamate Moiety

Chemically, fosmidomycin is often described as a retro-hydroxamate. More specifically, with respect to the hydroxamate moiety, fosmidomycin is an *N*-substituted formohydroxamic acid. Regarding fosmidomycin analogs, the term reverse fosmidomycin derivative is commonly used for analogs, where the carbonyl group of the reversed hydroxamic acid is attached to the propyl linker and not to the nitrogen. The hydroxamic acid (HA) functionality is a common bidentate metal binding group (MBG) capable of chelating metal cations such as Zn^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} and Mn^{2+} in the active sites of metalloenzymes [96]. The

chelation of the catalytically essential metal cation (Mg^{2+} or Mn^{2+}) in the active site of DXR by the retro-hydroxamate group of fosmidomycin is essential to its anti-infective effects.

4.1.1. Inversion of the Retro-Hydroxamate Moiety

The concept of reversing the orientation of the hydroxamate moiety was pioneered by the Rohmer group which synthesized compounds **3** and **4** (Figure 9) as analogs of fosmidomycin and FR900098. Both reverse analogs exhibited inhibitory activity comparable to that of fosmidomycin against *Ec*DXR with IC₅₀ values of 0.17 (**3**) and 0.05 μ M (**4**), respectively [97]. One year later, Woo et al. showed that compound **3** is a slower *Synechocystis* DXR binder in comparison to fosmidomycin [98]. In 2010, Zinglé et al. demonstrated that the superior *Ec*DXR inhibition of **4** was attributed to the hydrophobic interaction between the *N*-methyl group and the indole of Trp212 of *Ec*DXR [99]. Homolog **5** with an ethyl residue showed two orders of magnitude decrease in activity compared to **4** [99].



Figure 9. Structures, antibacterial, and antiplasmodial activities of the reverse fosmidomycin analogs **3–6**.

In parallel, reverse fosmidomycin analogs with a phenyl substituent in the α -position of the propyl linker were reported by Kurz and co-workers (**6a–d**, Figure 9). α -Phenyl analog (**6a**) served as a lead compound for the reverse inhibitor type. Furthermore, the compounds were decorated with small alkyl substituents (Me, Et, *i*Pr) at the hydroxamic acid nitrogen. The *N*-methylated carba analog **6b** was the most active inhibitor in the first reverse series, outperforming fosmidomycin and FR900098 in *Ec*DXR and *Pf*DXR inhibition with IC₅₀ values of 0.24 µM and 3 nM, respectively. Enzyme inhibition data demonstrated that the strength of *Ec*DXR and *Pf*DXR inhibition decreased as the size of the substituent on the hydroxamic acid nitrogen increased. While the *N*-methyl-substituted DXR inhibitor **6b** is a potent *Pf* growth inhibitor, the *N*-ethyl substituted derivative **6c** already showed a 5-fold reduction in cellular antiplasmodial activity against *Pf*-K1. The bulkier *N*-isopropyl group of compound **6d** led to a loss of inhibitory activity against the *Pf*DXR and *Ec*DXR enzymes and *Pf*-K1 [100,101].

4.1.2. Alteration of the Acyl Moiety and Replacement of the Hydroxamic Acid Moiety

In order to create beneficial hydrophobic interactions in the hydrophobic sub-pockets of *Ec* and *Pf*DXR, Giessmann et al. [102] and Ortmann et al. [103] replaced the formyl group of fosmidomycin with aliphatic and aromatic acyl residues (**7**, **8**, Figure 10). Within these series, the pentafluoro benzoyl derivative (**7c**) and the 4-phenoxybutanamide analog (**8b**) were the most active representatives with IC₅₀ values of 1.3 (**7c**) and 1.0 μ M (**8b**) against *E*cDXR [102,103]. Flexible docking studies suggested that the acyl residues of compounds **7a–e** prevented the formation of the preferred geometry of the hydroxamatemetal complex [103].



Figure 10. Structures and biological activities of compounds 7–9 with modified MBGs.

And aloussi et al. developed the *N*-hydroxypyridone **9** (Figure 10) as an MBG [104], which only showed very weak *Mt*DXR enzyme inhibition with an IC₅₀ value of 53 μ M and no in vitro growth inhibition of *Mt* [104].

To confirm the importance of the hydroxamic acid functionality, the hydroxamic acid MBG was replaced with various amide moieties (**10a–e**, Figure 11) [102,105]. The IC₅₀ values of amides **10a–e** against *Ec*DXR was > 30 μ M. This was also demonstrated for fosmidomycin and FR900098 by Woo et al. who replaced the *N*-hydroxyl group of the retro-hydroxamate moiety with a methyl group in compounds **11a**, **b** (Figure 11) resulting in a complete loss of inhibitory activity against *Synechocystis* DXR [98]. Chofor et al. reported a series of *ortho*-substituted arylamide derivatives (**12a–c**, Figure 11) [16]. These *ortho*-substituents were expected to contribute to the chelation of the active site metal cation. However, none of the synthesized derivatives **12a–c** inhibited *Ec*DXR and *Mt*DXR at a concentration of 100 μ M nor the growth of *Pf*-K1 parasites in human erythrocytes. According to Chofor et al., the low flexibility of the amide bond might be responsible for the lack of metal-binding and, therefore, inhibitory activity [16].



Figure 11. Structures and biological activities of analogs 10–29 with alternative chelating functionalities.

Kaye and colleagues studied the replacement of the hydroxamate MBG with a variety of *N*-arylalkyl substituted amides (**13a**, **b**, Figure 11), in which the benzyl group was intended to occupy the hydrophobic sub-pocket of the substrate binding site. However, the synthesized analogs **13a**, **b** were completely inactive against the *Pf*DXR enzyme [106]. Secondly, they introduced aryl and heteroaryl carboxamide groups (**14a–c**, Figure 11) in addition to shortening the propyl linker, but these modifications also led to inactive analogs [107,108].

Further work on replacing the hydroxamate MBG with different nitrogen-containing metal chelating moieties such as hydroxyureas (15a-c), hydrazide (16), O-methylated hydroxamate (17, 18), dithiocarbamate (19) or hydantoin (20) functionalities (Figure 11) was performed [109]. For the hydroxyureas (15a–c) results regarding antiplasmodial or antibacterial activity have not been published [109]. Furthermore, the potential metal chelators **16–20** did not display any inhibitory activity towards *EcDXR*. The authors suggested that the protonation of the hydrazide group of **16** under the assay's conditions (pH = 7.5) could explain the loss of its chelation capability. In the case of 19, the authors reported decomposition of the dithiocarbamate moiety under the conditions of the enzyme assay [110]. The negligible MtDXR inhibition of **20** is not surprising given that the hydantoin moiety of derivative 20 is not an established MBG [104]. Mercklé et al. showed that, as expected, the removal of the hydroxamic acid MBG as in the propyl phosphonic acid 21 and the aminopropyl phosphonic acid 22 (Figure 11) resulted in a complete loss of activity towards *EcDXR* [105]. Mancini reported a chemically interesting derivative with a boronic acid unit as a potential MBG (23, Figure 11), though it was inactive in the *EcDXR* enzyme assay. Prodrug 24 (Figure 11) to boronic acid 23 showed negligible activity towards E. coli [111]. Additionally, phosphinic acids with an aryl (25) or heteroaryl residues (26) were synthesized, but not evaluated against DXR (Figure 11) [112]. Furthermore, the bisphosphonic acid (27) was also inactive against DXR of *Ec*, *Pf* and *Mt* (Figure 11) [93]. The two catechol derivatives with a 3,4-catechol (28) and 2,3-catechol moiety (29) stood in contrast to the previously mentioned inactive derivatives (Figure 11). Compound 28 was at least weakly active against MtDXR (IC₅₀ = 41 μ M) but no in vitro growth inhibition of Mt was observed. Interestingly, when tested against EcDXR, the 2,3-catechol derivative 29 $(IC_{50} = 25 \ \mu\text{M})$ was weaker than the 3,4-catechol analog **28** $(IC_{50} = 4.5 \ \mu\text{M})$. These results confirmed the importance of the position of the two catechol hydroxyl groups for sufficient metal coordination [110,113].

So far, all attempts to replace the hydroxamate group with alternative chelating groups greatly reduced or resulted in a complete loss of inhibitory activity. The above-summarized results illustrate the predominant role of the hydroxamic acid MBG in DXR inhibitors.

4.1.3. Development of Bisubstrate Inhibitors

Since the adenosine-binding pocket of the cofactor NADPH returned a good score on a druggability test conducted by Hirsch and coworkers [114], a new bisubstrate inhibitor approach has been explored, aimed at simultaneously targeting the substrate and cofactor binding sites of DXR.

Guided by an *Mt*DXR fosmidomycin co-crystal structure, the Dowd group was the first to develop a series of fosmidomycin analogs aimed to occupy both binding pockets. Two series of compounds, fosmidomycin-like hydroxamic acids with large acyl residues (**30a–d**, Figure 12) and arylalkoxyamides (**31a–d**, termed *O*-linked bisubstrate inhibitors, Figure 12), were synthesized as potential bisubstrate inhibitors. While none of the derivatives was more active than fosmidomycin against *Mt*DXR, compounds **30a** and **30b** showed at least weak IC₅₀ values of 18 and 27 μ M. Docking experiments suggested that compound **30a** could interact with *Mt*DXR via an alternative non-bisubstrate mode of binding. So far, the Dowd group concluded that the hydroxamic acids **30a, b** are more potent *Mt*DXR inhibitors than the arylalkoxyamide derivatives (**31a, b**) [41,115]. Later on, compound **30a** was tested for its ability to inhibit the *Pf*DXR enzyme, but the compound showed only moderate activity with an IC₅₀ of 1.34 μ M [115,116].



Figure 12. Biological activities of the potential bisubstrate inhibitors **30–37**. Values marked with * indicate the percentage of inhibition at 100 μ M.

To improve the antibacterial activity and confirm that both hydroxamic acid and arylalkyloxyamide analogs can act as DXR bisubstrate inhibitors a larger series of hydroxamic acids (**30c**, **d**, Figure 12) and arylalkyloxyamides (**31c**, **d**, Figure 12) was developed by San Jose et al. [41]. When tested against *Mt*DXR, the most active compound was the arylalkyloxyamide **31c** with an IC₅₀ value of $1.5 \,\mu$ M. However, **31c** and **31d** required concentrations of \geq 200 µg/mL to be effective against *Mt*, while compound **31d** inhibited the growth of *Mt* at 25–50 μ g/mL [41]. With an IC₅₀ value of 0.33 μ M against YpDXR, compound **31c** was the most potent analog. Therefore, the authors suggested that a free hydroxamic acid functionality to strongly chelate the metal cation is not necessary for YpDXR inhibition in the case of these potential bisubstrate inhibitors [41]. To assess whether **30c** and **31c** are bisubstrate inhibitors, Lineweaver-Burk analysis of **30c** and **31c**, tested against *Mt*DXR and YpDXR, respectively, indicated that both compounds competitively inhibit NADPH and DXP. In 2021 Girma et al. tested alkoxyamides **31c**, **d** for their activity against *Pf*DXR. **31d** showed superior activity to **31c** with an IC₅₀ of 0.80 to 3.36 μ M, respectively. To determine the mechanism of inhibition of **31d**, Lineweaver-Burk analysis against *Pf*DXR enzyme was also performed. **31d** showed the lowest inhibition constant (K_i) with respect to both the substrate DXP and the cofactor NADPH. This finding demonstrated that **31d** is a bisubstrate inhibitor of *Pf*DXR [116].

The retro-hydroxamate **32** (Figure 12) showed submicromolar inhibitory activity towards MtDXR (IC₅₀ = 0.32 µM) in addition to potent in vitro growth inhibition in a Pfparasite assay (IC₅₀ = 0.04 µM). A co-crystal structure of **32** in complex with MtDXR in the presence of NADPH (PDB 3ZHY) showed that the terminal phenyl ring binds close to the NADPH binding site at a distance of 3.5–3.7 Å of the NADPH nicotinamide ring. In this position, the terminal phenyl ring can also interact with Met267. Inspired by the crystal structure, additional substituents were introduced at different positions on the phenyl ring, aimed at reaching the cofactor-binding pocket (**32–34**, Figure 12). The presence of methyl (**32**) or 1,2,4-triazole (**33**) substituents in the *ortho*-position of the phenyl moiety did not improve the inhibition. Isomers **35** and **36** (Figure 12) featuring the 1,2,4-triazole substituent in the *meta-* and *para*-position displayed enhanced inhibitory activity against MtDXR compared to **34**, with IC₅₀ values of 0.14 µM (**35**) and 1.2 µM (**36**).

In contrast, the introduction of the phenol ester substituent in compound **37** (Figure 12) resulted in a complete loss of activity towards *Mt*DXR. The strong in vitro growth inhibition of compounds **35** and **36** in a *Pf* growth assay and their potent *Mt*DXR inhibition suggested that the terminal triazole moiety might be involved in specific interactions with the DXR binding site [117]. Current efforts to develop DXR bisubstrate inhibitors provided novel compounds with heterogenous biological activities, with some inhibitors (**32**, **35**) showing very promising *Mt*DXR inhibition and antiplasmodial in vitro activity. Analog **37** showed that larger residues within the NADPH binding site are tolerated. This provides an

interesting starting point for the development of further inhibitors of this class. To further elucidate the binding modes of potential bisubstrate inhibitors, co-crystallization with an occupied NADPH binding site is required.

4.2. Modifications of the Propyl Linker

Earlier studies already highlighted the importance of the phosphonic acid and hydroxamate groups and a well-defined linker length between both pharmacophores. In contrast, the linker modifications provided a wide spectrum of options for further improvements of anti-infective activity against various microorganisms. The synthesized derivatives are structurally diverse. These modifications encompass alterations of the linker length (38–41), insertion of a double bond (42–46) or hetero atoms (47–54), restriction of the linker flexibility (55–60) and substitution of the linker in the α -, β - and γ -position.

4.2.1. Linker Length Variation

In an initial effort to determine the ideal linker length, the Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd. was the first to explore modifications of the carbon backbone. However, the short-ened ethylene analogs **38** did not show any antibacterial activity against, e.g., *P. aeruginosa* (Figure 13) [118]. The Dowd group synthesized a series of FR900098 analogs with two to five methylene units separating the MBG and phosphonic acid moiety (**39a–c**, Figure 13) [119]. The results showed that compounds with chain lengths of two, four or five methylene groups weakly inhibited *Mt*DXR at 100 μ M (74-86%) [119]. Later, Zinglé et al. prepared reverse fosmidomycin (**3**) and reverse FR900098 (**4**) homologs bearing a shortened ethylene (**40a**, **41a**, Figure 13) or extended butylene linker (**40b**, **41b**, Figure 13). The derivatives with an ethylene linker were weakly active (**41a**) or lacked activity (**40a**) against *EcDXR*, while the reduction was less drastic for the butylene homologs (**40b**, **41b**), with IC₅₀ values of 0.27 and 0.11 μ M, respectively [99].



Figure 13. Biological activities of analogs **38–41.** Values marked with * indicate the percentage of inhibition at 100 μ M.

4.2.2. α , β -Unsaturated Propenyl Linker

FR32863 (**IV**), a natural antibiotic isolated from *Streptomyces lavendulae* in 1980, is the dehydro-congener of fosmidomycin (1). FR32863 and its acetylated analog **42** showed activity similar to **1** and **2** against a panel of Gram-negative bacteria including *P. aeruginosa* [21,118]. Biological evaluation showed that FR32863 is an excellent inhibitor of *Pf*DXR (IC₅₀ = 9 nM) that also potently inhibits the growth of *Pf*3D7 with an IC₅₀ of 19 nM. Compound **42** was further active against *Mt*DXR with an IC₅₀ of 1.1 μ M. Based on these results, Devreux synthesized *Z*- (**43a–e**, **44d**) and *E*-configured (**44a–c**, Figure 13) α , β -unsaturated DXR inhibitors with additional substituents in the α -position and tested them against *Ec*DXR [119]. The *Z*-configured α -bromo derivative **44d** was the most active compound, displaying a submicromolar IC₅₀ value of 0.45 μ M. Furthermore, the *E*-configured.

Analogs (**44a–c**) were active in the micromolar range (IC₅₀ = 5.5–16 μ M), while the *Z*-configured derivatives **43a–e** were inactive. This suggested that the relative *trans*-conformation of the phosphonic acid and hydroxamate moiety towards each other is essential for activity. However, the combination of an α -substituent and an α , β -unsaturated linker constrained

the rotational freedom, thus leading to reduced activity against *Ec*DXR [120]. The Dowd group also designed and synthesized a series of FR32863 (**IV**) analogs **45** and **46a–d** (Figure 14). Although, none of the derivatives exceeded the activity of FR32863 against *Pf*DXR, compounds **45** and **46a–c** showed moderate inhibitory activity in vitro with IC₅₀ of 2.1–14 μ M [121].



Figure 14. Biological activity of the fosmidomycin and FR900098 derivatives (**42–46**) with an α , β -unsaturated linker. * Ammonium salts were prepared. ^a Values in parentheses are the percent remaining enzyme activity at 100 μ M.

4.2.3. Oxa Analogs

Fosfoxacin (47, Figure 15), the naturally occurring phosphate congener and α -oxa analog of fosmidomycin as well as fosfoxacin's acetyl analog (48), are more potent inhibitors of *Synechocystis* DXR compared to fosmidomycin [122]. These results encouraged Haemers et al. to synthesize a series of β - and γ -oxa-isosteres (49–54, Figure 15) as the electronegative oxygen might increase the acidity of the phosphonic acid and hydroxamic acid moiety. While compounds 49 and 50 are β -oxa-isosteres of fosmidomycin and FR900098, respectively, analogs 51–54 are reverse derivatives. The results showed that the β -oxa analogs 49–52 are more active *Ec*DXR inhibitors than the γ -counterparts (hydroxycarbamates) 53 and 54. The β -oxa isosteres 50 and 52 were almost as potent as FR900098 displaying IC₅₀ values of 87 nM (50) and 72 nM (52) against *Ec*DXR and submicromolar activity against strain *Pf*3D7 [123].



Figure 15. Structure and biological activity of the oxa analogs 47–54.

4.2.4. Conformationally Restricted Analogs

In 2006, the Van Calenbergh group incorporated a cyclopropyl (55–57, Figure 16) [124] and cyclopentyl (58–59, Figure 16) [125] ring into the linker to restrict rotational freedom. The racemic *trans*-cyclopropyl *N*-acetyl analog 55 resulted in submicromolar inhibition of *Ec*DXR with an IC₅₀ of 0.16 μ M, while the enantiomerically pure (1*R*,2*S*)-55 showed enhanced activity (IC₅₀ = 50 nM) that was comparable to fosmidomycin. Additionally, (1*R*,2*S*)-55 was similarly active compared to fosmidomycin (IC₅₀ = 0.32 μ M) in an in vitro *Pf*3D7 assay. The replacement of the acetyl moiety of (1*R*,2*S*)-55 by a formyl moiety (56) reduced the activity against *Ec*DXR and *Pf*3D7 by approximately 6-fold.



Figure 16. Biological activity of conformationally restricted analogs 55-60.

The racemic mixture of an α -phenyl substituted *cis*-cyclopropyl derivative (**57**) was inactive towards *Ec*DXR. Unfortunately, it is not clear whether the loss of activity was caused by the bulky α -phenyl moiety or by the *cis*-conformation of the phosphonic acid and hydroxamate moieties [124]. Haemers et al. gave some insights regarding the preferred configuration of restricted analogs as they synthesized the *cis*- and *trans*-cyclopentyl derivatives of fosmidomycin (**1**) and FR900098 (**2**). The *cis* isomers of **58** and **59** (IC₅₀ values of 0.20 and 2.3 μ M, respectively) were more active than their *trans*-isomers (IC₅₀ values of 2.3 and 12 μ M, respectively).

One year later, the synthesis and antiplasmodial activity of three conformationally restrained aromatic analogs **60a–c** (Figure 16) were reported by Walter and colleagues. The analogs **60a–c** were tested as bis(pivaloyloxymethyl) (POM) ester prodrugs and the POM prodrugs of **1** and **2** were prepared for direct comparison. While the POM-prodrugs of **1** and **2** were moderately active against *Pf*3D7 (IC₅₀ = 0.4–2.1 µM), the activity of the corresponding rigidized analogs (**60a–c**) was very weak [126].

4.3. α -, β - and γ -Substituted Fosmidomycin Analogs

4.3.1. α -Phenyl and α -Biaryl-Substituted Analogs

To date, most attempts to improve the anti-infective properties of fosmidomycin are related to the substitution and modification of the α -position of the propyl linker (Figure 17) [45,125,127–131]. The first chain-substituted derivatives were decorated with an α -phenyl-substituent and were synthesized and patented in 2005 by Kurz et al. [132]. The diethanolammonium salt of α -phenyl-fosmidomycin (**61**, Figure 17) was the first inhibitor to exceed the antiplasmodial activity of FR900098 (**61** IC₅₀ = 0.4 µM and FR900098 IC₅₀ = 0.8 µM) against *Pf*Dd2.



Figure 17. Antibacterial and antiplasmodial activities of α -phenyl derivatives (**61–76**). ^a Diethanolammonium salt was prepared. ^b Ammonium salts were prepared.

In 2006 and 2007, Van Calenbergh and coworkers presented a comprehensive series of α -phenyl substituted analogs with electron-rich and electron-deficient substituents at the phenyl moiety (62–74, Figure 17) [130]. The authors aimed to investigate the influence of lipophilicity and electronic properties with respect to their inhibitory activity against *Ec*DXR and the *Pf*Dd2 strain [45]. Whereas several α -phenyl-substituted compounds of this series showed slightly lower inhibitory activity than lead structures fosmidomycin (1) and FR900098 (2) against *Ec*DXR, the inhibition of *Pf* growth (Dd2 and 3D7 strains) was consistently superior. The authors suggested the 3,4-dichlorophenyl unit of the derivatives 63 and 69 increased the lipophilicity and facilitated entry into *P. falciparum* cells and/or enabled more selective interactions with *Pf*DXR. The α -3,4-dichlorophenyl substituted analog 63 was a milestone in lead optimization, as it was the first inhibitor which exceeded the potency of 2, with an IC₅₀ value of 59 nM against *Ec*DXR. In addition, 63 exhibited potent in vitro activity with IC₅₀ values of 28 and 90 nM against *Pf*Dd2 and *Pf*3D7 strains, respectively. Unfortunately, *Pf*DXR inhibition was not reported [45].

In accordance with previous studies [45], the potency of the most active *N*-acetyl-(4-cyano)phenyl analog **73** was exceeded by its *N*-formyl analog **64**. Furthermore, both compounds exceeded **1** and **2** in an antiplasmodial growth assay (IC₅₀ = 0.27 μ M) using intraerythrocytic stages of the *Pf*D2d strain [130]. A 2-thienyl and 3-thienyl analog (**75–76**, Figure 17) exhibited submicromolar activity (IC₅₀ = 0.48–0.60 μ M) as well, which confirmed that thiophene can be used in this case as a phenyl bioisoster [130].

Achieving whole-cell activity for fosmidomycin-like DXR inhibitors against *M. tuber-culosis* is particularly challenging as *Mt* lacks the GlpT-type transporters, responsible for inhibitor uptake in other bacteria.

In 2011, FR900098 (2) was first tested against *Mt*DXR by the Karlén group [128]. Although significant *Mt*DXR inhibition was observed, no antimycobacterial activity was detected. In response, the Karlén group developed more lipophilic inhibitors based on the work of Van Calenbergh and Kurz [120,130,131,133]. Both research groups demonstrated that α -phenyl substituents increased the activity of *Pf* and *Ec*DXR inhibitors. Employing the same strategy, the Karlén group synthesized several α -phenyl derivatives with different substituents in the *ortho*-position of the phenyl moiety, α -biaryl derivatives, and inhibitors with bicyclic ring systems in the α -position (77–91, Figure 18) [128,129]. The *ortho*-substitution of the α -phenyl moiety completely reduced the activities of the inhibitors against *Mt*DXR. Docking experiments proposed possible clashes between the *ortho*-substituents and the enzyme, which could explain the loss of activity. Furthermore, none of the derivatives (**77–91**, Figure 18) inhibited the growth of *Mt* H37Rv. The inhibitors with bulky moieties in the α -position (**84–88**) inhibited *Mt*DXR with IC₅₀ values between 1.5 and 27 μ M. The α -4-(pyridine-3-yl)phenyl analog (**89**) exhibited the best activity against *Mt*DXR (IC₅₀ = 0.8 μ M), which is comparable to the α -3,4-dichlorophenyl derivate (**90**, IC₅₀ = 0.7 μ M). No correlation between calculated logP and IC₅₀ values of this compound series (**77–91**) was found. Docking experiments of **89** with *Mt*DXR suggested that the biaryl moiety of **89** interacts with the flexible loop formed by Gly198-Met208 (Figure 19). This possible interaction provided the basis for further inhibitor optimizations.



Figure 18. Structure–activity relationship of α -substituted FR900098 analogs **77–90**, the *N*-formyl analog **91** and their activity against *Mt*DXR.



Figure 19. Compound **89** (turquoise carbon atoms) docked in the X-ray structure of *Mt*DXR in complex with 3 orange carbon atoms (PDB code 2Y1G) [128]. The Gly198-Met208 flap (colored in pink) from the 2JVC structure representing *Mt*DXR bound to fosmidomycin (**1**). Reprinted with permission from *J. Org. Chem.* 2011, *76*, *21*, *8986–8998* [129]. Copyright 2022 American Chemical Society.

4.3.2. α-Halogenated Phosphonic Acid Derivatives

Verbrugghen et al. [127] tried to mimic the acidity of the phosphate group of fosfoxacin (47, Section 4.2.3) with α -chloro (92) and α -fluoro (93) phosphonic acid moieties (Figure 20). Additionally, the group conducted P³¹-NMR-titrations of FR900098 and its α -chloro and fluoro analogs (92, 93). This experiment revealed that the decreased pKa₂ value of the phosphonic acid moiety of both analogs (pKa₂ ~ 6 vs. pKa₂ ~ 7.35 for 2) is isoacidic to a monoalkyl phosphate group. The corresponding SAR data led to the conclusion that DXR inhibitors with a dianionic phosphonate group are more potent inhibitors than the corresponding monoprotonated phosphonate anions (further explanations are discussed in Section 5) [98,104,127,134].



Figure 20. Biological activities of α -halogenated phosphonic acid derivatives (92–96). * Ammonium salts were prepared.

Furthermore, the Van Calenbergh group synthesized the *α*-fluoro analog (94) of the reverse FR900098 [127]. The three racemic compounds (92–94) were screened for their activity against asexual blood stages of *Pf* and found to inhibit their growth with IC₅₀ values in the micromolar range (IC₅₀ = 0.29–0.31 µM), surpassing the activity of FR900098 (IC₅₀ = 0.42 µM). Both fluorinated analogs (93–94) were further evaluated in the *Plasmodium berghei* (GFP ANKA strain) mouse model by intraperitoneal (i.p.) application of high doses (50 mg/kg) for 5 consecutive days. Chloroquine (CQ) eradicated parasitemia after 4 days post-infection, while FR900098 only led to 93% suppression of parasitemia. Compared to the reference substances CQ and FR9800098, the in vivo activity of 93 (88%) and 94 (85%) was slightly weaker on day 4. In summary, 93 and 94 exhibited significant in vivo antimalarial activity at day 4 after i.p. application, but none of the monohalogenated DXR inhibitors (93–94) demonstrated curative antimalarial activity [127]. This was an important outcome and provided a starting point to investigate inhibitors with further substitutions at the *α*-methylene group.

Recently, Dreneau et al. extended the mono α -halogenation into diffuorination synthesizing the α, α -difluorophosphonic acid derivatives of fosmidomycin and FR9000098 (95a, b, Figure 20) as well as their reverse analogs (96a, b, Figure 20). The difluorinated analogs were tested for their inhibitory activity against *Ec*DXR and a fosmidomycin-resistant *E. coli* (FosR) strain [135]. Against *Ec*DXR, the *N*-acylated and *N*-methylated derivatives (95b, **96b**) showed excellent IC₅₀ values of 9 and 17 nM, respectively. Therefore, the potency of 95b and 96b is in the same range as fosmidomycin and FR900098. In contrast, the non-methylated difluoromethylene compound 96a was significantly less efficient than its N-methylated congener 96a (IC₅₀ = 4.6 μ M) against EcDXR. The same observation was made in the E. coli growth inhibition assay paper determined with the disc diffusion method, where 96a was inactive, while 95b and 96b effectively inhibited bacterial growth. Moreover, no spontaneous resistance to these compounds occurred in E. coli as was observed for fosmidomycin [136]. This increase in activity was attributed to the formation of phosphonate dianions under test conditions. The isoacidic nature and the isosteric geometry of the fluorinated phosphonic moiety, together with improved electrostatic and van der Waals interactions, are possible explanations for the pronounced activity. None of the derivatives could prevent the growth of the fosmidomycin-resistant *E. coli* strain FosR, in which the GlpT transporter is dysfunctional and did not facilitate the uptake of

these inhibitors. This suggested that uptake of inhibitors **95a**, **b** and **96a**, **b** relied on an active transport mechanism by intact and functioning GlpT transporters. In summary, the introduction of two fluorine atoms in the α -position of the linker improved *Ec*DXR inhibition significantly and enhanced the antimicrobial activity compared to phosphate analogs (**47**, **48**) or non-fluorinated lead structures in *E. coli* (**1**–**4**, Figure 9).

4.3.3. Structurally Diverse Substituents in the α -Position

The promising results obtained with the α -phenyl substituted DXR inhibitors (Section 4.3.1), encouraged the Van Calenbergh group to extend the scope of α -substituents to benzamido (97), a phenylurea moiety (98), methoxy (99), phenoxy (100), substituted 1,2,3-triazolyl groups (101a–c), azido (102) and a hydroxyl group (103, all Figure 21) [137]. Of the structurally diverse inhibitors, only the α -azido derivative (102) and the α -hydroxy derivative (103) showed pronounced *Ec*DXR inhibition. The electron-rich α -triazole derivatives (101a–c) did not inhibit *Ec*DXR and only moderately suppressed the growth of *Pf*-K1. This behavior was postulated by the authors to be caused by the inability of the triazole ring to form π – π interactions with Trp211. Later, a reverse analog (104, Figure 21) was synthesized and showed weak inhibition of *Pf* and *Ec*DXR with IC₅₀ values of 9–11 µM [138].



Figure 21. Biological data of structurally diverse *α*-substituted analogs 97–104.

The α -pyridinyl-substituted fosmidomycin analogs (**105a**, **b** and **106a**, **b**, Figure 22) were designed by Xue et al. [139] and assessed with respect to their inhibitory potential against *EcDXR*, *PfDXR*, *PfDd2* and *Pf3D7* (data of the latter not shown). The pyridine-containing derivatives **105a**, **b** and **106a**, **b** showed similar IC₅₀ values to fosmidomycin when tested against *EcDXR* (IC₅₀ = 35–87 nM vs. IC₅₀ (**1**) = 34 nM), while being 2-fold more active than fosmidomycin towards *PfDXR* (IC₅₀ = 2-13 nM vs. IC₅₀ (**1**) = 21 nM). The antiplasmodial activity of the four compounds was stronger compared to fosmidomycin. Similar to fosmidomycin, the four pyridine derivatives (**105a**, **b** and **106a**, **b**) exhibited no cytotoxicity against human noncancerous fibroblast WI-38 cells (>300 µM) resulting in extraordinarily high selectivity indices of >1700.



Figure 22. Rational design of α -pyridinyl DXR-inhibitors **105a**, **b** and **106a**, **b**. K_i values are given in μ M (black) or nM (blue) against *Ec*DXR, *Pf*DXR and *Pf*Dd2.

To elucidate the interactions between **106b** and *Pf*DXR, the crystal structure in complex with NADPH and Mn^{2+} was solved and analyzed (Figure 23). In the crystal structure, the backbone of **106b** showed similar interactions to previously analyzed DXR inhibitors with α -phenyl substituents (e.g., **66**, Figure 17) [32,94,140,141]. In addition, the pyridine

nitrogen atom formed a hydrogen bond with the thiol group of Cys338. This interaction is not possible for the unsubstituted phenyl analog **66** and is thus a conceivable explanation for the weaker activity of **66** compared to **106b**.



Figure 23. (**A**) overall structure of *Pf*DXR in complex with Mn^{2+} (brown sphere), **106b** (green) and NADPH. (**B**) Close-up view of the active site of *Pf*DXR:**106b**. Reproduced from Xue et al. (PDB: 4GAE [139].

4.3.4. α -Substituted Reverse Carba Analogs

Focusing on reverse fosmidomycin analogs, Kurz and coworkers broadly investigated the effects of the substitution at the α -position of the propyl linker [93,100,101]. The comprehensive biological data of α -substituted reverse analogs (107–111) are summarized in Figure 24. Several reverse carba analogs (107b, 108a, 109 and 110a, b, 111b) inhibited *Pf*DXR with IC₅₀ values in the low nanomolar range and outperformed fosmidomycin. The IC₅₀ values against *Ec*DXR are 1–3 orders of magnitude higher than the corresponding IC₅₀ values for *Pf*DXR, but comparable to fosmidomycin. This finding is of significant importance since *Ec*DXR was initially used as a surrogate for *Pf*DXR inhibition due to its difficult production and handling [100]. Kurz and coworkers concluded based on this series that α -phenyl derivatives with a free or *N*-methylated hydroxamic acid (107a, b) moiety are very promising derivatives for further drug development [93,100,101]. Introduction of electron-withdrawing chloro- and fluoro-substituents (109, 110a, b) led to excellent inhibitors of *Pf*DXR (IC₅₀ = 3–4 nM), while electron-donating groups (111) decreased activity (Figure 24). Derivative **110b** was furthermore a potent inhibitor of *Pf*Dd2 in vitro (IC₅₀ = 40 nM).

Interestingly, the in vivo efficacy of the difluorophenyl derivative **110a** (application of 80 mg/kg i.p. for 5 days) in a *P. berghei* ANKA mouse model at day 5 post-infection was almost similar to fosmidomycin. Compounds **110a** and **110b** reduced the percentage of infected erythrocytes significantly (89% and 78%, respectively), but the effect on mice survival was less pronounced, and no curative antimalarial activity was observed [100].



Figure 24. Biological data of *α*-substituted reverse fosmidomycin analogs (105–109).

Moreover, the X-ray crystal structure of *Ec*DXR in complex with fosmidomycin and Mn^{2+} (Figure 25) revealed that fosmidomycin fits perfectly into the closed conformation of the catalytic site, whereas the difluorophenyl ring of **110b** would clash with the flexible loop region and therefore binds to the open conformation of the catalytic site.



Figure 25. Schematic overview between **110b** (green) and the active site of *Ec*DXR. Intramolecular van der Waals interactions (light blue) between the *N*-methyl group with the difluorophenyl ring and the linker atoms of **110b**. Distances are in Å [100]. Reprinted with permission from *J. Med. Chem.* 2011, 54, 6796–6802 [100]. Copyright 2022 American Chemical Society.

4.3.5. Reverse α-Substituted Oxa, Thia and Aza Analogs

Based on the promising α -phenyl-substituted reverse carba analogs, Kurz and coworkers developed bioisosteric α -substituted β -thia and β -oxa analogs (**112–115**, Figure 26) [93,138,142,143]. Compounds **112–115** were tested against *Pf*, *Mt* and *Ec*DXR enzymes as well as in antiplasmodial growth assays towards *Pf*Dd2 and *Pf*3D7. The β -oxa analogs with an unsubstituted hydroxamic acid group (**113**) were at least 2 orders of magnitude less potent than their *N*-methylated analogs **112a–h** in all DXR enzymes and *Pf* growth assays. Derivatives **112a–h** were good to excellent inhibitors of *Pf*DXR (IC₅₀ = 12–65 nM), but were less efficient in *Pf* growth assays (IC₅₀ = 0.2 μ M–1.3 μ M). These results indicated that the *N*-methylation of the hydroxamic acid moiety is often beneficial for potent antiplasmodial in vitro activity of α -phenyl-substituted reverse analogs (**115a–h**) as the non-methylated derivatives **114a–f** were in general less efficient compared to the *N*-methyl-substituted analogs. Analysis of the crystal structures of *N*-methylated derivatives showed, that the methyl group forms beneficial van der Waals interactions [100,138].



Figure 26. Antibacterial and antiplasmodial activity of thia (112+113), oxa (114+115), sulfone (116) and aza (117) analogs.

Furthermore, carba, oxa and thia analogs showed potent inhibitory activity towards the DXRs of *E. coli*, *P. falciparum* and *M. tuberculosis* (Figures 17 and 26). The thia-analogs **115a–h** were more active against *Ec*DXR and *Mt*DXR than the carba analogs (**107b–111b**, Figure 24) while the carba derivatives displayed the strongest activity against *Pf*DXR. The oxa analogs (**112a–h**, **113**) demonstrated the weakest inhibitory activity against all tested DXR enzymes.

The higher activity of the thia analogs was explained by the interaction of the large polarizable sulfur atom with the highly conserved Met298 of the flexible loop. In oxa analogs, the considerably smaller electronegative oxygen atom would lead to a repulsive effect, while the carbon atom does not interact with the enzyme [138]. Kunfermann et al. identified the remarkable enantioselectivity of thia analog **115a** towards *Pf*DXR [138]. The highly active *S*-(+)-enantiomer of **115a** gave a IC₅₀ of 9 nM, whereas the *R*-(–) enantiomer was virtually inactive with an IC₅₀ of >10 μ M. This was confirmed by the co-crystallization of the *S*-(+)-isomer of **115a** with *Pf*DXR. In addition, the *α*-3,4-dichlorophenyl-substituted derivative **115d** showed excellent inhibition of all tested DXR enzymes (*Ec*, *Mt*, *Pf*) with excellent IC₅₀ values of 5-10 nM. In a later publication, the thioethers were oxidized

to their corresponding sulfones with the general structure **116** (Figure 26). The sulfone derivatives were 2–3 orders of magnitude weaker inhibitors than their corresponding thioethers in respect to the three enzyme orthologs. The majority of the sulfone derivatives showed no significant inhibition of *Pf*3D7 growth in vitro. One exception is the α -3,5-dimethoxy substituted sulfone derivative (structure not shown), which displayed at least moderate antiplasmodial in vitro activity [143]. Adeyemi et al. recently synthesized a series of α -benzyl analogs (**117a–c**, Figure 26), where the benzyl residues were attached to a nitrogen atom instead of the *sp*³-hybridized α -carbon atom of the propyl linker, resulting in phosphoramidate analogs of reverse FR900098. The α -benzyl derivatives (**117a–c**) were non-cytotoxic to the mammalian cells, but only weakly active or inactive against *P. falciparum*. Docking studies suggested that the benzyl substituent would not fit into the substrate binding site of *Pf*DXR due to its size and conformational constraint [144].

4.3.6. β - and γ -Substituted Analogs

Compared to α -substituted DXR inhibitors, there are fewer β - and γ -substituted DXR inhibitors available due to their more difficult synthetic accessibility. Earlier in the development of fosmidomycin analogs, Geffken and coworkers synthesized some moderately to weakly active POM-prodrugs of **1** and **2** with γ -methyl and γ -phenyl substitution (**118–119**, Figure 27) [133]. While the POM-prodrug of **1** inhibited 100% growth of the *Pf*3D7 strain at 100 μ M, the activity for γ -methyl (**118a**, **b**) and γ -phenyl (**119a**, **b**) derivatives dropped to or below 60% growth inhibition. The weak antiplasmodial activity was attributed to the γ -methyl and γ -phenyl residues which could interfere with the interaction between the hydroxamic acid moiety and the divalent cation in the active site of DXR [133].



Figure 27. Antiplasmodial activity of β - and γ -substituted analogs (118–121).

Van Calenbergh and coworkers [145] introduced aryl (120a–e, Figure 27), alkyl (120f), and aryl alkyl substituents (121a–d) at the β -position of lead structure 4 (Figure 9).

If a β -aryl moiety (**120a**–e) is directly attached to the carbon linker, the derivatives are weak to poor inhibitors of *Ec*, *Pf* and *Mt*DXR. The reduction in inhibitory activity was lower in the β -methyl substituted analog (**120f**), but still significant. A small activity improvement was observed for inhibitors with arylalkyl residues in the β -position (**121a**–d). For example, compound **121c** with a phenyl-propyl residue inhibited *Ec*DXR and *Pf*DXR with IC₅₀ values of 0.8 and 0.1 μ M, respectively. In contrast, the β -phenyl-butyl derivative **121d** was more active against *Pf*DXR with an IC₅₀ of 69 nM, surpassing the inhibitory activity of fosmidomycin. However, **121d** was less active towards *Ec*DXR and inactive against *Mt*DXR.

X-ray structures of **121c** and **121d** in complex with *Pf*DXR revealed that the longer, more flexible phenyl alkyl residues led to different flap structures in the case of *Pf*DXR.

The β -phenyl residues of these compounds are in a boomerang shape and able to interact with their own *N*-methylated hydroxamic acid moiety as well as with Trp296 through an acyl-group-to-ring interaction. Additionally, the X-ray structures revealed that the *R*-enantiomer is primarily bound to the enzyme.

Expanding their prior work, van Calenbergh and coworkers synthesized a series of β -arylpropyl derivatives (**121e–g**, Figure 27) bearing various substituted phenyl moieties [**146**]. The introduction of a methyl group in the 3-position in the case of **121e** improved inhibitory activity to 50 nM against *Ec*DXR compared to the unsubstituted phenyl ring (**121c**). An improvement of *Pf*-K1 inhibition was realized by the introduction of a methyl group in the 4-position of the phenyl ring (**121f**), leading to an IC₅₀ value of 1.4 µM. The replacement of the phenyl moiety with a biphenyl substituent (**121g**) slightly decreased inhibitory activity against *Pf*DXR (IC₅₀ = 1.6 µM) while significantly reducing inhibitory activity against *Pf*-K1 (IC₅₀ > 64 µM). X-ray structure analysis of **121e** and other members of this series revealed that upon inhibitor binding the flap covering the active site was disordered resulting in key interactions of Trp296 with **1** and **2** being no longer possible.

5. Phosphonic Acid Isosteres and Bioisosteres

Fosfoxacin (47), first isolated from P. fluorescens in 1990 [122], is the phosphate bioisoster of fosmidomycin (Figure 15). In 2006, fosfoxacin (47) and its acetylated congener 48 (Figure 15) were first synthesized by Woo et al. and identified as more potent inhibitors of Synechocystis DXR than 1 (K_i 47 = 19 nM and K_i 48 = 2 nM vs. K_i 1 = 57 nM, data not shown in Figure 28) [98]. Munier et al. [147] continued investigating the replacement of the phosphonic acid moiety of 1–4 (Figure 9) by a phosphate moiety and evaluated the antibacterial efficacy of bioisosteres 47–48 and 122–123 against DXRs of E. coli and M. smegmatis (Figure 28, data for *M. smegmatis* not presented). The organic phosphates **123** $(IC_{50} = 46 \text{ nM})$ and 48 $(IC_{50} = 77 \text{ nM})$ inhibited *EcDXR* in a similar range as fosmidomycin $(IC_{50} = 42 \text{ nM})$ but are still 12–20-fold weaker inhibitors than 2 $(IC_{50} = 4 \text{ nM}, \text{Figure 1})$. Surprisingly, the formyl analog 47 and the non-methylated hydroxamic acid analog 122 are only moderate to weak inhibitors of *EcDXR* (IC₅₀ = 0.34 μ M and 2.6 μ M, respectively). Furthermore, 47-48 and 122-123 were tested in bacterial growth assays but were less effective than **1** and **2** (Figure 1) in *Ec* and a fosmidomycin-resistant *Ec* strain (FosR). In general, it was unexpected that all phosphonic acid derivatives were more potent than their phosphate analogs because phosphate derivatives should fit better into the phosphatebinding site of DXR [147,148].

Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd., performed one of the earliest attempts to replace the phosphonic acid with a phosphinic acid group (**124–125**, Figure 28). However, both phosphinic acid analogs (**124–125**) were less active against selected Gram-negative bacteria than **1** and **2** [**118**].

Perruchon et al. [134] retained the phosphonic acid group and synthesized biologically stable monoalkyl phosphonates (**126–133**, Figure 28) that are not rapidly cleaved by phosphatases [149,150]. To further investigate the possible presence of an extended binding region, compounds (**131–133**, Figure 28) were synthesized [134]. Indeed, the activity against *Ec*DXR increased with the chain length of the alkyl residue (IC₅₀ = 50 μ M for **126** with methyl group vs. IC₅₀ = 2.1 μ M for **130** with isopentyl group), suggesting the presence of the proposed lipophilic binding region. However, the alkyl monoesters showed no measurable antiplasmodial activity (IC₅₀ > 10 μ M) with the exception of the arylethyl monoesters (**131–133**), which showed weak inhibitory activities against *Pf*Dd2 strains (IC₅₀ = 5–6 μ M). In summary, it was demonstrated that both hydroxy groups of the phosphonic acid moiety are mandatory for potent inhibitory activity and all synthesized derivatives displayed low in vitro inhibitory activity against *Pf*Dd2 and *Ec*DXR.



Figure 28. Biological data of phosphonic acid isosteres. Light blue: hydroxamate moiety. Grey: hydroxamic acid moiety. a: R = H. b: R = methyl. n.d. = not determined. Fosmidomycin (1) as a reference compound.

Furthermore, different research groups replaced the phosphonic acid group with isosteric groups, which are summarized in the second half of Figure 28. Derivatives with a carboxylic acid moiety (**136–138**, Figure 28) were inactive against *Synechocystis*, *Ec* or *Mt* DXR [98,99,151]. A possible explanation for the loss of inhibitory activity resulting from the phosphonic acid replacement is the planar geometry of a carboxylic acid moiety compared to the pyramidal geometry of the phosphonic acid group.

In 2011, Andaloussi et al. [104] tried to identify less polar *Mt*DXR inhibitors, which can penetrate the highly lipophilic cell wall by replacing the phosphonate with carboxylic acid bioisosters (**139–141**, Figure 28). Only the isoxazole carboxylic acid analog (**140**) showed negligible *Mt*DXR inhibition with an IC₅₀ of 150 μ M (IC₅₀ **1** = 0.08 μ M), while the hydantoin (**139**) and C-substituted tetrazoles (**141**) showed no inhibition [104]. Nguyen-

Trung et al. [152] developed analogous *C*- and *N*-substituted tetrazole derivatives (**142–144**, Figure 28), which demonstrated no inhibitory activity towards *Ec*DXR. The loss of activity was explained by the planar rigid structure of the tetrazole, which could disrupt several potential interactions between the heterocycle and various amino acids in the active site of DXR. The authors hypothesized that **142–144** were unable to occupy the hydroxamate and phosphonic acid binding sites simultaneously.

In addition, several working groups studied the importance of the phosphonic acid pharmacophore by replacing this moiety with charged and uncharged sulfur-containing functional groups.

The mono alkyl sulfate analogs (145–146), sulfonic acid (147) and sulfamate analog 148 (Figure 28) were weak or inactive against *EcDXR* [98,99,151], likely due to their different abilities to form hydrogen-bond interactions compared to the phosphonic acid moiety [153]. Perruchon et al. [134] synthesized derivatives with polar, but uncharged, sulfone or sulfonamide moieties (149–151, Figure 28). Both groups contain two oxygen atoms which could act as hydrogen bond acceptors and form hydrogen-bond networks with Ser186, Ser222, Asn227 and Lys228, akin to the interactions of the phosphonic acid group. Furthermore, Perruchon et al. analyzed the surface of the phosphonic acid binding site and identified a small sub-pocket that eventually permits the attachment of small additional residues. The sulfone derivatives with small alkyl (149) and arylalkyl moieties (150) can only act as hydrogen bond acceptors, while the N-H moiety of the sulfonamide (150) might form hydrogen bonds with Ser186 and Ser222 due to their side-chain flexibility, which allows rotational and conformational changes. However, no derivative showed inhibitory activity against *EcDXR* (Figure 28). In 2015, Gadakh et al. [154] continued the efforts regarding possible replacements for the phosphonic acid pharmacophore by modifying the unsubstituted sulfonamide moiety. The authors synthesized four *N*-acylated sulfonamides with methyl, phenyl, benzyl and phenylethyl residues (151, Figure 28). Even though molecular modelling results indicated the occupation of a larger hydrophobic pocket like for the arylethyl esters (131–133), the compounds with an N-acyl sulfonamide moiety (152, Figure 28) were completely inactive against *EcDXR*. At least, 29% inhibition of *MtDXR* was observed for the N-(methylsulfonyl)amide (153, Figure 28) at a concentration of 100 μ M. A possible explanation for the lack of activity of compounds 151–153 could be the strong delocalization of the negative charge weakening the hydrogen bond network in the phosphate-binding site.

In summary, derivatives with sulfamate or *N*-substituted tetrazole derivatives as neutral molecules, as well as carboxylic acid, sulfonate and *C*-substituted tetrazole derivatives as monoprotonic acids and mono- and diesters of the phosphonic acid moiety do not inhibit DXR enzymes.

The data presented underscore the importance of two negatively charged groups which are present in the (monoalkyl)phosphate and the phosphonate moiety. However, differences between phosphonate and phosphate-based inhibitors (47–48 and 122–123) observed in antimicrobial growth assays could be related to the cell wall and/or membrane penetration and chemical/metabolic stability. Interestingly, the fact that phosphate-based derivatives (47–48) inhibited *Ec* growth indicated that highly hydrophilic phosphates can penetrate into cells, likely via the glycerol 3-phosphate transporter (GlpT) and/or the hexose 6-phosphate (UhpT) transporter [155–157]. This hypothesis is supported by the lack of inhibition observed in a fosmidomycin-resistant *Ec* strain in which GlpT/UhpT transporters are not active [158]. Besides this, the metabolic instability of organic phosphates due to their cleavage and inactivation by phosphatases is well described and can contribute to the different activities of phosphates compared to the phosphonic acid-based inhibitors [98]. Consequently, further investigation by several groups concentrated on the synthesis of phosphonic acid prodrugs and derivatives.

6. Conclusions Regarding Structure-Activity Relationship

The hydroxamate and retro-hydroxamate moiety are thus far the only suitable MBGs that result in potent DXR inhibitory activity. Inhibitors with hydroxamate and retro-

hydroxamate MBGs showed comparable activity and no enhanced selectivity for specific bacteria or parasites. All analogs with (bio)isosteric replacements for these groups were only weakly active or inactive (Figure 29). The tight structure–activity relationship was also demonstrated for the phosphonic acid moiety. Only the naturally occurring monoalkylphosphate fosfoxacin (47) and the phosphate analogs 48, and 122–123 (Figure 15) showed comparable or slightly superior activity against DXRs compared with fosmidomycin. All other tested di- and monoprotonic acids (carboxylates, sulfonates, phosphonic acids) as well as non-dissociating moieties (sulfamates, *N*-substituted tetrazoles) showed no DXR inhibition. Furthermore, it has been demonstrated that both hydroxy groups of the phosphonic acid moiety are essential for potent inhibitory activity.



Figure 29. Structure–activity relationship (SAR) of fosmidomycin derivatives. EW = electron withdrawing, ED = electron donating, o = ortho, MBG = metal binding group.

To optimize the linker, several structurally diverse inhibitors were synthesized: The optimal linker consists of three atoms being classified as α -, β - and γ -atoms, which in most inhibitors are carbon atoms. Nitrogen atoms in the α -position and oxygen atoms in the γ -position were not tolerated, while β -oxa analogs were partly tolerated. However, a sulfur atom in the β -position of the linker (**115**, Figure 26), led to the most potent known inhibitors and showed increased selectivity for *Mt*DXR. The majority of conformationally restricted linkers were not tolerated. Two exceptions are a trans-configured cyclopropyl linker (**55**, Figure 16), which displayed similar activity as fosmidomycin (**1**), and an unsaturated propenyl linker as in FR32863 (**IV**, Figure 2), which was active in the nanomolar range.

In the α position electron-withdrawing chlorine and fluorine atoms increased activity and the acidity of the phosphonate moiety. Furthermore, α -phenyl substituents, especially with electron-withdrawing residues in *para-* and *meta*-position such as fluorine (**110a**, **b**, Figure 24 and **114c**, **115c**, Figure 26), were beneficial. β - and γ - substituted analogs are scarce and these types of modifications are mostly not well tolerated.

Despite the promising anti-infective activity of DXR inhibitors in vitro, to date, none of the inhibitors exhibited significant curative antimalarial in vivo activity in infectious

mouse models. However, among emerging diverse inhibitors, some derivatives showed excellent DXR enzyme inhibition in the low nanomolar range.

7. Prodrugs of Fosmidomycin and Its Analogs

Phosphonic acid groups in drugs and drug candidates are often associated with unfavorable and challenging physicochemical and ADME properties. Despite their stability towards phosphatases, the membrane permeability and subsequent cellular uptake of small molecules containing phosphonic acid groups are often insufficient [159–161]. The poor membrane permeability of phosphonic acids is due to their anionic nature at physiological pH. To mask the anionic structure and to overcome the limitation described above, various types of phosphonic acid prodrugs were and are still under development. The overall goal of this prodrug concept is to enable efficient oral administration of phosphonic acid-based small molecules.

Particularly challenging organisms include *Mt* due to its highly lipophilic mycolic acid-containing cell wall, and parasites with apicoplasts, in which the DXR enzyme is located. In *Pf* erythrocyte models, prodrugs need to pass seven membranes and the exact compartment of bioactivation is not known [36]. To date, all in vivo studies with DXR inhibitors have been conducted with mice infected with *Plasmodia*.

To mask the highly polar phosphonic acid moiety of fosmidomycin and its analogs and to achieve in vivo efficacy against malaria, established prodrug concepts commonly used for antiviral drugs were employed. These concepts include lipophilic phosphonate esters, e.g., tenofovir disoproxil (Viread, 2001) [162] containing a bis-POC (isopropyloxycarbony-loxymethyl) moiety and adefovir dipivoxil (Hepsera, 2002) [163] with a bis-POM (pivaloy-loxymethyl) moiety, aryloxyphosphoramidate (e.g., remdesivir, sofosbuvir) [161,164–167], aryloxyphosphonamidate prodrugs (e.g., tenofovir alafenamide) [162,168,169] phosphobisamidates [170], cyclic esters and monoalkylphosphonates [163].

7.1. Lipophilic Phosphonic Acid Esters

Aiming to overcome the poor permeability and absorption as well as the relatively short half-life time of fosmidomycin and FR900098 (Figure 1) [61,62], several groups developed phosphonic acid prodrugs to increase oral bioavailability and in vivo efficacy. Most prodrug moieties increase the lipophilicity of the phosphonic acid group. The different structure types of lipophilic prodrugs presented in the following chapters are summarized in Figure 30.



Figure 30. Lipophilic phosphonate prodrugs used for fosmidomycin and its analogs.

7.1.1. Ester Prodrugs of Fosmidomycin and FR900098

In 2001, the first in vivo studies with FR900098 (2, Figure 1) and its diaryl ester prodrugs were conducted by Wiesner et al. (154a–c, Figure 31). While a significant increase in the in vivo antimalarial efficacy for the bis(4-methoxyphenyl) diester prodrug (154c) was observed, no curative properties have been detected [171].





Figure 31. Results of in vivo studies of lipophilic FR900098 (2) esters. Blue indicates improvement and grey reduction of efficacy/plasma concentration of the prodrug compared to parent compound 2. p.o. = per os, p.i. = postinfection.

Due to toxicity concerns for the liberated phenols upon bioconversion, alternative lipophilic phosphonic acid derivatives such as acyloxyalkyl and alkoxycarbonyloxyethyl esters (Figure 30) of FR900098 (2) have been synthesized by the Schlitzer group. These derivatives were designed to reduce toxicity while increasing bioavailability and antimalarial in vivo activity [172–174]. Initial investigations documented an improved in vitro antiplasmodial activity of the FR900098-prodrug 155 against *Pf*3D7 and Dd2 strains as well as increased oral bioavailability. To prove the bioconversion of 155 and verify oral bioavailability, 40 mg/kg of ester prodrug 155 and 2 were orally administered to mice. 2 showed a plasma concentration of 1.2 μ M after 30 min while application of 155 led to an improved plasma concentration of 3 μ M of 2 after cleavage of the prodrug moiety by plasma esterases. The plasma levels of 155 and 2 were below the detection limit 2 h after application underlining the poor pharmacokinetic properties of 2 and its prodrugs [173].

Following up on this concept, the Schlitzer group synthesized further bis[(acyloxy)alkyl] (157–159, 162–166, Figure 31) and bis[(alkoxycarbonyloxy) ethyl] ester (160–161) prodrugs of 2 and tested them in a *P. vinckei* mouse model over 6 to 11 days. Even though the prodrug 158 was more active than its parent compound 2, the formation of formaldehyde from the dioxymethylene group was classified as unfavorable. In contrast, prodrugs containing a 1,1-dioxyethylene group (157, 159–161, 163–165) released less problematic acetaldehyde during bioactivation.

The most promising derivative **157** was tested in vivo and compared with FR900098. 10 mg/kg of **157** showed the same activity as 40 mg/kg of FR900098, while higher dosages up to 40 mg/kg of **157** exceeded the efficacy of FR900098 after 8 days [174]. Although the in vivo efficacy of **2** has been improved through the development of prodrugs, further improvements are necessary in order to provide candidates with curative properties.

In 2017, Courtens et al. [175] described acyloxybenzyl and alkoxyalkyl phosphonate ester prodrugs of the reverse FR900098 (167–168, Figure 32). The acyloxybenzyl prodrugs 167a–e surpassed the inhibitory activity of fosmidomycin against Pf-K1 (IC₅₀ (1) = 1.7 μ M) and Mt H37Ra strains (IC₅₀ (1) > 64 μ M). Among the tested compounds, the acetyl ester **167a** was the weakest inhibitor, while **167c** and **167e** were highly active derivatives (IC₅₀ = 0.4μ M) against Mt. However, prodrugs 167a-e showed cytotoxic effects in the MRC-5 fibroblast cell line. In contrast to alkyloxymethyl prodrugs, acyloxybenzyl prodrugs release the reactive electrophile quinone methide during bioactivation, which could be the reason for the observed cytotoxicity [175]. The synthesized monoalkoxyalkyl phosphonates (168a–d) were not active against *Mt*, but the antiplasmodial activity of dodecyl **168c** and hexadecyl analog 168d exceeded the efficacy of fosmidomycin. The authors hypothesized that the long alkyl chains could improve passive diffusion. The Dowd group elucidated the activity of phosphonate ester as potential prodrugs of 2 against a panel of Gram-positive (B. anthracis, E. faecalis, S. aureus (MSSA and MRSA)) and Gram-negative bacteria (Acinetobacter and E. coli) as well as Mt (Figure 33) [42]. Consistent with previous results with dialkyl ester prodrugs, the prodrugs 169, 173 and 175 showed weak or reduced activity against these bacteria (for results of all tested bacteria, see Uh et al. [42]), which was expected due to insufficient bioactivation of small aliphatic dialkylphosphonates.



Figure 32. Antiplasmodial and antimycobacterial activity of acyloxybenzyl (157) and alkoxyalkyl phosphonate ester prodrugs (158).



Figure 33. Inhibitory activity of different FR900098 prodrugs (**169–177**) against *M. tuberculosis* H37Rv in growth assay.

The bis-POM ester (**176**) (MIC = $50-100 \ \mu g/mL$) and the bis-[benzoyloxymethyl] ester (**177**) (MIC = $25-100 \ \mu g/mL$) were moderately active against *Mt* H37Rv. In general, the antimycobacterial activity increases with the size of the prodrug moiety [42]. In *Mt*, the uptake of hydrophilic DXR inhibitors does not occur via the GlpT transporter due to its absence. Consequently, the effectiveness of the prodrugs **176** and **177** mainly relies on their lipophilicity, which enables penetration of the membranes by passive diffusion. Moreover, it was hypothesized that prodrugs **176** and **177** circumvent resistance caused by *glpT* mutations observed in bacteria where uptake of DXR inhibitors is reliant on the GlpT. The second observation made in this study is that ester prodrugs of primary alcohols (**176**, **177**) are more active than esters prodrugs of secondary alcohols (**170**, **172**, **174**). It was hypothesized that cellular esterases are unable or only partially able to hydrolyze substrates with a substituted acyl moiety [42,176].

In 2012, Ponaire et al. reported further acyloxymethyl phosphonate prodrugs of **3** and **4** (**178–180**, Figure 34) and tested their activity in an *M. smegmatis* growth assay using a paper disc diffusion method with a concentration of 400 nmol/disk. (Figure 34) [177]. The phosphonic acids **1** and **2** inhibited the growth of *M. smegmatis*, whereas the prodrugs **178a–c** showed no growth inhibition. Prodrugs of *N*-methylated DXR inhibitors (**180a–c**) moderately inhibited mycobacterial growth. The *n*-propionyloxymethyl prodrug **180a** was more active than the lipophilic POM (**180b**) and benzoyloxymethyl (**180c**) prodrugs [178]. This suggested that the uptake of bulky and rigid prodrugs might be restricted. As the most active prodrug **180a** contained an *n*-propionyloxymethyl moiety, the *n*-propionyloxymethyl prodrugs of **1** and **2** were prepared (**179a**, **b**). However, **179a**, **b** demonstrated no growth inhibitory effects.



Figure 34. Antimycobacterial activity of prodrugs (**178–180**) against M. smegmatis determined by paper disc diffusion method.

7.1.2. Ester Prodrugs of Fosmidomycin Analogs

Haemers et al. synthesized the β -oxa isostere of 4 (54, Figure 15) and the corresponding POM-prodrug (181, Figure 35), which showed a 4-fold improvement in in vitro efficacy against *Pf*3D7 compared to the parent compound 54 [123]. The Dowd group designed and synthesized POM prodrugs (182a, b) of the natural product FR32863 (IV) and the acetylated analog 42 (Figure 35). Both prodrugs (182a, b) Prodrug 182a was identified as a potent inhibitor of *Pf* growth with an IC₅₀ of 13 nM [179].



Figure 35. Structure and antiplasmodial activity of prodrugs 181 and 182.

The POM prodrug **182a** was further evaluated for in vivo efficacy in a *P. berghei*infected mouse model of malaria, where groups of mice were infected with luciferase-based blood-stage *P. berghei* ANKA (PbA). Prodrug **182a** reduced parasitemia in the mice treated with a dose of 20 mg/kg for 5 days. Moreover, **182a** was well tolerated and showed no evidence of cytotoxicity in vitro [121]. The POM-prodrug **182b** was only tested in vitro in an *Mt* growth assay and compared to parent compound **45** (Figure 14) increased the MIC from >200 µg/mL to 9.4 µg/mL [119].

In 2006, Schlüter et al. published a series of α -benzylated POM-prodrugs shown in Figure 36. These prodrugs contain benzyl (183), 2,5-dimethyl-benzyl (184), 3,4-dichlorobenzyl (185), 4-methoxybenzyl (186) and (5,6,7,8) tetrahydronaphthalen-eylmethyl (THN) (187-188) substituents in the α -position of the propyl linker (Figure 36). While the prodrugs with a 3,4dichlorobenzyl (185) moiety retained most of their antiplasmodial activity (59% inhibition at 1 μ M) compared to 1 and 2 (32% and 71% at 1 μ M), all other bulky substituents at the phenyl moiety drastically reduced antiplasmodial potency [131]. Schlüter et al. expanded the SAR analysis of the substitution pattern in the α -position by comparing the antiplasmodial activities of a number of α -alkyl-substituted (methyl, dimethyl, ethyl, *n*-propyl and *i*-propyl) inhibitors (189, 191–194) with POM-prodrugs of 1 and 2 (Figure 36) [131] The α -methylsubstituted prodrugs (189a, b) exerted significant antiplasmodial activity (IC₅₀ = 0.7μ M), while longer alkyl chains led to a considerable loss of antimalarial activity (less than 50% Pf growth inhibition at 25 μ M, data and structures not shown). The α -phenyl derivatives (**190a**, **b**) exhibited similar antiplasmodial activity to (**189a**, **b**). Extending this concept, the *N*-acetylated and *N*-formylated derivatives with α -hydroxymethyl (**195a**, **b**) and fluorinated α -phenyl substituents (196–198) were prepared and evaluated. The α -hydroxymethyl moiety compromised the inhibitory effects and reduced activities of inhibitors with IC_{50} values of 6.7 μ M for **195a** and 3.7 μ M for **195b**. The presence of the α -2,6-dimethyl-phenyl group in **198a** led to reduced activity. In contrast, the introduction of an α -3,4-difluoro phenyl substituent (196a) increased the potency towards Pf compared to the analog bearing an unsubstituted phenyl ring (43.7% inhibition @ $0.5 \ \mu$ M for **196a** vs. 39% for **190a** with an α -phenyl substituent) [133].



Figure 36. Antiplasmodial activity of α -benzyl and α -alkyl analogs **183–198**. Derivatives were screened for their inhibition of *P. falciparum* 3D7 growth at 0.5, 1 and 25 μ M.

The Kurz group also synthesized phosphonate ester prodrugs of reverse β -oxa and carba analogs with a 3,4-difluorophenyl substituent in the α -position of the linker (110a, 110b and 114b, Figure 37). The phosphonic acid group of the inhibitors 110a, 110b and 114b was masked with *n*-butyloxycarbonyloxymethyl (A), POC (B) and POM (C) prodrug moieties (Figure 37). All prodrugs of this series (199-205, Figure 37) were excellent to potent inhibitors of Pf 3D7 and Dd2 with IC₅₀ values between 8 and 49 nM and were more potent than their respective parent compounds (IC₅₀ = $0.075-0.54 \mu$ M) [37]. Significant growth inhibition was achieved by the introduction of the POM prodrug moiety unit into the β -oxa analog 205 with an IC₅₀ value of 13 nM against Pf 3D7. 205 was more than 40-fold more active than the parent compound **114b** (IC₅₀ value of 0.54 μ M). The antiplasmodial activity of **114b** was further surpassed by the carba analog **203** with an excellent IC_{50} value of 8 nM. The inhibitors with an *n*-butyloxycarbonyloxymethyl prodrug unit (A) outperformed the inhibitors with a POC prodrug unit (**B**), which could be due to less steric hindrance during enzymatic or chemical cleavage. Notably, the *n*-butyloxycarbonyloxymethyl (199, 200, 201) and POM (205) prodrugs exhibited the same antiplasmodial potency (IC₅₀ = 13–39 nM) in a whole-cell assay as their parent phosphonic acids **110a**, **b** and **114b** in a *Pf*DXR enzyme assay. Finally, it should be mentioned that, to date, no prodrugs of the highly active reverse thia analogs were synthesized, which could be an interesting strategy, especially for Mtdrug research.



Figure 37. Antiplasmodial activity of parent compounds (**110a**, **110b**, **114b**) and prodrugs (**199–205**) against *Pf*3D7.

Faísca Phillips et al. [180] combined several concepts that increased antiplasmodial activity and synthesized the rigidized 1-hydroxy-piperidin-2-one analogs **206** and 1-hydroxy-azepan-2-one **207** (Figure 38). In accordance with the design, the cyclic POM-prodrug **208** surpassed the activity of fosmidomycin, FR900098, and its POM-prodrug (IC₅₀ = 72 nM) against *Pf*Dd2.

An interesting example of an intramolecular cyclic phosphonate is the potential prodrug **208** synthesized by Andaloussi et al. (Figure 38) [128]. While the parent compound with a free phosphonic acid (**83**, Figure 18) showed 36% growth inhibition of *Mt*DXR at 100 μ M, the cyclic ester was 3-fold less active and showed little activity. Both compounds lacked activity against *Mt* H37Ra.



Figure 38. Inhibitory activity of rigidized prodrugs 206–208 against PfDd2 or Mt H37Ra.

7.2. Double Prodrugs

In 2012 and 2015 Kurz and collaborators also published the first double ester prodrugs of the reverse α -3,4-difluorophenyl-substituted DXR inhibitors (**108b** and **112b**, see Section 4.3.5) containing acyloxymethyl or alkoxycarbonyloxymethyl phosphonate prodrug moieties. [127] Since the penetration of several membranes is necessary to reach the target DXR in the plasmodial apicoplast, the hydroxy group of the hydroxamic acid moiety was also masked by acetate, pivalate, carbonate and carbamate (Figure 39) [37]. By masking the phosphonic acid and hydroxamate structures concurrently, the calculated log *p* values increased significantly (log *p* = -2.5 for **1** vs. log *p* > 2.5 for all double prodrugs) [37].



Figure 39. Schematic overview of reverse α -3,4-difluorophenyl-substituted β -oxa and carba analogs.

As expected, none of the double prodrugs inhibited PfDXR. Surprisingly, despite the nanomolar antiplasmodial in vitro activity against PfDd2 (IC₅₀ = 4–70 nM) and 3D7 (IC₅₀ = 8–20 nM) no significant in vivo antimalarial activity in a *P. berghei* and a humanized SCID *P. falciparum* mouse model was observed.

By combining the concept of POM-phosphonate prodrugs with different hydroxamic acid prodrugs such as carboxylic acid esters, carbonates and carbamates, the Van Calenbergh group synthesized novel double prodrugs (**209–219**, Figure 40). The biological evaluation of this series was performed via whole-cell assays against *Pf*-K1 and *Mt* H37Rv or H37Ra [181]. Although, the majority of compounds (**209–214**, **217–219**) did not inhibit *Mt* growth, prodrugs with a 2-nitrofuran (**215**) and 2-nitrothiophene (**216**) moiety were weak *Mt* H37Rv inhibitors with MIC of 12.5 μ M. The authors hypothesized that **215** and **216** are bioreductive prodrugs. Unfortunately, significant cytotoxicity of **215** and **216** against MRC-5 fibroblasts was observed, diminishing their selectivity indices to approximately 2. The carbonate prodrug **219** and the nonanoyloxybenzyl ester prodrug **218** showed low activity against *Pf*-K1, while the ester prodrugs **210–212** were equipotent to fosmidomycin. The *N*-benzyl substituted carbamate prodrug **209** was the only retro-hydroxamate to surpass



the activity of its parent compound **180b** (IC₅₀ of **209** = 0.64 μ M vs. IC₅₀ of **180b** = 0.73 μ M). To date, no in vivo data of these double prodrugs have been published.

Figure 40. Antiplasmodial activity of double prodrugs **209–219** against asexual blood stages of *Pf*-K1 (IC₅₀ in μ M) and *Mt* H37Rv (MIC in μ M).

In conclusion, while the bioconversion of the POC- and POM-prodrug is well studied, further studies regarding the bioactivation of hydroxamate prodrugs in vitro and in vivo are required.

7.3. Amino Acid Esters and Phosphonamidate Prodrugs

A third prodrug strategy, that is already well-studied and applied to improve pharmacokinetic properties in hepatitis and HIV therapies is the phosphonoamidate prodrug concept. Aryloxyphosphoramidate prodrugs that are currently in clinical use are sofosbuvir (Sovaldi, 2013) [166,167] and remdesivir (Veklury, 2020) [161] while tenofovir alafenamide (Vemlidy, 2015) [168] is the only aryloxyphosphonamidate in clinical use.

The Calenbergh group published two series of amino acid-based reverse N-methylfosmidomycin derivatives (220-223) and their in vitro inhibitory activity was tested against *Mt* H37Rv and asexual blood stages of *Pf*-K1 (Figure 41) [182,183]. In the first series, they focused solely on the conversion of the phosphonate moiety into bis-phosphonamidate prodrugs. These modifications were performed by varying amino acid residues (220a-f). Only the L-lysine-based bis-phosphonamidate prodrug (220e) showed submicromolar activity against Pf (IC₅₀ = 0.96 μ M), while the other derivatives showed activity similar to fosmidomycin. The *L*-tyrosine **222a** (IC₅₀ = 0.23 μ M) and *N*-acetyl-tyrosine **222b** $(IC_{50} = 0.31 \,\mu\text{M})$ prodrugs showed improved inhibition of *Pf*-K1 growth in comparison with fosmidomycin (IC₅₀ = 1.73μ M). According to the authors, the likely protonation of 222a at physiological pH did not appear to affect the uptake into red blood cells. Against the H37Rv wild-type strain of *Mt*, only the *L*-leucine **221b** and *L*-alanine **220f** based prodrugs exhibited weak activity with MIC values of 50 and 20 μ M, respectively. The other derivatives did not show activity, which might be attributed to a lack of uptake. Furthermore, 220e and 222b were evaluated in a P. berghei malaria mouse model with a dose of 50 mg/kg applied intraperitoneally for 5 consecutive days. Compound 220e failed to show a reduction of parasitemia post-infection, probably due to chemical/metabolic stability or insufficient bioactivation, while 222b was able to initially reduce parasitaemia at day 4 (82% suppression). However, the in vivo activity was reduced stepwise after 7 days (66%) and reached 50% of suppression after 14 days.



Figure 41. Biological data of amino acid-based prodrugs **220a**–*f*, **221a**–*f*, **222a**–*b*, and **223a**–*f* against asexual blood stages of *Pf*-K1 (IC₅₀ in μ M) and *Mt* H37Rv (MIC in μ M). AAS = Amino acid side chain.

The α -3,4-dichlorophenyl substitution of reverse fosmidomycin derivatives is a key structural element responsible for potent DXR inhibition and anti-infective in vitro activity [100]. Based on this successful modification, the *L*-alanine ethyl ester and *N*-acetyl *L*-tyrosine ethyl ester prodrugs (structures not shown) have been synthesized. Both derivatives lacked antiplasmodial activity, while the parent α -3,4-dichlorophenyl compound (109) exhibited nanomolar activity [37].

The Dowd group recently published arylalkyloxyamide analogs of **2** which potentially act as bisubstrate inhibitors for the natural substrate DXP and the NADPH cofactor [41]. Van Calenbergh and coworkers combined these findings with their phosphodiamidate prodrug strategy and developed prodrugs with improved penetration capabilities due to increased lipophilicity [183]. The promising whole-cell antimycobacterial activity of *L*-leucine ethyl ester phosphondiamidate (**221b**) was used as a starting point for further modification combined with different *N*-alkoxy residues (**223a–g**, Figure 41). All tested derivatives were less active against *Pf*-K1 (IC₅₀ = 4.2–8.9 μ M) compared to fosmidomycin (IC₅₀ = 1.73 μ M) and less active than **220f** against the nonvirulent *Mt* H37Ra strain. These derivatives were inactive against H37Rv *Mt*, but cytotoxicity against MRC-5 fibroblasts was significant.

In summary, the phosphobisamidate prodrug **220f** exhibited moderate in vitro activity against *Mt* H37Hv strains, whereas fosmidomycin was inactive, suggesting that this prodrug strategy may allow permeation through the highly lipophilic *Mt* cell wall. The combination of a phosphodiamidate prodrug and arylalkyloxyamide moieties (**223a–g**) was unsuccessful. In *Pf*, the tyrosine ester strategy was more promising than the phosphodiamidate strategy as *N*-acetyl- and *L*-tyrosine esters (**222a**, **b**) were the most active compounds.

In 2019, Munier et al. synthesized aryl phosphoramidate prodrugs of fosfoxacin (47) and its *N*-methylated analog 48 bearing an *L*-alanine methyl ester and a 4-methoxyphenyl moiety (Figure 42) [184].



Figure 42. Structures of aryl phosphoramidate prodrugs of fosmidomycin (224) and FR900098 (225).

Both compounds (**224–225**) did not inhibit the growth of *E. coli* and *M. smegmatis* at the highest concentration of 400 nmol/disc in a paper disc diffusion assay. The authors demonstrated that **225** was not stable in the buffer used during the 48 h assay. Furthermore, the bioconversion into fosfoxacin was determined via incubation with carboxypeptidase Y (CPY), which catalyzes the hydrolyses of the carboxylic acid ester as the first step in bioactivation. While the results are not meaningful for **225** due to its instability in the buffer, **224** was completely converted to the amino acyl phosphoramidate intermediate with a half-life time of 20 h [184]. This new prodrug strategy for DXRi is interesting and should be used for phosphonic acid analogs, as this moiety is more stable compared to the phosphate moiety of the fosfoxacin analogs.

In summary, the Van Calenbergh group successfully implemented the synthesis of a new prodrug type for DXR inhibitor discovery. However, significant in vivo activity was not achieved. To date, none of the applied prodrugs concepts presented in this chapter led to curative properties of the parent DXR inhibitors. However, the opportunities are not yet exhausted, and a combination with other concepts and the development of bisubstrate inhibitors may help accomplish the desired curative in vivo activity.

8. Fosmidomycin Conjugates and Hybrids

Sparr et al. addressed the poor permeability of fosmidomycin analogs by facilitating cellular uptake via a carrier. Cell-penetrating peptides (CPPs), e.g., polycationic oligoarginins are able to transport physiologically active compounds across membranes and act as a carrier or delivery vehicle [185–188]. The authors synthesized a salt of fosmidomycin and 6-carboxyfluorescein (FAM) labeled octaarginine amide in a 4-to-1 ratio (**226**, Figure 43). For the second target molecule, octaarginine was attached to the retrohydroxamate group of diethyl phosphonate ester of FR900098 using a glutaric acid linker (**227**, Figure 43). First, the activity against asexual blood-stage *Pf*3D7 in comparison to fosmidomycin was determined. While the covalent conjugate **227** was less active than fosmidomycin, the salt **226** was 40-fold more active ($IC_{50} = 4$ nM). It was demonstrated that the FAM-octaarginine alone is no plasmodial growth inhibitor at concentrations up to 100 μ M, suggesting the improved activity of **226** is caused by enhanced uptake rather than synergistic effects. In contrast, neither fosmidomycin nor salt **226** inhibited the growth of *T. gondii* (strain RH) in infected human foreskin fibroblasts (HFF). The authors demonstrated that this is due to the inability of both compounds to cross the parasite's membranes.



Figure 43. Structure and antiplasmodial activity of fosmidomycin (226) and FR900098 (227) octaarginine conjugates.

It has been demonstrated that artemisinin–spermidine conjugates were up to 10-fold more active against the chloroquine-sensitive *Pf*3D7 strain [189]. This inspired Palla et al. to synthesize fosmidomycin conjugates and hybrids using the following fragments: the diethyl phosphonate ester of fosmidomycin (blue), a propyl carboxylic acid linker (grey) attached to the fosmidomycin hydroxamate nitrogen, a second linker (black), and the second pharmacophore (green). The artemisinin (ART) conjugates used the polyamines spermidine (**228**) or homospermidine (**229**) as a second linker, while the desalkylchloroquin (DCQ) hybrids were connected via an ethylenediamine (**230**) or piperazine (**231**) linker (Figure 44).



Figure 44. Antiplasmodial activities of artemisinin (ART)-conjugates **228–229** and desalkylchloroquin (DCQ) hybrids (**230–231**) against chloroquine-resistant *P. falciparum* FcB1 strain with ART and CQ as references.

Compared to the diethyl phosphonate ester of fosmidomycin (structure not shown), which was completely inactive towards *P. falciparum* FcB1, the artemisinin conjugates **228** and **229** exhibited potent activity with IC₅₀ values of 0.36 and 0.65 μ M, respectively. However, these values are one order of magnitude higher than the IC₅₀ value of artemisinin (IC₅₀ = 55 nM). Compared to **228** and **229**, the DCQ hybrids **230** and **231** were active in the

low micromolar range, but are still less active than the parent compound chloroquine. As demonstrated in this and previous studies, the phosphonic acid moiety of fosmidomycin is crucial for activity against DXR and its alkyl esters are not cleaved by plasma esterases. This suggests that the fosmidomycin pharmacophore of the reported conjugates is also inactive against DXR. Consequently, the potency of **228–231** in the conducted plasmodial growth assay is likely caused by the pharmacological effect of the second drug (ART, DCQ).

To compensate for the poor physicochemical properties of fosmidomycin, the novel concepts of covalent and noncovalent attachment to drug delivery vehicles as well as drugs-conjugates and hybrid molecules have been demonstrated to be sufficient, but not well examined for DXR inhibitors. These first explorative studies were auspicious and provide opportunities for further improvement, e.g., application of more labile linker units for drug delivery vehicles for complete drug release or the use of DXR inhibitors bearing a free phosphonic acid moiety or proven ester prodrugs instead of stable dialkyl phosphonate esters. Furthermore, DXR assays must be conducted to elucidate if the inhibitory effect of the drug-drug and hybrid conjugates can be attributed to DXR inhibition and/or other target-based effects.

9. DXR-Inhibitors Not Based on Fosmidomycin

Non-fosmidomycin-based DXR inhibitors are herein defined as molecules that inhibit the isolated enzyme but do not follow the classical pharmacophore of fosmidomycin and reverse analogs. The number and success of these inhibitors have so far been limited. Due to the similarity of nitrogen-containing bisphosphonates to DMAPP and its antimalarial activity, Yajima et al. screened a library of bisphosphonic acid derivatives and identified compounds **232** and **233** as moderate DXR inhibitors with IC₅₀ values of 4 and 7 μ M, respectively (Figure 45). Interestingly, the crystal structures of **232** showed that the bisphosphonic acid group acts as the metal chelator and does not occupy the phosphonic acid pocket [190].



232 IC₅₀ *Ec*DXR = 4 μM



235 IC₅₀ *Ec*DXR = 0.8 μM



238: R = NHOH - IC₅₀ *Ec*DXR = 6.1 μM **239**: R = OH - IC₅₀ *Ec*DXR = 4.4 μM



IC₅₀ *Ec*DXR = 7 μM



236 IC₅₀ *Ec*DXR = 7.1 μM





234 IC₅₀ *Ec*DXR = 1.4 μM MIC *E.coli* > 100 μM



237 IC₅₀ *Ec*DXR = 10 μM

Figure 45. Structure and biological data of non-fosmidomycin-based DXR inhibitors 232–240.

Aiming to increase the lipophilicity of bisphosphonic acid-based inhibitor **232**, Deng et al. tested phenyl and benzyl derivatives containing different cyclic metal-binding moieties against *EcDXR*, including inhibitor **234** (Figure 45). Among the tested compounds, 1-hydroxypyridin-2(1*H*)-one **234** inhibited *EcDXR* at low micromolar concentrations (IC₅₀ = 1.4 μ M) [113]. To expand on the concept that an increase in lipophilicity is
beneficial to the design of DXR inhibitors, the authors synthesized a series of arylphosphates containing electron-deficient aromatic moieties. Compounds containing pyridine rings (**236** and **237**, Figure 45) were active in micromolar concentrations, while compound **235** (Figure 45) inhibited the enzyme at submicromolar concentrations (**235** IC₅₀ = 0.8μ M) [191]. The *Ec*DXR cocrystal structure demonstrated that the phosphonic acid group of **235** occupied the phosphate binding site of DXP and is not interacting with the catalytic metal (Figure 46).



Figure 46. Superposition of fosmidomycin (green) PDB 10NP, compound **235** (blue) PDB 3ANM and compound **232** (pink) PDB 1T1R in the structure of *Ec*DXR (salmon) PDB 10NP.

To design a molecule that can interact with the catalytic metal ion and occupy the NADPH binding site, Zinglé et al. synthesized catechol-rhodanine-based DXR inhibitors. The compounds were found to be promiscuous inhibitors due to the formation of aggregates. With the inclusion of a detergent in the assay media, compounds **238** and **239** (Figure 45) showed inhibition at micromolar concentrations (**238** IC₅₀ = 6.1μ M and **239** IC₅₀ = 4.4μ M). Alteration of NADPH concentration in the assay did not alter the inhibition of **238** and **239**, suggesting that the compounds indeed did not interact with the NADPH recognition site [192].

More recently, in silico studies identified *N*-substituted phosphoramidate derivatives with a free phosphonic acid as potential DXR inhibitors. However, only the corresponding phosphonic acid esters were tested against the enzyme and compound **240** (Figure 45) was the most active compound of this series [193].

Theaflavins have been found to be non-competitive inhibitors of DXR. Theaflavin-3,3'-digallate (**241**, Figure 47) showed IC₅₀ of 14.9 μ M [194]. Docking studies suggested the compounds interact with the entrance of the substrate-binding site, supporting its non-orthosteric inhibition. A recent high throughput screening (HTS) campaign to identify inhibitors of the MEP pathway focusing on IspC and IspD used LOPAC (Library of Pharmacologically Active Compounds), a mixed library of 1280 commercial compounds, and 150 natural products [195]. The result of this work was the identification of novel chemical scaffolds as DXR inhibitors **241–246** shown in Figure 47. However, no experimental validation of these scaffolds has been conducted.



Figure 47. Structures of natural products (**241–246**) that potentially act as DXR inhibitors. Lead structures for the design of DXRi identified via HTS by Haymond et al. [195].

10. Summary

The importance of the MEP pathway for the development of anti-infective drugs has been demonstrated by target- and cell-based assays in animal models and clinical trials with fosmidomycin. The majority of DXR inhibitor development focused on the structural optimization of the natural products fosmidomycin (1) and FR900098 (2). Both natural compounds potently inhibited the DXR enzymes of a panel of pathogenic bacteria and parasites such as *E. coli*, *M. tuberculosis*, and *P. falciparum*.

Different design strategies have been employed to optimize the inhibitor profile and thereby pharmacokinetic (PK) and pharmacodynamic (PD) properties of **1** and **2**. The most promising analogs reported are α -phenyl and α -fluoro-substituted derivatives, which exhibited low nanomolar activity towards the DXR enzymes of *P. falciparum* and *M. tuberculosis*. However, this success was only in part transferred to whole-cell activity, and the in vivo efficacy of fosmidomycin has never been exceeded by an analog. The main shortcomings of **1** and **2** are their insufficient membrane permeability due to the charged phosphonic acid group and the short half-life as demonstrated by several unsatisfactory clinical trials.

To enhance the permeability of **1**, **2**, and their analogs, which are present as phosphonate anions at physiological pH of 7.4, several phosphonate prodrug concepts were applied, including lipophilic ester and phosphonamidate prodrugs. Some mono and double prodrugs showed significantly improved antiparasitic and antibacterial activity compared to their parent compounds. However, even nanomolar in vitro activity could not be translated into potent or, at best, curative in vivo properties.

Recent results suggest that addressing the hydrophobic subpocket within the substrate binding site or the NADPH binding site (e.g., the adenosine-binding pocket) are promising strategies toward more lipophilic and druglike DXR inhibitors. However, so far, the postulated bisubstrate inhibitors have not been validated by co-crystal structures with DXR enzymes. Bisubstrate inhibitors are recent developments in the field of DXR inhibitors, and thus their potential may not have been fully explored.

In more than 40 years of fosmidomycin drug research, no new highly active structure types have been developed based on numerous DXR crystal structures or discovered in drug screening approaches. A few examples of innovative drug design concepts have been used, including the conjugation of fosmidomycin to cell-penetrating-peptides (CPP) or fragments of other antimalarials. These concepts have so far not yielded improved anti-infectives, leaving room for further optimization. Since competitive catalytic site inhibitors of the phosphonohydroxamic acid type have not shown the expected in vivo efficacy, possible strategies include the development of small molecules with more druglike properties such as allosteric DXR inhibitors or DXR dimerization inhibitors. It remains to be seen whether the application of novel prodrug concepts from the field of antivirals will be more successful than the concepts used to date.

Despite the widespread distribution of the MEP pathway, significant antiparasitic activity has only been achieved against *Plasmodia*, but even here, no inhibitors with curative properties in animal models have been developed. Various studies revealed that the antiplasmodial properties of DXR inhibitors are more pronounced than their antibacterial effects, although several bacterial DXRs are inhibited with nanomolar IC_{50} values. Among the bacterial pathogens, studies with *M. tuberculosis* dominate, while studies with Gram-negative bacteria are underrepresented. To improve the antibacterial properties of fosmidomycin analogs, the design of siderophore conjugates to target resistant Gram-negative bacteria is another promising opportunity as demonstrated by the recently approved antibiotic Cefiderocol (Fetroja, 2020).

In conclusion, since no further clinical studies with fosmidomycin as an antibiotic have been carried out since 1985, it cannot currently be assessed whether fosmidomycin could gain importance as a reserve antibiotic against certain bacteria. Current data provide hardly any arguments for the suitability of fosmidomycin for this purpose. Although approval for the treatment of Malaria could not be achieved so far, fosmidomycin in combination with approved antimalarials showed promising in vivo activity in humans with curative potential. On the other hand, the required repeat application of high doses of fosmidomycin and unimprovable cure rates as a standalone antimalarial are both unsatisfactory. As novel clinical studies with fosmidomycin-based combination therapy for malaria is still possible. In our view, the DXR enzyme and the MEP pathway remain viable targets for anti-infective drug research, not only because of the vital importance of isoprenoids for the survival of pathogens, but also due to the pathway's widespread prevalence and its absence in mammals.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: https://www.mdpi.com/article/10.3390/ph15121553/s1. In this file, we describe obtained IC₅₀ or MIC values of fosmidomycin (1) and FR900098 (2) for all tested microorganisms and the PDB codes from DXR crystal structures. Table S1: Antiparasitic and antibiotic data of fosmidomycin (1) and FR900098 (2) obtained from enzyme assays and growth inhibition assays; Table S2: Existing co-crystal structures of DXR enzymes.

Author Contributions: Data curation and writing—original draft preparation, T.K. (Talea Knak), M.A.A., S.H., L.A.A.A., S.K. and N.T.; writing—review and editing, T.K. (Talea Knak), M.A.A., S.H., L.A.A.A., S.K., M.F., M.M., N.T. and T.K. (Thomas Kurz); visualization, T.K. (Talea Knak), M.A.A., S.H., L.A.A.A., S.K. and N.T.; supervision, T.K. (Thomas Kurz); project administration, T.K. (Talea Knak), M.A.A., S.H., M.A.A., S.H. and T.K. (Thomas Kurz). All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: T. Knak, T. Kurz and S.H. are funded in part by the Deutsche Forschungsgemeinschaft— 270650915 (Research Training Group GRK 2158, TP2d to SB). M.A.A. receives funding from The Egyptian Ministry of Higher Education and Scientific Research (MHESR) and the German Academic Exchange Service (DAAD) (GERLS Scholarship 91705741).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data sharing not applicable.

Acknowledgments: We want to acknowledge the Institute of Pharmaceutical and Medicinal Chemistry at Heinrich-Heine-University, Düsseldorf. Especially, we are grateful for Adelbert Bacher's valuable suggestions and our fruitful discussions. **Conflicts of Interest:** The authors have no relevant affiliations with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with a subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed and thus declare that there is no conflict of interests.

Abbreviations

ADME, absorption, distribution, metabolism, and excretion; BLAST, Basic Local Alignment Search Tool; DMAPP, dimethylallyl diphosphate; CPY, carboxypeptidase Y; DXP, 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate; DXR, 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase; DXRi, 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase inhibitor; Ec, Escherichia coli; fsr, fosmidomycin resistance gene; GlpT, glycerol-3-phosphate transporter; IPP, isopentenyl diphosphate; IspC, 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase; IspD, 4diphosphocytidyl-2C methyl-D-erythritol synthase; IspE, 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol kinase; IspF, 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase; IspG, 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate reductase; IspH, 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)butenyl-4-diphosphate reductase; HA, hydroxamic acid; HTS, high throughput screening; MBG, metal binding group; MDR, multidrug resistance; MEP, 2C-methyl-d-erythritol-4-phosphate pathway; MRC-5, Medical Research Council cell strain 5; MRSA, methicillin -resistant Staphylococcus aureus; MSSA, methicillin-sensitive Staphylococcus aureus; Mt, Mycobacterium tuberculosis; NHP, N-hydroxypyridone; n.i., no inhibition; NMP, nonmevalonate pathway; PDB, protein database; Pf, Plasmodium falciparum; Pf3D7, chloroquinesensitive plasmodium falciparum strain 3D7; PfDd2, multiresistant strain plasmodium falciparum strain Dd2; Pf-K1, Plasmodium falciparum strain K1, a chloroquine- and pyrimethamineresistant strain; PMB, p-methoxybenzyl; POC, isopropyloxycarbonyloxymethyl; POM, pivaloyloxymethyl; QSAR, quantitative structure–activity relationship; R, residue; SAR, structure-activity relationship; SCID, severe combined immunodeficiency; ssp., subspecies; THN, (5,6,7,8)-tetrahydronaphthaleneylmethyl; UhpT, hexose 6-phosphate transporter; Yp, Yersinia pestis.

References

- Rohmer, M.; Knani, M.; Simonin, P.; Sutter, B.; Sahm, H. Isoprenoid Biosynthesis in Bacteria: A Novel Pathway for the Early Steps Leading to Isopentenyl Diphosphate. *Biochem. J.* 1993, 295, 517–524. [CrossRef] [PubMed]
- Disch, A.; Schwender, J.; Müller, C.; Lichtenthaler, H.K.; Rohmer, M. Distribution of the Mevalonate and Glyceraldehyde Phosphate/Pyruvate Pathways for Isoprenoid Biosynthesis in Unicellular Algae and the Cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6714. *Biochem. J.* 1998, 333, 381–388. [CrossRef] [PubMed]
- Arigoni, D.; Sagner, S.; Latzel, C.; Eisenreich, W.; Bacher, A.; Zenk, M.H. Terpenoid Biosynthesis from 1-Deoxy-D-xylulose in Higher Plants by Intramolecular Skeletal Rearrangement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94, 10600–10605. [CrossRef] [PubMed]
- Schwender, J.; Zeidler, J.; Gröner, R.; Müller, C.; Focke, M.; Braun, S.; Lichtenthaler, F.W.; Lichtenthaler, H.K. Incorporation of 1-Deoxy-D-Xylulose into Isoprene and Phytol by Higher Plants and Algae. *FEBS Lett.* **1997**, 414, 129–134. [CrossRef]
- Cvejić, J.H.; Rohmer, M. CO₂ as Main Carbon Source for Isoprenoid Biosynthesis via the Mevalonate-independent Methylerythritol 4-Phosphate Route in the Marine Diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Nitzschia ovalis*. *Phytochemistry* 2000, 53, 21–28. [CrossRef]
- Eberl, M.; Hintz, M.; Reichenberg, A.; Kollas, A.-K.; Wiesner, J.; Jomaa, H. Microbial Isoprenoid Biosynthesis and Human γδ T Cell Activation. *FEBS Lett.* 2003, 544, 4–10. [CrossRef]
- Coppens, I. Targeting Lipid Biosynthesis and Salvage in Apicomplexan Parasites for Improved Chemotherapies. *Nat. Rev. Microbiol.* 2013, 11, 823–835. [CrossRef]
- 8. Hunter, W.N. The Non-Mevalonate Pathway of Isoprenoid Precursor Biosynthesis. J. Biol. Chem. 2007, 282, 21573–21577. [CrossRef]
- Okuhara, M.; Kuroda, Y.; Goto, T.; Okamoto, M.; Terano, H.; Kohsaka, M.; Aoki, H.; Imanaka, H. Studies on New Phosphonic Acid Antibiotics. I. FR-900098, Isolation and Characterization. J. Antibiot. 1980, 33, 13–17. [CrossRef]
- 10. Kamiya, T.; Hashimoto, M.; Hemmi, K.; Takeno, H. Hydroxyaminohydrocarbonphosphonic Acids. U.S. Patent US4206156A, 3 June 1980.
- 11. Patterson, D.R. Herbicidal Hydroxyamino Phosphonic Acids and Derivatives. U.S. Patent US4693742A, 15 September 1987.
- 12. Kuzuyama, T.; Shimizu, T.; Takahashi, S.; Seto, H. Fosmidomycin, a Specific Inhibitor of 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase in the Nonmevalonate Pathway for Terpenoid Biosynthesis. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 7913–7916. [CrossRef]
- Jomaa, H.; Wiesner, J.; Sanderbrand, S.; Altincicek, B.; Weidemeyer, C.; Hintz, M.; Türbachova, I.; Eberl, M.; Zeidler, J.; Lichtenthaler, H.K.; et al. Inhibitors of the Nonmevalonate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis as Antimalarial Drugs. *Science* 1999, 285, 1573–1576. [CrossRef] [PubMed]

- Zeidler, J.; Schwender, J.; Müller, C.; Wiesner, J.; Weidemeyer, C.; Beck, E.; Jomaa, H.; Lichtenthaler, H. Inhibition of the Non-Mevalonate 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Pathway of Plant Isoprenoid Biosynthesis by Fosmidomycin. *Z. Für Nat. C* 1998, 53, 980–986. [CrossRef]
- Baumeister, S.; Wiesner, J.; Reichenberg, A.; Hintz, M.; Bietz, S.; Harb, O.S.; Roos, D.S.; Kordes, M.; Friesen, J.; Matuschewski, K.; et al. Fosmidomycin Uptake into *Plasmodium* and *Babesia*-Infected Erythrocytes Is Facilitated by Parasite-Induced New Permeability Pathways. *PLoS ONE* 2011, 6, e19334. [CrossRef] [PubMed]
- Chofor, R.; Risseeuw, M.D.P.; Pouyez, J.; Johny, C.; Wouters, J.; Dowd, C.S.; Couch, R.D.; Van Calenbergh, S. Synthetic Fosmidomycin Analogues with Altered Chelating Moieties Do Not Inhibit 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase or *Plasmodium falciparum* Growth in Vitro. *Molecules* 2014, 19, 2571–2587. [CrossRef]
- 17. Iguchi, E.; Okuhara, M.; Kohsaka, M.; Aoki, H.; Imanaka, H. Studies on New Phosphonic Acid Antibiotics. II. Taxonomic Studies on Producing Organisms of the Phosphonic Acid and Related Compounds. J. Antibiot. **1980**, 33, 19–23. [CrossRef]
- Parkinson, E.I.; Erb, A.; Eliot, A.C.; Ju, K.-S.; Metcalf, W.W. Fosmidomycin Biosynthesis Diverges from Related Phosphonate Natural Products. *Nat. Chem. Biol.* 2019, 15, 1049–1056. [CrossRef]
- Eliot, A.C.; Griffin, B.M.; Thomas, P.M.; Johannes, T.W.; Kelleher, N.L.; Zhao, H.; Metcalf, W.W. Cloning, Expression, and Biochemical Characterization of *Streptomyces rubellomurinus* Genes Required for Biosynthesis of Antimalarial Compound FR900098. *Chem. Biol.* 2008, 15, 765–770. [CrossRef]
- 20. Johannes, T.W.; DeSieno, M.A.; Griffin, B.M.; Thomas, P.M.; Kelleher, N.L.; Metcalf, W.W.; Zhao, H. Deciphering the Late Biosynthetic Steps of Antimalarial Compound FR-900098. *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 57–64. [CrossRef]
- 21. Kuroda, Y.; Okuhara, M.; Goto, T.; Okamoto, M.; Terano, H.; Kohsaka, M.; Aoki, H.; Imanaka, H. Studies on New Phosphonic Acid Antibiotics. IV. Structure Determination of FR-33289, FR-31564 and FR-32863. J. Antibiot. 1980, 33, 29–35. [CrossRef]
- 22. Shigi, Y. Inhibition of Bacterial Isoprenoid Synthesis by Fosmidomycin, a Phosphonic Acid-containing Antibiotic. *J. Antimicrob. Chemother.* **1989**, *24*, 131–145. [CrossRef]
- Missinou, M.A.; Borrmann, S.; Schindler, A.; Issifou, S.; Adegnika, A.A.; Matsiegui, P.B.; Binder, R.; Lell, B.; Wiesner, J.; Baranek, T.; et al. Fosmidomycin for Malaria. *Lancet* 2002, 360, 1941–1942. [CrossRef] [PubMed]
- Nair, S.C.; Brooks, C.F.; Goodman, C.D.; Sturm, A.; McFadden, G.I.; Sundriyal, S.; Anglin, J.L.; Song, Y.; Moreno, S.N.; Striepen, B. Apicoplast Isoprenoid Precursor Synthesis and the Molecular Basis of Fosmidomycin Resistance in *Toxoplasma gondii*. J. Exp. Med. 2011, 208, 1547–1559. [CrossRef]
- 25. Armstrong, C.M.; Meyers, D.J.; Imlay, L.S.; Freel Meyers, C.; Odom, A.R. Resistance to the Antimicrobial Agent Fosmidomycin and an FR900098 Prodrug through Mutations in the Deoxyxylulose Phosphate Reductoisomerase Gene (dxr). *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 5511–5519. [CrossRef] [PubMed]
- Ball, H.S.; Girma, M.B.; Zainab, M.; Soojhawon, I.; Couch, R.D.; Noble, S.M. Characterization and Inhibition of 1-Deoxy-d-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase: A Promising Drug Target in *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae*. ACS Infect. Dis. 2021, 7, 2987–2998. [CrossRef] [PubMed]
- Altincicek, B.; Hintz, M.; Sanderbrand, S.; Wiesner, J.; Beck, E.; Jomaa, H. Tools for Discovery of Inhibitors of the 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate (DXP) Synthase and DXP Reductoisomerase: An Approach with Enzymes from the Pathogenic Bacterium *Pseudomonas aeruginosa. FEMS Microbiol. Lett.* 2000, 190, 329–333. [CrossRef]
- Misic, A.M.; Cain, C.L.; Morris, D.O.; Rankin, S.C.; Beiting, D.P.; Fey, P.D. Divergent Isoprenoid Biosynthesis Pathways in *Staphylococcus* Species Constitute a Drug Target for Treating Infections in Companion Animals. *mSphere* 2016, 1, e00258-16. [CrossRef]
- Lange, B.M.; Rujan, T.; Martin, W.; Croteau, R. Isoprenoid Biosynthesis: The Evolution of Two Ancient and Distinct Pathways Across Genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000, 97, 13172–13177. [CrossRef]
- 30. Van Laar, T.A.; Lin, Y.-H.; Miller, C.L.; Karna, S.L.R.; Chambers, J.P.; Seshu, J. Effect of Levels of Acetate on the Mevalonate Pathway of *Borrelia burgdorferi*. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e38171. [CrossRef]
- 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. [CrossRef]
- Mac Sweeney, A.; Lange, R.; Fernandes, R.P.M.; Schulz, H.; Dale, G.E.; Douangamath, A.; Proteau, P.J.; Oefner, C. The Crystal Structure of *E.coli* 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase in a Ternary Complex with the Antimalarial Compound Fosmidomycin and NADPH Reveals a Tight-Binding Closed Enzyme Conformation. *J. Mol. Biol.* 2005, 345, 115–127. [CrossRef]
- 33. Brown, A.C.; Parish, T. Dxr is Essential in *Mycobacterium tuberculosis* and Fosmidomycin Resistance is Due to a Lack of Uptake. *BMC Microbiol.* **2008**, *8*, 1–9. [CrossRef] [PubMed]
- Cai, G.; Deng, L.; Xue, J.; Moreno, S.N.J.; Striepen, B.; Song, Y. Expression, Characterization and Inhibition of *Toxoplasma gondii* 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2013, 23, 2158–2161. [CrossRef] [PubMed]
- 35. Howe, R.; Kelly, M.; Jimah, J.; Hodge, D.; Odom, A.R. Isoprenoid Biosynthesis Inhibition Disrupts *Rab5* Localization and Food Vacuolar Integrity in *Plasmodium falciparum*. *Eukaryot*. *Cell* **2013**, *12*, 215–223. [CrossRef] [PubMed]
- Botté, C.Y.; Dubar, F.; McFadden, G.I.; Maréchal, E.; Biot, C. *Plasmodium falciparum* Apicoplast Drugs: Targets or Off-Targets? *Chem. Rev.* 2012, 112, 1269–1283. [CrossRef] [PubMed]
- 37. Brücher, K.; Gräwert, T.; Konzuch, S.; Held, J.; Lienau, C.; Behrendt, C.; Illarionov, B.; Maes, L.; Bacher, A.; Wittlin, S.; et al. Prodrugs of Reverse Fosmidomycin Analogues. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 2025–2035. [CrossRef]

- He, L.; He, P.; Luo, X.; Li, M.; Yu, L.; Guo, J.; Zhan, X.; Zhu, G.; Zhao, J. The MEP Pathway in *Babesia orientalis* Apicoplast, a Potential Target for Anti-Babesiosis Drug Development. *Parasites Vectors* 2018, 11, 452. [CrossRef]
- Sivakumar, T.; Aboulaila, M.; Khukhuu, A.; Iseki, H.; Alhassan, A.; Yokoyama, N.; Igarashi, I. In Vitro Inhibitory Effect of Fosmidomycin on the Asexual Growth of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. J. Protozool. Res. 2008, 18, 71–78.
- Clastre, M.; Goubard, A.; Prel, A.; Mincheva, Z.; Viaud-Massuart, M.C.; Bout, D.; Rideau, M.; Velge-Roussel, F.; Laurent, F. The Methylerythritol Phosphate Pathway for Isoprenoid Biosynthesis in *Coccidia*: Presence and Sensitivity to Fosmidomycin. *Exp. Parasitol.* 2007, 116, 375–384. [CrossRef]
- San Jose, G.; Jackson, E.R.; Haymond, A.; Johny, C.; Edwards, R.L.; Wang, X.; Brothers, R.C.; Edelstein, E.K.; Odom, A.R.; Boshoff, H.I.; et al. Structure–Activity Relationships of the MEPicides: N-Acyl and O-Linked Analogs of FR900098 as Inhibitors of Dxr from *Mycobacterium tuberculosis* and *Yersinia pestis*. ACS Infect. Dis. 2016, 2, 923–935. [CrossRef]
- 42. Uh, E.; Jackson, E.R.; San Jose, G.; Maddox, M.; Lee, R.E.; Lee, R.E.; Boshoff, H.I.; Dowd, C.S. Antibacterial and Antitubercular Activity of Fosmidomycin, FR900098, and Their Lipophilic Analogs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 6973–6976. [CrossRef]
- Edwards, R.L.; Heueck, I.; Lee, S.G.; Shah, I.T.; Miller, J.J.; Jezewski, A.J.; Mikati, M.O.; Wang, X.; Brothers, R.C.; Heidel, K.M.; et al. Potent, Specific MEPicides for Treatment of Zoonotic *Staphylococci. PLoS Pathog.* 2020, *16*, e1007806. [CrossRef] [PubMed]
- 44. Ropponen, H.-K.; Richter, R.; Hirsch, A.K.H.; Lehr, C.-M. Mastering the Gram-negative Bacterial Barrier—Chemical Approaches to Increase Bacterial Bioavailability of Antibiotics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2021**, *172*, 339–360. [CrossRef] [PubMed]
- Haemers, T.; Wiesner, J.; Poecke, S.V.; Goeman, J.; Henschker, D.; Beck, E.; Jomaa, H.; Calenbergh, S.V. Synthesis of α-Substituted Fosmidomycin Analogues as Highly Potent *Plasmodium falciparum* Growth Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006, *16*, 1888–1891. [CrossRef] [PubMed]
- 46. Fujisaki, S.; Ohnuma, S.; Horiuchi, T.; Takahashi, I.; Tsukui, S.; Nishimura, Y.; Nishino, T.; Kitabatake, M.; Inokuchi, H. Cloning of a Gene from *Escherichia coli* that Confers Resistance to Fosmidomycin as a Consequence of Amplification. *Gene* **1996**, *175*, 83–87. [CrossRef]
- 47. Nishino, K.; Yamaguchi, A. Analysis of a Complete Library of Putative Drug Transporter Genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*. **2001**, *183*, 5803–5812. [CrossRef] [PubMed]
- 48. Sauret-Güeto, S.; Urós, E.M.; Ibáñez, E.; Boronat, A.; Rodríguez-Concepción, M. A Mutant Pyruvate Dehydrogenase E1 Subunit Allows Survival of *Escherichia coli* Strains Defective in 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Synthase. *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 736–740. [CrossRef]
- 49. Perez-Gil, J.; Uros, E.M.; Sauret-Güeto, S.; Lois, L.M.; Kirby, J.; Nishimoto, M.; Baidoo, E.E.; Keasling, J.D.; Boronat, A.; Rodriguez-Concepcion, M. Mutations in *Escherichia coli aceE* and *ribB* Genes Allow Survival of Strains Defective in the First Step of the Isoprenoid Biosynthesis Pathway. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e43775. [CrossRef]
- Messiaen, A.S.; Verbrugghen, T.; Declerck, C.; Ortmann, R.; Schlitzer, M.; Nelis, H.; Van Calenbergh, S.; Coenye, T. Resistance of the *Burkholderia cepacia* Complex to Fosmidomycin and Fosmidomycin Derivatives. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2011, 38, 261–264. [CrossRef]
- Malott, R.J.; Wu, C.-H.; Lee, T.D.; Hird, T.J.; Dalleska, N.F.; Zlosnik, J.E.A.; Newman, D.K.; Speert, D.P. Fosmidomycin Decreases Membrane Hopanoids and Potentiates the Effects of Colistin on *Burkholderia multivorans* Clinical Isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014, 58, 5211–5219. [CrossRef]
- 52. Mackie, R.; McKenney, E.; van Hoek, M. Resistance of *Francisella Novicida* to Fosmidomycin Associated with Mutations in the Glycerol-3-Phosphate Transporter. *Front. Microbiol.* **2012**, *3*, 226. [CrossRef]
- Jawaid, S.; Seidle, H.; Zhou, W.; Abdirahman, H.; Abadeer, M.; Hix, J.H.; van Hoek, M.L.; Couch, R.D. Kinetic Characterization and Phosphoregulation of the *Francisella tularensis* 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase (MEP Synthase). *PLoS* ONE 2009, 4, e8288. [CrossRef] [PubMed]
- Biological and Chemical Terrorism: Strategic Plan for Preparedness and Response. Recommendations of the CDC Strategic Planning Workgroup. MMWR Recomm. Rep. 2000, 49, 1–14.
- 55. Nguyen, V.K.; Parra-Rojas, C.; Hernandez-Vargas, E.A. The 2017 Plague Outbreak in Madagascar: Data Descriptions and Epidemic Modelling. *Epidemics* 2018, 25, 20–25. [CrossRef]
- Haymond, A.; Johny, C.; Dowdy, T.; Schweibenz, B.; Villarroel, K.; Young, R.; Mantooth, C.J.; Patel, T.; Bases, J.; San Jose, G.; et al. Kinetic Characterization and Allosteric Inhibition of the *Yersinia pestis* 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate Reductoisomerase (MEP Synthase). *PLoS ONE* 2014, 9, e106243. [CrossRef] [PubMed]
- 57. Ball, H.S.; Girma, M.; Zainab, M.; Riley, H.; Behrendt, C.T.; Lienau, C.; Konzuch, S.; Avelar, L.A.A.; Lungerich, B.; Soojhawon, I.; et al. Inhibition of the *Yersinia pestis* Methylerythritol Phosphate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis by α-Phenyl-Substituted Reverse Fosmidomycin Analogues. *ACS Omega* **2020**, *5*, 5170–5175. [CrossRef]
- 58. Michalopoulos, A.; Falagas, M.E. Treatment of Acinetobacter Infections. Expert Opin. Pharmacother. 2010, 11, 779–788. [CrossRef] [PubMed]
- 59. Tzouvelekis, L.S.; Markogiannakis, A.; Psichogiou, M.; Tassios, P.T.; Daikos, G.L. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and Other Enterobacteriaceae: An Evolving Crisis of Global Dimensions. *Clin. Microbiol. Rev.* **2012**, *25*, 682–707. [CrossRef]
- 60. Głowińska, A.; Trochimczuk, A.W. Polymer-Supported Phosphoric, Phosphonic and Phosphinic Acids—From Synthesis to Properties and Applications in Separation Processes. *Molecules* **2020**, *25*, 4236. [CrossRef]
- 61. Kuemmerle, H.P.; Murakawa, T.; De Santis, F. Pharmacokinetic Evaluation of Fosmidomycin, a New Phosphonic Acid Antibiotic. *Chemioterapia* **1987**, *6*, 113–119.
- 62. 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. [CrossRef]
- 63. Wiesner, J.; Borrmann, S.; Jomaa, H. Fosmidomycin for the Treatment of Malaria. Parasitol. Res. 2003, 90, S71–S76. [CrossRef] [PubMed]

- Ruangweerayut, R.; Looareesuwan, S.; Hutchinson, D.; Chauemung, A.; Banmairuroi, V.; Na-Bangchang, K. Assessment of the Pharmacokinetics and Dynamics of Two Combination Regimens of Fosmidomycin-Clindamycin in Patients with Acute Uncomplicated *Falciparum* Malaria. *Malar. J.* 2008, 7, 225. [CrossRef] [PubMed]
- 65. Tsuchiya, T.; Ishibashi, K.; Terakawa, M.; Nishiyama, M.; Itoh, N.; Noguchi, H. Pharmacokinetics and Metabolism of Fosmidomycin, a New Phosphonic Acid, in Rats and Dogs. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **1982**, *7*, 59–64. [CrossRef] [PubMed]
- 66. Wiesner, J.; Henschker, D.; Hutchinson, D.B.; Beck, E.; Jomaa, H. In Vitro and In Vivo Synergy of Fosmidomycin, a Novel Antimalarial Drug, with Clindamycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 2889–2894. [CrossRef] [PubMed]
- 67. 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. *Malar. J.* **2007**, *6*, 70. [CrossRef]
- 68. Wiesner, J.; Ziemann, C.; Hintz, M.; Reichenberg, A.; Ortmann, R.; Schlitzer, M.; Fuhst, R.; Timmesfeld, N.; Vilcinskas, A.; Jomaa, H. FR-900098, an Antimalarial Development Candidate that Inhibits the Non-Mevalonate Isoprenoid Biosynthesis Pathway, Shows no Evidence of Acute Toxicity and Genotoxicity. *Virulence* 2016, 7, 718–728. [CrossRef]
- 69. Uppala, R.; Arthanareeswari, M. Determination of Hydroxylamine Genotoxic Impurity by Derivatization in Penicillamine Drug Substance by GCHS-MS. *Mater. Today Proc.* 2021, 34, 506–509. [CrossRef]
- Kuemmerle, H.P.; Murakawa, T.; Soneoka, K.; Konishi, T. Fosmidomycin: A New Phosphonic Acid Antibiotic. Part I: Phase I Tolerance Studies. Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol. 1985, 23, 515–520.
- 71. Wiesner, J.; Reichenberg, A.; Hintz, M.; Ortmann, R.; Schlitzer, M.; Van Calenbergh, S.; Borrmann, S.; Lell, B.; Kremsner, P.G.; Hutchinson, D.; et al. Fosmidomycin as an Antimalarial Agent. In *Isoprenoid Synthesis in Plants and Microorganisms*; Bach, T., Rohmer, M., Eds.; Springer: New York, NY, USA, 2012.
- 72. World Health, O. Guidelines for the Treatment of Malaria, 3rd ed.; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2015.
- Fernandes, J.F.; Lell, B.; Agnandji, S.T.; Obiang, R.M.; Bassat, Q.; Kremsner, P.G.; Mordmüller, B.; Grobusch, M.P. Fosmidomycin as an Antimalarial Drug: A Meta-Analysis of Clinical Trials. *Future Microbiol.* 2015, 10, 1375–1390. [CrossRef]
- 74. Borrmann, S.; Lundgren, I.S.; Oyakhirome, S.; Impouma, B.; Matsiegui, P.; Adegnika, A.; Issifou, S.; Kun, J.; Hutchinson, D.; Wiesner, J.; et al. Fosmidomycin plus Clindamycin for Treatment of Pediatric Patients Aged 1 to 14 Years with *Plasmodium falciparum* Malaria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006, 50, 2713–2718. [CrossRef]
- Lanaspa, M.; Moraleda, C.; Machevo, S.; González, R.; Serrano, B.; Macete, E.; Cisteró, P.; Mayor, A.; Hutchinson, D.; Kremsner, P.G.; et al. Inadequate Efficacy of a New Formulation of Fosmidomycin-Clindamycin Combination in Mozambican Children Less than Three Years Old with Uncomplicated *Plasmodium falciparum* Malaria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012, 56, 2923–2928. [CrossRef] [PubMed]
- 76. Mombo-Ngoma, G.; Remppis, J.; Sievers, M.; Zoleko Manego, R.; Endamne, L.; Kabwende, L.; Veletzky, L.; Nguyen, T.T.; Groger, M.; Lötsch, F.; et al. Efficacy and Safety of Fosmidomycin–Piperaquine as Nonartemisinin-Based Combination Therapy for Uncomplicated *Falciparum* Malaria: A Single-Arm, Age De-Escalation Proof-of-Concept Study in Gabon. *Clin. Infect. Dis.* 2017, 66, 1823–1830. [CrossRef] [PubMed]
- Eberl, M.; Oldfield, E.; Herrmann, T. Immuno-Antibiotics: Targeting Microbial Metabolic Pathways Sensed by Unconventional T Cells. *Immunother. Adv.* 2021, 1, 1–12. [CrossRef] [PubMed]
- 78. Deutsche Malaria Gesellschaft GmbH. DMG Receives Financing from European Union Malaria Fund. Available online: https://www. dmg-deutschemalaria.com/news/eu-malaria-fund-financing/ (accessed on 14 September 2021).
- Zhao, L.; Chang, W.C.; Xiao, Y.; Liu, H.W.; Liu, P. Methylerythritol Phosphate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 2013, 82, 497–530. [CrossRef] [PubMed]
- Kuzuyama, T.; Takahashi, S.; Watanabe, H.; Seto, H. Direct Formation of 2-C-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate from 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase, a New Enzyme in the Non-Mevalonate Pathway to Isopentenyl Diphosphate. *Tetrahedron Lett.* 1998, *39*, 4509–4512. [CrossRef]
- 81. Chellapandi, P.; Prathiviraj, R.; Prisilla, A. Deciphering Structure, Function and Mechanism of *Plasmodium* IspD Homologs from Their Evolutionary Imprints. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2019**, *33*, 419–436. [CrossRef]
- 82. Hoeffler, J.-F.; Tritsch, D.; Grosdemange-Billiard, C.; Rohmer, M. Isoprenoid Biosynthesis via the Methylerythritol Phosphate Pathway. Mechanistic Investigations of the 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase. *Eur. J. Biochem.* 2002, 269, 4446–4457. [CrossRef]
- Wong, U.; Cox, R. The Chemical Mechanism of D-1-Deoxyxylulose-5-Phosphate Reductoisomerase from *Escherichia coli*. Angew. Chem. 2007, 46, 4926–4929. [CrossRef]
- Koppisch, A.T.; Fox, D.T.; Blagg, B.S.J.; Poulter, C.D.E. coli MEP Synthase: Steady-State Kinetic Analysis and Substrate Binding. Biochemistry 2002, 41, 236–243. [CrossRef]
- 85. Proteau, P.J. 1-Deoxy-D-xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase: An Overview. Bioorg. Chem. 2004, 32, 483–493. [CrossRef]
- Argyrou, A.; Blanchard, J.S. Kinetic and Chemical Mechanism of *Mycobacterium tuberculosis* 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate Isomeroreductase. *Biochemistry* 2004, 43, 4375–4384. [CrossRef] [PubMed]
- Singh, N.; Cheve, G.; Avery, M.; McCurdy, C. Targeting the Methyl Erythritol Phosphate (MEP) Pathway for Novel Antimalarial, Antibacterial and Herbicidal Drug Discovery: Inhibition of 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase (DXR) Enzyme. *Curr. Pharm. Des.* 2007, *13*, 1161–1177. [CrossRef] [PubMed]
- 88. The UniProt, C. UniProt: The Universal Protein Knowledgebase in 2021. Nucleic Acids Res. 2021, 49, D480–D489. [CrossRef] [PubMed]

- Johnson, M.; Zaretskaya, I.; Raytselis, Y.; Merezhuk, Y.; McGinnis, S.; Madden, T.L. NCBI BLAST: A Better Web Interface. *Nucleic Acids Res.* 2008, 36, W5–W9. [CrossRef] [PubMed]
- McWilliam, H.; Li, W.; Uludag, M.; Squizzato, S.; Park, Y.M.; Buso, N.; Cowley, A.P.; Lopez, R. Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res.* 2013, 41, W597–W600. [CrossRef] [PubMed]
- 91. Umeda, T.; Tanaka, N.; Kusakabe, Y.; Nakanishi, M.; Kitade, Y.; Nakamura, K.T. Molecular Basis of Fosmidomycin's Action on the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum. Sci. Rep.* **2011**, *1*, 9. [CrossRef] [PubMed]
- 92. Henriksson, L.M.; Unge, T.; Carlsson, J.; Aqvist, J.; Mowbray, S.L.; Jones, T.A. Structures of *Mycobacterium tuberculosis* 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase Provide New Insights into Catalysis. J. Biol. Chem. 2007, 282, 19905–19916. [CrossRef]
- 93. Konzuch, S.; Umeda, T.; Held, J.; Hähn, S.; Brücher, K.; Lienau, C.; Behrendt, C.T.; Gräwert, T.; Bacher, A.; Illarionov, B.; et al. Binding Modes of Reverse Fosmidomycin Analogs Toward the Antimalarial Target IspC. J. Med. Chem. 2014, 57, 8827–8838. [CrossRef]
- 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. [CrossRef]
- Henriksson, L.M.; Björkelid, C.; Mowbray, S.L.; Unge, T. The 1.9 A Resolution Structure of *Mycobacterium tuberculosis* 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase, a Potential Drug Target. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 2006, 62, 807–813. [CrossRef]
- 96. Codd, R. Traversing the coordination chemistry and chemical biology of hydroxamic acids. *Coord. Chem. Rev.* 2008, 252, 1387–1408. [CrossRef]
- Kuntz, L.; Tritsch, D.; Grosdemange-Billiard, C.; Hemmerlin, A.; Willem, A.; Bach, T.J.; Rohmer, M. Isoprenoid Biosynthesis as a Target for Antibacterial and Antiparasitic Drugs: Phosphonohydroxamic Acids as Inhibitors of Deoxyxylulose Phosphate Reducto-Isomerase. *Biochem. J.* 2005, 386, 127–135. [CrossRef] [PubMed]
- Woo, Y.-H.; Fernandes, R.P.M.; Proteau, P.J. Evaluation of Fosmidomycin Analogs as Inhibitors of the Synechocystis sp. PCC6803 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase. *Bioorg. Med. Chem.* 2006, 14, 2375–2385. [CrossRef]
- 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, 3203–3207. [CrossRef]
- 100. Behrendt, C.T.; Kunfermann, A.; Illarionova, V.; Matheeussen, A.; Pein, M.K.; Gräwert, T.; Kaiser, J.; Bacher, A.; Eisenreich, W.; Illarionov, B.; et al. Reverse Fosmidomycin Derivatives Against the Antimalarial Drug Target IspC (Dxr). *J. Med. Chem.* 2011, 54, 6796–6802. [CrossRef]
- 101. Behrendt, C.T.; Kunfermann, A.; Illarionova, V.; Matheeussen, A.; Gräwert, T.; Groll, M.; Rohdich, F.; Bacher, A.; Eisenreich, W.; Fischer, M.; et al. Synthesis and Antiplasmodial Activity of Highly Active Reverse Analogues of the Antimalarial Drug Candidate Fosmidomycin. *ChemMedChem* 2010, 5, 1673–1676. [CrossRef] [PubMed]
- 102. Giessmann, D.; Heidler, P.; Haemers, T.; Van Calenbergh, S.; Reichenberg, A.; Jomaa, H.; Weidemeyer, C.; Sanderbrand, S.; Wiesner, J.; Link, A. Towards New Antimalarial Drugs: Synthesis of Non-Hydrolyzable Phosphate Mimics as Feed for a Predictive QSAR Study on 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase Inhibitors. *Chem. Biodivers.* 2008, *5*, 643–656. [CrossRef]
- Ortmann, R.; Wiesner, J.; Silber, K.; Klebe, G.; Jomaa, H.; Schlitzer, M. Novel Deoxyxylulosephosphate-Reductoisomerase Inhibitors: Fosmidomycin Derivatives with Spacious Acyl Residues. *Arch. Der Pharm.* 2007, 340, 483–490. [CrossRef]
- 104. Andaloussi, M.; Lindh, M.; Björkelid, C.; Suresh, S.; Wieckowska, A.; Iyer, H.; Karlén, A.; Larhed, M. Substitution of the Phosphonic Acid and Hydroxamic Acid Functionalities of the DXR Inhibitor FR900098: An attempt to Improve the Activity Against Mycobacterium Tuberc. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2011, 21, 5403–5407. [CrossRef]
- Mercklé, L.; Andrés-Gómez, A.D.; Dick, B.; Cox, R.; Godfrey, C. A Fragment-Based Approach to Understanding Inhibition of 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase. *ChemBioChem* 2005, *6*, 1866–1874. [CrossRef]
- 106. Adeyemi, C.M.; Faridoon; Isaacs, M.; Mnkandhla, D.; Hoppe, H.C.; Krause, R.W.M.; Kaye, P.T. Synthesis and Antimalarial Activity of N-Benzylated (N-Arylcarbamoyl)alkylphosphonic Acid Derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* 2016, 24, 6131–6138. [CrossRef] [PubMed]
- Bodill, T.; Conibear, A.C.; Blatch, G.L.; Lobb, K.A.; Kaye, P.T. Synthesis and Evaluation of Phosphonated N-Heteroarylcarboxamides as DOXP-Reductoisomerase (DXR) Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 2011, 19, 1321–1327. [CrossRef] [PubMed]
- Bodill, T.; Conibear, A.C.; Mutorwa, M.K.; Goble, J.L.; Blatch, G.L.; Lobb, K.A.; Klein, R.; Kaye, P.T. Exploring DOXP-Reductoisomerase Binding Limits Using Phosphonated N-Aryl and N-Heteroarylcarboxamides as DXR Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 2013, 21, 4332–4341. [CrossRef]
- 109. Kurz, T.; Geffken, D.; Wackendorff, C. Hydroxyurea analogues of Fosmidomycin. Z. Für Nat. 2003, 58, 106–110. [CrossRef]
- Zinglé, C.; Kuntz, L.; Tritsch, D.; Grosdemange-Billiard, C.; Rohmer, M. Modifications Around the Hydroxamic Acid Chelating Group of Fosmidomycin, an Inhibitor of the Metalloenzyme 1-Deoxyxylulose 5-Phosphate Reductoisomerase (DXR). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2012, 22, 6563–6567. [CrossRef] [PubMed]
- Mancini, G.; Bouda, M.; Gamrat, J.M.; Tomsho, J.W. Synthesis and Antimicrobial Evaluation of γ-Borono Phosphonate Compounds in *Escherichia coli* and *Mycobacterium smegmatis*. ACS Omega 2019, 4, 14551–14559. [CrossRef]
- 112. Montel, S.; Midrier, C.; Volle, J.-N.; Braun, R.; Haaf, K.; Willms, L.; Pirat, J.-L.; Virieux, D. Functionalized Phosphanyl-Phosphonic Acids as Unusual Complexing Units as Analogues of Fosmidomycin. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 2012, 3237–3248. [CrossRef]
- 113. Deng, L.; Sundriyal, S.; Rubio, V.; Shi, Z.-Z.; Song, Y. Coordination Chemistry Based Approach to Lipophilic Inhibitors of 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase. J. Med. Chem. 2009, 52, 6539–6542. [CrossRef]

- 114. Masini, T.; Kroezen, B.S.; Hirsch, A.K.H. Druggability of the Enzymes of the Non-Mevalonate-Pathway. *Drug Discov. Today* 2013, 18, 1256–1262. [CrossRef]
- 115. San Jose, G.; Jackson, E.R.; Uh, E.; Johny, C.; Haymond, A.; Lundberg, L.; Pinkham, C.; Kehn-Hall, K.; Boshoff, H.I.; Couch, R.D.; et al. Design of Potential Bisubstrate Inhibitors Against *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase (Dxr)—Evidence of a Novel Binding Mode. *MedChemComm* 2013, 4, 1099–1104. [CrossRef]
- 116. Girma, M.B.; Ball, H.S.; Wang, X.; Brothers, R.C.; Jackson, E.R.; Meyers, M.J.; Dowd, C.S.; Couch, R.D. Mechanism of Action of N-Acyl and N-Alkoxy Fosmidomycin Analogs: Mono- and Bisubstrate Inhibition of IspC from *Plasmodium falciparum*, a Causative Agent of Malaria. ACS Omega 2021, 6, 27630–27639. [CrossRef] [PubMed]
- 117. Jansson, A.M.; Więckowska, A.; Björkelid, C.; Yahiaoui, S.; Sooriyaarachchi, S.; Lindh, M.; Bergfors, T.; Dharavath, S.; Desroses, M.; Suresh, S.; et al. DXR Inhibition by Potent Mono- and Disubstituted Fosmidomycin Analogues. *J. Med. Chem.* 2013, 56, 6190–6199. [CrossRef] [PubMed]
- Hemmi, K.; Takeno, K.; Hashimoto, M.; Kamiya, T. Studies on Phosphonic Acid Antibiotics. IV. Synthesis and Antibacterial Activity of Analogs of 3-(N-Acetyl-N-hydroxyamino)-propylphosphonic Acid (FR-900098). *Chem. Pharm. Bull.* 1982, 30, 111–118. [CrossRef] [PubMed]
- 119. Jackson, E.R.; San Jose, G.; Brothers, R.C.; Edelstein, E.K.; Sheldon, Z.; Haymond, A.; Johny, C.; Boshoff, H.I.; Couch, R.D.; Dowd, C.S. The Effect of Chain Length and Unsaturation on *Mtb* Dxr Inhibition and Antitubercular Killing Activity of FR900098 Analogs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2014, 24, 649–653. [CrossRef]
- 120. Devreux, V.; Wiesner, J.; Jomaa, H.; Van der Eycken, J.; Van Calenbergh, S. Synthesis and Evaluation of α,β-Unsaturated α-Aryl-substituted Fosmidomycin Analogues as DXR Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 4920–4923. [CrossRef]
- 121. Wang, X.; Edwards, R.L.; Ball, H.; Johnson, C.; Haymond, A.; Girma, M.; Manikkam, M.; Brothers, R.C.; McKay, K.T.; Arnett, S.D.; et al. MEPicides: α,β-Unsaturated Fosmidomycin Analogues as DXR Inhibitors against Malaria. *J. Med. Chem.* 2018, 61, 8847–8858. [CrossRef]
- 122. Katayama, N.; Tsubotani, S.; Nozaki, Y.; Harada, S.; Ono, H. Fosfadecin and Fosfocytocin, New Nucleotide Antibiotics Produced by Bacteria. J. Antibiot. 1990, 43, 238–246. [CrossRef]
- 123. Haemers, T.; Wiesner, J.; Giessmann, D.; Verbrugghen, T.; Hillaert, U.; Ortmann, R.; Jomaa, H.; Link, A.; Schlitzer, M.; Van Calenbergh, S. Synthesis of β- and γ-Oxa Isosteres of Fosmidomycin and FR900098 as Antimalarial Candidates. *Bioorg. Med. Chem.* 2008, *16*, 3361–3371. [CrossRef]
- 124. Devreux, V.; Wiesner, J.; Goeman, J.L.; Van der Eycken, J.; Jomaa, H.; Van Calenbergh, S. Synthesis and Biological Evaluation of Cyclopropyl Analogues of Fosmidomycin as Potent Plasmodium falciparum Growth Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 2656–2660. [CrossRef]
- 125. Haemers, T.; Wiesner, J.; Busson, R.; Jomaa, H.; Van Calenbergh, S. Synthesis of α-Aryl-Substituted and Conformationally Restricted Fosmidomycin Analogues as Promising Antimalarials. *Eur. J. Org. Chem.* 2006, 2006, 3856–3863. [CrossRef]
- Kurz, T.; Schlueter, K.; Pein, M.; Behrendt, C.T.; Bergmann, B.; Walter, R.D. Conformationally Restrained Aromatic Analogues of Fosmidomycin and FR900098. Arch. Der Pharm. 2007, 340, 339–344. [CrossRef] [PubMed]
- 127. Verbrugghen, T.; Cos, P.; Maes, L.; Van Calenbergh, S. Synthesis and Evaluation of α-Halogenated Analogues of 3-(Acetylhydroxyamino)propylphosphonic Acid (FR900098) as Antimalarials. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 5342–5346. [CrossRef] [PubMed]
- 128. Andaloussi, M.; Henriksson, L.M.; Więckowska, A.; Lindh, M.; Björkelid, C.; Larsson, A.M.; Suresh, S.; Iyer, H.; Srinivasa, B.R.; Bergfors, T.; et al. 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. [CrossRef] [PubMed]
- Nordqvist, A.; Björkelid, C.; Andaloussi, M.; Jansson, A.M.; Mowbray, S.L.; Karlén, A.; Larhed, M. Synthesis of Functionalized Cinnamaldehyde Derivatives by an Oxidative Heck Reaction and their Use as Starting Materials for Preparation of *Mycobacterium tuberculosis* 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase Inhibitors. J. Org. Chem. 2011, 76, 8986–8998. [CrossRef] [PubMed]
- 130. Devreux, V.; Wiesner, J.; Jomaa, H.; Rozenski, J.; Van der Eycken, J.; Van Calenbergh, S. Divergent Strategy for the Synthesis of α-Aryl-Substituted Fosmidomycin Analogues. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 3783–3789. [CrossRef] [PubMed]
- 131. Schlüter, K.; Walter, R.D.; Bergmann, B.; Kurz, T. Arylmethyl Substituted Derivatives of Fosmidomycin: Synthesis and Antimalarial Activity. *Eur. J. Med. Chem.* 2006, *41*, 1385–1397. [CrossRef] [PubMed]
- 132. Kurz, T.; Geffken, D.; Kaula, U. Phosphororganische Verbindungen und deren Verwendung. DE10356410A1, 23 June 2005.
- 133. Kurz, T.; Schlüter, K.; Kaula, U.; Bergmann, B.; Walter, R.D.; Geffken, D. Synthesis and Antimalarial Activity of Chain Substituted Pivaloyloxymethyl Ester Analogues of Fosmidomycin and FR900098. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 5121–5135. [CrossRef] [PubMed]
- 134. Perruchon, J.; Ortmann, R.; Altenkämper, M.; Silber, K.; Wiesner, J.; Jomaa, H.; Klebe, G.; Schlitzer, M. Studies Addressing the Importance of Charge in the Binding of Fosmidomycin-like Molecules to Deoxyxylulosephosphate Reductoisomerase. *ChemMedChem* **2008**, *3*, 1232–1241. [CrossRef]
- 135. Dreneau, A.; Krebs, F.S.; Munier, M.; Ngov, C.; Tritsch, D.; Lièvremont, D.; Rohmer, M.; Grosdemange-Billiard, C. α,α-Difluorophosphonohydroxamic Acid Derivatives Among the Best Antibacterial Fosmidomycin Analogues. *Molecules* 2021, 26, 5111. [CrossRef] [PubMed]
- 136. Chekan, J.R.; Cogan, D.P.; Nair, S.K. Molecular Basis for Resistance Against Phosphonate Antibiotics and Herbicides. *MedChem-Comm* 2016, 7, 28–36. [CrossRef]

- Verbrugghen, T.; Vandurm, P.; Pouyez, J.; Maes, L.; Wouters, J.; Van Calenbergh, S. Alpha-Heteroatom Derivatized Analogues of 3-(Acetylhydroxyamino)propyl Phosphonic Acid (FR900098) as Antimalarials. J. Med. Chem. 2013, 56, 376–380. [CrossRef] [PubMed]
- 138. Kunfermann, A.; Lienau, C.; Illarionov, B.; Held, J.; Gräwert, T.; Behrendt, C.T.; Werner, P.; Hähn, S.; Eisenreich, W.; Riederer, U.; et al. IspC as Target for Antiinfective Drug Discovery: Synthesis, Enantiomeric Separation, and Structural Biology of Fosmidomycin Thia Isosters. J. Med. Chem. 2013, 56, 8151–8162. [CrossRef] [PubMed]
- 139. 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. [CrossRef] [PubMed]
- 140. Steinbacher, S.; Kaiser, J.; Eisenreich, W.; Huber, R.; Bacher, A.; Rohdich, F. Structural Basis of Fosmidomycin Action Revealed by the Complex with 2-C-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate Synthase (IspC). Implications for the Catalytic Mechanism and Anti-Malaria Drug Development. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 18401–18407. [CrossRef]
- 141. 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 Gosmidomycin. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 2007, 63, 466–470. [CrossRef]
- 142. Brücher, K.; Illarionov, B.; Held, J.; Tschan, S.; Kunfermann, A.; Pein, M.K.; Bacher, A.; Gräwert, T.; Maes, L.; Mordmüller, B.; et al. α-Substituted β-Oxa Isosteres of Fosmidomycin: Synthesis and Biological Evaluation. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 6566–6575. [CrossRef]
- 143. Lienau, C.; Gräwert, T.; Alves Avelar, L.A.; Illarionov, B.; Held, J.; Knaab, T.C.; Lungerich, B.; van Geelen, L.; Meier, D.; Geissler, S.; et al. Novel Reverse Thia-Analogs of Fosmidomycin: Synthesis and Antiplasmodial Activity. *Eur. J. Med. Chem.* 2019, 181, 111555. [CrossRef]
- 144. Adeyemi, C.M.; Hoppe, H.C.; Isaacs, M.; Klein, R.; Lobb, K.A.; Kaye, P.T. Synthesis of N-Substituted Phosphoramidic Acid Esters as "Reverse" Fosmidomycin Analogues. *Tetrahedron* 2019, 75, 2371–2378. [CrossRef]
- 145. Chofor, R.; Sooriyaarachchi, S.; Risseeuw, M.D.P.; Bergfors, T.; Pouyez, J.; Johny, C.; Haymond, A.; Everaert, A.; Dowd, C.S.; Maes, L.; et al. Synthesis and Bioactivity of β-Substituted Fosmidomycin Analogues Targeting 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase. J. Med. Chem. 2015, 58, 2988–3001. [CrossRef]
- 146. Sooriyaarachchi, S.; Chofor, R.; Risseeuw, M.D.P.; Bergfors, T.; Pouyez, J.; Dowd, C.S.; Maes, L.; Wouters, J.; Jones, T.A.; Van Calenbergh, S.; et al. Targeting an Aromatic Hotspot in *Plasmodium falciparum* 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase with β-Arylpropyl Analogues of Fosmidomycin. *ChemMedChem* 2016, *11*, 2024–2036. [CrossRef]
- 147. Munier, M.; Tritsch, D.; Krebs, F.; Esque, J.; Hemmerlin, A.; Rohmer, M.; Stote, R.H.; Grosdemange-Billiard, C. Synthesis and Biological Evaluation of Phosphate Isosters of Fosmidomycin and Analogs as Inhibitors of *Escherichia coli* and *Mycobacterium smegmatis* 1-Deoxyxylulose 5-Phosphate Reductoisomerases. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 684–689. [CrossRef] [PubMed]
- 148. Meyer, O.; Grosdemange-Billiard, C.; Tritsch, D.; Rohmer, M. Isoprenoid Biosynthesis via the MEP Pathway. Synthesis of (3R,4S)-3,4-Dihydroxy-5-Oxohexylphosphonic Acid, an Isosteric Analogue of 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate, the Substrate of the 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Reducto-isomerase. Org. Biomol. Chem. 2003, 1, 4367–4372. [CrossRef] [PubMed]
- 149. Freeman, S.; Ross, K.C. 3 Prodrug Design for Phosphates and Phosphonates. In *Progress in Medicinal Chemistry*; Ellis, G.P., Luscombe, D.K., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1997; Volume 34, pp. 111–147.
- 150. Krise, J.P.; Stella, V.J. Prodrugs of Phosphates, Phosphonates, and Phosphinates. Adv. Drug Deliv. Rev. 1996, 19, 287–310. [CrossRef]
- 151. Kurz, T.; Geffken, D.; Wackendorff, C. Carboxylic Acid Analogues of Fosmidomycin. Z. Für Nat. 2003, 58, 457–461. [CrossRef]
- 152. Nguyen-Trung, A.T.; Tritsch, D.; Grosdemange-Billiard, C.; Rohmer, M. Synthesis of Tetrazole Analogues of Phosphonohydroxamic Acids: An Attempt to Improve the Inhibitory Activity Against the DXR. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 1643–1647. [CrossRef]
- 153. Macchiarulo, A.; Pellicciari, R. Exploring the Other Side of Biologically Relevant Chemical Space: Insights into Carboxylic, Sulfonic and Phosphonic Acid Bioisosteric Relationships. J. Mol. Graph. Model. 2007, 26, 728–739. [CrossRef]
- Gadakh, B.; Pouyez, J.; Wouters, J.; Venkatesham, A.; Cos, P.; Van Aerschot, A. N-Acylated Sulfonamide Congeners of Fosmidomycin Lack Any Inhibitory Activity Against DXR. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2015, 25, 1577–1579. [CrossRef]
- 155. Island, M.D.; Wei, B.Y.; Kadner, R.J. Structure and Function of the *uhp* Genes for the Sugar Phosphate Transport System in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **1992**, 174, 2754–2762. [CrossRef]
- 156. Lemieux, M.J.; Huang, Y.; Wang, D.-N. Glycerol-3-Phosphate Transporter of *Escherichia coli:* Structure, Function and Regulation. *Res. Microbiol.* **2004**, 155, 623–629. [CrossRef]
- 157. Sakamoto, Y.; Furukawa, S.; Ogihara, H.; Yamasaki, M. Fosmidomycin Resistance in Adenylate Cyclase Deficient (cya) Mutants of *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2003**, *67*, 2030–2033. [CrossRef]
- 158. Hemmerlin, A.; Tritsch, D.; Hammann, P.; Rohmer, M.; Bach, T.J. Profiling of Defense Responses in *Escherichia coli* Treated with Fosmidomycin. *Biochimie* 2014, 99, 54–62. [CrossRef] [PubMed]
- 159. Halpern, L. The Transfer of Inorganic Phosphorous Across the Red Cell Membrane. J. Biol. Chem. 1936, 114, 747–770. [CrossRef]
- 160. Leibman, K.C.; Heidelberger, C. The Metabolism of P³²-Labelled Ribonucleotides in Tissue Slices and Cell. *J. Biol. Chem.* **1955**, *216*, 823–830. [CrossRef] [PubMed]
- 161. Wiemer, A.J. Metabolic Efficacy of Phosphate Prodrugs and the Remdesivir Paradigm. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* **2020**, *3*, 613–626. [CrossRef]
- 162. De Clercq, E. Tenofovir Alafenamide (TAF) as the Successor of Tenofovir Disoproxil Fumarate (TDF). *Biochem. Pharmacol.* **2016**, 119, 1–7. [CrossRef]
- 163. Hostetler, K.Y. Alkoxyalkyl Prodrugs of Acyclic Nucleoside Phosphonates Enhance Oral Antiviral Activity and Reduce Toxicity: Current State of the Art. *Antivir. Res.* **2009**, *82*, A84–A98. [CrossRef]

- 164. Spinner, C.D.; Gottlieb, R.L.; Criner, G.J.; Arribas López, J.R.; Cattelan, A.M.; Soriano Viladomiu, A.; Ogbuagu, O.; Malhotra, P.; Mullane, K.M.; Castagna, A.; et al. Effect of Remdesivir vs Standard Care on Clinical Status at 11 Days in Patients With Moderate COVID-19: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 2020, 324, 1048–1057. [CrossRef]
- 165. Goldman, J.D.; Lye, D.C.B.; Hui, D.S.; Marks, K.M.; Bruno, R.; Montejano, R.; Spinner, C.D.; Galli, M.; Ahn, M.Y.; Nahass, R.G.; et al. Remdesivir for 5 or 10 Days in Patients with Severe COVID-19. N. Engl. J. Med. 2020, 383, 1827–1837. [CrossRef]
- Smolders, E.J.; Jansen, A.M.E.; Ter Horst, P.G.J.; Rockstroh, J.; Back, D.J.; Burger, D.M. Viral Hepatitis C Therapy: Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Considerations: A 2019 Update. *Clin. Pharmacokinet.* 2019, 58, 1237–1263. [CrossRef]
- Kirby, B.J.; Symonds, W.T.; Kearney, B.P.; Mathias, A.A. Pharmacokinetic, Pharmacodynamic, and Drug-Interaction Profile of the Hepatitis C Virus NS5B Polymerase Inhibitor Sofosbuvir. *Clin. Pharmacokinet.* 2015, 54, 677–690. [CrossRef]
- 168. Scott, L.J.; Chan, H.L.Y. Tenofovir Alafenamide: A Review in Chronic Hepatitis B. Drugs 2017, 77, 1017–1028. [CrossRef] [PubMed]
- 169. Agarwal, K.; Fung, S.K.; Nguyen, T.T.; Cheng, W.; Sicard, E.; Ryder, S.D.; Flaherty, J.F.; Lawson, E.; Zhao, S.; Subramanian, G.M.; et al. Twenty-Eight Day Safety, Antiviral Activity, and Pharmacokinetics of Tenofovir Alafenamide for Treatment of Chronic Hepatitis B Infection. J. Hepatol. 2015, 62, 533–540. [CrossRef] [PubMed]
- 170. Mackman, R.L. Anti-HIV Nucleoside Phosphonate GS-9148 and Its Prodrug GS-9131: Scale Up of a 2'-F Modified Cyclic Nucleoside Phosphonate and Synthesis of Selected Amidate Prodrugs. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* 2014, 56, 10–14. [CrossRef] [PubMed]
- 171. Reichenberg, A.; Wiesner, J.; Weidemeyer, C.; Dreiseidler, E.; Sanderbrand, S.; Altincicek, B.; Beck, E.; Schlitzer, M.; Jomaa, H. Diaryl Ester Prodrugs of FR900098 with Improved in Vivo Antimalarial Activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2001, *11*, 833–835. [CrossRef] [PubMed]
- 172. Wiesner, J.; Ortmann, R.; Jomaa, H.; Schlitzer, M. Double Ester Prodrugs of FR900098 Display Enhanced in-Vitro Antimalarial Activity. *Arch. Der Pharm.* 2007, 340, 667–669. [CrossRef]
- 173. Ortmann, R.; Wiesner, J.; Reichenberg, A.; Henschker, D.; Beck, E.; Jomaa, H.; Schlitzer, M. Acyloxyalkyl Ester Prodrugs of FR900098 With Improved in Vivo Anti-Malarial Activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2003, 13, 2163–2166. [CrossRef]
- 174. Ortmann, R.; Wiesner, J.; Reichenberg, A.; Henschker, D.; Beck, E.; Jomaa, H.; Schlitzer, M. Alkoxycarbonyloxyethyl Ester Prodrugs of FR900098 With Improved in vivo Antimalarial Activity. *Arch. Der Pharm.* **2005**, *338*, 305–314. [CrossRef]
- 175. Courtens, C.; Risseeuw, M.; Caljon, G.; Cos, P.; Van Calenbergh, S. Acyloxybenzyl and Alkoxyalkyl Prodrugs of a Fosmidomycin Surrogate as Antimalarial and Antitubercular Agents. *ACS Med. Chem. Lett.* **2018**, *9*, 986–989. [CrossRef]
- 176. Jackson, E.R.; Dowd, C.S. Inhibition of 1-Deoxy-D-Xylulose-5-phosphate Reductoisomerase (Dxr): A Review of the Synthesis and Biological Evaluation of Recent Inhibitors. *Curr. Top. Med. Chem.* **2012**, *12*, 706–728. [CrossRef]
- 177. Ponaire, S.; Zinglé, C.; Tritsch, D.; Grosdemange-Billiard, C.; Rohmer, M. Growth Inhibition of *Mycobacterium smegmatis* by Prodrugs of Deoxyxylulose Phosphate Reducto-Isomerase Inhibitors, Promising Anti-Mycobacterial Agents. *Eur. J. Med. Chem.* 2012, 51, 277–285. [CrossRef]
- 178. Liu, J.; Barry, C.E., III; Besra, G.S.; Nikaido, H. Mycolic Acid Structure Determines the Fluidity of the Mycobacterial Cell Wall. J. Biol. Chem. **1996**, 271, 29545–29551. [CrossRef]
- 179. Edwards, R.L.; Brothers, R.C.; Wang, X.; Maron, M.I.; Ziniel, P.D.; Tsang, P.S.; Kraft, T.E.; Hruz, P.W.; Williamson, K.C.; Dowd, C.S.; et al. MEPicides: Potent Antimalarial Prodrugs Targeting Isoprenoid Biosynthesis. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 8400. [CrossRef] [PubMed]
- Faísca Phillips, A.M.; Nogueira, F.; Murtinheira, F.; Barros, M.T. Synthesis and Antimalarial Evaluation of Prodrugs of Novel Fosmidomycin Analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2015, 25, 2112–2116. [CrossRef] [PubMed]
- 181. Courtens, C.; Risseeuw, M.; Caljon, G.; Maes, L.; Cos, P.; Martin, A.; Van Calenbergh, S. Double Prodrugs of a Fosmidomycin Surrogate as Antimalarial and Antitubercular Agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2019**, *29*, 1232–1235. [CrossRef] [PubMed]
- Courtens, C.; Risseeuw, M.; Caljon, G.; Maes, L.; Martin, A.; Van Calenbergh, S. Amino Acid Based Prodrugs of a Fosmidomycin Surrogate as Antimalarial and Antitubercular Agents. *Bioorg. Med. Chem.* 2019, 27, 729–747. [CrossRef] [PubMed]
- Courtens, C.; Risseeuw, M.; Caljon, G.; Cos, P.; Martin, A.; Van Calenbergh, S. Phosphonodiamidate Prodrugs of N-Alkoxy Analogs of a Fosmidomycin Surrogate as Antimalarial and Antitubercular Agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2019, 29, 1051–1053. [CrossRef] [PubMed]
- Munier, M.; Tritsch, D.; Lièvremont, D.; Rohmer, M.; Grosdemange-Billiard, C. Synthesis and Biological Evaluation of Aryl Phosphoramidate Prodrugs of Fosfoxacin and its Derivatives. *Bioorg. Chem.* 2019, *89*, 103012. [CrossRef]
- 185. Langel, Ü. Cell-Penetrating Peptides: Processes and Applications; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2002; p. 424.
- Pujals, S.; Fernández-Carneado, J.; López-Iglesias, C.; Kogan, M.J.; Giralt, E. Mechanistic Aspects of CPP-Mediated Intracellular Drug Delivery: Relevance of CPP Self-Assembly. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 2006, 1758, 264–279. [CrossRef]
- 187. Kamena, F.; Monnanda, B.; Makou, D.; Capone, S.; Patora-Komisarska, K.; Seebach, D. On the Mechanism of Eukaryotic Cell Penetration by α- and β-Oligoarginines—Targeting Infected Erythro cytes. *Chem. Biodivers.* 2011, *8*, 1–12. [CrossRef]
- 188. Samuel, B.U.; Hearn, B.; Mack, D.; Wender, P.; Rothbard, J.; Kirisits, M.J.; Mui, E.; Wernimont, S.; Roberts, C.W.; Muench, S.P.; et al. Delivery of Antimicrobials into Parasites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, 100, 14281–14286. [CrossRef]
- Chadwick, J.; Jones, M.; Mercer, A.E.; Stocks, P.A.; Ward, S.A.; Park, B.K.; O'Neill, P.M. Design, Synthesis and Antimalarial/Anticancer Evaluation of Spermidine Linked Artemisinin Conjugates Designed to Exploit Polyamine Transporters in *Plasmodium falciparum* and HL-60 Cancer Cell Lines. *Bioorg.Med. Chem.* 2010, 18, 2586–2597. [CrossRef] [PubMed]
- 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. [CrossRef] [PubMed]

- Zinglé, C.; Tritsch, D.; Grosdemange-Billiard, C.; Rohmer, M. Catechol-Rhodanine Derivatives: Specific and Promiscuous Inhibitors of Escherichia coli Deoxyxylulose Phosphate Reductoisomerase (DXR). Bioorg. Med. Chem. 2014, 22, 3713–3719. [CrossRef]
- Adeyemi, C.M.; Hoppe, H.C.; Isaacs, M.; Mnkandhla, D.; Lobb, K.A.; Klein, R.; Kaye, P.T. Synthesis and Anti-Parasitic Activity of N-Benzylated Phosphoramidate Mg²⁺-Chelating Ligands. *Bioorg. Chem.* 2020, 105, 104280. [CrossRef]
- 194. Hui, X.; Yue, Q.; Zhang, D.D.; Li, H.; Yang, S.Q.; Gao, W.Y. Antimicrobial Mechanism of Theaflavins: They Target 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase, the Key Enzyme of the MEP Terpenoid Biosynthetic Pathway. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 38945. [CrossRef]
- 195. Haymond, A.; Dowdy, T.; Johny, C.; Johnson, C.; Ball, H.; Dailey, A.; Schweibenz, B.; Villarroel, K.; Young, R.; Mantooth, C.J.; et al. A High-Throughput Screening Campaign to Identify Inhibitors of DXP Reductoisomerase (IspC) and MEP Cytidylyltransferase (IspD). Anal. Biochem. 2018, 542, 63–75. [CrossRef]

Over 40 years of fosmidomycin drug research: A comprehensive review and future opportunities

- Supporting information -

Talea Knak, Mona A. Abdullaziz, Stefan Höfmann, Leandro A. Alves Avelar, Saskia Klein, Matthew Martin, Adelbert Bacher, Markus Fischer, Nobutada Tanaka and Thomas Kurz

Table S1: Antiparasitic and antibiotic data of fosmidomycin (1) and FR900098 (2) obtained from enzyme assays and growth inhibition assays

	Fosmidomycin (1)		FR900098 (2)		
	DXR IC ₅₀ ^a	Whole-cell MIC ^b	DXR IC ₅₀ ^a	Whole-cell MIC ^b	
Plasmodium		$IC_{11} = 0.81 \text{ m}\text{M}^{1}$		$IC_{11} = 0.16 \text{ m}\text{M}^{1}$	
falciparum Dd2	0.16 µM*1	$1C_{50} = 0.81 \ \mu \text{M}^2$	0.015M*l	$1C_{50} - 0.10 \mu WI^2$	
Plasmodium	0.10 µW	$IC_{50} = 0.88 \ \mu M^1$	0.015 µW	$IC_{50} = 0.16 \text{ u}\text{M}^{1}$	
falciparum 3D7				1030 0.10 µm	
Toxoplasma gondii	$K_i = 0.090 \ \mu M^{*2}$	32% growth inhibition at 2.5	$K_i = 0.048 \ \mu M^{*2}$		
		20% growth			
Fimeria tenella		inhibition at 3.3			
Limeria ieneita		mM^3			
Svnechocystis sp.	$K_i = 4 n M^{**4}$		$K_i = 2 n M^{**4}$		
		Gram (+)		1	
Bacillus anthracis		$0.78 \mu g/ml^5$		$50 \ \mu g/ml^5$	
Bacillus subtilis		0.16			
(wild strain)		8 mM ^o			
Enterococcus		$> 200 a/m^{15}$		$> 200 a/m^{15}$	
faecalis		> 200 µg/ml		> 200 µg/ml	
Mycobacterium	$0.31 \text{ u}\text{M}^7$	$> 500 \mu a/m^{15}$	2 91 µM ⁸	$> 500 \mu g/m^{15}$	
tuberculosis	0.51 µlvi	> 500 µg/III	2.91 µW	> 500 µg/III	
Staphylococcus		$> 200 \mu g/ml^5$		$> 200 \mu g/ml^5$	
aureus (MSSA)		· 200 µg/mi		· 200 µg/iii	
S. aureus (MRSA)		200 μg/ml ⁵		50 μg/ml ⁵	
Staphylococcus		n.i. ¹⁰			
epidermidis					
Staphylococcus		n.i. ¹⁰			
iudgenensis					
Staphylococcus		$0.5 - 1 \ \mu g/ml^{10}$			
Stankylococcus					
schleiferi		0.5 -8 μg/ml ¹⁰			
senierjeri		Gram (-)			
Acinetobacter					
baumannii	46.8 nM^{11}	$> 512 \ \mu g/ml^{11}$	23.9 nM^{11}	$128 - > 512 \ \mu g/ml^{11}$	
Burkholderia				256 / 112	
cepacia LMG 1222		$> 512 \ \mu g/ml^{12}$		$256 \mu g/m^{12}$	
Burkholderia					
multivorans LMG		$> 512 \ \mu g/ml^{12}$		256 µg/ml ¹²	
13010				_	
Burkholderia					
cenocepacia LMG		$> 512 \ \mu g/ml^{12}$		$> 512 \ \mu g/ml^{12}$	
16656					
E. coli K12	0.03 μM* ¹³	$> 12.5 \mu g/ml^{5}$	0.03 μM* ¹³	200 µg/ml ⁵	
E.coli tolc		$> 6.25 \ \mu g/ml^{2}$		12.5 μg/ml ⁵	
Francisella	247 nM ¹⁴		230 nM ¹⁴		
tularensis		126 3 514		254 3514	
Francisella		136 µM ¹⁴		234 μM ¹⁴	

novicida				
Pseudomonas aeruginosa	150 nM ⁹		150 nM ⁹	
Klebsiella pneumoniae	20.2 nM ¹¹	$64 - 128 \ \mu g/ml^{11}$	23.1 nM ¹¹	256 µg/ml ¹¹
Yersinia pestis	710 nM ¹⁵	128 µg/ml ¹⁶	231 nM ¹⁵	

^a IC₅₀ values for enzyme assays are given unless denoted otherwise ^b MIC (minimum inhibitory concentration) values for whole cell assays are given unless denoted otherwise * recombinant enzyme ** listed value obtained by preincubation studies

n.i. = no inhibition

Table S2: Existing co-crystal structures of DXR enzymes

Organism	PDB ID	Co-crystallized elements	Publication year	
	400F	NADPH, 1, Mn ²⁺	2014	
	3ZHZ	DXRi,		
	3ZI0	DXRi, Mn ²⁺	2013	
	3ZHX	DXRi, Mn ²⁺		
	3ZHY	DXRi, NADPH, Mn ²⁺		
	2Y1C	Mn ²⁺		
	2Y1D	DXRi, Mn ²⁺	-	
	2Y1E	Mn ²⁺	2011	
	2Y1F	NADPH, DXRi, Mn ²⁺		
	2Y1G	DXR, Mn ²⁺		
Muchaeterium tuberculosis	2JCV	NADPH, 1		
Mycobucierium iuberculosis	2JCX	NADPH, 1		
	2JCY	None	2007	
	2JD0	NADPH	2007	
	2JD1	NADPH, Mn ²⁺		
	2JD2	Mn ²⁺		
	2C82	None	2006	
	4AIC	NADPH, 1 , Mn ²⁺	2012	
	4RCV	NADPH, Mn ²⁺	2015	
	4A03	NADPH, 2 , Mn ²⁺	2012	
	3RAS	NADPH, DXRi, Mn ²⁺	2011	
	3AU8	Mn ²⁺ , NADPH	2011	
	3AU9	Mg ²⁺ , NADPH, 1		
	3AUA	Mg ²⁺ , NADPH, 2		
	4Y67	DXRi, Mn ²⁺		
	4Y6S	DXRi, Mn ²⁺	2015	
	4Y6R	DXRi, Mn ²⁺	2015	
	4Y6P	DXRi, Mn ²⁺		
	3WQS	NADPH, DXRi, Mg ²⁺	2014	
	3WQR	NADPH, DXRi, Mg ²⁺		
	3WQQ	NADPH, DXRi, Mg2 ⁺		
Plasmodium falciparum	5JMP	DXRi, Mn ²⁺	2016	
	5JO0	DXRi, Mn ²⁺		
	5JNL	DXRi, Mn ²⁺		
	5JBI	DXRi, Mn ²⁺		
	5JC1	DXRi, Mn ²⁺		
	5JAZ	DXRi, Mn ²⁺		
	5JMW	DXRi, Mn ²⁺		
	4QJB	Mg ²⁺	2014	
	4GAE	DXRi, NADPH, Mn ²⁺	2013	
	4KP7	DXRi, NADPH, Mn ²⁺	2013	
	4QOX	Mg ²⁺ , DXRi	2014	

Organism	PDB ID	Co-crystallized elements	Publication year	
	2EGH	NADPH, 1, Mg ⁺²	2007	
	3ANL	NADPH, DXRi	2011	
	3ANM	NADPH, DXRi		
	3ANN	NADPH, DXRi		
	1Q0L	NADPH, 1		
Facherichia coli	1Q0Q NADPH, DXP		2004	
Escherichia coli	1Q0H	NADPH, 1		
	1T1R	DXRi	2004	
	1T1S	DXRi, Mg ²⁺	2004	
	1K5H	None	2002	
	3R0I	DXRi, Mn ²⁺	2011	
	1JVS	NADPH	2002	
Zumanan ga mahilig	1R0K	None	2004	
Zymomonas mobilis	1R0L	NADPH	2004	
The own at a game we avitime a	3A06	NADPH, 1, Mg ²⁺	2010	
Thermologa marilima	3A14	NADPH, Mg ²⁺	2010	
Varsinia pastis	3IIE	Mg^{2+}	2009	
i ersinia pestis	5DUL	NADPH	2015	
	6MH4	None	2020	
Staphylococcus schleiferi	6MH5	1	2020	
	3UPY	1 , Mg ²⁺		
Brucella abortus	3UPL	Mg^{2+}	2012	
	4ZN6	None	2015	
Acinetobacter baumannii	7S04	NADPH, Mg ²⁺ , 2	2021	
	4ZQE	None	2016	
	4ZQF	Mg ²⁺ , 1		
Moraxella catarrhalis	4ZQH	NADPH, Mg ²⁺ , 1		
	4ZQG	NADPH, Mg ²⁺ , 1		
	5KRR	Mn ²⁺		
	5KS1	Mn ²⁺	2017	
Vibrio vulnificus	5KRV	Arginine		
, , , , , , , , , , , , , , , , , , ,	5KRY	None		
	5KQO	None		

References

(1) Brücher, K.; Gräwert, T.; Konzuch, S.; Held, J.; Lienau, C.; Behrendt, C.; Illarionov, B.; Maes, L.; Bacher, A.; Wittlin, S.; et al. Prodrugs of Reverse Fosmidomycin Analogues. *Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, *58* (4), 2025-2035. DOI: 10.1021/jm5019719.

(2) Cai, G.; Deng, L.; Xue, J.; Moreno, S. N. J.; Striepen, B.; Song, Y. Expression, characterization and inhibition of Toxoplasma gondii 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate reductoisomerase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2013**, 23 (7), 2158-2161. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.01.097.

(3) Clastre, M.; Goubard, A.; Prel, A.; Mincheva, Z.; Viaud-Massuart, M. C.; Bout, D.; Rideau, M.; Velge-Roussel, F.; Laurent, F. The methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in coccidia: presence and sensitivity to fosmidomycin. *Exp Parasitol* **2007**, *116* (4), 375-384. DOI: 10.1016/j.exppara.2007.02.002 From NLM.

(4) Woo, Y.-H.; Fernandes, R. P. M.; Proteau, P. J. Evaluation of fosmidomycin analogs as inhibitors of the Synechocystis sp. PCC6803 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2006**, *14* (7), 2375-2385. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.11.012.

(5) Uh, E.; Jackson, E. R.; San Jose, G.; Maddox, M.; Lee, R. E.; Lee, R. E.; Boshoff, H. I.; Dowd, C. S. Antibacterial and antitubercular activity of fosmidomycin, FR900098, and their lipophilic analogs. *Bioorg Med Chem Lett* **2011**, *21* (23), 6973-6976. DOI: 10.1016/j.bmcl.2011.09.123 PubMed.

(6) Sivy, T. L.; Fall, R.; Rosenstiel, T. N. Evidence of isoprenoid precursor toxicity in Bacillus subtilis. *Biosci Biotechnol Biochem* **2011**, *75* (12), 2376-2383. DOI: 10.1271/bbb.110572 From NLM.

(7) Dhiman, R. K.; Schaeffer, M. L.; Bailey, A. M.; Testa, C. A.; Scherman, H.; Crick, D. C. 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase (IspC) from *Mycobacterium tuberculosis*: towards Understanding Mycobacterial Resistance to Fosmidomycin. *Journal of Bacteriology* **2005**, *187* (24), 8395-8402. DOI: doi:10.1128/JB.187.24.8395-8402.2005.

(8) San Jose, G.; Jackson, E. R.; Haymond, A.; Johny, C.; Edwards, R. L.; Wang, X.; Brothers, R. C.; Edelstein, E. K.; Odom, A. R.; Boshoff, H. I.; et al. Structure–Activity Relationships of the MEPicides: N-Acyl and O-Linked Analogs of FR900098 as Inhibitors of Dxr from Mycobacterium tuberculosis and Yersinia pestis. *ACS Infectious Diseases* **2016**, 2 (12), 923-935. DOI: 10.1021/acsinfecdis.6b00125.

(9) Altincicek, B.; Hintz, M.; Sanderbrand, S.; Wiesner, J.; Beck, E.; Jomaa, H. Tools for discovery of inhibitors of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) synthase and DXP reductoisomerase: an approach with enzymes from the pathogenic bacterium Pseudomonas aeruginosa. *FEMS Microbiology Letters* **2000**, *190* (2), 329-333. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09307.x (accessed 1/10/2022).

(10) Misic, A. M.; Cain, C. L.; Morris, D. O.; Rankin, S. C.; Beiting, D. P.; Fey, P. D. Divergent Isoprenoid Biosynthesis Pathways in *Staphylococcus* Species Constitute a Drug Target for Treating Infections in Companion Animals. *mSphere* **2016**, *1* (5), e00258-00216. DOI: doi:10.1128/mSphere.00258-16.

(11) Ball, H. S.; Girma, M. B.; Zainab, M.; Soojhawon, I.; Couch, R. D.; Noble, S. M. Characterization and Inhibition of 1-Deoxy-d-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase: A Promising Drug Target in Acinetobacter baumannii and Klebsiella pneumoniae. *ACS Infectious Diseases* **2021**, *7* (11), 2987-2998. DOI: 10.1021/acsinfecdis.1c00132.

(12) Messiaen, A. S.; Verbrugghen, T.; Declerck, C.; Ortmann, R.; Schlitzer, M.; Nelis, H.; Van Calenbergh, S.; Coenye, T. Resistance of the Burkholderia cepacia complex to fosmidomycin and fosmidomycin derivatives. *Int J Antimicrob Agents* **2011**, *38* (3), 261-264. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2011.04.020 From NLM.

(13) Haemers, T.; Wiesner, J.; Poecke, S. V.; Goeman, J.; Henschker, D.; Beck, E.; Jomaa, H.; Calenbergh, S. V. Synthesis of α -substituted fosmidomycin analogues as highly potent Plasmodium falciparum growth inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2006**, *16* (7), 1888-1891. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.12.082.

(14) McKenney, E. S.; Sargent, M.; Khan, H.; Uh, E.; Jackson, E. R.; Jose, G. S.; Couch, R. D.; Dowd, C. S.; van Hoek, M. L. Lipophilic Prodrugs of FR900098 Are Antimicrobial against Francisella novicida In Vivo and In Vitro and Show GlpT Independent Efficacy. *PLOS ONE* **2012**, *7* (10), e38167. DOI: 10.1371/journal.pone.0038167.

(15) Haymond, A.; Johny, C.; Dowdy, T.; Schweibenz, B.; Villarroel, K.; Young, R.; Mantooth, C. J.; Patel, T.; Bases, J.; San Jose, G.; et al. Kinetic characterization and allosteric inhibition of the Yersinia pestis 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (MEP synthase). *PLoS One* **2014**, *9* (8), e106243. DOI: 10.1371/journal.pone.0106243 From NLM.

(16) Ball, H. S.; Girma, M.; Zainab, M.; Riley, H.; Behrendt, C. T.; Lienau, C.; Konzuch, S.; Avelar, L. A. A.; Lungerich, B.; Soojhawon, I.; et al. Inhibition of the Yersinia pestis Methylerythritol Phosphate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis by α -Phenyl-Substituted Reverse Fosmidomycin Analogues. *ACS Omega* **2020**, *5* (10), 5170-5175. DOI: 10.1021/acsomega.9b04171.

2.4.4. Bakterielle Siderophore

Eisen ist für das Wachstum von Bakterien essentiell.¹⁸⁵ Um Eisen (Fe³⁺) zu akquirieren, haben GRAM-negative und GRAM-positive Bakterien verschiedene Möglichkeiten entwickelt dieses vom Wirt aufzunehmen. Darunter fällt die Produktion von Siderophoren, die sezerniert werden und Eisen von humanen Eisenspeicherproteinen wie beispielsweise Transferrin (Tf), Lactoferrin (Lf) oder Ferritin lösen und komplexieren. Die Siderophor-Fe³⁺-Komplexe können über eine Vielzahl an Transportsystemen und -mechanismen in die Bakterienzellen aufgenommen werden.¹⁸⁶⁻¹⁸⁸ Unter dem Begriff "Siderophor" werden kleine Moleküle mit einem Molekulargewicht zwischen 100 und 2000 Da und einer starken Affinität zu Fe³⁺-Ionen mit K_A-Werten bis zu 10⁵² M⁻¹ zusammengefasst.¹⁸⁹

2.4.4.1. Struktur bakterieller und mykobakterieller Siderophore

Insgesamt wurden über 500 bakterielle Siderophore identifiziert und die überwiegende Anzahl der Siderophore tragen als chelatisierende funktionelle Gruppen Catechole, Phenole, Carbonsäuren oder Hydroxamsäuren (Schema 17).^{190,191}



Schema 17: Struktur ausgewählter Siderophore aus verschiedenen Stoffklassen. Blau = Catechole, rot = Carbonsäuren, orange = Phenole, grün = Hydroxamsäuren.

Zudem gibt es Siderophore mit gemischten chelatisierenden funktionellen Gruppen wie die von Mykobakterien produzieren Mycobactine. Diese unterteilen sich aufgrund ihrer Variation des Restes R⁵ in hydrophobe Zellwand- und Membran-assoziierten Mycobactine mit langen

aliphatischen Ketten und hydrophilere, wasserlösliche Carboxymycobactine mit terminalen Carboxlgruppen (Abbildung 12, **A**).¹⁹²⁻¹⁹⁶ Beide Klassen teilen ein identisches Grundgerüst, bestehend aus einem 2-(2-Hydroxy-)Oxazolin, *N*-hydroxyliertem und *N*-acyliertem L-Lysin, β -Hydroxy-Carbonsäure und einem *N*-Hydroxy- ϵ -Lactam (Abbildung 12, **A**).^{192,197} Basierend auf diesem Grundgerüst zeigen verschiedene Spezies innerhalb des *Mycobacterium* Genus Variationen an den Resten R¹-R⁵.^{192,197} Die Mycobactine besitzen mit zwei Hydroxamsäuregruppen und dem 2-(2-Hydroxy-)Oxazolin-Strukturmotiv drei chelatisierenden Gruppen, um als sechs-zähniger Ligand mit Fe³⁺ -Ionen einen stabilen binären Komplex zu bilden, der K_A-Werte von 10¹⁰ – 10²⁵ M⁻¹ aufweist (Abbildung 11, **B** + **C**).¹⁹⁸⁻²⁰⁰



Abbildung 11: Allgemeine Struktur der (Carboxy-)Mycobactine. A Strukturformeln mit definierten Resten für die von Vertretern des *Mycobacterium* Genus produzierten Mycobactine. B Ein Mycobactin T-Analogon mit R⁵ = Me in Komplex mit Fe³⁺ in 2D-Darstellung. C 3D-Darstellung von B mit analogem Farbcode. Mit Einverständnis entnommen aus dem Journal of Organic Chemistry (2021), Volume 86, Ausgabe 21, Seite 15453–15468.²⁰¹ Copyright © 2021 American Chemical Society.

2.4.4.2. Ablauf der Siderophor-vermittelten Fe³⁺-Aufnahme in *M. tuberculosis*

GRAM-positive, GRAM-negative Bakterien und Mykobakterien haben verschiedene Möglichkeiten entwickelt, um Siderophore zu synthetisieren, sezernieren und aufzunehmen.^{202,203} Am Beispiel von *M. tuberculosis* soll die Eisenaufnahme mittels Siderophoren exemplarisch besprochen werden.

Die mykobakteriellen Siderophore aus den Stoffklassen der Mycobactine (MB) und Carboxymycobactine (CMB) haben unterschiedliche physikochemische Eigenschaften, sodass sie dedizierte Aufgaben beim Eisenimport und -export erfüllen.



Abbildung 12: Mycobactin-abhängige Aufnahme von Fe³⁺-Ionen in *Mycobacterium tuberculosis*. Rote Kreise stellen Fe³⁺-Ionen, grüne Pfeile Carboxymycobactine und grüne Pfeile mit Alkylketten Mycobactine dar. A Import von Mycobactine, die Eisen von humanen Speicherproteinen komplexieren und über Membranassoziierte Mycobactine zur periplasmatischen Seite der inneren Membran transportiert. Dort übernehmen FecB und FecB2 den Transport über den periplasmatischen Raum zu dem IrtA/IrtB-System, welcher den Transport über die innere Membran transportiert.^{204,205} Im Zytosol erfolgt die Freisetzung der Eisen-Ionen über die *N*-terminale Domäne von IrtA (IrtA-NTD) und ViuB, zwei Eisen(III)-Reduktasen, unter gleichzeitigem Recycling der Mycobactine. B Export der recycelten Mycobactine mittels MmpL4/S4 und MmpL5/S5. C Der ESX-3 Komplex ist über einen unbekannten Mechanismus am Import und Export von Mycobactin beteiligt. Mit Einverständnis entnommen und modifiziert aus Chemical Reviews (2019), Volume 119, Ausgabe 2, Seite 1193–1220.²⁰³ Copyright © 2019 American Chemical Society.

Weil Carboxymycobactine vergleichsweise gut wasserlöslich sind, können sie in den Extrazellulärraum sezerniert werden (Abbildung 12, **B**), wo sie Eisen von humanen Eisenspeicherproteinen wie Tf und Lf komplexieren können (Abbildung 12, **A**).²⁰⁶

Der aktuelle wissenschaftliche Konsensus ist, dass die lipophilen Mycobactine Zellwandassoziiert sind, bzw. als Zell-Oberflächen-Rezeptoren fungieren könnten,²⁰³ indem sie im Extrazellulärraum Fe³⁺ von dem Fe³⁺-CMB-Komplex übernehmen und Fe³⁺ an die innere Seite der Zellwand transportieren (Abbildung 12, **A**).^{192,193} Im Periplasma sind die periplasmatischen Fe³⁺-Siderophor Bindungsproteine (PPBP) FecB (Rv3044) and FecB2 (Rv0265c) lokalisiert.^{207,208} Zu deren Funktion und Rolle gibt es drei Hypothesen: Die erste Hypothese postuliert, dass FecB Zellwand-assoziiert ist, während sich FecB2 im Periplasma befindet und beide im Zusammenspiel Fe³⁺-CMB oder Fe³⁺-MB über die Zellwand an die periplasmatische Seite der inneren Membran transportieren.²⁰³ Dabei sollen Affinitätsunterschiede von FecB und FecB2 gegenüber Fe³⁺-CMB und/oder Fe³⁺-MB einen unidirektionalen Transport ins Zytosol ermöglichen. Alternativ könnte ein komplexerer Mechanismus zugrunde liegen, bei dem Fe³⁺ im Periplasma von den Siderophoren dissoziiert wie es auch für *P. aeruginosa* beschrieben ist.²⁰⁹⁻²¹² Die dritte Hypothese beschreibt einen FecB-unabhängigen Mechanismus, da *Mt ΔfecB* Mutanten unabhängig von der Eisenkonzentration im Nährmedium wachsen können.²¹³ Allerdings könnte FecB2 den Verlust von FecB auch funktionell kompensieren.²¹³

Im nächsten Schritt könnte FecB- oder FecB2- gebundenes Fe³⁺-MB und/oder Fe³⁺-CMB auf den IrtAB-Transporter übertragen werden, um ins Zytosol transloziert zu werden (Abbildung 12, **A**).^{203,204} IrtAB ist ein Heterodimer bestehend aus IrtA und IrtB und gehört zu den primär aktiven Transportern mit ATP-bindender Kassette (Abbildung 13).²⁰⁴



Abbildung 13: Struktur des Heterodimers IrtA (türkis) / IrtB (magenta) an der inneren Zellmembran von *M. tuberculosis* und dessen Rolle bei der Aufnahme von Mycobactinen (MB) (grün) und Carboxymycobactinen (CMB) (blau). Eisenbindende MB/CMB sind in dunklen und die freien Siderophore in hellen Farbtönen dargestellt. Für die Aufnahme von Fe³⁺-MB ist die Siderophor-Interaktionsdomäne (SID, blau) essentiell, die mit der *N*-terminalen Domäne von IrtA (IrtA-NTD) fusioniert ist. Die SID bindet Mycobactin (gelb). Die Aufnahme Fe³⁺-CMB ist nicht SID-abhängig und könnte auch mittels passiver Diffusion erfolgen (gestrichelte Linie). Abbildung verwendet mit der Genehmigung von © 2020 Springer Nature Limited, aus Nature (2020), Volume 580, Seite 413–417²¹⁴; die Genehmigung mit der Lizenznummer 5794840925562 wurde am 23.05.2024 über das Copyright Clearance Center, Inc. erteilt.

Obwohl IrtAB eine ABC-Exporterfaltung aufweist, ist es funktional betrachtet ein Importer. Eine weitere strukturelle Besonderheit stellt der *N*-Terminus von IrtA (IrtA-NTD) dar, an welche eine Siderophor-Interaktionsdomäne (SID) fusioniert ist (Abbildung 13).

Zudem wurde die Substratspezifität von IrtAB gegenüber Fe³⁺-CMB und Fe³⁺-MB und der Rolle der SID untersucht. Zum einen kann die SID sowohl *in vivo*²¹⁵ und *in vitro*²¹⁴ im Zusammenspiel mit der IrtA-NTD Fe³⁺-MB und Fe³⁺-CMB reduzieren und Fe²⁺ ins Zytoplasma abgeben (Abbildung 12, **A**). IrtAB benötigt für die Aufnahme von Fe³⁺-MB die SID, für die Aufnahme von Fe³⁺-CMB allerdings nicht (Abbildung 13, rechts).²¹⁴ Im Gegensatz zu initialen Erkenntnissen,²⁰⁴ suggerierten Messungen der ATPase-Aktivität in Kombination mit *in vivo* Wachstumsstudien, dass IrtAB eine Präferenz für MB im Vergleich zu CMB habe.²¹⁴ Beide Beobachtungen lassen sich dadurch erklären, dass Fe³⁺-MB Membran-assoziiert und somit in räumlicher Nähe zu IrtAB ist, wodurch die lokale Konzentration höher ist als die von Fe³⁺-CMB. Umgekehrt könnte die Membranassoziation von MB die Notwendigkeit der SID erklären, die eine Verbindung zwischen IrtAB und Fe³⁺-MB ermöglicht.^{214,216,217}

Darüber hinaus konnte ARNOLD *et al.* zeigen, dass die Länge des aliphatischen Rests (R⁵) der (Carboxy-)Mycobactine keinen Einfluss auf die Affinität IrtAB zu CMB oder MB hat.²¹⁴

Aufgrund weiterer Untersuchungen an *M. smegmatis* Knockout-Mutanten und der Tatsache, dass die SID für eine CMB-Aufnahme nicht essentiell ist, schlussfolgerten die Autoren, dass es neben IrtAB ein weiteres Transportprotein für Fe³⁺-CMB geben müsse oder wasserlösliches CMB auch mittels passiver Diffusion die innere Membran überwinden könnte (Abbildung 13, rechts).

Nachdem Fe³⁺-MB oder Fe³⁺-CMB von IrtAB ins Zytosol importiert wurde, muss Fe³⁺ zu Fe²⁺ reduziert werden. Dies ermöglicht die Dissoziation des Eisens vom Siderophor, da Fe²⁺ eine deutlich geringe Affinität als Fe³⁺ zum Siderophor aufweist.²¹⁸ Es wird postuliert, dass die Reduktion durch den Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD)-abhängigen Komplex aus IrtA-NTD und SID erfolgt.^{215,219} IrtA-NTD und SID katalysieren zum einen die Reduktion von Fe³⁺ zu Fe²⁺ und sorgen dabei für das Recycling von CMB, zum anderen ist die Bindung von FAD an IrtA-NTD essentiell für die volle Funktionstüchtigkeit der IrtA/IrtB-Permease.^{215 215} Neben IrtA-NTD wird auch die Rolle einer weiteren Fe³⁺-Siderophor-Reduktase ViuB (Rv2895c) untersucht.

Der Export von CMB und MB über die innere Membran erfolgt über die Proteine MmpL4 und MmpL5 (*engl.: mycobacterial membrane protein large*) zusammen mit den kleineren, Membran-assoziierten akzessorischen Proteinen MmpS4 and MmpS5 (*engl.: mycobacterial membrane protein small*) (Abbildung 12, **B**).²²⁰ Die 14 bekannten MmpL-Proteine gehören zur RND (*engl.: resistance-nodulation-division*) Superfamilie der Transmembranproteine,²²¹ welche mit Faktoren der äußeren Membran assoziiert sind.²²² Zusammen mit periplasmatischen Membranfusionsproteinen entsteht ein ternärer Komplex, der eine

Effluxpumpe bildet.²²³ Die MmpL-Proteine transportieren neben Siderophoren eine Vielzahl an Substraten wie Lipide über die innere Zellmembran der Mykobakterien.^{224,225}

Weiterhin konnte in Ansätzen gezeigt werden, dass das Sekretionssystem ESX-3 ebenfalls eine Rolle beim Siderophortransport spielt, da Fehlfunktionen von ESX-3 zur intrazellulären Akkumulation von MB führt (Abbildung 12, **C**).²²⁶

2.4.4.3. Die Strategie des trojanischen Pferds

Wenn sich eisenbindende Strukturelemente in Antibiotika widerfinden, können die Antibiotika über die aktiven Aufnahmewege der Siderophore in Bakterien aufgenommen werden.¹⁹⁰

Dieser Effekt zeigt sich zum einen bei natürlich vorkommenden, antimikrobiell wirkenden Sideromycinen wie Albomycin²²⁷, aber auch in dem 2019 durch die amerikanische Zulassungsbehörde *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassenen Cefiderocol (*Fetroja*[®]) (Schema 18).²²⁸⁻²³¹

Während Albomycin ein Ferrichrom-Siderophor mit drei Acetohydroxamsäuregruppen besitzt, trägt Cefiderocol mit der 3-Chlorcatecholgruppe ein Siderophor-Fragment, welches bisher nicht als Siderophor gemäß der herkömmlichen Definition (Kapitel 2.4.4) identifiziert worden ist.



Schema 18: Struktur von Albomycin (links) und Cefiderocol (rechts). blau = chelatisierende funktionelle Gruppen, rot = Pharmakophor des Antibiotikums.

In beiden Fällen fungieren die Siderophor(-fragmente) als "trojanisches Pferd", welche den aktiven Transport des Antibiotikums in den periplasmatischen Raum der Bakterien ermöglichen.^{229,232} Neben Cefiderocol konnten in der präklinischen Entwicklung durch Antibiotika-Siderophor-Konjugate eine Steigerung der antibakteriellen Aktivität im Vergleich zu den alleinigen Antibiotika gegen GRAM-negative und GRAM-positive Bakterien erzielt werden.^{185,232}

Für *Mt* ist diese Strategie bisher wenig verfolgt. Die MILLER Gruppe konnte anhand eines Artemisinin-Mycobactin-Konjugats (Schema 19) zeigen, dass der antiplasmodial wirksame Naturstoff Artemisinin, welcher allein keine *in vitro* Wachstumsinhibition von *Mt* zeigt, als Konjugat an ein Mycobactin-Analogon das Wachstum mit einer MHK₉₀ von 0.39 μg/mL hemmt.²³³ Ebenso konnten MDR- und XDR-Stämme von *Mt* gehemmt werden, während das Wachstum anderer Bakterien nicht eingeschränkt wurde.²³³



Artemisinin-Mycobactin-Konjugat

Schema 19: Struktur eines Artemisinin-Mycobactin-Konjugates synthetisiert von MILLER et al.233

Somit ist die Konjugation von Siderophoren mit Antibiotika eine neue und interessante Möglichkeit, um Permeabilitätsprobleme der Antibiotika zu überwinden und die Potenz der Antibiotika zu erhöhen.

3. Zielsetzung

3.1. Chlorflavonin und Bromflavonin

Die natürlich vorkommenden Flavonoide Chlor- und Bromflavonin (Schema 20) stellen mit ihrer mykobakteriellen *in vitro* Wachstumshemmung gegenüber dem virulenten *Mt*-Stamm H37Rv (MHK₉₀ = 1.56 μ M (I) und 0.78 μ M (III)), keiner Zytotoxizität gegenüber humanen Zelllinien (THP-1, HEK-293, MRC-5) und somit guten Selektivitätsindices interessante Leitstrukturen für die präklinische Strukturoptimierung dar.



X = CI, Chlorflavonin (**I**) X = Br, Bromflavonin (**III**)

Schema 20: Chemische Struktur von Chlor- (I) und Bromflavonin (III) mit Angabe der Flavonoid-Ringnomenklatur und Lokantensatz.

Für Chlorflavonin (I) konnte weiterhin gezeigt werden, dass es das Wachstum extensiv resistenter (XDR) klinischer Isolate ebenso wie das Wachstum von *Mt* H37Rv in einem infizierten Makrophagen-Modell hemmt. Als molekulare Zielstruktur konnte die katalytische Untereinheit IIvB1 der Acetohydroxysäure Synthase (AHAS) identifiziert und zusammen mit der Gruppe von PROF. DR. HOLGER GOHLKE ein Homologie-Modell generiert werden, sodass mittels *Docking*-Experimenten ein rationales Wirkstoffdesign möglich ist.⁶

Im Rahmen dieser Dissertation sollte die Synthese nach einer etablierten Synthese von DR. ALEXANDER BERGER von Chlor- (I) und Bromflavonin (III) im Hundert-Milligramm-Maßstab erfolgen, um die Evaluation physikochemischer und pharmakokinetischer Eigenschaften zu ermöglichen.



Abbildung 14: Konzept zur Synthese und Untersuchung der Chlor- und Bromflavonin-Analoga.

Basierend auf ersten Ergebnissen des phänotypischen ganzzellbasierten Aktivitätsassays aus der Gruppe von PROF. DR. RAINER KALSCHEUER und den daraus abgeleiteten Struktur-Aktivitäts-Beziehungen, dem Homologie-Modell der GOHLKE Gruppe und den Ergebnissen der physikochemischen und pharmakokinetischen Evaluation sollte ein rationales Design und die Synthese von Analoga der Leitstrukturen realisiert werden, um die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen eingehender zu untersuchen (Abbildung 14).

Bei dem Design der Analoga sollten im Verlauf der Arbeit zum einen die Ergebnisse der präklinischen Evaluation und die Ergebnisse der antimykobakteriellen *in vitro* Ganzzellaktivität einbezogen werden, um die Leitstrukturen in einem iterativen Prozess zu optimieren. Parallel zu den Synthesearbeiten dieser Dissertation sollte DR. ANNA-LENE KIFFE-DELF aus der Arbeitsgruppe von PROF. DR. RAINER KALSCHEUER ein IIvB1-Assay zur Bestimmung der Enzyminhibition etablieren. Dies stellt einen fundamentalen Bestandteil zur Evaluation des Pharmakophormodells dar, um Disparitäten zwischen Enzym- und Wachstumsinhibition und somit Permeabilitäts- oder Stabilitätsprobleme zu identifizieren.

3.2. Synthese neuartiger β -thia-isosterer Fosmidomycin-Analoga

Fosmidomycin ist aufgrund der nanomalen DXR-Hemmung verschiedener Parasiten, Mykobakterien und GRAM-negativer Bakterien eine interessante Leitstruktur in der Antiinfektivaforschung. Vor kurzem konnte die Arbeitsgruppe von PROF. DR. THOMAS KURZ in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von PROF. DR. NOBUTADA TANAKA eine neue lipophile Seitentasche mittels strukturbiologischer Untersuchungen entdecken, welche optimal mit der Einführung eines *N*-Phenylpropyl-Substituenten (**MAMK89**) adressiert werden kann (Abbildung 15).²³⁴ Zudem könnte die erhöhte Lipophilie von **MAMK89** die passive Diffusion durch die lipophile Zellwand der Mykobakterien und GRAM-negativen Bakterien verbessern.

Die Einführung eines Schwefel-Atoms in β -Position von inversen Fosmidomycin-Analoga wie bei **CL1** führte bei sechs von sieben Beispielen zu einer 9- bis 35-fachen Steigerung der Aktivität gegenüber *Ec*DXR und *Mt*DXR.²³⁵ Dies indiziert, dass β -thia-isostere Fosmidomycin-Analoga potentere DXR-Inhibitoren und damit potentiell bessere bakterielle Wachstumsinhibitoren als die Carba-Analoga sein könnten. Diese Tatsache sollte genutzt werden, um die gute bis sehr gute (myko-)bakterielle DXR-Inhibition von **MAMK89** mit einem IC₅₀ von 3000 nM (*Mt*DXR) und 35 nM (*Ec*DXR) durch Einführung eines Schwefelatoms in β -Position weiter zu optimieren.

Folglich sollte eine effiziente Syntheseroute für β -thia-isostere **MAMK89**-Analoga etabliert werden (Abbildung 15, Strukturtyp 1). Als Ausgangspunkt dienten die Synthese- und Schutzgruppenstrategien von DR. CLAUDIA LIENAU und DR. MONA MAHMOUD.

102



Abbildung 15: Geplante Strukturtypen von β -thia-isosteren Fosmidomycin-Analoga. VE = Verbindungseinheit.

Basierend auf Kristallstrukturanalysen und der bisher ableiteten Struktur-Aktivitäts-Beziehungen sollte im zweiten Teil dieses Projektes eine weitere neue Syntheseroute etabliert werden, welche eine vielfältige Substitution des *a*-Phenyl-Rings mit langen lipophilen Resten und verschiedenen Verbindungseinheiten ermöglicht (Abbildung 15, Strukturtyp 2). Die Darstellung von Analoga mit Amid-substituierten oder geschützten funktionellen Gruppen war mit den bisher verwendeten Synthesewegen weder bei den Carba- noch bei den Thia-Analoga möglich, weil bei beiden Synthesewegen *n*-Butyllithium in einem Schlüsselschritt verwendet wird. *n*-Butyllithium ist inkompatibel mit den entsprechenden Amiden oder möglichen Schutzgruppen.

Beide neuen Strukturtypen sollen in Kooperationen mit PROF. DR. MARKUS FISCHER, DR. JANA HELD und PROF. DR. RAINER KALSCHEUER hinsichtlich ihrer DXR-Inhibition und antibakteriellen sowie antiplasmodialen Eigenschaften evaluiert werden. Zudem sollten ausgewählte Beispiele einer strukturbiologischen Untersuchung durch die Arbeitsgruppe von PROF. DR. NOBUTADA TANAKA unterzogen werden.

3.3. Synthese von Siderophor(-fragmenten) und β-thia-isosteren Fosmidomycin-Siderophor-Konjugaten

Antibiotika können neben der passiven Diffusion über aktive Transporter oder Carrier in das Zytosol der Bakterien gelangen. Sollte eine aktive Aufnahme des Antibiotikums selbst über einen aktiven Transport nicht möglich sein, können neue Konzepte wie die Strategie des "trojanischen Pferds" herangezogen werden.^{185,233,236} Bei diesem Konzept wird das Antibiotikum über einen Linker mit einem Fe³⁺-komplexiernden Siderophor verbunden, welches aktiv ins Zytosol der Bakterien aufgenommen wird. Auf diese Weise gelangt das Antibiotikum in das Bakterium.



Abbildung 16: Konzept zur Darstellung von β -thia-isosteren Fosmidomycin-Siderophor-Konjugaten. VE = Verbindungseinheit.

Um dieses Konzept auf β -thia-isostere Fosmidomycin-Analoga anwenden zu können, sollte der Strukturtyp 2 als Edukt zur weiteren Funktionalisierung eingesetzt werden (Abbildung 16). Komplementär dazu sollten ausgewählte Siderophore mit eisenbindenden Catechol-, Hydroxamsäuren- und Oxazolin-Strukturen sowie einer Carboxylgruppe dargestellt werden. Final sollte die Verknüpfung beider Bausteine zu einem Antibiotika-Siderophor-Konjugat optimiert werden (Abbildung 16).

4. Literaturübersicht

4.1. Literaturübersicht zur Darstellung von Flavonolen

Die AUWERS-Synthese wurde von dessen Namensgeber und MÜLLER im Jahr 1908 erstmals beschrieben.²³⁷ Die Autoren synthetisierten ausgehend von 2-Chlor-4'-methylacetophenon (**V**) und Benzaldehyd 3-Hydroxy-6-methyl-2-phenyl-4*H*-chromen-4-on (**VII**) über ein Auron (**X**) als Zwischenstufe (Schema 21, **A**).



Schema 21: AUWERS-Flavonolsynthese.237

(A) Reagenzien und Bedingungen. (a) Na₂CO₃ • 10 H₂O (1.5 Äq.), EtOH, 100 °C, 10 min; (b) Benzaldehyd, konz. HCI, EtOH, 60 °C; (c) Br₂, CHCl₃; (d) KOH (2.0 Äq.). (B) Postulierter Reaktionsmechanismus der AUWERS-Flavonolsynthese.²³⁸

COREY postulierte im Konsens mit der publizierten Literatur einen nachvollziehbaren Mechanismus.²³⁸ Zunächst wird Bromid vom Dibrom-Cumaron (**VIII**) abgespalten, sodass ein Oxonium-Ion (**VIIIa**) entsteht, gefolgt von einer nukleophilen Addition eines Hydroxid-Ions an

den C₂-Carbonylkohlenstoff. Das Zwischenprodukt (**VIIIb**) wird deprotoniert und eine Ringöffnung des Benzofuran-3(2*H*)-on resultiert, sodass Verbindung **VIIIc** entsteht. Durch eine MICHAEL-analoge Addition des Phenolates an die α , β -ungesättigte Carbonylverbindung entsteht ein 2*H*-Chromen-3,4-diol (**VIIId**). Nach Abspaltung eines zweiten Bromid-Ions entsteht das Flavonol (**IX**).

In den kommenden Jahren untersuchten AUWERS *et al.*^{239,240} den Reaktionsverlauf und versuchten weitere Derivate zu synthetisieren. Sie kamen zu dem Schluss, dass die entwickelte Synthese nur begrenzt anwendbar sei. Schon bei wenig substituierten Acetophenonen wurde initial nur wenig Benzofuran-3(2*H*)-on (**VI**) gebildet. Dagegen verlief die Kondensation von **VI** mit Benzaldehyden zu den entsprechenden Auronen (**VII**) in guter Ausbeute. Bei der nukleophilen Addition von Brom an die Benzyliden-Struktur entstanden bei hydroxylierten Benzolringen Nebenprodukte mit bromierten Aromaten. Zudem gestaltete sich die eigentliche AUWERS-Synthese als schwierig, da die Addition von Brom reversibel war, sodass sich durch die Eliminierung von Brom statt des Flavonols (**IX**) das Auron (**VII**) bildete. Außerdem verlief der Ringschluss nicht quantitativ, sodass die Reaktion auf Stufe der *α*, *β*-ungesättigte Carbonylverbindung (**VIIIc**) stehen blieb.

Weder gelang es DEAN und NIERENSTEIN²⁴¹ Myricetin (3,5,7-Trihydroxy-2-(3,4,5trihydroxyphenyl)-4*H*-chromen-4-on) noch KALFF und ROBINSON²⁴² Datiscetin (3,5,7-Trihydroxy-2-(2-hydroxyphenyl)-4*H*-chromen-4-on) mittels AUWERS-Synthese darzustellen. Datiscetin ähnelt in Bezug auf das Substitutionsmuster Chlorflavonin, jedoch fehlen die Substituenten in 8- und 3'-Position. Dementsprechend ist davon auszugehen, dass eine analoge Synthese von Chlorflavonin schwierig sein könnte. MINTON und STEPHAN²⁴³ gelang zwar unter leicht modifizierten Bedingungen die Darstellung von 8-Chlorflavonol in guter Ausbeute, dies dürfte jedoch auf die spärliche Substitution des Benzofuran-3(*2H*)-ons zurückzuführen sein. Dass bereits AUWERS *et al.* die Limitation ihrer Synthese erkannten, in Kombination mit der spärlichen Literatur zu weiteren Synthesen, die alle fast über 100 Jahre in der Vergangenheit liegen, zeugen von der schlechten Durchführbarkeit, sodass diese Syntheseroute für Chlorflavonin(-analoga) nicht infrage kam.

Eine erfolgreiche Möglichkeit zur Darstellung von Flavonolen bietet die ALLAN-ROBINSON-Kondensation (ARK). Bei dieser Synthese reagieren 2'-Hydroxyacetophenone (**X**) aus ihrer Enolform (**Xa**) mit aromatischen Carbonsäureanhydriden (**XI**) in Anwesenheit ihrer korrespondieren Alkalisalze zu 1,3-Diketonen (**XIII**), welche wiederum zum entsprechenden Enol (**XIIIa**) tautomerisieren können (Schema 22). Die Deprotonierung des Phenols (**XIV**) ermöglicht einen intramolekularen nukleophilen Angriff an die Enol-Funktionalität unter Ausbildung eines Sechsringes (**XV**). Anschließende Protonierung und Tautomerisierung des Enolats folgt die Dehydratisierung zum Flavonol (**XVII**).

106



Schema 22: Reaktionsmechanismus der ALLAN-ROBINSON-Kondensation.^{244,245}

Auch die BAKER-VENKATARAMAN Reaktion stellt eine weitere etablierte Möglichkeit zur Flavonolsynthese dar (Schema 23). Ausgehend von 2'-Hydroxyacetophenonen (**X**) und Carbonsäurechloriden werden im basischen Milieu α -Acyloxyacetophenone (**XVIII**) als Edukte für die BAKER-VENKATARAMAN Umlagerung hergestellt.²⁴⁵⁻²⁵¹ Die Enolisierung des α -Acyloxyacetophenons (**XVIII**) ermöglicht die intramolekulare Cyclisierung zu (**XX**), sodass nach Umlagerung und Protonierung das 1,3-Diketon **XIII** entsteht. Anschließende säurekatalysierte Aktivierung der Carbonylfunktion des 1,3-Diketons **XIII** ermöglicht den Angriff des Phenols an die Carbonylfunktion und damit den zweiten intramolekularen Ringschluss zum Halbacetal **XXII**. Abschließende Dehydratation des Halbacetal **XXII** führt zum Flavonol **XVII**.



Schema 23: Reaktionsmechanismus der die BAKER-VENKATARAMAN-Umlagerung.^{245,247}

Die BAKER-VENKATARAMAN-Umlagerung zeigt im Vergleich zu den beiden zuvor beschriebenen einen deutlich breiten Anwendungsbereich und wurde in den letzten Jahren durch den Einsatz von Lewis-Säuren, verschiedener Säuren sowie Festphasen- oder Mikrowellen-unterstützte Synthesen stetig optimiert.²⁴⁵

Eine ebenfalls weit verbreite Möglichkeit zur Darstellung von Flavonolen ist die ALGAR-FLYNN-OYAMADA-Reaktion.²⁴⁵ Für diese muss zunächst in einer basenkatalysierten CLAISEN-SCHMIDT-Kondensation (CSK) aus einem 2'-Hydroxyacetophenon **XXII** und Benzaldehyd **XXIV** ein 2-Hydroxy-Chalkon **XXV** als Intermediat hergestellt werden (Schema 24, oben links).²⁵²⁻²⁵⁵ Der zugrundeliegende Reaktionsmechanismus ist zwar intensiv untersucht worden, dennoch existieren immer noch zwei Möglichkeiten, bei denen die Reaktion über die Bildung eines Epoxids in zwei Schritten oder konzertiert ablaufen könnte (Schema 24). Bereits 1975 postulierte FERREIRA *et al.* ²⁵⁶, dass das 2-Hydroxychalkon **XXV** im Basischen deprotoniert werde, und die β -Position nukleophil angreifen könne, wobei das nicht-isolierbare Enolat **XXVI** entstehe. An das Enolat **XXVI** kann Wasserstoffperoxid elektrophil addieren, sodass sich das Flavanonol **XXVII** bildet, welches zum Flavonol **IX** oxidiert wird (Schema 24, rechts).²⁵⁵

Die zweite Hypothese geht von einer Deprotonierung im basischen Reaktionsmilieu und simultanen Reaktion des Alkens mit einem Hydroperoxid-Anion zum Epoxid **XXVIII** aus. Anschließend kann intramolekular ein nukleophiler Angriff des Phenolats an den α -Kohlenstoff erfolgen, sodass nach subsequenter Dehydratisierung des Auron Hydrates **XXIX** ein Auron **VII** entsteht. Alternativ kann der Angriff am β -Kohlenstoff erfolgen, sodass ein Flavanonol **XXVII** entsteht, welches folglich zum Flavonol **IX** oxidiert wird (Schema 24, links).²⁵⁵



Schema 24: Mögliche Reaktionsmechanismen der ALGAR-FLYNN-OYAMADA-Reaktion.²⁵²⁻²⁵⁶

SHEN *et al.* konnten mittels Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS) und ¹H-NMR-Spektroskopie zudem zeigen, dass durch einen kompetitiven intermolekularen Angriff eines Hydroperoxid-Anions an den β -Kohlenstoff das Peroxid-Intermediat **XXX** gebildet werden kann, welches schnell zu Salicylsäure **XXXI** und Benzaldehyd **XXIV** zerfällt (Schema 24, mittig). Die Hypothese, der Reaktionsmechanismus verlaufe über ein Epoxid, erklärt die Bildung eines Aurons und diverser weiterer Nebenprodukte sinnvoller als der konzertierte Reaktionsmechanismus. Der Vollständigkeit halber sollte auch erwähnt werden, dass unter den Reaktionsbedingungen ebenfalls eine Retro-CLAISEN-SCHMIDT-Kondensation zu den Edukten stattfinden kann (Schema 24, oben links).²⁵⁵

SHEN *et al.* untersuchten zudem die kompetitive Bildung von Flavonolen IX und seinen Analoga durch Variation des Lösemittels, der Base, Temperatur sowie der Anzahl der

eingesetzten Äquivalente an Basen und Wasserstoffperoxid (Schema 25).²⁵⁵ Die Wahl des Lösemittels hatte dabei nur einen geringen Einfluss, allerdings zeigte sich, dass die optimale Temperatur für die Bildung von Flavonolen (IX) 27 °C, bzw. Raumtemperatur betrug, während niedrigere Temperaturen die Auron (VII)- und Flavanon (XXXII)-Bildung induzierten (Schema 25, grün). Die Verwendung von starken Basen führte in einer Retro-CSK zur Rückgewinnung der Edukte XXIII und XXIV, während schwache Basen zur Bildung von Flavanonen (XXXII) führte (Schema 25, blau). Als optimal für die Bildung der Flavonole IX ergaben sich Natriumund Kaliumhydroxid sowie Natriumcarbonat als mittelstarke Basen. Um den Einfluss der verwendeten Äquivalente beispielhaft an Natriumcarbonat zu untersuchen, wurden 5.00 Äquivalente Natriumcarbonat und 2.50 Äquivalente Wasserstoffperoxid eingesetzt, welche als Standard definiert wurden (Schema 25, rot). Bei Reduktion der Wasserstoffperoxid-Äquivalente bildete sich vorwiegend Flavon XXXIII, während eine Erhöhung der Wasserstoffperoxid-Äquivalente neben dem gewünschten Flavonol IX auch Salicylsäure (XXXI) und Benzaldehyd (XXIV) durch intermolekulare Reaktion mit einem Hydroperoxid-Anion gebildet wurden (Schema 24, mittig). Außerdem vermerkten die Autoren, dass eine Reaktionszeit von 24 h nicht überschritten werden sollte, da die Zersetzung zur oxidierten Salicylsäure (XXXI) und Benzaldehyd (XXIV) auch bei den optimalen Reaktionsbedingungen zunahm.



Schema 25: Einfluss verschiedener Parameter auf die Produktbildung bei der ALGAR-FLYNN-OYAMADA-Reaktion ^a Standardbedingungen waren 5.00 Äq.Na₂CO₃ und 2.50 Äq. H₂O₂.

Neben den Reaktionsbedingungen beeinflusst zudem das Substitutionsmuster des eingesetzten 2'-Hydroxyacetophons **XXIII** und des Benzaldehyds **XXIV**, welches Hauptprodukt gebildet wird. Eine eingehende Analyse der Literatur^{254,255,257-266} zeigte, dass beispielsweise elektronenschiebende (EDG) oder elektronenziehende (EWG) Substituenten in 6'-Position oder elektronenschiebende Substituenten in 4'-Position vorwiegend zum α -Angriff und damit zur Bildung des entsprechenden Aurons **VII** führen (Schema 26, rot).^{267,268} Dieser Effekt scheint additiv zu sein, da sich bei elektronenschiebenden Rest in 4'- und 6'-Position ausschließlich die Aurone **VII** bildet.^{255,268} Hingegen führen vor allem elektronenschiebende Reste in 2-, 3- oder 4-Position vermehrt zur Bildung der Flavonole **IX** (Schema 26).^{257,268}



Schema 26: Einfluss der Substituenten des Chalkons auf die Bildung des Hauptproduktes der ALGAR-FLYNN-OYAMADA-Reaktion. EDG = Elektronenschiebend, EWG = Elektronenziehend.

Aus den Beobachtungen der Autoren lässt sich ableiten, dass je nukleophiler das Phenolat ist, desto mehr Auron **VII** wird gebildet. Ist die negative Ladung des Phenolates hingegen aufgrund ausgeprägter Mesomerie durch elektronenziehende Reste stark delokalisiert, findet kein Reaktionsumsatz des Chalkons **XXV** statt.

Neue Synthesemöglichkeiten stellen die Dimethyldioxiran (DMDO)-vermittelte Oxidation der entsprechende Flavane XXXIII dar, wobei sich die Handhabung von DMDO schwierig gestaltet (Schema 27, Methode A).²⁶⁹ Zudem können Flavone XXXIII in 3-Position lithiiert, anschließend boryliert und der entsprechende Boronsäureester XXXV oxidativ zum Flavonol IX hydrolysiert werden (Schema 27, Methode B).^{258,270} Zudem konnten KRAUS et al. eine neue Methode etablieren, bei der die phenolische Gruppe von 2-(2-Hydroxyphenyl)-2-oxoessigsäureestern (XXXVI) mit 2-Brom-2-phenylacetonitril (XXXVII) alkyliert und die 2-Oxo-Funktionalität mit Natriumborhydrid zum 2-Hydroxyessigsäureester XXXVIII reduziert wurde. Ein Lithiumdiisopropylamid (LDA)-induzierter Ringschluss lieferte das gewünschte Flavonol IX (Schema 27, Methode C).²⁵⁹



Schema 27: Neue Synthesemöglichkeiten zur Darstellung von Flavonolen.
4.1.1. Literaturbekannte Synthesen von Chlorflavonin und Analoga

Die erste synthetische Darstellung von Chlorflavonin (I) beschrieben TOEKES et al. im Jahr 1980 ausgehend vom kommerziell erwerblichen 3-Chlorsalicylaldehyd (XXXIX) und 2-Hydroxy-2',4',6'-trihydroxyacetophenon (XLIII) (Schema 28). Um den Aufbau des Flavonolgerüstes mittels ALLAN-ROBINSON-Kondensation (ARK) durchzuführen, musste die phenolische Hydroxygruppe von 3-Chlorsalicylaldehyd (XXXIX) zunächst Benzyl-geschützt werden, sodass das Intermediat XL erhalten wurde. Der geschützte Aldehyd XL konnte anschließend zur Carbonsäure XLI oxidiert und Thionylchlorid-vermittelt zum Carbonsäureanhydrid XLII kondensiert werden (Schema 28, A). Die Synthese des zweiten Edukts 2-Hydroxy-2',4',6'-trihydroxyacetophenon (XLIII) wurde von TOEKES et al. nicht beschrieben. Die Edukte XLII und XLIII wurden anschließend in einer ALLAN-ROBINSON-Kondensation zum Flavonol XLIV umgesetzt (Schema 28, B). Die 8-Position wurde mittels **ELBS-Persulfat-Oxidation** zum 5,7,8-Trihydroxyflavonol (XLV) oxidiert und die Hydroxygruppen in 7- und 8-Position selektiv methyliert (XLVI). Im letzten Schritt wurde die



B Darstellung von Chlorflavonin (I) nach TOEKES et al.



Schema 28: Synthese von Chlorflavonin (1) nach TOEKES et al.²⁷¹

(a) Benzylchlorid, K₂CO₃, DMF, erhitzen, 1 h; (b) NaOH, AgNO₃, H₂O, erhitzen, 30 min; (c) Thionylchlorid, Pyridin, Benzol, 14 h; (d) Et₃N, 175 °C, 1 h; (e) KOH, K₂S₂O₈, H₂O, 12 h; (f) Dimethylsulfat, K₂CO₃, Aceton; (g) Pd/C, H₂, Aceton.²⁷²

Benzyl-Schutzgruppe hydrogenolytisch mit Palladium auf Aktivkohle als Katalysator entfernt und Chlorflavonin (I) über sieben Schritte in einer Gesamtausbeute von 0.8 % erhalten.

In einem ersten Versuch konnte DR. BERGER die freie phenolische Hydroxygruppe von Antiarol (**XLVII**) mit lodmethan methylieren und eine FRIEDEL-CRAFTS-Acylierung zum 2'-Methoxyacetophenon **XLVIII** durchführen (Schema 29, **A**).





(A) über die ALLAN-ROBINSON-Kondensation oder (B) mittels Oxidation einer Flavon-Zwischenstufe.
(a) 1.33 Äq. K₂CO₃, 2.00 Äq. CH₃I, Aceton, Reflux; (b) 1.30 Äq. Methoxyacetylchlorid, 2.00 Äq. AlCl₃, Et₂O, -15 °C – RT; (c) 1.20 Äq. AlCl₃, CH₂Cl₂, -20 °C – RT, 59 %; (d) 3.00 Äq. Dimethylsulfat, 3.00 Äq. K₂CO₃, Aceton, Reflux; (e) i) 3.15 Äq. AlCl₃, ACN, 70 °C; ii) 6 % HCl, ACN/H₂O, 60 °C; (f) 5.00 Äq. NaOH_(aq.), EtOH, 50 °C; (g) 0.10 Äq. I₂, DMSO, 140 °C; (h) 7.30 Äq. Oxon[®], NaHCO₃/Na₂CO₃-Puffer/Aceton/CH₂Cl₂, 0 °C – 5 °C.

Anschließend sollte die 2-Methoxygruppe selektiv demethyliert werden, um das 2'-Hydroxyacetophenon XLIX als Edukt für eine ALLAN-ROBINSON-Kondensation zu gewinnen (Schema 29, **A**). Die partielle selektive Demethylierung von Flavonoiden ist in der Literatur zwar zahlreich beschrieben,²⁷³⁻²⁷⁵ allerdings konnte das 2'-Hydroxyacetophenon XLIX von BERGER auch nach Variation der LEWIS-Säuren zu Bortrichlorid, Bortribromid, Aluminiumtribromid, Lithiumchlorid oder Magnesiumiodid nicht isoliert werden. Da die freie 2'-Hydroxygruppe für die ARK essentiell ist, konnte dieser Versuch zum Aufbau des Flavonolgerüstes nicht weiterverfolgt werden.

In einem zweiten Ansatz sollte eine neue Möglichkeit neben der ARK erprobt werden. Dazu wurde Antiarol (XLVII) in einer FRIEDEL-CRAFTS-Acylierung mit Acetylchlorid zum 6'-Hydroxyacetophenon umgesetzt und die phenolische Hydroxygruppe anschließend mit Dimethylsulfat zu Tetramethoxyacetophenon (LII) methyliert (Schema 29, B). Mittels partieller selektiver Demethylierung unter Verwendung von Aluminiumtrichlorid wurde das 2'-Hydroxyacetophenon LIII gewonnen, welches in einer CLAISEN-SCHMIDT-Kondensation mit dem Benzyl-geschützten Benzaldehyd XL zum Chalkon LIV kondensiert wurde. In einer oxidativen Cyclodehydratisierung konnte das Flavonol LVI, insgesamt über sechs Schritte in einer Gesamtausbeute von rund 4 % gewonnen werden (Schema 29, B). Die Oxidation des Flavons LV zum Flavonol LVI war mit einer schlechten Ausbeute von 14 % der limitierende Schritt dieser Syntheseroute. Trotzdem intensiver Optimierung ließ sich die Ausbeute dieser Reaktion nicht verbessern (Schema 29, B). Da ausgehend vom Flavonol LVI noch die 3-Hydroxygruppe methyliert, die 5-Methoxygruppe partiell und selektiv demethyliert und die Benzylschutzgruppe entfernt werden müssten, wurde diese Synthesestrategie nicht weiter verfolgte, da bereits absehbar war, dass diese Synthesestrategie weder zu einer Reduktion der Gesamtschritte noch Verbesserung der Gesamtausbeute im Vergleich zu BOGNÁR et al. 271 geführt hätte.

Letztlich gelang BERGER die Synthese von Chlorflavonin und –analoga über eine AFO-Reaktion und späte Einführung der 5-Hydroxygruppe mittels Ruthenium-katalysierter *ortho*-C(sp²)-Hydroxylierung (Kapitel 4.1.3).

4.1.2. Literaturbekannte Synthese von Ternatin

Im Jahr 1950 publizierten BRIGGS und LOCKER eine Totalsynthese von Ternatin (**IV**) mittels ALLAN-ROBINSON-Kondensation und ELBS-Persulfat-Oxidation ausgehend von Vanillinsäure (**LVII**) und 2-Methoxy-2',4',6'-trihydroxyacetophenon (**XLIII**) über acht Schritte, wobei keine Ausbeuten angegeben wurden (Schema 30).²⁷⁶



Schema 30: Synthese von Ternatin (IV) nach BRIGGS und LOCKER.²⁷⁶

4.1.3. Total Synthesis of the Antimycobacterial Natural Product Chlorflavonin and Analogs via a Late-Stage Ruthenium(II)-Catalyzed *ortho*-C(sp²)-H-Hydroxylation

Zusammenfassung:

Das zunehmende Auftreten von multidrug (MDR)- und extensively (XDR)-resistenten Mycobacterium tuberculosis (Mt) Stämmen lässt das Ziel der World Health Organization (WHO), die Tuberkulosepandemie bis 2035 zu beenden, zunehmend unrealistisch werden. Während der vergangenen 50 Jahre wurden nur wenige neue Tuberkulostatika zur Behandlung der resistenten Tuberkulose zugelassen, sodass für diese Indikation dringend neue Arzneistoffe benötigt werden. In der vorlegenden Publikation wird die Totalsynthese des antimykobakteriell wirksamen Naturstoffes Chlorflavonin (CF) mittels selektiver Ruthenium(II)katalvsierter ortho-C(sp²)-H-Hydroxylierung beschrieben. Mithilfe der neu etablierten Syntheseroute konnte basierend auf einem Homologiemodell von dem Target, der Acetohydroxysäure Synthase (AHAS), und anschließenden Docking-Experimenten eine Substanzbibliothek von 14 Strukturanaloga (1a-n) dargestellt werden. Die neuen Analoga 1a-n wurden hinsichtlich ihrer antimykobakteriell in vitro Aktivität gegen Mykobakterium tuberculosis und ihrer Zytotoxizität gegen humane Ziellinien getestet. Das vielversprechendste Analogon Bromflavonin (BF) zeigte eine verbesserte in vitro Aktivität gegen den virulenten H37Rv Stamm von *Mt* (Minimale Hemmkonzentration $MHK_{90} = 0.78 \mu M$). Darüber hinaus wurden die chemische und metabolische Stabilität von Chlor- und Bromflavonin sowie deren pKs-Werte mittels ¹H-NMR-Titration bestimmt. Für weitergehende Strukturoptimierungen wurde basierend auf den MHK₉₀-Werten ein Modell zur Quantitativen Struktur-Aktivitäts-Beziehung (QSAR) erstellt.

Zu Beginn dieser Promotion hatte Dr. ALEXANDER BERGER bereits die Synthese von Chlorflavonin (1) wie in der vorliegenden Publikation etabliert. Zudem konnte BERGER erste Chlorflavonin Analoga synthetisieren, bei denen das Chloratom gegen weitere (bio-)isostere (1a-e) ausgetauscht und das Substitutionsmuster des B-Ringes (1k-I) variiert wurde. Die weiteren Analoga (1h-i, 1m-n) wurden parallel zu den im Rahmen dieser Promotion hergestellten Analoga (1f-g, 1j) synthetisiert und hinsichtlich ihrer *in vitro* Aktivität gegen den virulenten H37Rv Stamm von *Mt* getestet.





Article

Total Synthesis of the Antimycobacterial Natural Product Chlorflavonin and Analogs via a Late-Stage Ruthenium(II)-Catalyzed *ortho*-C(sp²)-H-Hydroxylation

Alexander Berger, Talea Knak, Anna-Lene Kiffe-Delf, Korana Mudrovcic, Vinayak Singh, Mathew Njoroge, Bjoern B. Burckhardt, Mohanraj Gopalswamy, Beate Lungerich, Lutz Ackermann et al.

Special Issue C-H Functionalization Chemistry: Applications in Drug Synthesis

Edited by Dr. Yinuo Wu





https://doi.org/10.3390/ph15080984





Article Total Synthesis of the Antimycobacterial Natural Product Chlorflavonin and Analogs via a Late-Stage Ruthenium(II)-Catalyzed *ortho*-C(sp²)-H-Hydroxylation

Alexander Berger ^{1,†}, Talea Knak ^{1,†}, Anna-Lene Kiffe-Delf ², Korana Mudrovcic ¹, Vinayak Singh ^{3,4}, Mathew Njoroge ⁴, Bjoern B. Burckhardt ⁵, Mohanraj Gopalswamy ¹, Beate Lungerich ¹, Lutz Ackermann ⁶, Holger Gohlke ^{1,7}, Kelly Chibale ^{3,4}, Rainer Kalscheuer ² and Thomas Kurz ^{1,*}

- ¹ Institute of Pharmaceutical and Medicinal Chemistry, Heinrich Heine University Düsseldorf, Universitätsstraße 1, 40225 Düsseldorf, Germany
- ² Institute of Pharmaceutical Biology and Biotechnology, Heinrich Heine University Düsseldorf, Universitätsstraße 1, 40225 Düsseldorf, Germany
- ³ South African Medical Research Council Drug Discovery and Development Research Unit, Department of Chemistry and Institute of Infectious Disease and Molecular Medicine, University of Cape Town, Rondebosch 7701, South Africa
- ⁴ Drug Discovery and Development Centre (H3D), University of Cape Town, Rondebosch 7701, South Africa
- ⁵ Institute of Clinical Pharmacy and Pharmacotherapy, Heinrich Heine University Düsseldorf, Universitätsstraße 1, 40225 Düsseldorf, Germany
- ⁶ Institut für Organische und Biomolekulare Chemie, Georg-August-Universität Göttingen, Tammannstraße 2, 37077 Göttingen, Germany
- ⁷ John-von-Neumann-Institute for Computing (NIC), Jülich Supercomputing Centre (JSC), Institute of Biological Information Processing (IBI-7: Structural Biochemistry), and Institute of Bio- and Geosciences (IBG-4: Bioinformatics), Forschungszentrum Jülich GmbH, 52428 Jülich, Germany
- Correspondence: thomas.kurz@hhu.de
- † These authors contributed equally to this work.

Abstract: The continuous, worldwide spread of multidrug-resistant (MDR) and extensively drugresistant (XDR) tuberculosis (TB) endanger the World Health Organization's (WHO) goal to end the global TB pandemic by the year 2035. During the past 50 years, very few new drugs have been approved by medical agencies to treat drug-resistant TB. Therefore, the development of novel antimycobacterial drug candidates to combat the threat of drug-resistant TB is urgent. In this work, we developed and optimized a total synthesis of the antimycobacterial natural flavonoid chlorflavonin by selective ruthenium(II)-catalyzed ortho-C(sp²)-H-hydroxylation of a substituted 3'methoxyflavonoid skeleton. We extended our methodology to synthesize a small compound library of 14 structural analogs. The new analogs were tested for their antimycobacterial in vitro activity against Mycobacterium tuberculosis (Mtb) and their cytotoxicity against various human cell lines. The most promising new analog bromflavonin exhibited improved antimycobacterial in vitro activity against the virulent H37Rv strain of Mtb (Minimal Inhibitory Concentrations (MIC₉₀) = 0.78 µm). In addition, we determined the chemical and metabolic stability as well as the pK_a values of chlorflavonin and bromflavonin. Furthermore, we established a quantitative structure-activity relationship model using a thermodynamic integration approach. Our computations may be used for suggesting further structural changes to develop improved derivatives.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; natural product; flavonoid; acetohydroxyacid synthase inhibitor; *ortho*-C(sp²)-H-hydroxylation; 4H-chromen-4-one; chlorflavonin; antimycobacterial activity

1. Introduction

In 2020, the World Health Organization estimated that over two billion people were infected with tuberculosis (TB) caused by the bacterial pathogen *Mycobacterium tuberculosis*



Citation: Berger, A.; Knak, T.; Kiffe-Delf, A.-L.; Mudrovcic, K.; Singh, V.; Njoroge, M.; Burckhardt, B.B.; Gopalswamy, M.; Lungerich, B.; Ackermann, L.; et al. Total Synthesis of the Antimycobacterial Natural Product Chlorflavonin and Analogs via a Late-Stage Ruthenium(II)-Catalyzed *ortho*-C(sp²)-H-Hydroxylation. *Pharmaceuticals* **2022**, *15*, 984. https://doi.org/10.3390/ ph15080984

Academic Editor: Yinuo Wu

Received: 8 July 2022 Accepted: 8 August 2022 Published: 10 August 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https:// creativecommons.org/licenses/by/ 4.0/). (*Mtb*). The first-line therapy for drug-susceptible *Mtb* strains has remained unchanged for 50 years, despite a long treatment duration and, in part, severe side effects. During this period, only three new anti-TB drugs with novel modes of action, bedaquiline, delamanid, and pretomanid, have been clinically approved. However, these three drugs are only approved for the treatment of multidrug-(MDR-) and extensively drug-resistant-(XDR-)TB [1-3]. Therefore, there is a strong need for the development of novel lead structures, and (pre)clinical candidates with novel mechanisms of action for inclusion in novel drug regimens that can contribute to shortening treatment and delaying resistance. The naturally occurring flavonoid chlorflavonin (CF, Figure 1) was first isolated in 1969 from Aspergillus candidus. CF's antimycotic properties against, e.g., Aspergillus amstelodami und Paecilomyces *variotii* were reported in the same year [4]. In 1970, the structure of CF was resolved [5]. Recently, Rehberg et al. discovered CF's strong in vitro growth inhibition against virulent *Mtb* H37Rv (MIC₉₀ = 1.56 μ M) and *Mtb* XDR clinical isolates. CF exhibited no cytotoxicity against the human fetal lung fibroblast cell line MRC-5 and monocyte cell line THP-1. For mono treatment with CF, a bacteriostatic effect was observed. In addition, CF demonstrated synergistic efficacy with delamanid and the first-line anti-TB drug isoniazid, including intracellular activity against infected human macrophages. CF specifically inhibits the large catalytic subunit IlvB1 of the mycobacterial acetohydroxyacid synthase (AHAS), which is the first common enzyme in the de novo biosynthetic pathway of essential branched-chain amino acids (BCAA) and pantothenic acid [6-13]. The inhibition of the mycobacterial AHAS through chlorflavonin causes combined auxotrophies of BCAA and pantothenic acid [14]. In addition, the treatment of *Mtb*-infected mice with the AHAS inhibitor sulfometuron methyl, which is approved as a herbicide, led to a significantly reduced proliferation of the pathogen in the host's lungs [15]. In the context of vaccine research, it was shown that BCAA-auxotrophic mutants of intracellular pathogens exhibited significantly reduced virulence in vivo [16]. The fact that AHAS is present in *Mtb* but not in the human host makes it a promising target for developing novel antituberculosis drugs [17].





chlorflavonin (1)

Figure 1. Structure and nomenclature of CF (1).

None of the currently approved TB drugs inhibit AHAS nor any enzyme in the BCAA biosynthetic pathway [14]. CF's novel mechanism of action, structure, and potent antimy-cobacterial in vitro activity make it a promising lead structure for developing a new class of anti-TB drugs. The eponymous chlorine substituent on the B-ring adjacent to the phenolic hydroxyl group is particularly noteworthy and unusual for a flavonoid [18,19]. In 1980, Tökés et al. described the only published synthesis of CF through an Allan–Robinson condensation of 2-(benzoyloxy)-3-chlorobenzoic anhydride (3) with a hydroxyacetophenone derivative 4 in a total yield of only 0.79% over seven steps (Scheme 1A) [20].



B Attempted synthesis of chlorflavonin (1) via Allan-Robinson condensation (ARC)



C Attempted synthesis of chlorflavonin (1) via oxidation of flavone (10)



Scheme 1. Synthetic approaches towards chlorflavonin (1).

2. Results and Discussion

2.1. Synthesis of CF

In a first synthetic attempt, we tried to avoid the occasionally unfavorable Elbs persulfate oxidation by using the 2'-hydroxyacetophenon 7 with the natural substitution pattern of the A-ring [21]. Using this approach adapted from Tökés et al. [20], we planned to circumvent the difficult selective methylation of the phenolic hydroxyl groups in the 7- and 8-position (Scheme 1A). While intermediate 6 was successfully synthesized, the selective demethylation of 6 with BBr₃ to provide 1-(2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyphenyl)-2methoxyethan-1-one (7) in sufficient yield was not feasible (Scheme 1B, see Supplementary Materials for details). In our second attempt, flavone 10 was synthesized by a Claisen-Schmidt condensation of the substituted 2'-hydroxyacetophenon 8 and the salicylic aldehyde derivative 9, followed by oxidative cyclo-dehydration of the chalcone intermediate with a catalytic amount of iodine in dimethyl sulfoxide (DMSO). Unfortunately, the oxidation of flavone 10 with dimethyldioxirane (DMDO), oxone®, or tert-butylhydroperoxid (TBHP) resulted in poor yields (Scheme 1C, see Supplementary Materials for details). To introduce the important phenolic hydroxyl group of the A-ring immediately and to forego selective demethylation in a separate step, the commonly used Algar-Flynn-Oyamada (AFO) reaction was employed to build the flavonol skeleton. However, the substrate scope

of the AFO reaction was limited due to the competing formation of aurones when using substrates with electron-donating groups [21–23]. Based on this limitation, we planned to generate the essential substitution pattern of the A-ring via a transition metal-catalyzed *ortho*-C(sp²)-H-functionalization using the carbonyl oxygen of the 4-chromanone moiety as the coordinating directing group in the last step (Scheme 2). Therefore, the synthesis of the 3'-methoxyflavonol **16** should take place by methylation of the flavonol **15**, which can be synthesized in advance by Claisen–Schmidt condensation of the commercially available starting materials **2** and **13**. The oxidative ring closure of the chalcone intermediate should then be initiated with alkaline hydrogen peroxide in an ethanolic solution in a sequential one-pot process. Starting from 3-chloro-2-hydroxybenzaldehyde (**2**), the methoxymethyl ether (MOM) protecting group was introduced to the phenolic hydroxyl group by nucleophilic substitution with chloromethyl methyl ether in the presence of *N*,*N*-diisopropylethylamine (DIPEA) with an excellent yield of 97% (Scheme **3**).



Scheme 2. Retrosynthetic approach.



Scheme 3. Synthesis of 3'-methoxyflavonol 17.

Next, the resulting MOM-protected salicylaldehyde **12** was condensed with the commercially available 2'-hydroxyacetophenone **13** by a base-mediated Claisen–Schmidt condensation in ethanolic solution. Afterward, hydrogen peroxide was added to initiate the oxidative Algar–Flynn–Oyamada ring closure to provide flavonol **15** with a moderate yield of 42% on a multigram scale. Effective cooling, a slow addition rate of hydrogen peroxide, and sufficient dilution of the reaction mixture were critical for avoiding side products and simplifying the purification process (Scheme 3). Next, the enolic hydroxyl group of flavonol **15** was methylated with iodomethane in the presence of Cs_2CO_3 in dimethylformamide (DMF). The MOM protecting group of 3'-methoxyflavonol **16** was then removed by acidolysis with methanolic hydrochloric acid at 50 °C to give the deprotected flavonoid **17** with a good yield. It was unnecessary to add a scavenger to deactivate in situ-generated formaldehyde, since no significant side reactions were observed (Scheme 3).

In the final step, we studied the introduction of the essential phenolic hydroxyl group in position 5 of the A-ring by a selective transition metal-catalyzed *ortho*-C(sp²)-H-hydroxylation using the carbonyl oxygen of the 4H-chromen-4-one skeleton as a coordinating directing group. In the last two decades, significant progress has been made for C-H-functionalization [24–26], especially for substrates with weakly coordinating directing groups such as the carbonyl oxygen of acetophenones and chromones [26–33] An extensive catalyst, oxidant, solvent, and temperature screening was performed to optimize our method. For this purpose, the conversion and selectivity of the *ortho*-C(sp²)-H-hydroxylation were monitored by HPLC-UV/Vis (Table 1). Inspired by the work of Shan et al. and others, we first studied palladium(II)-catalysts in combination with PhI(TFA)2 as the terminal oxidant in 1,2-dichlorethane (DCE) [34]. However, these reaction conditions provided only trace amounts of CF, and in the case of longer reaction times and an excess of oxidant, the substrate decomposed (entries 1–2). Replacing DCE with a mixture of trifluoroacetic acid (TFA) and trifluoroacetic anhydride (TFAA) (9:1, v/v) resulted in a higher conversion rate and moderate selectivity. Notably, reversing the solvent ratio significantly increased conversion and improved selectivity (entries 3–4). By combining $[RuCl_2(p-cymene)]_2$ as a catalyst and selectfluor as an oxidizing agent, the formation of byproducts could be suppressed to such an extent that purification by silica gel chromatography or recrystallization was successfully applied (entries 5–6). The addition of a silver(I) additive was beneficial because of its role as a halogen scavenger. Silver-cations abstract chloride from the neutral dimeric catalyst and form two monomeric, cationic catalyst species, which can interact with the partially negatively charged oxygen in a stronger fashion [29,35]. While an increased number of side reactions was observed with 2.0 equivalents of the oxidizing agent, virtually no side reaction occurred with a slight stoichiometric excess of 1.1 equivalents (entries 7–8). At the ideal reaction temperature of 80 °C, good conversions and superior selectivity were achieved, while only trace amounts of 1 were detected at 60 °C. In contrast, complete conversion of the starting material was observed at 120 °C, as well as the formation of several side products, necessitating purification with RP-flash chromatography (entries 9–10). Furthermore, no significant increase in conversion was observed when the reaction was carried out under argon atmosphere, nor with the continuous addition of the oxidants or without separate previous activation of the catalyst through the silver additive (see Supplementary Materials for complete optimization studies). Initially, the ortho-C(sp²)-H-hydroxylation yielded the 2,2,2-trifluoroacetate intermediate 18, which was converted into the desired product 1 through methanolysis. The structure of chlorflavonin was elucidated via ¹H-and ¹³C-NMR, which agrees with the spectral data published and discussed by Rehberg et al. [14].

		5mol% Pd(II) o oxidant additive solvent, T	s , time	methanolysis	chlorflax	O O O O O O O O O O	
Entry ^a	Catalyst	Oxidant (Equiv.)	Additive (Equiv.)	Solvent (0.07 M)	T (°C)	Time (h)	Conversion (%)
1	Pd(TFA) ₂	PhI(TFA) ₂ (1.2)	-	DCE	80	8	trace
2	Pd(TFA) ₂	PhI(TFA) ₂ (2.0)	-	DCE	80	16	decomp.
3	Pd(TFA) ₂	PhI(TFA) ₂ (1.2)	-	9:1 TFA/TFAA	80	8	48
4	Pd(TFA) ₂	PhI(TFA) ₂ (1.2)	-	1:66 TFA/TFAA ^b	80	8	52
5	[RuCl ₂ (<i>p</i> - cymene)] ₂	PhI(TFA) ₂ (1.5)	Ag ₂ CO ₃ (1.5)	1:66 TFA/TFAA ^b	80	24	43
6	[RuCl ₂ (<i>p</i> - cymene)] ₂	selectfluor (1.5)	Ag ₂ CO ₃ (1.5)	1:66 TFA/TFAA ^b	80	16	53
7	[RuCl ₂ (<i>p</i> - cymene)] ₂	selectfluor (2.0)	Ag ₂ CO ₃ (2.0)	1:66 TFA/TFAA ^b	80	16	61
8	[RuCl ₂ (p- cymene)] ₂	selectfluor (1.1)	Ag ₂ CO ₃ (2.0)	1:66 TFA/TFAA ^b	80	24	72
9	[RuCl ₂ (<i>p</i> -cymene)] ₂	selectfluor (1.5)	Ag ₂ CO ₃ (1.5)	1:66 TFA/TFAA ^b	60	16	trace
10	[RuCl ₂ (<i>p</i> - cymene)] ₂	selectfluor (1.2)	Ag ₂ CO ₃ (1.2)	1:66 TFA/TFAA ^b	120	2	74

Table 1. Optimization of ortho-C(sp²)-H-hydroxylation of 3'-methoxyflanonol 17.

^a Reaction conditions: Flavone 8 (0.5 mmole, 1.0 equiv.), 5 mol% catalyst, 1.1–2.0 equiv oxidant, 1.2–2.0 equiv additive. ^b 3.0 equiv. TFA were used.

2.2. Lead Optimization of CF

After establishing the optimal reaction conditions, we designed a small compound library of CF analogs for preliminary structure-activity relationship (SAR) studies. Previously, we published a homology model of the Mtb H37Rv IlvB1 catalytic subunit of AHAS using the Saccharomyces cerevisiae and Arabidopsis thaliana (PDB ID 1T9C and 1YBH) AHAS proteins as templates [14]. Subsequent docking studies performed with Glide and AutoDock identified potential interactions between CF and amino acid residues within the putative active site of IlvB1, which provided a rational approach for the design of the analogs. Therefore, in this first series of analogs, we focused on modifications to the B-ring. Since the lipophilic chlorine substituent might interact with amino acid side chains inside a hydrophobic side pocket, we replaced the chlorine substituent with bioisosteric moieties and lipophilic substituents, e.g., Br and CF₃ [14]. In addition, we wanted to increase the acidity of the phenolic hydroxyl group of the B-ring to facilitate its deprotonation and strengthen the possible salt bridge to Lys197. To analyze the importance of the 2'-hydroxy group, we replaced it with the bioisosteric difluoromethoxy group and a chlorine or fluorine substituent [36-38]. The salicylic aldehyde starting materials and several MOM-protected salicylic aldehydes were purchased or synthesized according to the literature [39–45]. Analogs 17a–p were synthesized according to Scheme 3. For the preparation of 1h, an additional step was needed. According to a procedure of Li et al. for difluromethylation of phenols [46], the 2'-hydroxy group of intermediate 17b was treated with aqueous KOH solution in dichloromethane. Dropwise addition of (bromodifluormethyl)trimethylsiliane as difluorocarbene precursor gave intermediate 19 with a yield of 78%. The final *ortho*-C(sp²)-H-hydroxylation of **17a**–**p** afforded the CF analogs **1a**–**p** with yields of 6–53% (Scheme 4).



Scheme 4. Scope of ortho-C(sp²)-H-hydroxylation. ^a Reactions were performed on a 1.0 mmole scale. ^b 0.3–0.8 mmole reaction scales.

The SAR for the B-ring was quite narrow, and even small structural changes resulted in a loss of antimycobacterial activity. This activity loss was observed for the bioisosteric replacement of the 2'-hydroxy group with potential bioisosteric groups (1f,g), the introduction of a fluorine or a methyl substituent in the 5'-position of the B-ring (1h–j), and the variation in the substitution pattern (1k–o). An explanation for the inactivity of these analogs could be their poor water solubility. For a more comprehensive assessment of the antimycobacterial activity, a better understanding of the biological functions of the different mycobacterial AHAS isoenzymes is needed. For this purpose, we are currently developing a new robust AHAS enzyme assay.

2.3. Evaluation of Selected Physicochemical Properties, Microsomal Stability, and Computations

For further preclinical profiling of CF and BF, selected physicochemical properties (e.g., water solubility), chemical and microsomal metabolic stability were determined. The aqueous solubility of both compounds was determined to be $<5 \mu$ M at a pH of 7.4 using a miniaturized shake-flask method (Table 2). While the chemical stability of CF and BF in a phosphate buffer at pH 2.0 and 7.4 was excellent (99% drug content after 48 h), the metabolic stability in human liver microsomes was moderate, and both compounds can be classified as high extraction drugs (hepatic extraction ratio $E_H \ge 0.72$) (Table 2).

Table 2. Determination of physicochemical properties.

	CF	BF
Water solubility at pH 7.4 ^a	<5 µM	$<5 \ \mu M$
pK_{a1} (2'-OH) ^b	6.80 ± 0.07	6.74 ± 0.04
р <i>K</i> _{a2} (5-ОН) ^{<i>b</i>}	10.40 ± 0.03	10.30 ± 0.04
remaining after 30 min ^c	48%	60%
$CL_{int, app}^{d}$	76.3 mL/min/mg	53.4 mL/min/mg
$\mathrm{E}_{\mathrm{H}} d^{-}$	0.78	0.72

^{*a*} 1 mg/mL compound was dissolved in phosphate buffer pH 7.4. The solubility was determined using the shake-flask method and measured with HPLC at 254 nm after 4 and 24 h. ^{*b*} pK_a values were determined by ¹H-NMR titration. ^{*c*} The compounds were incubated at 1 μ M in human liver microsomes (0.4 mg/mL) for 30 min at 37 °C. The samples were analyzed by LC-MS/MS for the disappearance of the parent compound. ^{*d*} Predicted in vivo intrinsic clearance (CL_{int, app}) and hepatic extraction ratio (E_H) were determined using standard equations established by Di et al. and Obach et al. [47,48].

To investigate the protonation state of CF and BF in physiological media (pH = 7.4) and these compounds' ability to form the proposed salt bridge with Lys197, the p K_a values were determined by ¹H-NMR titration (see Supplementary Data File; Figures S1–S4). For

determination of the p K_a of the 5-hydroxy group, the shift of the singlet at 6.65 ppm, the triplet at 7.01 ppm for the 2'-hydroxyl group, and both double duplets at 7.42 and 7.59 ppm were used.

Furthermore, seven structurally diverse chlorflavonin derivatives (1, 1a, 1b, 1c, 1d, 1f, 1i) with substitutions at the B-ring were chosen to establish a quantitative structure– activity relationship model using the thermodynamic integration (TI) approach [49,50], as implemented in FEW [51] of Amber21 (see Supplementary Materials Data File) [52]. The computed relative free energies ($\Delta\Delta G$) were generally in qualitative agreement with the changes in the minimal inhibitory concentrations (MIC₉₀) (see Supplementary Materials Data File; Figure S7). This suggests that changes in MIC₉₀ were predominantly determined by differences in the derivatives' affinities. Furthermore, such computations may suggest further structural changes to obtain more active chlorflavonin derivatives.

3. Materials and Methods

3.1. Chemistry

The syntheses of chlorflavonin and chlorflavonin analogs are described in detail in the Supplementary Materials Data File. Commercially available reagents and solvents were purchased from Apollo Scientific, Sigma-Aldrich, TCI, BLDpharm, Carbolution, ABCR GmbH, Acros Organics, or Alfa Aesar and were used without further purification. Dry solvents were purchased from Acros Organics. Analytical thin-layer chromatography was performed using silica gel 60 F254 aluminium plates. Compound spots were visualized either by UV light (254 nm) or by staining with a solution of 1% FeCl₃ in ethanol. Flash chromatography was performed on CombiFlash[®] Rf 200 using RediSep[™] Rf-columns. ¹H-, ¹³C-, and ¹⁹F-NMR spectra were recorded with Bruker Avance III—300, Bruker Avance III— 600, or Bruker Avance DRX—500 spectrometers. ¹H- and ¹³C-NMR signals were calibrated to the residual proton and carbon resonance of the solvent: CDCl₃ (¹H-NMR δ = 7.26 ppm, ¹³C-NMR δ = 77.2 ppm), DMSO (¹H-NMR δ = 2.50 ppm, ¹³C-NMR δ = 39.5 ppm). The following abbreviations were used to describe peak splitting patterns when appropriate: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, h = hextet, m = multiplet, dd = doublet of doublet, td = doublet of triplet, ddd = doublet of doublet of doublet and brs = broad singlet. Coupling constants, J, were reported in the Hertz unit (Hz). ESI-MS data were recorded with UHR-QTOF maXis 4G. Melting points were measured on a Büchi M 565 instrument and were not corrected. Reverse-phase high-performance liquid chromatography data were measured with Varian ProStar 210 with a Phenomenex Luna C-18 (2) particle size $5 \,\mu\text{m}$ ($250 \times 4.6 \,\text{mm}$) column. The detection took place with the UV detector Varian ProStar 330 at 220–254 nm, and eluents water/acetonitrile with 0.1% TFA were used.

3.2. Determination of Minimal Inhibitory Concentration (MIC)

To characterize the structure–activity-relationship, the MIC assay was employed as previously described. Briefly, *M. tuberculosis* H37Rv cells were precultured in Middlebrook 7H9 liquid medium supplemented with 0.5% (v/v) glycerol, 0.05% (v/v) tyloxapol, and 10% (v/v) ADS (0.81% NaCl, 5% BSA and 2% dextrose) at 37 °C to an OD_{600 nm} of 0.5–0.8. Cells were diluted with fresh medium and seeded into 96-well plates to yield a final density of 10⁵ cells in 100 µL medium per well. The compounds were tested in two-fold serial dilutions with a final concentration ranging from 100 to 0.05 µM. The microtiter plates were incubated at 37 °C, 5% CO₂, and 80% humidity for 5 days. Then 10 µL of a 100 µg/mL resazurin solution were added to each well and incubated for 16 h at room temperature. After fixation of the bacteria for 30 min with a final concentration of 5% (v/v) formalin, the fluorescence was measured in a TECAN microplate reader (excitation of 540 nm, emission of 590 nm). The percentage of growth was calculated in comparison to dimethyl sulfoxide (DMSO)-treated cells (=100% growth) and the sterile control (=0% growth). All experiments were performed in triplicates.

3.3. Determination of Cytotoxcity

For the determination of the cytotoxicity of the compounds, different human cell lines were used. The human fetal lung fibroblast cell line MRC-5 (American Type Culture Collection) was incubated in Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) containing 1% (v/v) Na-pyruvate, whereas the human embryonic kidney cell line HEK-293 (CLS Cell Lines Service GmbH) was cultivated in EMEM supplemented with 2 mM L-glutamine, 1% (v/v) non-essential amino acids, and 1 mM sodium pyruvate. The human monocyte cell line THP-1 (Deutsche Sammlung von Mikroogranismen und Zellkulturen GmbH) was cultured in RPMI 1640 medium. All media were supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS).

The cell densities were quantified using a hemocytometer and then adjusted to 10^6 cells/mL. Next, 100 µL per well were seeded in 96-well microtiter plates to yield an inoculation cell density of 5×10^5 cells per well. Compounds were added employing two-fold serial dilutions resulting in final concentrations ranging from 100 to 0.78 µM. Cells were incubated for two days at 37 °C and 5% CO₂ in a humidified atmosphere. Subsequently, 10 µL of a 100 µg/mL resazurin solution was added to each well, mixed thoroughly, and incubated for an additional 3–4 h. Fluorescence was measured in a TECAN microplate reader (excitation of 540 nm, emission of 590 nm). The percentage of growth was calculated with respect to DMSO (100% growth) and Triton X-100 (0% growth) controls.

3.4. Evaluation of Solubility

Solubility was measured at pH 7.4 using an adapted miniaturized shake-flask method in 96-well plate format [53,54]. Briefly, 4 μ L of a 10 mM stock in DMSO was added to a 96-well plate and evaporated using a GeneVac[®] system. Phosphate buffer pH 7.4 was then added to the wells, and the plate was incubated for 24 h at 25 °C with shaking. At the end of this incubation, the samples were centrifuged at 3500 *g* for 15 min then transferred to an analysis plate. A calibration curve in DMSO for each sample between 10 and 220 μ M was prepared and included in the analysis plate. Analysis was then performed by HPLC-DAD, and the solubility of each sample was determined from the corresponding calibration curve. Reserpine and hydrocortisone were used as positive controls and treated similarly.

3.5. Evaluation of Compound Chemical Stability

Stability testing was performed in phosphate buffer pH 2.0 and 7.4 (prepared according to Ph. Eur. 10) at 20 °C over a period of 48 h. Therefore, 0.4 mg of substance was dissolved in Tween[®] 20 und ethanol (7/3 v/v) and diluted with the respective phosphate buffer. The solution was shaken with an IKA KS 260 basic (250 min⁻¹) at 25 °C for 48 h. Analysis was performed after 1, 3, 6, 24, and 48 h by comparing the area under the curve (A.U.C.), which was measured with HPLC-UV at 254 nm (n = 1).

3.6. Evaluation of Compound Metabolic Stability

The metabolic stability assay was performed in Human Liver Microsomes (HLM) using a single-point metabolic stability assay. Briefly, the compounds were incubated at 1 μ M in 0.4 mg/mL human mixed-gender liver microsomes (Xenotech, Kansas City, KS, USA, pool of 50) for 30 min at 37 °C. Reactions were quenched by adding ice-cold acetonitrile containing internal standard. The samples were then centrifuged and analyzed by LC-MS/MS for the disappearance of the parent compound. Half-life, clearance, and hepatic excretion ratios were determined using standard equations [47,48]. Propranolol and midazolam were used as positive controls and treated similarly.

3.7. Determination of Compound pK_a Values

NMR experiments were performed at 298 K on a Bruker Avance III HD spectrometer operating at 600 MHz equipped with 5 mm triple resonance TCI (¹H, ¹³C, ¹⁵N) cryoprobes and shielded z-gradients. For the pK_a value determination, 23 samples of 200 μ M concentration of CF and BF were prepared with pH ranges from 2 to 13 (pH in 0.5 log unit

steps) in 50 mM sodium phosphate, 100 mM sodium chloride, 10% (v/v) DMSO-d₆. 1D ¹H-NMR experiments were performed using 128 or 256 scans for each sample, and the data were processed and analyzed by the TopSpin 3.2 software (TopSpin, v3.2, Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Germany). Sodium 2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate (DSS) was used for chemical shift referencing. ¹H chemical shift values were extracted for the reporter protons using the TopSpin software (see Supplementary Materials Data File Figures S1 and S3). The pK_a values were calculated using the chemical shifts of the protonated and unprotonated forms and their corresponding mole fraction values applying the Henderson–Hasselbalch equation as explained by Gift et al. [55]. The data were plotted with the Origin software (Origin Pro 2019, v9.6.0.172, OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) (see Supplementary Data File Figures S2 and S4).

3.8. Analysis of a Quantitative Structure-Activity Relationship Model

Chlorflavonin derivates were prepared with the LigPrep module of the Schrödinger suite [56] and subsequently aligned with align_ligands of the Schrödinger suite to chlorflavonin docked into the homology model of the catalytic subunit of human AHAS [14]. The homology model [14] was prepared for calculations with the Protein Preparation Wizzard module of the Schrödinger suite. Files for relative free energy computations and analyses were prepared with the TI module of FEW [51], and AMBER version 21.1 [52] was used for simulations. The RESP charge model [57] was chosen for computing partial charges of the ligands.

Ligands in water and ligand–protein complexes in water were minimized with a three-step procedure, each with 2000 steps of steepest descent and 1000 steps of conjugategradient minimization in the presence of 25 kcal mol⁻¹ A^{-2} , 5 kcal mol⁻¹ A^{-2} , and no restraints on the solute, respectively. Subsequently, three replicas of each system were heated from 100 K to 300 K in the NVT (constant temperature and constant volume) ensemble during 50 ps of MD simulations followed by an adjustment of the density in the NPT (constant temperature and constant pressure) ensemble during a 50 ps MD run.

The transition map was based on Kruskal's algorithm [58] with a modification introduced to close thermodynamic cycles for convergence control. As "cost" of the edges, $10^3 \times (2$ —TanimotoCombo) was calculated, where the TanimotoCombo score was computed with the ROCS module of OpenEye [56,59]. Production phase MD simulations were carried out at 300 K in the NVT ensemble for 9 λ windows, $\lambda = 0.1, 0.2, \ldots, 0.9$, respectively, with lengths of 10 ns per λ window for ligands in solvent and 30 ns per λ window for complexes in solvent. The impact of the simulation time per λ window (10 ns and 30 ns) on the precision of the computations in the case of complex simulations was estimated by calculating the standard deviation over three replicas (Figure S5). The convergence of the computations was confirmed in three ways: First, the precision of average $dV/d\lambda$ for each λ window was determined by employing the Student's distribution for each replica separately as implemented in the FEW workflow (convergence_check_method 2) [51]; second, the average $dV/d\lambda$ values were checked with respect to their consistency across the three replicas (Figure S6); third, the cycle-closure hysteresis of closed thermodynamic cycles was computed (Table S3).

3.9. Solubility and Partition Coefficient Predictions

QikProp [60] of the Schrödinger suite (version 6.7), Schrödinger, LLC, New York, NY, USA, 2015 was used to compute the solubility (QPlog*S*) and octanol/water partition coefficient (QPlog $P_{o/w}$) for chlorflavonin derivates included in relative free energy computations (Table S4).

4. Conclusions

In conclusion, we developed an efficient five-step synthesis of the antimycobacterial natural flavonoid chlorflavonin (1) and 14 structural analogs, demonstrating the broad applicability of our method. The overall yield of CF (13.5%) was significantly improved

compared to the original synthesis by Tökés et al. The SAR for the B-ring was surprisingly narrow, as small structural changes resulted in a loss of antimycobacterial activity. We will therefore extend the future optimization to rings A and C. The most active compound, BF, exhibited submicromolar antimycobacterial activity with no cytotoxicity toward human cells. The bromine substituent appeared to fill the proposed lipophilic sub-pocket ideally. While the chemical stability of CF and BF was excellent, the metabolic stability needs improvement through future lead optimization. The initially derived SARs should encourage and guide the synthesis of further analogs. For a successful and more comprehensive structure optimization of CF and BF, we are currently developing a robust AHAS enzyme assay. In addition, our quantitative structure-activity relationship model will be further developed to effectively support this lead optimization program.

Supplementary Materials: The following Supplementary data files can be downloaded at: https:// www.mdpi.com/article/10.3390/ph15080984/s1. References [55-61] are cited in the Supplementary Materials. In this file, we describe the synthesis, characterization, and analysis of chlorflavonin 1 and chlorflavonin analogs 1a-n. Spectral copies of ¹H-, ¹³C-, and ¹⁹F-NMR data of chlorflavonin 1 and chlorflavonin analogs 1a-n. Table S1. Literature for known compounds. Table S2. Reaction optimization. Table S3. Relative free energy of binding calculated with the FEW free energy workflow. All values of cycle closure hysteresis are below the threshold of chemical accuracy (1 kcal mol^{-1}). Figure S1: ¹H-NMR-Spectra of chlorflavonin's aromatic protons (6–8 ppm) at pH of 2.0–12.5. A– D are the four aromatic protons. Chemical shift in ppm (parts per million). Figure S2: Titration curves (chemical shift in ¹H-NMR spectra vs. pH value) of chlorflavonin's four aromatic protons plotted with Origin software (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). Figure S3: ¹H-NMR-Spectra of bromflavonin's aromatic protons (6–8 ppm) at pH of 2.0–12.5. A–D are the four aromatic protons. Chemical shift in ppm (parts per million). Figure S4: Titration curves (chemical shift in ¹H-NMR spectra vs. pH value) of bromflavonin's four aromatic protons plotted with Origin software (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). Table S4. Predicted solubility and octanol/water partition coefficient computed with QikProp for chlorflavonin derivatives included in the relative free energy computations. Figure S5. Average $dV/d\lambda$ over three replicas of free energy calculations of complexes with respect to the simulation time (10 ns per λ step and 30 ns per λ step). Error bars denote the standard deviation from the three replicas. Figure S6. Ensemble-averaged $dV/d\lambda$ after 10 ns per λ step (ligand in solvent) and 30 ns per λ step (complex in solvent) of sampling time for transitions of chlorflavonin derivatives. The standard error of the mean in all cases was < 0.1 kcal mol⁻¹. Figure S7. Comparison of predicted relative free energy of binding ($\Delta\Delta G$ predicted) with the corresponding relative free energy of binding calculated from difference in minimal inhibitory concentration ($\Delta\Delta G$ calculated from MIC₉₀) for the transitions V0 \rightarrow V1 shown on the x-axis.

Author Contributions: Conceptualization, A.B., T.K. (Talea Knak) and T.K. (Thomas Kurz); Methodology, A.B., T.K. (Talea Knak), K.M., M.G., V.S., M.N. and A.-L.K.-D.; Software, K.M., H.G. and M.G.; Validation, A.B., T.K. (Talea Knak), A.-L.K.-D., K.M., M.G. and B.L.; Formal Analysis, A.B., T.K. (Talea Knak), A.-L.K.-D., K.M. and M.G.; Investigation, A.B., T.K. (Talea Knak), K.M., A.-L.K.-D., M.G. and B.L.; Resources, H.G., K.C., R.K. and T.K. (Thomas Kurz); Data Curation, H.G., R.K., K.C. and T.K. (Thomas Kurz); Writing—Original Draft Preparation, A.B., T.K. (Talea Knak), K.M., A.-L.K.-D., M.G., V.S. and M.N.; Writing—Review & Editing, L.A., B.B.B., A.B., K.C., H.G., R.K., T.K. (Talea Knak) and T.K. (Thomas Kurz); Visualization, A.B., T.K. (Talea Knak), M.G. and K.M.; Supervision, T.K. (Thomas Kurz); Project Administration, T.K. (Talea Knak) and T.K. (Thomas Kurz), Funding Acquisition, H.G., R.K., K.C. and T.K. (Thomas Kurz). All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was financially supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft—GRK 2158/2—270650915 (Research Training Group GRK 2158, TP4a to H.G., TP3a to R.K., TP2c to T.K.) and GO 1367/4-3 (to H.G.). The University of Cape Town, South African Medical Research Council, and South African Research Chairs Initiative of the Department of Science and Innovation, administered through the South African National Research Foundation, are gratefully acknowledged for support (K.C.).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are contained within the article and Supplementary Materials.

Acknowledgments: Thanks to the CeMSA@HHU (Center for Molecular and Structural Analytics @ Heinrich Heine University) for recording the mass-spectrometric and the NMR-spectroscopic data. M.G. and H.G. acknowledge access to the Jülich-Düsseldorf Biomolecular NMR Center and are thankful to Manuel Etzkorn for the discussion of NMR data. H.G. is grateful to OpenEye for a Free Public Domain Research License and for computational support by the "Zentrum für Informations und Medientechnologie" at the Heinrich Heine University Düsseldorf and the computing time provided by the John von Neumann Institute for Computing (NIC) to H.G. on the supercomputer JUWELS at Jülich Supercomputing Centre (JSC) (user ID: HKF7, VSK33). We would also like thank Carolyn Glasser, University of Michigan for editing and proofreading this manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- 1. Gandhi, N.R.; Brust, J.C.M.; Shah, N.S. A new era for treatment of drug-resistant tuberculosis. *Eur. Respir. J.* 2018, 52, 1801350. [CrossRef] [PubMed]
- 2. Ignatius, E.H.; Dooley, K.E. New Drugs for the Treatment of Tuberculosis. Clin. Chest Med. 2019, 40, 811–827. [CrossRef] [PubMed]
- 3. Li, Y.; Sun, F.; Zhang, W. Bedaquiline and delamanid in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis: Promising but challenging. *Drug Dev. Res.* 2018, *80*, 98–105. [CrossRef]
- 4. Richards, M.; Bird, A.E.; Munden, J.E. Chlorflavonin, A New Antifungal Antibiotic. J. Antibiot. 1969, 22, 388. [CrossRef]
- 5. Bird, A.E.; Marshall, A.C. Structure of chlorflavonin. J. Chem. Soc. Perkin 1 1969, 18, 2418–2420. [CrossRef] [PubMed]
- Sampson, S.L.; Mansfield, K.G.; Carville, A.; Magee, D.M.; Quitugua, T.; Howerth, E.W.; Bloom, B.R.; Hondalus, M.K. Extended safety and efficacy studies of a live attenuated double leucine and pantothenate auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis* as a vaccine candidate. *Vaccine* 2011, 29, 4839–4847. [CrossRef] [PubMed]
- Sampson, S.L.; Dascher, C.C.; Sambandamurthy, V.K.; Russell, R.G.; Jacobs, W.R.; Bloom, B.R.; Hondalus, M.K. Protection Elicited by a Double Leucine and Pantothenate Auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis* in Guinea Pigs. *Infect. Immun.* 2004, 72, 3031–3037. [CrossRef]
- 8. Hondalus, M.K.; Bardarov, S.; Russell, R.; Chan, J.; Jacobs, W.R.; Bloom, B.R. Attenuation of and protection induced by a leucine auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* **2000**, *68*, 2888–2898. [CrossRef]
- Radhakrishnan, A.N.; Wagner, R.P.; Snell, E.E. Biosynthesis of Valine and Isoleucine: III. α-Keto-β-hydroxy acid reductase and α-hydroxy-β-keto acid reductoisomerase. *J. Biol. Chem.* 1960, 235, 2322–2331. [CrossRef]
- 10. Leaviti, R.I. Isoleucine and Valine Metabolism in Escherichia coli XII. J. Bacteriol. 1964, 88, 172–178. [CrossRef]
- Steinmetz, A.; Vyazmensky, M.; Meyer, D.; Barak, Z.E.; Golbik, R.; Chipman, D.M.; Tittmann, K. Valine 375 and Phenylalanine 109 Confer Affinity and Specificity for Pyruvate as Donor Substrate in Acetohydroxy Acid Synthase Isozyme II from Escherichia coli. *Biochemistry* 2010, 49, 5188–5199. [CrossRef] [PubMed]
- Choi, K.-J.; Yu, Y.G.; Hahn, H.G.; Choi, J.-D.; Yoon, M.-Y. Characterization of acetohydroxyacid synthase from *Mycobacterium tuberculosis* and the identification of its new inhibitor from the screening of a chemical library. *FEBS Lett.* 2005, 579, 4903–4910.
 [CrossRef] [PubMed]
- 13. Umbarger, H.E.; Brown, B. Isoleucine and Valine Metabolism in Escherichia coli: VIII. The Formation of Acetolactate. *J. Biol. Chem.* **1958**, 233, 1156–1160. [CrossRef]
- Rehberg, N.; Akone, H.S.; Ioerger, T.R.; Erlenkamp, G.; Daletos, G.; Gohlke, H.; Proksch, P.; Kalscheuer, R. Chlorflavonin Targets Acetohydroxyacid Synthase Catalytic Subunit IlvB1 for Synergistic Killing of *Mycobacterium tuberculosis*. ACS Infect. Dis. 2018, 4, 123–134. [CrossRef] [PubMed]
- 15. Grandoni, J.A.; Marta, P.T.; Schloss, J.V. Inhibitors of branched-chain amino acid biosynthesis as potential antituberculosis agents. *J. Antimicrob. Chemother.* **1998**, *42*, 475–482. [CrossRef]
- Awasthy, D.; Gaonkar, S.; Shandil, R.K.; Yadav, R.; Bharath, S.; Marcel, N.; Subbulakshmi, V.; Sharma, U. Inactivation of the ilvB1 gene in *Mycobacterium tuberculosis* leads to branched-chain amino acid auxotrophy and attenuation of virulence in mice. *Microbiology* 2009, 155, 2978–2987. [CrossRef]
- 17. Gokhale, K.; Tilak, B. Mechanisms of bacterial acetohydroxyacid synthase (AHAS) and specific inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* AHAS as potential drug candidates against tuberculosis. *Curr. Drug Targets* **2015**, *16*, 689–699. [CrossRef]
- Martins, B.T.; Correia da Silva, M.; Pinto, M.; Cidade, H.; Kijjoa, A. Marine natural flavonoids: Chemistry and biological activities. Nat. Prod. Res. 2018, 33, 3260–3272. [CrossRef]
- 19. Veitch, N.C.; Grayer, R.J. Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins. Nat. Prod. Rep. 2011, 28, 1626–1695. [CrossRef]
- 20. Toekes, A.L.; Bognar, R. Synthesis of chlorflavonin. Acta Chim. Acade. Sci. Hung. 1981, 107, 365–368.
- 21. Zhao, X.; Liu, J.; Xie, Z.; Li, Y. A One-Pot Synthesis of Aurones from Substituted Acetophenones and Benz aldehydes: A Concise Synthesis of Aureusidin. *Synthesis* **2012**, *44*, 2217–2224. [CrossRef]
- 22. Ferreira, D.; Brandt, E.V.; du Volsteedt, F.R.; Roux, D.G. Parameters regulating the α- and β-cyclization of chalcones. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1 1975, 1437–1446. [CrossRef]

- 23. Serdiuk, I.E.; Roshal, A.D.; Błażejowski, J. Quantum-Chemical Analysis of the Algar–Flynn–Oyamada Reaction Mechanism. *Chem. Heterocycl. Compd.* 2014, *50*, 396–403. [CrossRef]
- Wencel-Delord, J.; Dröge, T.; Liu, F.; Glorius, F. Towards mild metal-catalyzed C–H bond activation. *Chem. Soc. Rev.* 2011, 40, 4740–4761. [CrossRef]
- Gensch, T.; Hopkinson, M.N.; Glorius, F.; Wencel-Delord, J. Mild metal-catalyzed C–H activation: Examples and concepts. *Chem. Soc. Rev.* 2016, 45, 2900–2936. [CrossRef]
- Chen, S.; Ranjan, P.; Voskressensky, L.G.; Van der Eycken, E.V.; Sharma, U.K. Recent Developments in Transition-Metal Catalyzed Direct C-H Alkenylation, Alkylation, and Alkynylation of Azoles. *Molecules* 2020, 25, 4970. [CrossRef]
- Kim, J.; Kim, J.; Chang, S. Ruthenium-catalyzed direct C-H amidation of arenes including weakly coordinating aromatic ketones. Chemistry 2013, 19, 7328–7333. [CrossRef]
- Shin, Y.; Han, S.; De, U.; Park, J.; Sharma, S.; Mishra, N.K.; Lee, E.-K.; Lee, Y.; Kim, H.S.; Kim, I.S. Ru(II)-Catalyzed Selective C–H Amination of Xanthones and Chromones with Sulfonyl Azides: Synthesis and Anticancer Evaluation. J. Org. Chem. 2014, 79, 9262–9271. [CrossRef]
- Kim, K.; Choe, H.; Jeong, Y.; Lee, J.H.; Hong, S. Ru(II)-Catalyzed Site-Selective Hydroxylation of Flavone and Chromone Derivatives: The Importance of the 5-Hydroxyl Motif for the Inhibition of Aurora Kinases. Org. Lett. 2015, 17, 2550–2553. [CrossRef]
- 30. Da Silva Júnior, E.N.; Jardim, G.A.M.; Gomes, R.S.; Liang, Y.-F.; Ackermann, L. Weakly-coordinating N-oxide and carbonyl groups for metal-catalyzed C–H activation: The case of A-ring functionalization. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 7398–7411. [CrossRef]
- 31. Das, R.; Kumar, G.S.; Kapur, M. Amides as Weak Coordinating Groups in Proximal C–H Bond Activation. *Eur. J. Org. Chem.* 2017, 2017, 5439–5459. [CrossRef]
- 32. Leitch, J.A.; Wilson, P.B.; McMullin, C.L.; Mahon, M.F.; Bhonoah, Y.; Williams, I.H.; Frost, C.G. Ruthenium(II)-Catalyzed C–H Functionalization Using the Oxazolidinone Heterocycle as a Weakly Coordinating Directing Group: Experimental and Computational Insights. *ACS Catal.* **2016**, *6*, 5520–5529. [CrossRef]
- 33. De Sarkar, S.; Liu, W.; Kozhushkov, S.I.; Ackermann, L. Weakly Coordinating Directing Groups for Ruthenium(II)-Catalyzed C-H Activation. *Adv. Synth. Catal.* **2014**, *356*, 1461–1479. [CrossRef]
- 34. Shan, G.; Yang, X.; Ma, L.; Rao, Y. Pd-Catalyzed C-H Oxygenation with TFA/TFAA: Expedient Access to Oxygen-Containing Heterocycles and Late-Stage Drug Modification. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 13070–13074. [CrossRef] [PubMed]
- Sambiagio, C.; Schönbauer, D.; Blieck, R.; Dao-Huy, T.; Pototschnig, G.; Schaaf, P.; Wiesinger, T.; Zia, M.F.; Wencel-Delord, J.; Besset, T.; et al. A comprehensive overview of directing groups applied in metal-catalysed C–H functionalisation chemistry. *Chem. Soc. Rev.* 2018, 47, 6603–6743. [CrossRef] [PubMed]
- Meanwell, N.A. Fluorine and Fluorinated Motifs in the Design and Application of Bioisosteres for Drug Design. J. Med. Chem. 2018, 61, 5822–5880. [CrossRef] [PubMed]
- Zafrani, Y.; Sod-Moriah, G.; Yeffet, D.; Berliner, A.; Amir, D.; Marciano, D.; Elias, S.; Katalan, S.; Ashkenazi, N.; Madmon, M.; et al. CF₂H, a Functional Group-Dependent Hydrogen-Bond Donor: Is It a More or Less Lipophilic Bioisostere of OH, SH, and CH₃? J. Med. Chem. 2019, 62, 5628–5637. [CrossRef]
- 38. Zafrani, Y.; Yeffet, D.; Sod-Moriah, G.; Berliner, A.; Amir, D.; Marciano, D.; Gershonov, E.; Saphier, S. Difluoromethyl Bioisostere: Examining the "Lipophilic Hydrogen Bond Donor" Concept. J. Med. Chem. 2017, 60, 797–804. [CrossRef]
- Kobayashi, S.; Arai, K.; Shimizu, H.; Ihori, Y.; Ishitani, H.; Yamashita, Y. A Novel Dinuclear Chiral Niobium Complex for Lewis Acid Catalyzed Enantioselective Reactions: Design of a Tridentate Ligand and Elucidation of the Catalyst Structure. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005, 44, 761–764. [CrossRef]
- 40. 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*, 127–137. [CrossRef]
- Christensen, H. Preparation of Salicylaldehydes via the Ortho-Lithio Derivatives of Methoxymethyl-Protected Phenols. Synth. Commun. 1975, 5, 65–78. [CrossRef]
- 42. Takeuchi, D.; Chiba, Y.; Takano, S.; Osakada, K. Double-Decker-Type Dinuclear Nickel Catalyst for Olefin Polymerization: Efficient Incorporation of Functional Co-monomers. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 12536–12540. [CrossRef] [PubMed]
- 43. Bischof, D.; Tripp, M.W.; Hofmann, P.E.; Ip, C.-H.; Ivlev, S.I.; Gerhard, M.; Koert, U.; Witte, G. Regioselective Fluorination of Acenes: Tailoring of Molecular Electronic Levels and Solid-State Properties. *Chemistry* 2022, 28, e202103653. [CrossRef] [PubMed]
- Badetti, E.; Lloveras, V.; Amadio, E.; Di Lorenzo, R.; Olivares-Marín, M.; Tesio, A.Y.; Zhang, S.; Pan, F.; Rissanen, K.; Veciana, J.; et al. Organic Polyradicals as Redox Mediators: Effect of Intramolecular Radical Interactions on Their Efficiency. ACS Appl. Mater. Interfaces 2020, 12, 45968–45975. [CrossRef] [PubMed]
- Ohno, S.; Qiu, J.; Miyazaki, R.; Aoyama, H.; Murai, K.; Hasegawa, J.-Y.; Arisawa, M. Ni-Catalyzed Cycloisomerization between 3-Phenoxy Acrylic Acid Derivatives and Alkynes via Intramolecular Cleavage and Formation of the C–O Bond To Give 2,3-Disubstituted Benzofurans. Org. Lett. 2019, 21, 8400–8403. [CrossRef]
- Li, L.; Wang, F.; Ni, C.; Hu, J. Synthesis of gem-Difluorocyclopropa(e)nes and O-, S-, N-, and P-Difluoromethylated Compounds with TMSCF₂Br. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2013, 52, 12390–12394. [CrossRef]
- 47. Di, L.; Kerns, E.H.; Gao, N.; Li, S.Q.; Huang, Y.; Bourassa, J.L.; Huryn, D.M. Experimental Design on Single-Time-Point High-Throughput Microsomal Stability Assay. *J. Pharm. Sci.* **2004**, *93*, 1537–1544. [CrossRef]

- Obach, R.S. Prediction of Human Clearance of Twenty-Nine Drugs from Hepatic Microsomal Intrinsic Clearance Data: An Examination of In Vitro Half-Life Approach and Nonspecific Binding to Microsomes. *Drug Metab. Dispos.* 1999, 27, 1350–1359.
- Kaus, J.W.; Pierce, L.; Walker, R.C.; McCammont, J.A. Improving the Efficiency of Free Energy Calculations in the Amber Molecular Dynamics Package. J. Chem. Theory Comput. 2013, 9, 4131–4139. [CrossRef]
- Homeyer, N.; Stoll, F.; Hillisch, A.; Gohlke, H. Binding Free Energy Calculations for Lead Optimization: Assessment of Their Accuracy in an Industrial Drug Design Context. J. Chem. Theory Comput. 2014, 10, 3331–3344. [CrossRef]
- Homeyer, N.; Gohlke, H. FEW: A workflow tool for free energy calculations of ligand binding. J. Comput. Chem. 2013, 34, 965–973. [CrossRef] [PubMed]
- Case, D.A.; Cheatham, T.E., III; Darden, T.; Gohlke, H.; Luo, R.; Merz, K.M., Jr.; Onufriev, A.; Simmerling, C.; Wang, B.; Woods, R.J. The Amber biomolecular simulation programs. J. Comput. Chem. 2005, 26, 1668–1688. [CrossRef] [PubMed]
- 53. Alelyunas, Y.W.; Liu, R.; Pelosi-Kilby, L.; Shen, C. Application of a Dried-DMSO rapid throughput 24-h equilibrium solubility in advancing discovery candidates. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2009, *37*, 172–182. [CrossRef] [PubMed]
- 54. Zhou, L.; Yang, L.; Tilton, S.; Wang, J. Development of a high throughput equilibrium solubility assay using miniaturized shake-flask method in early drug discovery. *J. Pharm. Sci.* **2007**, *96*, 3052–3071. [CrossRef] [PubMed]
- Gift, A.D.; Stewart, S.M.; Kwete Bokashanga, P. Experimental Determination of pKa Values by Use of NMR Chemical Shifts, Revisited. J. Chem. Educ. 2012, 89, 1458–1460. [CrossRef]
- 56. ROCS, 3.4.2.1; OpenEye Scientific Software: Santa Fe, NM, USA, 2020.
- 57. Wang, J.; Cieplak, P.; Kollman, P.A. How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? *J. Comput. Chem.* **2000**, *21*, 1049–1074. [CrossRef]
- 58. Kruskal, J.B. On the shortest spanning subtree of a graph and the traveling salesman problem. *Proc. Am. Math. Soc.* **1956**, *7*, 48–50. [CrossRef]
- Hawkins, P.C.D.; Skillman, A.G.; Nicholls, A. Comparison of Shape-Matching and Docking as Virtual Screening Tools. J. Med. Chem. 2006, 50, 74–82. [CrossRef]
- 60. QikProp, Release 2021-4; Schrödinger: New York, NY, USA, 2021.
- Ioannidis, H.; Drakopoulos, A.; Tzitzoglaki, C.; Homeyer, N.; Kolarov, F.; Gkeka, P.; Freudenberger, K.; Liolios, C.; Gauglitz, G.; Cournia, Z.; et al. Alchemical Free Energy Calculations and Isothermal Titration Calorimetry Measurements of Aminoadamantanes Bound to the Closed State of Influenza A/M2TM. J. Chem. Inf. Modeling 2016, 56, 862–876.

Supporting Information

Total Synthesis of the Antimycobacterial Natural Product Chlorflavonin and Analogs via a Late-stage Ruthenium(II)-Catalyzed *ortho*-C(sp²)-H-Hydroxylation

Alexander Berger^a, Talea Knak^a, Anna-Lene Kiffe-Delf^b, Korana Mudrovcic^a, Vinayak Singh^c, Mathew Njoroge^d, Bjoern B. Burckhardt^e, Mohanraj Gopalswamy^a, Beate Lungerich^a, Lutz Ackermann^f, Holger Gohlke^{a,g}, Kelly Chibale^c, Rainer Kalscheuer^b, and Thomas Kurz^a*

^a Institute of Pharmaceutical and Medicinal Chemistry, Heinrich Heine University Düsseldorf, Universitätsstraße 1, 40225 Düsseldorf, Germany

^b Institute of Pharmaceutical Biology and Biotechnology, Heinrich Heine University Düsseldorf, Universitätsstraße 1, 40225 Düsseldorf, Germany

^c Drug Discovery and Development Centre (H3D), University of Cape Town; South African Medical Research Council Drug Discovery and Development Research Unit, Department of Chemistry and Institute of Infectious Disease and Molecular Medicine, University of Cape Town, Rondebosch 7701, South Africa.

^d Drug Discovery and Development Centre (H3D), University of Cape Town, Rondebosch 7701, South Africa.

^e Institute of Clinical Pharmacy and Pharmacotherapy, Heinrich Heine University Düsseldorf, Universitätsstraße 1, 40225 Düsseldorf, Germany

^f Institut für Organische und Biomolekulare Chemie, Georg-August-Universität Göttingen, Tammannstraße 2, 37077 Göttingen, Germany

^g John-von-Neumann-Institute for Computing (NIC), Jülich Supercomputing Centre (JSC), Institute of Biological Information Processing (IBI-7: Structural Biochemistry), and Institute of Bio- and Geosciences (IBG-4: Bioinformatics), Forschungszentrum Jülich GmbH, 52428 Jülich, Germany

*E-mail: <u>thomas.kurz@hhu.de</u>

Table of contents

1.	General	information	
2.	Experim	ental procedures	4
2	.1. Inter	mediates synthesized for synthetic approach A	4
2	.2. Inter	mediates synthesized for synthetic approach B	5
2	.3. Read	tion optimization	7
2	.4. Expe	erimental procedures for the synthesis of chlorflavonin ana	logs11
	2.4.1.	3-Brom-2-hydroxy-5-methyl-benzaldehyd (2j)	
	2.4.2.	General procedure for MOM ether protection	
	2.4.3.	General procedure for flavonol synthesis	
	2.4.4.	General procedure for methylation of flavonols	
	2.4.5.	General procedure for deprotection of MOM ether	
	2.4.6. one (19)	Synthesis of 2-(3-bromo-2-(difluoromethoxy)phenyl)-25	3,7,8-trimethoxy-4H-chromen-4-
	2.4.7.	General procedure for ruthenium(II)-catalyzed ortho-C(s	p ²)-H-hydroxylation25
3.	Methods	3	Error! Bookmark not defined.
3. 3.1.	Methods Phys	ssicochemical properties	Error! Bookmark not defined. Error! Bookmark not defined.
3. 3.1.	Methods Phys 3.1.1. St	s sicochemical properties ability	Error! Bookmark not defined. Error! Bookmark not defined. Error! Bookmark not defined.
3. 3.1.	Methods Phys 3.1.1. St 3.1.2. Sc	s sicochemical properties ability blubility	Error! Bookmark not defined. Error! Bookmark not defined. Error! Bookmark not defined. Error! Bookmark not defined.
3. 3.1.	Methods Phys 3.1.1. St 3.1.2. So 3.1.3. M	s sicochemical properties ability blubility etabolic stability	Error! Bookmark not defined. Error! Bookmark not defined. Error! Bookmark not defined. Error! Bookmark not defined. Error! Bookmark not defined.
3. 3.1.	Methods Phys 3.1.1. St 3.1.2. So 3.1.3. M 3.1.4. N	ssicochemical properties ability olubility etabolic stability MR spectroscopy for p <i>K</i> a determination	Error! Bookmark not defined. Error! Bookmark not defined. Error! Bookmark not defined. Error! Bookmark not defined. Error! Bookmark not defined.
 3. 3.1. 3.2. 	Methods Phys 3.1.1. St 3.1.2. Sc 3.1.3. M 3.1.4. N Dete	ssicochemical properties ability olubility etabolic stability MR spectroscopy for p K_a determination ermination of Minimal Inhibitory Concentration (MIC)	Error! Bookmark not defined. Error! Bookmark not defined.
 3. 3.1. 3.2. 3.3. 	Methods Phys 3.1.1. St 3.1.2. So 3.1.3. M 3.1.4. N Dete Dete	ssicochemical properties ability olubility etabolic stability MR spectroscopy for pK _a determination ermination of Minimal Inhibitory Concentration (MIC) ermination of Cytotoxicity	Error! Bookmark not defined. Error! Bookmark not defined.
 3. 3.1. 3.2. 3.3. 3.4. 	Methods Phys 3.1.1. St 3.1.2. So 3.1.3. M 3.1.4. N Dete Dete Quan	ssicochemical properties ability blubility etabolic stability MR spectroscopy for p K_a determination ermination of Minimal Inhibitory Concentration (MIC) ermination of Cytotoxicity mititative structure-activity relationship model	Error! Bookmark not defined. Error! Bookmark not defined.
 3. 3.1. 3.2. 3.3. 3.4. 	Methods Phys 3.1.1. St 3.1.2. So 3.1.3. M 3.1.4. N Dete Dete Quan 3.4.1.	Since the second stability and the second sta	Error! Bookmark not defined. Error! Bookmark not defined.
 3. 3.1. 3.2. 3.3. 3.4. 	Methods Phys 3.1.1. St 3.1.2. So 3.1.3. M 3.1.4. N Dete Dete Quan 3.4.1. 3.4.2.	Since the second properties ability and partition coefficient predictions	Error! Bookmark not defined. Error! Bookmark not defined.
 3. 3.1. 3.2. 3.3. 3.4. 4. 	Methods Phys 3.1.1. St 3.1.2. So 3.1.3. M 3.1.4. N Dete Dete Quar 3.4.1. 3.4.2. Results o	sincochemical properties ability blubility etabolic stability MR spectroscopy for pK_a determination mination of Minimal Inhibitory Concentration (MIC) ermination of Cytotoxicity rmination of Cytotoxicity relationship model Relative structure-activity relationship model Relative free energy calculations with FEW workflow Solubility and partition coefficient predictions of relative free energy calculations	Error! Bookmark not defined. Error! Bookmark not defined.
 3. 3.1. 3.2. 3.3. 3.4. 4. 5. 	Methods Phys 3.1.1. St 3.1.2. So 3.1.3. M 3.1.4. N Dete Dete Quar 3.4.1. 3.4.2. Results of Spectral	Since the second properties is a bility with the second	Error! Bookmark not defined. Error! Bookmark not defined. 32

1. General information

Reagents: Commercially available reagents and solvents were purchased from Apollo Scientific, Sigma-Aldrich, TCI, BLDpharm, Carbolution, ABCR GmbH, Acros Organics or Alfa Aesar and were used without further purification. Dry solvents were purchased from Acros Organics.

Chromatography: Analytical thin-layer chromatography was performed using silica gel 60 F254 aluminium plates. Compound spots were visualized either by UV light (254 nm) or by staining with a solution of 1% FeCl₃ in ethanol. Flash chromatography was performed on CombiFlash[®] Rf 200 using RediSepTM Rf-columns.

NMR Spectroscopy: ¹H-, ¹³C-, and ¹⁹F-NMR spectra were recorded with Bruker Avance III – 300, Bruker Avance III – 600 or Bruker Avance DRX – 500 spectrometers. ¹H- and ¹³C-NMR signals were calibrated to the residual proton and carbon resonance of the solvent: CDCl₃ (¹H-NMR δ = 7.26 ppm, ¹³C-NMR δ = 77.2 ppm), DMSO (¹H-NMR δ = 2.50 ppm, ¹³C-NMR δ = 39.5 ppm). The following abbreviations were used to describe peak splitting patterns when appropriate: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, h = hextet, m = multiplet, dd = doublet of doublet, td = doublet of triplet, ddd = doublet of doublet of doublet and brs = broad singlet. Coupling constants, J, were reported in Hertz unit (Hz).

High Resolution Mass Spectrometry: ESI-MS data were recorded with UHR-QTOF maXis 4G.

Melting Points: Melting points were measured on a Büchi M 565 instrument and are not corrected.

HPLC: Reverse-phase high performance liquid chromatography data were measured with Varian ProStar 210 with a Phenomenex Luna C-18 (2) particle size 5 μ m (250 x 4.6 mm) column. The detection took place with the UV detector Varian ProStar 330 at 220-254 nm and eluents water/acetonitrile with 0.1% TFA were used.

Compound	Structure	Literature
		Y. Bai, X. He, Y. Bai, Y. Sun, Z. Zhao, X. Chen, B. Li, J. Xie, Y. Li, P. Jia, X. Meng, Y. Zhao, Y. Ding, C. Xiao, S. Wang, J. Yu, S. Liao, Y. Zhang, Z. Zhu, Q. Zhang, Y. Zhao, F. Qin, Y. Zhang, X. Wei, M. Zeng, J. Liang, Y. Cuan, G. Shan, T. P. Fan, B. Wu, X. Zheng, <i>Eur. J. Med. Chem.</i> 2019 , <i>183</i> , 111650.
8	O O O O O O O O O O O O O O O O O O O	M. Tsukayama, Y. Kawamura, T. Ishizuka, S. Hayashi, F. Torii, <i>Heterocycles</i> 2003 , <i>60</i> , 2775–2784.
9	H Cl	R. Bognár, A. L. Tökés, Acta Chim. Acad. Sci. Hung 1981, 107, 365–368.

 Table S1. Literature for known compounds.

A. M. Daly, D. G. Gilheany, *Tetrahedron Asymmetry* **2003**, *14*, 127–137.

2. Experimental procedures

2.1.Intermediates synthesized for synthetic approach A 2-Methoxy-1-(2,3,4,6-tetramethoxyphenyl)ethan-1-one (6)



A solution of 1,2,3,5-tetramethoxybenzene (1.00 g, 5.04 mmol, 1.00 equiv.) and AlCl₃ (1.37 g, 10.1 mmol, 2.00 equiv.) in dry diethyl ether 30.0 mL was cooled to -20 °C under argon atmosphere. 2-Methoxyacetyl chloride (0.66 g, 6.05 mmol, 1.20 equiv.) was added dropwise and the reaction was stirred at ambient temperature for 24 h. The reaction mixture was quenched with the addition of 50 g ice and 1 N hydrochloric acid 50 mL. The aqueous phase was extracted four times with diethyl ether. The combined organic phase was washed with saturated NaCl solution, dried over Na₂SO₄, filtered, concentrated, and the remaining residue purified by flash chromatography (eluent: hexane/EtOAc = 9/1) to afford compound 6 as a brown solid (0.87 g, 64%); R_f 0.21 (hexane/EtOAc = 7/3); m.p. 90.1 °C; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 6.22 (s, 1H), 4.31 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H), 3.85 (d, *J* = 1.3 Hz, 6H), 3.75 (d, *J* = 3.3 Hz, 6H), 3.42 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 200.6, 155.7, 153.4, 151.9, 136.5, 115.5, 92.7, 78.9, 62.2, 61.2, 59.4, 56.4 ppm.

1-(2-Hydroxy-3,4,6-trimethoxyphenyl)-2-methoxyethan-1-one (7)



To a solution of 2-methoxy-1-(2,3,4,6-tetramethoxyphenyl)ethan-1-one (50 mg, 168 μ mmol, 1.00 equiv.) in dry dichloromethane 5.0 mL was added BBr₃ (1 M in CH₂CL₂; 161 μ L, 168 μ mol, 1.00 equiv.) at -30 °C. After 30 min and 60 min additional BBr₃ (1 M in CH₂CL₂; 161 μ L, 168 μ mol, 1.00 equiv.) were added and the reaction was stirred at -30 °C for 4 h. The reaction was quenched by the addition of 6 N hydrochloric acid 5.0 mL and extracted thrice with dichloromethane. The combined organic phase was washed twice with 2 M LiOH 5.0 mL, the aqueous layer acidified with 6 N hydrochloric acid and extracted thrice with dichloromethane. The combined over Na₂SO₄, filtered, and concentrated to afford compound 7 as a light-yellow solid in traces; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 13.49 (s, 1H), 5.96 (s, 1H), 4.59 (s, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.90 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.50 (s, 3H) ppm.

2.2. Intermediates synthesized for synthetic approach B

3-(2-(Benzyloxy)-3-chlorophenyl)-1-(2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one (10a)



To a solution of 1-(2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyphenyl)ethan-1-one (1.47 g, 6.49 mmol, 1.00 equiv.) and 2-(benzyloxy)-3-chlorobenzaldehyde (1.60 g, 6.49 mmol, 1.00 equiv.) in ethanol (25.0 mL) was added 5 N NaOH solution (6.49 mL, 32.4 mmol, 5.00 equiv.) and stirred at ambient temperature for 16 h. The solvent was removed under reduced pressure. The residue was treated with water 100 mL and at 0 °C the pH of the suspension was adjusted to 7 with 2 N hydrochloric acid solution. The aqueous phase was extracted four times with dichloromethane. The combined organic phase was washed with a saturated NaCl solution (50 mL), dried over Na₂SO₄, filtered, concentrated, and purified by flash chromatography (eluent: hexane/EtOAc + 0.1% TEA = 6/4) to afford compound 10a as an orange solid (1.91 g, 65%); R_f 0.35 (hexane/EtOAc = 1/1); m.p. 98.7 °C; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 13.88 (br s, 1H), 8.00 (d, *J* = *1*5.8 Hz, 1H), 7.90 (d, *J* = *1*5.7 Hz, 1H), 7.49 – 7.58 (m, 3H), 7.44 (dd, *J* = 7.9, 1.6 Hz, 1H), 7.29 – 7.42 (m, 3H), 7.12 (td, *J* = 7.9, 0.5 Hz, 1H), 5.96 (s, 1H), 4.99 (s, 2H), 3.95 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.79 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 193.2, 159.5, 158.7, 158.7, 154.2, 137.0, 136.4, 131.9, 131.8, 131.0, 129.9, 129.4, 129.0, 128.7, 128.6, 127.1, 125.3, 107.0, 87.1, 76.2, 61.0, 56.2, 56.0 ppm.

2-(2-(benzyloxy)-3-chlorophenyl)-5,7,8-trimethoxy-4H-chromen-4-one (10)



A solution of 3-(2-(benzyloxy)-3-chlorophenyl)-1-(2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one (4.82 g, 10.6 mmol, 1.00 equiv.) and iodine (0.27 g, 1.06 mmol, 0.10 equiv.) in dimethyl sulfoxide 40 mL was degassed with nitrogen for 10 min. Under nitrogen atmosphere the reaction mixture was stirred at 140 °C for 2 h 30 min. After cooling to ambient temperature, a solution of sodium thiosulfate 50 mL and EtOAc 50 mL were added. The organic phase was washed four times with a saturated NaCl solution (50 mL), dried over Na₂SO₄, filtered, concentrated, and the remaining residue purified by recrystallization from methanol to afford compound 10 as yellow crystals (4.05 g, 84%); R_f 0.11 (hexane/EtOAc = 1/3); m.p. 170.2 °C; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.67 (dd, J = 7.8, 1.7 Hz, 1H), 7.57 (dd, J = 8.0, 1.6 Hz, 1H), 7.33 – 7.40 (m, 2H), 7.19 – 7.33 (m, 4H), 6.81 (s, 1H), 6.45 (s, 1H), 5.00 (s, 2H), 4.00 (s, 3H), 3.99 (s, 3H), 3.84 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 177.7, 158.4, 156.8, 156.5, 153.2, 152.3, 135.8, 133.1, 130.8, 129.9, 129.2, 128.8, 128.7, 128.6, 128.1, 125.4, 113.8, 109.1, 92.8, 75.8, 61.8, 56.8, 56.5 ppm; MS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculated for C₂₅H₂₁ClNaO₆: 475.1, observed: 475.1.

2-(2-(Benzyloxy)-3-chlorophenyl)-3-hydroxy-5,7,8-trimethoxy-4H-chromen-4-one (11)



2-(2-(Benzyloxy)-3-chlorophenyl)-5,7,8-trimethoxy-4*H*-chromen-4-one (100 mg, 221 µmol, 1.00 equiv.) was dissolved in acetone 10.0 mL and dichloromethane 5.00 mL. At 0-5 °C a sodium bicarbonate-sodium bicarbonate buffer system 10.0 mL with the pH of 7 and oxone[®] (990 mg, 1.61 mmol, 7.30 equiv.) were added. The mixture was stirred at ambient temperature for 16 h. Thereafter the mixture was extracted three times with dichloromethane 20 mL and the combined organic phase concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved in dichloromethane 10 mL and catalytic *p*-toluenesulfonic acid (5.00 mg) was added. The reaction was stirred at ambient temperature for 1 h. The solvent was removed under reduced pressure and the remaining residue purified by flash chromatography (eluent: hexane/EtOAc = 3/7) to afford compound 11 as an colourless oil (32 mg, 14%);¹**H-NMR (300 MHz, CDCl₃)** δ 7.42 – 7.51 (m, 2H), 7.03 – 7.25 (m, 7H), 6.67 (s, 1H), 6.37 (s, 1H), 4.96 (s, 2H), 3.95 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 3.69 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 172.3, 156.8, 156.3, 153.5, 151.8, 141.8, 138.5, 136.5, 132.7, 130.0, 129.3, 128.9, 128.7, 128.5, 128.3, 128.3, 125.0, 106.8, 92.2, 76.1, 61.7, 56.7, 56.7 ppm.

2.3.Reaction optimization

Table S2. Reaction optimization.

			cataly oxida additi solvent,	vst nt ve ⊤, h ℃				
		17			1			
Entry	Cat. [mol%]	Oxidant [equiv.]	Additive [equiv.]	Additive [equiv.]	solvent	T [°C]	t [h]	conversion [%]
1	10.0 Pd(OAc) ₂	1.00 PhI(TFA) ₂	-	-	DCE	80	4	trace
2	5.00 Pd(TFA) ₂	1.20 PhI(TFA) ₂	-	_	DCE	80	8	trace
3	5.00 Pd(TFA) ₂	2.00 PhI(TFA) ₂	-	-	DCE	80	16	decomp.
4	5.00 Pd(TFA) ₂	1.20 PhI(TFA) ₂	-	-	9:1 TFA/TFAA	80	8	48
5	5.00 Pd(TFA) ₂	1.50 PhI(TFA) ₂	-	-	1:66 TFA/TFAA ¹	80	16	decomp.
6	5.00 Pd(TFA) ₂	2.00 KPS	-	-	TFA	80	16	-
7	5.00 Pd(OAc) ₂	2.00 selectfluor™	-	-	9:1 TFA/TFAA	80	16	15
8	5.00 Pd(TFA) ₂	1.50 selectfluor™	-	-	1:66 TFA/TFAA ¹	80	16	43
9	7.50 Pd(TFA) ₂	2.00 selectfluor™	-	-	1:66 TFA/TFAA ¹	90	20	decomp.
10	2.50 [RuCl ₂ (<i>p</i> - cymene)] ₂	1.50 selectfluor™	1.50 Ag ₂ CO ₃	3.00 TFA/5.00 TFAA	DCE	80	16	-
11	5.00 [RuCl ₂ (<i>p</i> - cymene)] ₂	1.50 selectfluor™	1.50 Ag ₂ CO ₃	3.00 TFA/5.00 TFAA	DCE	80	16	trace

12	5.00 [RuCl ₂ (<i>p</i> - cymene)] ₂	1.50 selectfluor™	0.20 Ag ₂ CO ₃	3.00 TFA/5.00 TFAA	DCE	80	16	trace ²
13	5.00 [RuCl ₂ (<i>p</i> - cymene)] ₂	1.20 oxone®	1.50 Ag ₂ CO ₃	-	1:66 TFA/TFAA ¹	80	8	11
14	5.00 [RuCl ₂ (<i>p</i> - cymene)] ₂	1.20 KPS	1.50 Ag ₂ CO ₃	-	1:66 TFA/TFAA ¹	80	8	trace
15	5.00 [RuCl ₂ (<i>p</i> - cymene)] ₂	1.00 PhI(TFA) ₂	1.00 Ag ₂ CO ₃	-	1:66 TFA/TFAA ¹	80	16	32
16	5.00 [RuCl ₂ (<i>p</i> - cymene)] ₂	1.20 PhI(TFA) ₂	0.20 Ag ₂ CO ₃	-	1:66 TFA/TFAA ¹	80	16	44 ²
17	5.00 [RuCl ₂ (<i>p</i> - cymene)] ₂	1.50 PhI(TFA) ₂	1.50 Ag ₂ CO ₃	-	1:66 TFA/TFAA ¹	80	24	43
18	5.00 [RuCl ₂ (<i>p</i> - cymene)] ₂	1.50 selectfluor™	1.50 Ag ₂ CO ₃	-	1:66 TFA/TFAA ¹	80	16	51 ³
19	5.00 [RuCl ₂ (<i>p</i> - cymene)] ₂	1.10 selectfluor™	2.00 Ag ₂ CO ₃	-	1:66 TFA/TFAA ¹	80	16	52 ⁴
20	5.00 [RuCl ₂ (<i>p</i> - cymene)] ₂	1.20 selectfluor™	1.20 Ag ₂ CO ₃	-	1:66 TFA/TFAA ¹	80	6	36 ⁴
21	5.00 [RuCl ₂ (<i>p</i> - cymene)] ₂	1.50 selectfluor™	1.50 Ag ₂ CO ₃	-	1:66 TFA/TFAA ¹	80	16	53
22	5.00 [RuCl ₂ (<i>p</i> - cymene)] ₂	1.50 selectfluor™	1.50 Ag ₂ CO ₃	-	1:66 TFA/TFAA ¹	60	16	-
23	5.00 [RuCl ₂ (p- cymene)] ₂	1.10 selectfluor™	2.00 Ag ₂ CO ₃	-	1:66 TFA/TFAA ¹	80	24	72
24	5.00 [RuCl ₂ (<i>p</i> - cymene)] ₂	1.10 selectfluor™	2.00 Ag ₂ CO ₃	-	1:66 TFA/TFAA ¹	100	16	52
25	5.00 [RuCl ₂ (<i>p</i> - cymene)] ₂	1.20 Selectfluor™	1.20 Ag ₂ CO ₃	-	1:66 TFA/TFAA ¹	120	2	74
26	5.00 [RuCl ₂ (<i>p</i> - cymene)] ₂	1.20 selectfluor™	1.20 Ag ₂ CO ₃	-	1:66 TFA/TFAA ¹	80	16	36 ³
27	5.00 [RuCl ₂ (<i>p</i> - cymene)] ₂	1.50 selectfluor™	1.50 Ag ₂ CO ₃	-	1:66 TFA/TFAA ¹	80	16	53
28	5.00 [RuCl ₂ (<i>p</i> - cymene)] ₂	1.80 selectfluor™	1.80 Ag ₂ CO ₃	-	1:66 TFA/TFAA ¹	80	16	41

20	5.00 [RuCl ₂ (<i>p</i> -	2.00	2.00		1:66	00	16	61	
29	cymene)] ₂	selectfluor™	Ag ₂ CO ₃	-	TFA/TFAA ¹	80	16	61	
30	5.00 [RuCl ₂ (<i>p</i> -	1.10	1.00	_	1:66	80	16	54	
	cymene)] $_2$	selectfluor™	Ag ₂ CO ₃		TFA/TFAA ¹			-	
31	10.0 [RuCl ₂ (<i>p</i> -	1.1	1.00	_	1:66	80	16	60	
	cymene)] ₂	selectfluor TM	Ag ₂ CO ₃		TFA/TFAA ¹		10		
32	5.00 [RuCl ₂ (<i>p</i> -	1.10	2.00		1:1.8	80	16	20	
52	cymene)] ₂	selectfluor TM	Ag ₂ CO ₃		TFA/TFAA ¹		10	20	
33	5.00 [RuCl ₂ (<i>p</i> -	1.10	2.00		1:66	80	16	48	
55	cymene)] ₂	selectfluor™	Ag ₂ CO ₃	-	TFA/TFAA ¹	80	10	-10	
24	5.00 [RuCl ₂ (<i>p</i> -	1.10	2.00		1:132	80	16	50	
54	cymene)] ₂	selectfluor TM	Ag ₂ CO ₃	-	TFA/TFAA ¹	80	10	50	
	2.50				2.1				
35	[Ru(MesCO ₂) ₂ (p-	1.20 APS	-	-	TFA/TFAA	80	16	-	
	cymene)]								
26	2.50	1.20			DOF				
36	$[Ru(MesCO_2)_2(p-cvmene)]$	PhI(TFA) ₂	-	-	DCE	80	4	-	
37	2.50 [Bu(MesCO ₂) ₂ (n_{-}	1.20	_	_	DCF	80	4	_	
57	cymene)]	PhI(OAc) ₂			Del				
	2 50								
38	$[Ru(MesCO_2)_2(p-$	1.20	-	-	3:2	80	4	decomp.	
	cymene)]	Phi(OAc) ₂			IFA/IFAA			-	
	2.50	1.00			2.1				
39	[Ru(MesCO ₂) ₂ (p-	1.20 PhI(OAc) ₂	-	-	2:1 TFA/TFAA	80	4	decomp.	
	cymene)]								
	5.00	1.20			1:66				
40	$[Ru(MesCO_2)_2(p-$	selectfluor TM	-	-	TFA/TFAA ¹	80	6	544	
41	5.00	1.50			1:66	80	2	54	
41	cymene)]	selectfluor TM	-	-	TFA/TFAA ¹	80	5	54	
	7.50								
42	$[Ru(MesCO_2)_2(p-$	1.50	-	-	1:66	80	4	56	
	cymene)]	selectfluor TM			TFA/TFAA ¹				
1 :	¹ 3.00 equiv. TEA: ² pre-activation of catalyst: ³ Schlenk-technique (argon): ⁴ continuous addition of the ovident								

DCE: Dichloroethane; TFA: Trifluoroacetic acid; TFAA: Trifluoroacetic anhydride; KPS: Potassium persulfate; APS: ammonium persulfate, decomp. = decomposition

2.4.Experimental procedures for the synthesis of chlorflavonin analogs 2.4.1. 3-Brom-2-hydroxy-5-methyl-benzaldehyd (2j)



A solution of the 2-hydroxy-5-methylbenzaldehyd (5.04 g, 37.0 mmol, 1.00 equiv.) in 50 mL acetic acid was cooled to 0 °C. Bromine (2.09 mL, 40.7 mmol, 1.10 equiv) was added dropwise and the reaction mixture was stirred for 1 h at 0 °C. 50 mL ice water was added, and the formed precipitate was filtered and washed with 100 mL cold water. The obtained solid was dried under vacuum. Compound 2j as a yellow solid (6.88 g, 87%); R_f 0.64 (hexane/EtOAc = 95/5); **m.p.** 65.7 °C; ¹**H-NMR (300 MHz, DMSO-***d*₆) δ 11.01 (s, 1H), 10.03 (s, 1H), 7.75 (dd, J = 2.2, 0.7 Hz, 1H), 7.57 (dd, J = 2.3, 0.8 Hz, 1H), 2.29 (t, J = 0.7 Hz, 3H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 195.01, 154.49, 139.82, 131.67, 130.61, 122.50, 110.70, 19.40 ppm.

2.4.2. General procedure for MOM ether protection

A solution of the respective phenol (1.00 equiv.) in dry dichloromethane (1.5 mL/mmol) was cooled to 0 °C and *N*,*N*-diisopropylethylamine (2.00 equiv.) was added. After 10 minutes chloromethyl methyl ether (1.20 equiv.) was added dropwise. The reaction was allowed to warm up to ambient temperature and was stirred overnight. The reaction was quenched with a saturated solution of NH₄Cl (2 mL/mmol) and extracted three times with dichloromethane (2 mL/mmol). The combined organic phase was washed with saturated NaCl solution, dried over Na₂SO₄, filtered, concentrated, and purified by flash chromatography to afford the desired product.

3-Chloro-2-(methoxymethoxy)benzaldehyde (12)[1]



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.2. to afford compound 12 as a white solid (12.1 g, 97%, eluent: hexane/EtOAc = 95/5); R_f 0.19 (hexane/EtOAc = 95/5); m.p. 43.2 °C; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 10.39 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 7.80 (dd, J = 7.8, 1.7 Hz, 1H), 7.68 (dd, J = 7.9, 1.7 Hz, 1H), 7.23 (td, J = 7.8, 0.8 Hz, 1H), 5.24 (s, 2H), 3.64 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 189.6, 156.2, 136.1, 131.6, 128.6, 126.9, 125.5, 100.7, 58.3 ppm.

3-Bromo-2-(methoxymethoxy)benzaldehyde (12a)[2]



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.2. to afford compound 12a as a white solid (5.89 g, 97%, eluent: hexane/EtOAc = 95/5); R_f 0.35 (hexane/EtOAc = 9/1); m.p. 54.2 °C; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 10.36 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 7.85 (q, J = 1.7 Hz, 1H), 7.82 (q, J = 1.7 Hz, 1H), 7.17 (td, J = 7.8, 0.9 Hz, 1H), 5.22 (s, 2H), 3.64 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 189.7, 157.3, 139.2, 131.7, 127.7, 126.0, 118.2, 101.0, 58.3 ppm.

3-Fluoro-2-(methoxymethoxy)benzaldehyde (12b)[3]



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.2. to afford compound 12b as a colourless liquid (5.72 g, 87%, eluent: hexane/EtOAc = 95/5); R_f 0.19 (hexane/EtOAc = 95/5); ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 10.42 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 7.62 (ddd, J = 7.8, 1.7, 1.1 Hz, 1H), 7.34 (ddd, J = 11.2, 8.1, 1.7 Hz, 1H), 7.14 (tdd, J = 8.0, 4.5, 0.8 Hz, 1H), 5.27 (d, J = 1.0 Hz, 2H), 3.57 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 189.1 (d, ⁴J(¹³C, ¹⁹F) = 3.3 Hz), 155.3 (d, ¹J(¹³C, ¹⁹F) = 248.9 Hz), 147.3 (d, ²J(¹³C, ¹⁹F) =

11.4 Hz), 131.0 (d, ${}^{3}J({}^{13}C, {}^{19}F) = 1.7$ Hz), 124.4 (d, ${}^{3}J({}^{13}C, {}^{19}F) = 7.4$ Hz), 123.9 (d, ${}^{4}J({}^{13}C, {}^{19}F) = 3.4$ Hz), 122.8 (d, ${}^{2}J({}^{13}C, {}^{19}F) = 19.7$ Hz), 99.9 (d, ${}^{4}J({}^{13}C, {}^{19}F) = 7.5$ Hz), 58.0 ppm; 19 F-NMR (282 MHz, CDCl₃) δ -129.2 ppm; HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculated for C₉H₁₀FO₃: 185.0608, observed: 185.0608.

3-Iodo-2-(methoxymethoxy)benzaldehyde (12c)[4]



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.2. to afford compound 12c as a colourless liquid (1.11 g, 98%, eluent: hexane/EtOAc = 95/5); R_f 0.47 (hexane/EtOAc = 9/1); ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 10.31 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.08 (dt, J = 7.8, 1.5 Hz, 1H), 7.86 (dt, J = 7.6, 1.5 Hz, 1H), 7.05 (tt, J = 7.8, 1.0 Hz, 1H), 5.19 (d, J = 1.1 Hz, 2H), 3.65 (d, J = 1.2 Hz, 3H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 190.2, 160.1, 145.5, 131.3, 128.9, 126.9, 101.6, 93.6, 58.6 ppm.

2-(Methoxymethoxy)-3-methylbenzaldehyde (12e)[1]



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.2. to afford compound 12e as a colourless liquid (3.78 g, 64%, eluent: hexane/EtOAc = 95/5); R_f 0.24 (hexane/EtOAc = 9/1); ¹H-NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 10.23 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 7.53 – 7.63 (m, 2H), 7.23 (tt, J = 7.5, 0.5 Hz, 1H), 5.09 (s, 2H), 3.50 (s, 3H), 2.31 (d, J = 0.8 Hz, 3H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 191.1, 158.9, 137.8, 132.8, 129.8, 126.4, 125.1, 101.0, 57.8, 16.4 ppm.

3-Chloro-5-fluoro-2-(methoxymethoxy)benzaldehyde (12h)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.2. to afford compound 12h as a white solid (4.99 g, 98%, eluent: hexane/EtOAc = 95/5); R_f 0.18 (hexane/EtOAc = 95/5); m.p. 72.6 °C; ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 10.16 (d, J = 3.0 Hz, 1H), 7.93 (dd, J = 8.0, 3.2 Hz, 1H), 7.50 (dd, J = 8.1, 3.2 Hz, 1H), 5.18 (s, 2H), 3.53 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 188.6 (d, ⁴J(¹³C, ¹⁹F) = 1.7 Hz), 157.9 (d, ¹J(¹³C, ¹⁹F) = 246.7 Hz), 152.0, 131.6 (d, ³J(¹³C, ¹⁹F) = 7.0 Hz), 129.3 (d, ³J(¹³C, ¹⁹F) = 10.3 Hz), 123.3 (d, ²J(¹³C, ¹⁹F) = 26.9 Hz), 112.9 (d, ²J(¹³C, ¹⁹F) = 23.4 Hz), 100.8 (d, ⁴J(¹³C, ¹⁹F) = 1.0 Hz), 57.8 ppm; ¹⁹F-NMR (282 MHz, DMSO-d₆) δ -114.6 ppm; HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculated for C₉H₉CIFO₃: 219.0219, observed: 219.0218.

3-Bromo-5-fluoro-2-(methoxymethoxy)benzaldehyde (12i)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.2. to afford compound 12i as a white solid (2.26 g, 99%, eluent: hexane/EtOAc = 95/5); R_f 0.19 (hexane/EtOAc = 9/1); m.p. 73.1 °C; ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.14 (d, J = 3.0 Hz, 1H), 8.04 (dd, J = 7.8, 3.2 Hz, 1H), 7.53 (dd, J = 8.1, 3.2 Hz, 1H), 5.17 (s, 2H), 3.54 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 188.8, 158.2 (d, ¹J(¹³C, ¹⁹F) = 247.6 Hz), 153.1 (d, ⁴J(¹³C, ¹⁹F) = 3.0 Hz), 131.6 (d, ³J(¹³C, ¹⁹F) = 6.6 Hz), 126.2 (d, ²J(¹³C, ¹⁹F) = 26.4 Hz), 118.9 (d, ³J(¹³C, ¹⁹F) = 9.4 Hz), 113.4 (d, ²J(¹³C, ¹⁹F) = 23.4 Hz), 101.0, 57.9 ppm; ¹⁹F-NMR (565 MHz, DMSO-*d*₆) δ -114.7 ppm; HRMS (ESI) *m*/*z* [M+H]⁺ calculated for C₉H₉BrFO₃: 262.9714, observed: 262.9713.

3-Bromo-2-(methoxymethoxy)-5methylbenzaldehyde (12j)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.2. to afford compound 12j as a white solid (7.5 g, 96%, eluent: hexane/EtOAc = 95/5); R_f 0.24 (hexane/EtOAc = 9/1); m.p. 47.1 °C; ¹H-NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 10.17 (s, 1H), 7.86 (dt, J = 2.3, 0.7 Hz, 1H), 7.56 (dq, J = 2.2, 0.7 Hz, 1H), 5.14 (s, 2H), 3.52 (s, 3H), 2.34 (t, J = 0.7 Hz, 3H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 189.79, 139.46, 136.29, 130.64, 127.82, 117.50, 100.76, 57.78, 19.78 ppm; HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculated for C₁₀H₁₂BrO₃: 258.9964, observed 258.9961.

4-Chloro-2-(methoxymethoxy)benzaldehyde (12k)[5]



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.2. to afford compound 12k as a white solid (3.76 g, 98%, eluent: hexane/EtOAc = 95/5); R_f 0.27 (hexane/EtOAc = 9/1); m.p. 58.2 °C; ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 10.32 – 10.36 (m, 1H), 7.73 (dd, J = 8.3, 1.2 Hz, 1H), 7.40 (t, J = 1.5 Hz, 1H), 7.21 (ddt, J = 8.3, 1.8, 0.9 Hz, 1H), 5.42 (s, 2H), 3.45 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 188.3, 159.4, 140.3, 129.4, 123.8, 122.0, 115.9, 94.6, 56.3 ppm.

4-Chloro-3-(methoxymethoxy)benzaldehyde (12l)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.2. to afford compound 121 as a white solid (3.78 g, 98%, eluent: hexane/EtOAc = 95/5); R_f 0.22 (hexane/EtOAc = 9/1); m.p. 29.2 °C; ¹H-NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9.96 (s, 1H), 7.71 (dd, J = 4.9, 3.1 Hz, 2H), 7.58 (dd, J = 8.1, 1.8 Hz, 1H), 5.39 (s, 2H), 3.43 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 192.0, 152.7, 136.0, 130.9, 128.8, 124.3, 115.1, 94.6, 56.0 ppm; HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculated for C₉H₁₀ClO₃: 201.0313, observed: 201.0313.

2.4.3. General procedure for flavonol synthesis

To a solution of 1-(2-hydroxy-3,4-dimethoxyphenyl)ethan-1-one (1.00 equiv.) and the corresponding aldehyde (12a-I, 1.00 equiv.) in ethanol (2 mL/mmol) was added an aqueous solution of 5 N NaOH (5.0 equiv.). The solution was stirred at 50 °C for 24 h. After cooling to ambient temperature, the dispersion was cooled to 0 °C and slowly hydrogen peroxide 30% (w/w) in water (2.25 equiv.) was added. The dispersion was diluted with ethanol (3 mL/mmol) to allow further stirring, warmed up to ambient temperature and stirred overnight. The solvent was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in water and at 0 °C and the pH of the suspension was adjusted to 7 with 2 N hydrochloric acid solution. The aqueous phase was extracted four times with dichloromethane (5 mL/mmol). The combined organic phase was washed with saturated NaCl solution (2 mL/mmol), dried over Na₂SO₄, filtered, concentrated, and purified by flash chromatography.

2-(3-Chloro-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-hydroxy-7,8-dimethoxy-4H-chromen-4-one (15)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.3. to afford compound 15 as a yellow solid (6.83 g, 42%, eluent: hexane/EtOAc = 7/3); R_f 0.28 (hexane/EtOAc = 1/1); m.p. 166.7 °C; ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.16 (s, 1H), 7.89 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.70 (dd, J = 8.0, 1.6 Hz, 1H), 7.59 (dd, J = 7.7, 1.6 Hz, 1H), 7.35 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.30 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 4.98 (s, 2H), 3.97 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.14 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.4, 155.9, 151.0, 149.3, 144.9, 138.7, 136.0, 132.1, 130.3, 127.4, 125.3, 120.3, 116.8, 110.7, 99.0, 60.8, 56.6, 56.5 ppm; HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculated for C₁₉H₁₈ClO₇: 393.0736, observed: 393.0740.

2-(3-Bromo-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-hydroxy-7,8-dimethoxy-4H-chromen-4-one (15a)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.3. to afford compound 15a as a yellow solid (4.04 g, 39%, eluent: hexane/EtOAc = 7/3); R_f 0.21 (hexane/EtOAc = 1/1); m.p. 126.3 °C; ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.13 (s, 1H), 7.87 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.84 (dd, J = 8.1, 1.6 Hz, 1H), 7.61 (dd, J = 7.6, 1.6 Hz, 1H), 7.29 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.26 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 4.94 (s, 2H), 3.96 (s, 3H), 3.83 (d, J = 0.8 Hz, 3H), 3.12 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.4, 155.9, 152.1, 149.3, 145.1, 138.6, 136.0, 135.2, 131.0, 127.3, 125.7, 120.3, 117.3, 116.8, 110.8, 99.1, 60.9, 56.7, 56.5 ppm; HRMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ calculated for C₁₉H₁₈BrO₇: 437.0230, observed: 437.0231.

2-(3-Fluoro-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-hydroxy-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-one (15b)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.3. to afford compound 15b as a yellow solid (4.98 g, 43%, eluent: hexane/EtOAc = 7/3); R_f 0.22 (hexane/EtOAc = 3/2); m.p. 148.2 °C; ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 9.12 (s, 1H), 7.88 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.48 (ddd, J = 11.4, 8.2, 1.6 Hz, 1H), 7.43 (dt, J = 7.8, 1.2 Hz, 1H), 7.26 – 7.34 (m, 2H), 5.05 (s, 2H), 3.97 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.19 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 172.4, 155.9, 155.1 (d, ¹J(¹³C, ¹⁹F) = 245.9 Hz), 149.3, 144.6 (d, ⁴J(¹³C, ¹⁹F) = 3.1 Hz), 142.4 (d, ²J(¹³C, ¹⁹F) = 12.2 Hz), 138.7, 136.0, 127.2 (d, ⁴J(¹³C, ¹⁹F) = 2.5 Hz), 126.8 (d, ³J(¹³C, ¹⁹F) = 3.3 Hz), 124.6 (d, ³J(¹³C, ¹⁹F) = 8.5 Hz), 120.3, 118.5 (d, ²J(¹³C, ¹⁹F) = 19.5 Hz), 116.8, 110.8, 98.8 (d, ⁴J(¹³C, ¹⁹F) = 5.2 Hz), 60.8, 56.5, 56.2 ppm; ¹⁹F-NMR (282 MHz, DMSO-d₆) δ -129.2 ppm; HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculated for C₁₉H₁₈FO₇: 377.1031, observed: 377.1034.

3-Hydroxy-2-(3-iodo-2-(methoxymethoxy)phenyl)-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-one (15c)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.3. to afford compound 15c as a yellow solid (0.67 g, 37%, eluent: hexane/EtOAc = 7/3); R_f 0.42 (hexane/EtOAc = 1/1); m.p. 130.2 °C; ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 9.09 (s, 1H), 8.03 (dd, J = 7.9, 1.6 Hz, 1H), 7.87 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.61 (dd, J = 7.6, 1.6 Hz, 1H), 7.29 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.10 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 4.89 (s, 2H), 3.96 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.12 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 172.9, 156.4, 155.3, 149.8, 145.9, 141.8, 139.0, 136.5, 132.2, 126.6, 126.6, 120.8, 117.3, 111.2, 99.8, 94.2, 61.3, 57.4, 57.0 ppm; HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculated for C₁₈H₁₆ClO₇: 485.0092, observed: 485.0094.

3-Hydroxy-7,8-dimethoxy-2-(2-(methoxymethoxy)-3-(trifluoromethyl)phenyl)-4H-chromen-4-one (15d)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.3. to afford compound 15d as a yellow solid (6.37 g, 32%, eluent: hexane/EtOAc = 7/3); R_f 0.34 (hexane/EtOAc = 1/1); m.p. 174.1 °C; ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 9.24 (br s, 1H), 7.90 (dd, J = 12.1, 7.8 Hz, 1H), 7.88 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.73 (ddd, J = 15.5, 7.7, 1.7 Hz, 1H), 7.48 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.30 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 4.89 (s, 2H), 3.96 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.13 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 172.7, 155.8, 149.8, 144.2, 138.9, 136.1, 135.2, 120.5, 120.2, 120.1, 118.9, 117.4, 117.1, 110.8, 110.5, 99.5, 89.4, 60.9, 56.5, 56.5 ppm; ¹⁹F-NMR (565 MHz, DMSO-d₆) δ -59.3 ppm; HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculated for C₂₀H₁₈F₃O₇: 427.0999, observed: 427.0999.

3-Hydroxy-7,8-dimethoxy-2-(2-(methoxymethoxy)-3-methylphenyl)-4H-chromen-4-one (15e)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.3. to afford compound 15e as a yellow solid (3.57 g, 56%, eluent: hexane/EtOAc = 7/3); R_f 0.42 (hexane/EtOAc = 1/1); m.p. 130.3 °C; ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.91 (s, 1H), 7.88 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.37 – 7.44 (m, 2H), 7.29 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.20 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 4.85 (s, 2H), 3.96 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.15 (s, 3H), 2.34 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 172.9, 156.2, 154.4, 149.8, 147.1, 138.9, 136.6, 133.5, 132.1, 129.5, 125.7, 124.3, 120.7, 117.3, 111.1, 99.3, 61.3, 57.0, 56.8, 16.9 ppm; HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculated for C₂₀H₂₁O₇: 373.1282, observed: 373.1282.

2-(3-Bromo-2-fluorophenyl)-3-hydroxy-7,8-dimethoxy-4H-chromen-4-one (15f)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.3. and purified by flash column chromatography (eluent: hexane/EtOAc = 7/3). A mixture of compound 15f (approx. 80 %), the corresponding flavanone (2-(3-bromo-2-fluorophenyl)-7,8-dimethoxychroman-4-one) and 2-(3-bromo-2-ethoxyphenyl)-3-hydroxy-7,8-dimethoxy-*4H*-chromen-4-one was obtained. The crude product was used without further purification. ¹**H-NMR (600 MHz, DMSO-***d*₆) δ 9.49 (s, 1H), 7.91 (ddd, *J* = 8.1, 6.5, 1.6 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.78 (ddd, *J* = 7.9, 6.3, 1.6 Hz, 1H), 7.36 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.31 (dd, *J* = 9.2, 2.7 Hz, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.84 (s, 2H) ppm; ¹³**C-NMR (75 MHz, DMSO-***d*₆) δ 172.41, 157.03, 156.12, 149.42, 145.15, 141.73 (d, ^{*4J*}(¹³C, ¹⁹F) = 1.6 Hz), 139.13, 136.09, 135.34, 130.70 (d, ^{*4J*}(¹³C, ¹⁹F) = 2.0 Hz), 125.93 (d, ^{3*J*}(¹³C, ¹⁹F) = 4.2 Hz), 120.57 (d, ^{2*J*}(¹³C, ¹⁹F) = 26.1 Hz), 116.76, 110.95, 109.06 (d, ^{2*J*}(¹³C, ¹⁹F) = 20.9 Hz), 60.92, 56.55 ppm; ¹⁹F-NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆) δ -104.85 ppm; HRMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ calculated for C₁₇H₁₃BrFO₇: 394.9925, observed: 394.9927.

2-(3-Chloro-5-fluoro-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-hydroxy-7,8-dimethoxy-4H-chromen-4-one (15h)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.3. to afford compound 15h as a yellow solid (2.11 g, 34%, eluent: hexane/EtOAc = 7/3); R_f 0.18 (hexane/EtOAc = 3/2); ¹H-NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9.29 (s, 1H), 7.87 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.75 (dd, J = 8.2, 3.1 Hz, 1H), 7.48 – 7.55 (m, 1H), 7.27 – 7.33

(m, 1H), 4.94 (s, 2H), 3.96 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.11 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.9, 157.8 (d, ¹*J*(¹³C,¹⁹F) = 244.9 Hz), 156.5, 149.8, 148.4 (d, ⁴*J*(¹³C,¹⁹F) = 3.4 Hz), 144.2 (d, ⁴*J*(¹³C,¹⁹F) = 1.3 Hz), 139.3, 136.5, 128.9 (d, ³*J*(¹³C,¹⁹F) = 11.6 Hz), 128.6 (d, ³*J*(¹³C,¹⁹F) = 9.7 Hz), 120.8, 119.7 (d, ²*J*(¹³C,¹⁹F) = 26.2 Hz), 117.4 (d, ²*J*(¹³C,¹⁹F) = 31.8 Hz), 117.4, 111.3, 99.7, 61.4, 57.2, 57.0 ppm; ¹⁹F-NMR (565 MHz, DMSO-*d*₆) δ -116.3 ppm; HRMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ calculated for C₁₉H₁₇ClFO₇: 411.0641, observed: 411.0644.

2-(3-Bromo-5-fluoro-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-hydroxy-7,8-dimethoxy-4H-chromen-4-one (15i)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.3. to afford compound 15i as a yellow solid (1.26 g, 32%, eluent: hexane/EtOAc = 7/3); R_f 0.19 (hexane/EtOAc = 3/2); m.p. 230.8 °C; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.00 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.49 (dd, J = 7.5, 3.1 Hz, 1H), 7.34 (dd, J = 8.1, 3.1 Hz, 1H), 7.11 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 5.00 (s, 2H), 4.02 (s, 3H), 3.99 (s, 3H), 3.23 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 175.3, 158.4, 156.9, 151.6, 150.5, 143.4, 138.4, 137.0, 136.7, 122.7, 121.2, 117.5, 116.2, 110.7, 110.6, 100.3, 61.9, 57.7, 56.8 ppm; ¹⁹F-NMR (282 MHz, CDCl₃) δ -115.9 ppm; HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculated for C₁₉H₁₇BrFO₇: 455.0136, observed: 455.0138.

2-(3-Bromo-2-(methoxymethoxy)-5-methylphenyl)-3-hydroxy-7,8-dimethoxy-4H-chromen-4-one (15j)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.3. to afford compound 15j as a yellow solid (3.86 g, 31%, eluent: hexane/EtOAc = 7/3); R_f 0.21 (hexane/EtOAc = 3/2); m.p. 182.6 °C; ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 9.09 (s, 1H), 7.87 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.68 (dd, J = 2.2, 0.8 Hz, 1H), 7.40 (dd, J = 2.2, 0.8 Hz, 1H), 7.29 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 4.90 (s, 2H), 3.96 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.10 (s, 3H), 2.34 (t, J = 0.7 Hz, 3H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 172.39, 155.87, 149.80, 149.29, 145.24, 138.57, 136.03, 135.37, 135.30, 131.18, 126.84, 120.28, 116.94, 116.80, 110.76, 99.06, 60.85, 56.62, 56.48, 19.77 ppm; HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculated for C₂₀H₂₀BrO₇: 451.0387, observed: 451.0393.

2-(4-Chloro-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-hydroxy-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-one (15k)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.3. to afford compound 15k as a yellow solid (3.62 g, 51%, eluent: hexane/EtOAc = 7/3); R_f 0.47 (hexane/EtOAc = 1/1); m.p. 193.4 °C; ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 9.01 (s, 1H), 7.86 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.56 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.35 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.28 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.22 (dd, J = 8.2, 2.0 Hz, 1H), 5.27 (s, 2H), 3.95 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.35 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 172.8, 156.2, 155.8, 149.8, 145.5, 139.0, 136.6, 135.9, 132.9, 121.7, 120.5, 120.3, 117.3, 115.9, 111.2, 94.8, 61.2, 56.9, 56.2 ppm; HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculated for C₁₉H₁₈ClO₇: 393.0736, observed: 393.0741.

2-(4-Chloro-3-(methoxymethoxy)phenyl)-3-hydroxy-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-one (12l)


The reaction was performed according to the general procedure 2.4.3. to afford compound 12l as a yellow solid (2.38 g, 33%, eluent: hexane/EtOAc = 7/3); R_f 0.48 (hexane/EtOAc = 1/1); m.p. 223.2 °C; ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 8.18 (br s, 1H), 7.86 – 8.06 (m, 2H), 7.53 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.00 – 7.15 (m, 2H), 5.36 (s, 2H), 4.05 (s, 3H), 4.02 (s, 3H), 3.58 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 167.9, 163.6, 156.9, 153.2, 150.0, 146.4, 134.0, 131.2, 130.6, 122.2, 121.1, 115.5, 115.0, 112.5, 110.5, 95.6, 61.8, 56.8, 56.7 ppm; HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculated for C₁₉H₁₈ClO₇: 393.0736, observed: 393.0735.

2-(2,3-Dichlorophenyl)-3-hydroxy-7,8-dimethoxy-4H-chromen-4-one (12m)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.3. to afford compound 12m as a yellow solid (3.34 g, 46%, eluent: hexane/EtOAc = 7/3); R_f 0.25 (hexane/EtOAc = 1/1); m.p. 196.8 °C; ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 9.38 (s, 1H), 7.90 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.85 (dd, J = 8.1, 1.6 Hz, 1H), 7.70 (dd, J = 7.7, 1.6 Hz, 1H), 7.56 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.32 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 3.97 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.57 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 172.6, 156.1, 149.3, 144.8, 138.6, 136.1, 132.3, 132.3, 132.1, 131.0, 130.8, 128.5, 120.4, 116.9, 110.9, 61.0, 56.6 ppm; HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculated for C₁₇H₁₃Cl₂O₅: 367.0135, observed: 367.0139.

2-(3-Chlorophenyl)-3-hydroxy-7,8-dimethoxy-4H-chromen-4-one (12n)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.3. to afford compound 12n as a yellow solid (2.77 g, 33%, eluent: hexane/EtOAc = 7/3); R_f 0.43 (hexane/EtOAc = 1/1); m.p. 187.5 °C; ¹H-NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9.86 (s, 1H), 8.24 (s, 1H), 8.14 (d, J = 6.5 Hz, 1H), 7.86 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.52 – 7.70 (m, 2H), 7.30 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 3.98 (s, 3H), 3.95 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 172.7, 156.2, 148.8, 142.7, 139.0, 136.0, 133.5, 133.3, 130.6, 129.3, 126.8, 125.5, 120.3, 116.1, 110.8, 61.0, 56.5 ppm; HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculated for C₁₇H₁₄ClO₅: 333.0524, observed: 333.0524.

2.4.4. General procedure for methylation of flavonols

To a solution of the respective flavonol (12a-n, 1.00 equiv.) and caesium carbonate (2.25 equiv.) in N,N-dimethylformamide (6-8 mL/mmol) was added iodomethane (1.50 equiv.). At ambient temperature the reaction mixture was stirred until complete conversion of the starting material. The mixture was diluted with EtOAc (20 mL/mmol) and the organic phase was washed six times with saturated NaCl solution (20 mL/mmol). The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtered, concentrated, and the residue purified by flash chromatography on silica gel to afford the desired product.

2-(3-Chloro-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3,7,8-trimethoxy-4H-chromen-4-one (16)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.4. to afford compound 16 as a yellow oil (4.12 g, 80%, eluent: hexane/EtOAc = 7/3); R_f 0.23 (hexane/EtOAc = 3/2); ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7.86 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.74 (dd, J = 8.0, 1.6 Hz, 1H), 7.59 (dd, J = 7.7, 1.7 Hz, 1H), 7.25 – 7.41 (m, 2H), 5.01 (s, 2H), 3.96 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 3.10 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 173.1, 156.3, 154.0, 151.1, 149.3, 140.5, 136.1, 132.6, 129.9, 127.4, 127.3, 125.6, 120.4, 118.5, 111.0, 99.3, 60.9, 59.6, 56.6, 56.5 ppm; HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculated for C₂₀H₂₀ClO₇: 407.0892, observed: 407.0891.

2-(3-Bromo-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3,7,8-trimethoxy-4H-chromen-4-one (16a)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.4. to afford compound 16a as an orange oil (3.28 g, 79%, eluent: hexane/EtOAc = 7/3); R_f 0.21 (hexane/EtOAc = 3/2); ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7.81 – 7.94 (m, 2H), 7.62 (dd, J = 7.7, 1.6 Hz, 1H), 7.23 – 7.35 (m, 2H), 4.99 (s, 2H), 3.96 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 3.09 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 173.1, 156.3, 154.1, 152.2, 149.3, 140.5, 136.1, 135.7, 130.6, 127.2, 126.0, 120.4, 118.6, 117.3, 111.0, 99.5, 60.9, 59.5, 56.7, 56.5 ppm; HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculated for C₂₀H₂₀BrO₇: 451.0387, observed: 451.0393.

2-(3-Fluoro-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3,7,8-trimethoxy-4*H*-chromen-4-one (16b)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.4. to afford compound 16b as a yellow oil (2.29 g, 83%, eluent: hexane/EtOAc = 7/3); R_f 0.20 (hexane/EtOAc = 3/2); ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7.86 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.51 (ddd, J = 11.4, 8.2, 1.7 Hz, 1H), 7.43 (ddd, J = 7.7, 1.7, 1.0 Hz, 1H), 7.27 – 7.38 (m, 2H), 5.07 (d, J = 0.7 Hz, 2H), 3.96 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 3.16 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-d₆) δ 173.6, 156.8, 155.4 (d, ¹J(¹³C, ¹⁹F) = 246.0 Hz), 154.1 (d, ⁴J(¹³C, ¹⁹F) = 3.0 Hz), 149.8, 142.9 (d, ²J(¹³C, ¹⁹F) = 12.2 Hz), 141.2, 136.6, 127.4 (d, ⁴J(¹³C, ¹⁹F) = 2.3 Hz), 126.9 (d, ³J(¹³C, ¹⁹F) = 8.1 Hz), 120.8, 119.5 (d, ²J(¹³C, ¹⁹F) = 19.3 Hz), 119.0, 99.5 (d, ⁴J(¹³C, ¹⁹F) = 5.7 Hz), 61.4, 60.2, 57.0, 56.9 ppm; ¹⁹F-NMR (565 MHz, DMSO-d₆) δ -129.0 ppm; HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculated for C₂₀H₂₀FO₇: 391.1188, observed: 391.1191.

2-(3-Iodo-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3,7,8-trimethoxy-4H-chromen-4-one (16c)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.4. to afford compound 16c as a yellow oil (0.47 g, 76%, eluent: hexane/EtOAc = 7/3); R_f 0.21 (hexane/EtOAc = 3/2); ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 8.01 (dd, J = 9.0, 1.0 Hz, 1H), 7.98 (dd, J = 7.9, 1.6 Hz, 1H), 7.52 (dd, J = 7.6, 1.6 Hz, 1H), 7.07 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.02 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 5.02 (s, 2H), 4.01 (s, 3H), 3.96 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.22 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 174.4, 156.4, 155.5, 155.0, 149.9, 141.9, 141.1, 136.7, 131.4, 126.5, 125.9, 121.1, 119.3, 110.1, 100.3, 93.2, 61.7, 60.3, 57.5, 56.5, 31.6, 14.1 ppm; HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculated for C₂₀H₂₀ClO₇: 499.0248, observed: 499.0242.

3,7,8-Trimethoxy-2-(2-(methoxymethoxy)-3-(trifluoromethyl)phenyl)-4*H*-chromen-4-one (16d)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.4. to afford compound 16d as a yellow oil (2.89 g, 53%, eluent: hexane/EtOAc = 7/3); R_f 0.40 (hexane/EtOAc = 3/2); ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.92 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.70 (dd, J = 7.9, 1.7 Hz, 1H), 7.64 (dd, J = 7.7, 1.7 Hz, 1H), 7.25 – 7.31 (m, 1H), 6.99 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 4.89 (s, 2H), 3.92 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.13 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 174.5, 156.6, 154.3 – 154.8 (m), 150.1, 141.3, 136.9, 135.2, 129.4 (q, ³J(¹³C, ¹⁹F) = 5.2 Hz), 127.1, 125.1 (q, ²J(¹³C, ¹⁹F) = 30.6 Hz), 124.7, 124.1, 123.4 (q, ¹J(¹³C, ¹⁹F) = 273.1 Hz), 121.2, 119.5, 110.3, 100.9 – 101.3 (m), 61.7, 60.4, 57.5, 56.6 ppm; ¹⁹F-NMR (565 MHz, CDCl₃) δ -60.7 ppm; HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculated for C₂₁H₂₀F₃O₇: 441.1156, observed: 441.1162.

3,7,8-Trimethoxy-2-(2-(methoxymethoxy)-3-methylphenyl)-4H-chromen-4-one (16e)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.4. to afford compound 16e as a yellow oil (2.48 g, 70%, eluent: hexane/EtOAc = 7/3); R_f 0.20 (hexane/EtOAc = 3/2); ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 8.03 (dd, J = 9.0, 0.8 Hz, 1H), 7.33 – 7.41 (m, 2H), 7.18 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.07 (dd, J = 9.0, 0.8 Hz, 1H), 4.95 (d, J = 0.8 Hz, 2H), 4.01 (d, J = 0.8 Hz, 3H), 3.96 (d, J = 0.8 Hz, 3H), 3.83 (d, J = 0.8 Hz, 3H), 3.27 (d, J = 0.8 Hz, 3H), 2.41 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 173.2, 156.1, 155.8, 153.8, 149.3, 140.4, 136.1, 133.6, 131.7, 128.5, 125.2, 124.0, 120.3, 118.6, 110.9, 99.0, 60.9, 59.5, 56.5, 56.3, 16.4 ppm; HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculated for C₂₁H₂₃O₇: 387.1438, observed: 387.1438.

2-(3-Bromo-2-fluorophenyl)-3,7,8-trimethoxy-4H-chromen-4-one (16f)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.4. to afford compound 16f as a yellow solid (620 mg, 47%, eluent: hexane/EtOAc = 3/2); R_f 0.16 (hexane/EtOAc = 7/3); m.p. 182.9 °C; ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7.97 (ddd, J = 8.2, 6.7, 1.6 Hz, 1H), 7.87 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.78 (ddd, J = 7.9, 6.4, 1.7 Hz, 1H), 7.40 (td, J = 7.9, 0.9 Hz, 1H), 7.34 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 3.97 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.79 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 173.08, 156.44, 155.39 (d, ¹J(¹³C, ¹⁹F) = 250.9 Hz), 150.43 (d, ⁴J(¹³C, ¹⁹F) = 1.0 Hz), 149.36, 140.97, 136.07 (d, ³J(¹³C, ¹⁹F) = 13.3 Hz), 130.70 (d, ⁴J(¹³C, ¹⁹F) = 1.7 Hz), 126.18 (d, ³J(¹³C, ¹⁹F) = 4.4 Hz), 120.44, 120.12 (d, ²J(¹³C, ¹⁹F) = 15.4 Hz), 118.52, 111.22, 108.97 (d, ²J(¹³C, ¹⁹F) = 21.0 Hz), 60.97, 60.05, 56.60 ppm; ¹⁹F-NMR (282 MHz, DMSO-d₆) δ -106.22 ppm; HRMS (ESI) *m*/*z* [M+H]⁺ calculated for C₁₈H₁₅BrFO₅: 409.0081, observed: 409.0085.

2-(3-Chloro-5-fluoro-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3,7,8-trimethoxy-4H-chromen-4-one (16h)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.4. to afford compound 16h as a yellow oil (0.83 g, 67%, eluent: hexane/EtOAc = 7/3); R_f 0.51 (hexane/EtOAc = 1/1); ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.95 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.29 (dd, J = 7.8, 3.1 Hz, 1H), 7.17 (dd, J = 8.0, 3.1 Hz, 1H), 7.05 (d, J = 9.1 Hz,

1H), 5.00 (s, 2H), 3.98 (s, 4H), 3.92 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.18 (s, 3H) ppm; ¹³C-**NMR (75 MHz, CDCl₃)** δ 174.2, 158.0 (d, ¹*J*(¹³C, ¹⁹F) = 247.8 Hz), 156.6, 153.4 (d, ⁴*J*(¹³C, ¹⁹F) = 2.1 Hz), 149.9, 148.4 (d, ⁴*J*(¹³C, ¹⁹F) = 3.6 Hz), 141.3, 136.7, 129.4 (d, ³*J*(¹³C, ¹⁹F) = 11.0 Hz), 128.2 (d, ³*J*(¹³C, ¹⁹F) = 9.3 Hz), 121.1, 119.7 (d, ²*J*(¹³C, ¹⁹F) = 25.7 Hz), 119.2, 116.4 (d, ²*J*(¹³C, ¹⁹F) = 23.9 Hz), 110.3, 99.9, 61.6, 60.4, 57.4, 56.5 ppm; ¹⁹F-NMR (282 MHz, CDCl₃) δ -115.8 ppm; HRMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ calculated for C₂₀H₁₉CIFO₇: 425.0798, observed: 425.0803.

2-(3-Bromo-5-fluoro-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3,7,8-trimethoxy-4H-chromen-4-one (16i)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.4. to afford compound 16i as a yellow oil (0.48 g, 78%, eluent: hexane/EtOAc = 7/3); R_f 0.21 (hexane/EtOAc = 3/2); ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.93 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.43 (dd, J = 7.5, 3.1 Hz, 1H), 7.19 (dd, J = 7.9, 3.1 Hz, 1H), 7.02 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 4.96 (s, 2H), 3.95 (s, 3H), 3.90 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.14 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 174.2, 158.1 (d, ¹J(¹³C, ¹⁹F) = 248.7 Hz), 156.6, 153.5, 149.9, 149.5 (d, ⁴J(¹³C, ¹⁹F) = 3.3 Hz), 141.2, 136.7, 128.1 (d, ³J(¹³C, ¹⁹F) = 8.9 Hz), 122.6 (d, ²J(¹³C, ¹⁹F) = 25.4 Hz), 121.1, 119.2, 118.5 (d, ³J(¹³C, ¹⁹F) = 10.1 Hz), 117.1 (d, ²J(¹³C, ¹⁹F) = 23.9 Hz), 110.3, 100.1, 61.6, 60.4, 57.4, 56.5 ppm; ¹⁹F-NMR (565 MHz, CDCl₃) δ -115.9 ppm; HRMS (ESI) *m*/*z* [M+H]⁺ calculated for C₂₀H₁₉BrFO₇: 469.0293, observed: 469.0295.

2-(3-Bromo-2-(methoxymethoxy)-5-methylphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4H-chromen-4-one (16j)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.4. to afford compound 16j as a yellow oil (3.98 g, 95%, eluent: hexane/EtOAc = 7/3); **R**_f 0.24 (hexane/EtOAc = 3/2); ¹**H-NMR (300 MHz**, DMSO-*d*₆) δ 7.86 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.72 (dd, *J* = 2.2, 0.9 Hz, 1H), 7.45 – 7.38 (m, 1H), 7.32 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 4.96 (s, 2H), 3.97 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 3.07 (s, 3H), 2.36 (s, 3H) ppm; ¹³**C-NMR (75 MHz, DMSO-***d***₆)** δ 173.13, 156.26, 154.30, 149.88, 149.29, 140.46, 136.12, 135.83, 135.72, 130.75, 126.79, 120.39, 118.55, 116.92, 111.04, 99.42, 60.91, 59.54, 56.65, 56.53, 19.82 ppm; **HRMS (ESI)** *m/z* [M+H]⁺ calculated for C₂₁H₂₂BrO₇: 465.0543, observed: 465.0544.

2-(4-Chloro-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3,7,8-trimethoxy-4H-chromen-4-one (16k)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.4. to afford compound 16k as a yellow solid (2.29 g, 84%, eluent: hexane/EtOAc = 7/3); R_f 0.47 (hexane/EtOAc = 1/1); m.p. 116.7 °C; ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7.86 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.59 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.40 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 7.31 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.26 (dd, J = 8.2, 1.9 Hz, 1H), 5.30 (s, 2H), 3.96 (s, 4H), 3.80 (s, 3H), 3.71 (s, 3H), 3.34 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 173.1, 156.2, 155.2, 154.2, 149.3, 140.7, 136.1, 136.0, 132.1, 121.4, 120.3, 119.5, 118.6, 115.3, 111.0, 94.3, 60.9, 59.9, 56.5, 55.8 ppm; HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculated for C₂₀H₂₀ClO₇: 407.0892, observed: 407.0891.

2-(4-Chloro-3-(methoxymethoxy)phenyl)-3,7,8-trimethoxy-4*H*-chromen-4-one (16l)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.4. to afford compound 16l as a beige solid (1.93 g, 79%, eluent: hexane/EtOAc = 7/3); R_f 0.21 (hexane/EtOAc = 3/2); m.p. 145.2 °C; ¹H-NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 8.00 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 7.83 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.74 (dd, J = 8.4, 1.9 Hz, 1H), 7.70 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.31 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 5.38 (s, 2H), 3.97 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.48 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 173.5, 156.4, 152.9, 152.3, 148.9, 140.5, 136.1, 130.5, 130.4, 124.8, 122.4, 120.3, 118.2, 115.8, 111.0, 95.0, 61.1, 59.7, 56.5, 56.0 ppm; HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculated for C₂₀H₂₀ClO₇: 407.0892, observed: 407.0983.

2-(2,3-Dichlorophenyl)-3,7,8-trimethoxy-4*H*-chromen-4-one (16m)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.4. to afford compound 16m as a yellow solid (1.38 g, 74%, eluent: hexane/EtOAc = 7/3); R_f 0.25 (hexane/EtOAc = 3/2); m.p. 148.4 °C; ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ 7.88 (dd, J = 8.2, 1.5 Hz, 1H), 7.88 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.74 (dd, J = 7.7, 1.5 Hz, 1H), 7.55 – 7.62 (m, 1H), 7.34 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.71 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ 173.1, 156.4, 153.7, 149.2, 140.5, 136.2, 132.4, 132.3, 131.9, 130.6, 130.2, 128.6, 120.3, 118.6, 111.2, 61.0, 59.9, 56.5 ppm; HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculated for C₁₈H₁₅Cl₂O₅: 381.0291, observed: 381.0295.

2-(3-Chlorophenyl)-3,7,8-trimethoxy-4*H*-chromen-4-one (16n)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.4. to afford compound 16n as a yellow solid (0.92 g, 72%, eluent: hexane/EtOAc = 7/3); R_f 0.25 (hexane/EtOAc = 3/2); m.p. 152.7 °C; ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ 8.02 (td, J = 1.7, 0.8 Hz, 1H), 7.99 (ddd, J = 6.4, 2.4, 1.7 Hz, 1H), 7.82 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.61 – 7.67 (m, 2H), 7.30 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 3.84 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 173.4, 156.4, 152.7, 148.9, 140.6, 136.1, 133.3, 132.6, 130.7, 130.5, 127.6, 126.7, 120.3, 118.2, 111.0, 61.0, 59.8, 56.5 ppm; HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculated for C₁₈H₁₆ClO₅: 347.0681, observed: 347.0685.

2.4.5. General procedure for deprotection of MOM ether

To a solution of the respective MOM-protected flavone (16a-n, 1.00 equiv.) in methanol (9.0 mL/mmol) was added 2 N hydrochloric acid (9.0 mL/mmol). The reaction was stirred at 50 °C until complete conversion of the starting material, as indicated by TLC.

Work-up method A. The reaction mixture was diluted with ice cold water (20 mL/mmol) and the suspension was stored overnight at 7 °C. The precipitated product was filtered off and washed with ice cold water. The filter cake was suspended in ethanol (3.0 mL/mmol) and the solvent was removed by distillation as an azeotrope on a rotary evaporator with a bath temperature of 45 °C. This process was repeated twice, and the product was used for the next step without further purification steps.

Work-up method B. The solvent volume was reduced by half under reduced pressure and the aqueous suspension was extracted four times with dichloromethane (10 mL/mmol). The combined organic phase was washed with

saturated NaCl solution (10 mL/mmol), dried over Na₂SO₄, filtered, concentrated, and the residue was purified by flash chromatography on silica gel or recrystallization to afford the desired product.

2-(3-Chloro-2-hydroxyphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4H-chromen-4-one (17)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.5. and workup method B to afford compound 17 as a white solid (2.12 g, 79%, eluent: hexane/EtOAc + 0.1% TEA = 2/3); R_f 0.35 (hexane/EtOAc = 3/1); m.p. 77.9 °C; ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.02 (s, 1H), 7.86 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.57 (dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz, 1H), 7.42 (dd, *J* = 7.7, 1.6 Hz, 1H), 7.31 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.01 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.72 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 173.4, 156.1, 154.4, 150.9, 149.6, 140.8, 136.2, 131.9, 129.5, 121.5, 120.4, 120.2, 120.1, 118.8, 110.8, 60.9, 59.8, 56.5 ppm; HRMS (ESI) *m*/*z* [M+H]⁺ calculated for C₁₈H₁₆ClO₆: 363.0630, observed: 363.0632.

2-(3-Bromo-2-hydroxyphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4H-chromen-4-one (17a)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.5. and workup method B to afford compound 17a as a white solid (1.51 g, 83%, eluent: hexane/EtOAc + 0.1% TEA = 3/2); R_f 0.41 (hexane/EtOAc = 1/1); m.p. 176.3 °C; ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 9.98 (s, 1H), 7.85 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.72 (dd, J = 8.0, 1.6 Hz, 1H), 7.44 (dd, J = 7.7, 1.6 Hz, 1H), 7.30 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 6.94 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.71 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 173.5, 156.1, 154.3, 151.7, 149.6, 140.9, 136.2, 135.0, 130.2, 120.6, 120.2, 120.1, 118.9, 111.5, 110.7, 60.9, 59.8, 56.5 ppm; HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculated for C₁₈H₁₆BrO₆: 407.0125, observed: 407.0129.

2-(3-Fluoro-2-hydroxyphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4H-chromen-4-one (17b)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.5. and workup method B to afford compound 17b as a white solid (0.86 g, 79%, eluent: hexane/EtOAc + 0.1% TEA = 1/1); R_f 0.37 (hexane/EtOAc = 1/1); m.p. 130.9 °C; ¹H-NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 10.18 (s, 1H), 7.86 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.38 (ddd, J = 11.2, 8.2, 1.6 Hz, 1H), 7.31 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.27 (dt, J = 7.8, 1.4 Hz, 1H), 6.97 (td, J = 8.0, 4.9 Hz, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.72 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 173.3, 156.1, 154.2 (d, ${}^4J({}^{13}C, {}^{19}F) = 3.5$ Hz), 151.6 (d, ${}^1J({}^{13}C, {}^{19}F) = 240.2$ Hz), 149.5, 143.4 (d, ${}^2J({}^{13}C, {}^{19}F) = 14.8$ Hz), 140.7, 136.2, 125.9 (d, ${}^4J({}^{13}C, {}^{19}F) = 3.2$ Hz), 121.0 (d, ${}^4J({}^{13}C, {}^{19}F) = 3.4$ Hz), 120.2, 119.1 (d, ${}^3J({}^{13}C, {}^{19}F) = 7.3$ Hz), 118.7, 117.8 (d, ${}^2J({}^{13}C, {}^{19}F) = 18.5$ Hz), 110.8, 60.9, 59.8, 56.5 ppm; ${}^{19}F$ -NMR (282 MHz, DMSO- d_6) δ -134.5 ppm; HRMS (ESI) m/z[M+H]⁺ calculated for C₁₈H₁₆FO₆: 347.0925, observed: 347.0930.

2-(2-Hydroxy-3-iodophenyl)-3,7,8-trimethoxy-4H-chromen-4-one (17c)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.5. and workup method A to afford compound 17c as a yellow solid (341 mg, 87%); R_f 0.43 (hexane/EtOAc = 1/1); m.p. 177.4 °C; ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 8.49 (s, 1H), 8.00 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.99 (dd, J = 7.7, 1.6 Hz, 1H), 7.78 (dd, J = 7.9, 1.6 Hz, 1H), 7.08 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 6.87 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 4.01 (s, 3H), 3.96 (s, 3H), 3.93 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 173.4, 156.8, 154.0, 153.9, 150.1, 142.6, 139.2, 136.9, 130.3, 122.4, 121.1, 118.8, 118.8, 110.4, 88.5, 62.1, 61.7, 56.6 ppm; HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculated for C₁₈H₁₆IO₆: 454.9986, observed: 454.9990.

2-(2-Hydroxy-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3,7,8-trimethoxy-4*H*-chromen-4-one (17d)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.5. and workup method B to afford compound 17d as a white solid (2.14 g, 68%, eluent: hexane/EtOAc = 3/2); R_f 0.45 (hexane/EtOAc = 1/1); m.p. 167.8 °C; ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 8.50 (s, 1H), 7.93 (dd, J = 8.3, 6.2 Hz, 2H), 7.73 (dd, J = 7.8, 1.6 Hz, 1H), 7.14 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.02 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 3.95 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.89 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 173.5, 157.1, 154.0, 153.5, 150.3, 139.3, 137.1, 133.7, 130.6 (d, ³J(¹³C, ¹⁹F) = 5.0 Hz), 124.5, 121.4, 121.1, 120.8, 120.5, 118.8, 110.6, 62.5, 61.8, 56.8 ppm; ¹⁹F-NMR (565 MHz, CDCl₃) δ -62.5 ppm; HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculated for C₁₉H₁₆F₃O₇: 397.0893, observed: 397.0895.

2-(2-Hydroxy-3-methylphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4H-chromen-4-one (17e)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.5. and workup method B to afford compound 17e as a white solid (1.22 g, 69%, recrystallization: hexane/EtOAc); R_f 0.29 (hexane/EtOAc = 1/1); m.p. 145.9 °C; ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.04 (s, 1H), 7.84 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.28 (dd, *J* = 8.5, 3.2 Hz, 2H), 7.23 (dd, *J* = 8.1, 1.6 Hz, 1H), 6.88 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 3.95 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.69 (s, 3H), 2.24 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO*d*₆) δ 173.5, 156.0, 155.9, 153.0, 149.6, 140.7, 136.2, 132.8, 128.1, 125.8, 120.1, 118.9, 118.9, 118.2, 110.6, 60.9, 59.7, 56.5, 16.5 ppm; HRMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ calculated for C₁9H₁9O₆: 343.1176, observed: 343.1182.

2-(3-Chloro-5-fluoro-2-hydroxyphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4H-chromen-4-one (17h)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.5. and workup method B to afford compound 17h as a yellow solid (342 mg, 64%, eluent: hexane/EtOAc = 3/2); R_f 0.16 (hexane/EtOAc = 3/2); m.p. 165.3 °C; ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 10.02 (s, 1H), 7.85 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.61 (dd, J = 8.3, 3.2 Hz, 1H), 7.38 (dd, J = 8.6, 3.2 Hz, 1H), 7.31 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.73 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 173.4, 156.2, 154.1 (d, ¹J(¹³C, ¹⁹F) = 239.0 Hz), 153.0 (d, ⁴J(¹³C, ¹⁹F) = 1.5 Hz), 149.6, 147.8 (d, ⁴J(¹³C, ¹⁹F) = 2.8 Hz), 140.9, 136.2, 122.2 (d, ³J(¹³C, ¹⁹F) = 23.9 Hz), 110.9, 61.0, 59.8, 56.6 ppm; ¹⁹F-NMR (282 MHz, DMSO-d₆) δ -123.0 ppm; HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculated for C₁₈H₁₅ClFO₆: 381.0536, observed: 381.0536.

2-(3-Bromo-5-fluoro-2-hydroxyphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4*H*-chromen-4-one (17i)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.5. and workup method A to afford compound 17i as a yellow solid (257 mg, 69%); R_f 0.25 (hexane/EtOAc = 3/2); m.p. 173.8 °C; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.11 (br s, 1H), 7.99 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.41 – 7.56 (m, 2H), 7.08 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 4.01 (s, 3H), 3.97 (s, 3H), 3.95 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 173.6, 157.2, 156.0 (d, ¹J(¹³C, ¹⁹F) = 243.4 Hz), 152.8 (d, ⁴J(¹³C, ¹⁹F) = 1.4 Hz), 150.2, 148.6 (d, ⁴J(¹³C, ¹⁹F) = 2.7 Hz), 139.8, 137.0, 123.6 (d, ²J(¹³C, ¹⁹F) = 25.8 Hz), 121.3, 120.2 (d, ³J(¹³C, ¹⁹F) = 8.2 Hz), 118.9, 115.4 (d, ²J(¹³C, ¹⁹F) = 24.5 Hz), 114.1 (d, ³J(¹³C, ¹⁹F) = 10.1 Hz), 110.7, 62.4, 61.9, 56.8 ppm; ¹⁹F-NMR (282 MHz, CDCl₃) δ -121.3 ppm; HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculated for C₁₈H₁₅BrFO₆: 425.0031, observed: 425.0034.

2-(3-Bromo-2-hydroxy-5-methylphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4H-chromen-4-one (17j)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.5. and workup method A to afford compound 17j as a white solid (2.49 g, 74%); R_f 0.33 (hexane/EtOAc = 1/1); m.p. 174.8 °C; ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.69 (s, 1H), 7.84 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.55 (dd, *J* = 2.1, 0.8 Hz, 1H), 7.30 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.22 (dd, *J* = 2.2, 0.8 Hz, 1H), 3.95 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.70 (s, 3H), 3.29 (s, 1H), 2.27 (d, *J* = 0.8 Hz, 3H) ppm; ¹³C-NMR (136 MHz, DMSO-*d*₆) δ 173.84, 156.47, 154.88, 150.01, 149.83, 141.28, 136.74, 135.63, 130.64, 130.25, 120.52, 120.33, 119.36, 111.74, 111.24, 61.35, 60.18, 56.98, 19.88 ppm; (ESI) *m/z* [M+H]⁺ calculated for C₁₉H₁₈BrO₆: 421.0281, observed: 421.0284.

2-(4-Chloro-2-hydroxyphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4*H*-chromen-4-one (17k)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.5. and workup method B to afford compound 17k as a yellow solid (1.78 g, 95%, eluent: hexane/EtOAc = 7/3); $R_f 0.37$ (hexane/EtOAc = 1/1); m.p. 194.2 °C; ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ 10.54 (s, 1H), 7.84 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.46 (d, J =8.2 Hz, 1H), 7.29 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.04 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.02 (dd, J = 8.1, 2.1 Hz, 1H), 3.95 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.71 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 173.2, 156.6, 156.1, 154.7, 149.4, 140.6, 136.1, 135.6, 132.1, 120.2, 118.9, 118.7, 117.2, 116.0, 110.8, 60.9, 59.7, 56.5 ppm; HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculated for C₁₈H₁₆ClO₆: 363.0630, observed: 363.0626.

2-(4-Chloro-3-hydroxyphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4*H*-chromen-4-one (17l)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.5. and workup method B to afford compound 17l as a beige solid (1.38 g, 74%, eluent: hexane/EtOAc = 7/3); $R_f 0.29$ (hexane/EtOAc = 1/1); m.p. 217.2 °C; ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 10.69 (s, 1H), 7.81 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.75 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 7.47 – 7.60 (m, 2H), 7.29 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.92 (s, 3H), 3.82 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 173.5, 156.3, 153.2, 153.2, 148.9, 140.4, 136.2, 130.3, 130.2, 122.3, 120.3, 119.7, 118.2, 115.8, 110.9, 61.2, 59.7, 56.5 ppm; **HRMS (ESI)** m/z [M+H]⁺ calculated for C₁₈H₁₆ClO₆: 363.0630, observed: 363.0629.

2.4.6. Synthesis of 2-(3-bromo-2-(difluoromethoxy)phenyl)-3,7,8-trimethoxy-4H-chromen-4one (19)



The reaction was performed according to the procedure of Li et al.[6] 2-(3-Bromo-2-hydroxyphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4H-chromen-4-one (407 mg, 1 mmol, 1.0 equiv.) was dissolved in 4 mL dichloromethane at 0 °C. An aqueous KOH solution 1.4 mL, 6.0 mmol) was added and stirred (20 wt%, vigorously. (Bromodifluoromethyl)trimethyl-silane (518 mg, 2.5 mmol, 2.5 equiv.) was added in three portions after 0, 30 and 60 min under ice bath cooling. The mixture was stirred for 16 h at ambient temperature and the reaction quenched by adding water (5 mL). The aqueous phase was extracted with dichloromethane (2×30 mL). The organic layers were combined and dried over anhydrous Na₂SO₄. The solvents were removed in vacuo and the crude product was purified by flash-column chromatography on silica gel (hexane/EtOAc) to afford the titel compound as a white solid (360 mg, 78%, recrystallization: hexane/EtOAc); R_f 0.22 (hexane/EtOAc = 1/1); m.p. 116.5 °C; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) $\delta \delta 8.01$ (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.80 (dd, J = 8.1, 1.6 Hz, 1H), 7.58 (dd, J = 7.7, 1.6 Hz, 1H), 7.30 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.07 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 6.51 (d, J = 74.0 Hz, 1H), 4.00 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 3.86 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 174.47, 156.70, 153.07, 150.08, 146.23 (t, ${}^{3}J({}^{13}C, {}^{19}F) = 3.3 \text{ Hz}$), 141.53, 136.96, 136.03, 131.05, 128.37, 127.88, 121.31, 119.56, 118.23, 116.67 (t, ${}^{I}J({}^{13}C, {}^{19}F)$ 264.8 Hz), 110.31, 61.88, 60.63, 56.66 ppm; ¹⁹F-NMR (282 MHz, DMSO-d₆) δ -80.48. ppm; **HRMS (ESI)** m/z [M+H]⁺ calculated for C₁₉H₁₆BrF₂O₆: 457.0093, observed: 457.0100.

2.4.7. General procedure for ruthenium(II)-catalyzed ortho-C(sp²)-H-hydroxylation

To a solution of the respective 3'-methoxyflavonol (1-1n, 1.00 equiv.), selectfluor (1.10 equiv.), silver carbonate (2.00 equiv.) and dichloro(*p*-cymene)ruthenium(II) dimer (5.00mol%) in trifluoroacetic anhydride (15.2 mL/mmol) was added trifluoroacetic acid (3.00 equiv.). The reaction vessel was closed and stirred in a preheated oil bath at 80 °C for 24 h. After cooling to ambient temperature dichloromethane (30.0 mL/mmol) was added and the reaction mixture was filtered through a pad of celite that was subsequently washed with multiple small portions of dichloromethane. The filtrate was concentrated under reduced pressure and the residue was dissolved in methanol (50.0 mL/mmol). The solvent was removed on a rotary evaporator with a bath temperature of 50 °C. The crude product was purified by flash chromatography on a short silica gel plug (eluent: hexane/EtOAc = 8/2) and following recrystallization to afford the desired product.

2-(3-Chloro-2-hydroxyphenyl)-5-hydroxy-3,7,8-trimethoxy-4H-chromen-4-one (1)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.7. to afford compound 1 as a yellow solid (192 mg, 51%, recrystallization: methanol); $R_f 0.34$ (hexane/EtOAc = 3/2); m.p. 213.7 °C; ¹H-NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 12.43

(s, 1H), 10.09 (s, 1H), 7.59 (dd, J = 8.0, 1.7 Hz, 1H), 7.42 (dd, J = 7.7, 1.7 Hz, 1H), 7.01 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 6.65 (s, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.72 (s, 3H), 3.71 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 178.6, 158.2, 156.5, 155.6, 150.9, 148.7, 139.4, 132.2, 129.5, 128.3, 121.6, 120.2, 119.8, 105.2, 95.8, 60.9, 60.1, 56.6 ppm; HRMS (ESI) *m*/*z* [M+H]⁺ calculated for C₁₈H₁₆ClO₇: 379.0585, observed: 379.0584.

2-(3-Bromo-2-hydroxyphenyl)-5-hydroxy-3,7,8-trimethoxy-4H-chromen-4-one (1a)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.7. to afford compound 1a as a yellow solid (195 mg, 46%, recrystallization: hexane/EtOAc); $R_f 0.24$ (hexane/EtOAc = 7/3); m.p. 210.2 °C; ¹H-NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 12.42 (s, 1H), 10.04 (s, 1H), 7.73 (dd, J = 8.0, 1.6 Hz, 1H), 7.44 (dd, J = 7.6, 1.6 Hz, 1H), 6.95 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 6.64 (s, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.71 (s, 3H), 3.70 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 178.7, 158.2, 156.5, 155.6, 151.7, 148.8, 139.5, 135.4, 130.2, 128.4, 120.7, 119.5, 111.6, 105.2, 95.8, 60.9, 60.1, 56.6 ppm; HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculated for C₁₈H₁₆BrO₇: 423.0079, observed: 423.0075.

2-(3-Fluoro-2-hydroxyphenyl)-5-hydroxy-3,7,8-trimethoxy-4H-chromen-4-one (1b)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.7. to afford compound 1b as a yellow solid (157 mg, 43%, recrystallization: hexane/EtOAc); $R_f 0.35$ (hexane/EtOAc = 3/2); m.p. 208.6 °C; ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d_6) δ 12.41 (s, 1H), 10.25 (s, 1H), 7.38 (ddd, J = 11.2, 8.2, 1.6 Hz, 1H), 7.27 (dt, J = 7.8, 1.3 Hz, 1H), 6.97 (td, J = 8.0, 4.7 Hz, 1H), 6.63 (s, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 3.70 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-d_6) δ 178.4, 158.1, 156.4, 155.3 (d, $^4J(^{13}C, ^{19}F) = 3.3$ Hz), 151.5 (d, $^1J(^{13}C, ^{19}F) = 240.7$ Hz), 148.5, 143.4 (d, $^2J(^{13}C, ^{19}F) = 15.1$ Hz), 139.2, 128.3, 125.8 (d, $^4J(^{13}C, ^{19}F) = 3.2$ Hz), 120.4 (d, $^3J(^{13}C, ^{19}F) = 3.7$ Hz), 119.1 (d, $^3J(^{13}C, ^{19}F) = 7.0$ Hz), 118.0 (d, $^2J(^{13}C, ^{19}F) = 18.3$ Hz), 105.0, 95.8, 60.8, 60.0, 56.5 ppm; ¹⁹F-NMR (282 MHz, DMSO-d_6) δ - 134.3 ppm; HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculated for C₁₈H₁₆FO₇: 363.0880, observed: 363.0873.

5-Hydroxy-2-(2-hydroxy-3-iodophenyl)-3,7,8-trimethoxy-4*H*-chromen-4-one (1c)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.7. to afford compound 1c as a yellow solid (129 mg, 39%, recrystallization: hexane/EtOAc); $R_f 0.36$ (hexane/EtOAc = 3/2); m.p. 223.4 °C; ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ 12.43 (s, 1H), 10.05 (s, 1H), 7.92 (dd, J = 7.8, 1.7 Hz, 1H), 7.44 (dd, J = 7.6, 1.7 Hz, 1H), 6.79 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 6.63 (s, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.70 (s, 3H), 3.69 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 178.7, 158.2, 156.5, 155.7, 153.8, 148.8, 141.5, 139.5, 130.9, 128.4, 121.3, 118.0, 105.3, 95.7, 87.7, 60.9, 60.1, 56.6 ppm; HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculated for C₁₈H₁₆IO₇: 470.9941, observed: 470.9939.

5-Hydroxy-2-(2-hydroxy-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3,7,8-trimethoxy-4*H*-chromen-4-one (1d)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.7. to afford compound 1d as a yellow solid (184 mg, 45%, recrystallization: methanol); R_f 0.34 (hexane/EtOAc = 3/2); m.p. 195.4 °C; ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d_6) δ 12.41 (s, 1H), 10.41 (s, 1H), 7.76 (dd, J = 7.9, 1.7 Hz, 1H), 7.71 (dd, J = 7.7, 1.7 Hz, 1H), 7.14 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 6.64 (s, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 3.70 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-d_6) δ 178.8, 158.2, 156.5, 154.6, 152.9 – 153.9 (m), 148.9, 139.9, 135.1, 129.3 (q, ³J(¹³C, ¹⁹F) = 5.2 Hz), 128.4, 123.7 (q, ¹J(¹³C, ¹⁹F) = 272.4 Hz), 119.6, 119.1, 117.7 (q, ²J(¹³C, ¹⁹F) = 30.0 Hz), 105.4, 95.8, 60.9, 60.1, 56.6 ppm; ¹⁹F-NMR (565 MHz, DMSO-d_6) δ -61.0 ppm; HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculated for C₁₉H₁₆F₃O₇: 413.0848, observed: 413.0844.

5-Hydroxy-2-(2-hydroxy-3-methylphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4*H*-chromen-4-one (1e)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.7. to afford compound 1e as a yellow solid (171 mg, 48%, recrystallization: hexane/EtOAc); $R_f 0.40$ (hexane/EtOAc = 3/2); m.p. 213.3 °C; ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ 12.50 (s, 1H), 9.11 (s, 1H), 7.29 (dd, J = 7.5, 1.7 Hz, 1H), 7.23 (dd, J = 7.6, 1.7 Hz, 1H), 6.89 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 6.62 (s, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.70 (s, 3H), 3.69 (s, 3H), 2.24 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 178.7, 158.1, 157.3, 156.5, 153.1, 148.8, 139.3, 133.1, 128.3, 128.0, 125.9, 119.0, 117.7, 105.2, 95.6, 60.9, 60.0, 56.5, 16.4 ppm; HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculated for C₁₉H₁₉O₇: 359.1131, observed: 359.1123.

2-(3-Bromo-2-fluorophenyl)-5-hydroxy-3,7,8-trimethoxy-4H-chromen-4-one (1f)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.7. to afford compound 1f as a yellow solid (50 mg, 6%, recrystallization: hexane/EtOAc); R_f 0.45 (hexane/EtOAc = 3/2); m.p. 217.4 °C; ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ 12.25 (s, 1H), 7.98 (ddd, J = 8.2, 6.7, 1.7 Hz, 1H), 7.77 (ddd, J = 7.9, 6.3, 1.7 Hz, 1H), 7.40 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 6.66 (s, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.72 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (126 MHz, Acetone-d₆) δ 180.08, 160.36, 158.73, 157.38 (d, ¹J(¹³C, ¹⁹F) = 252.1 Hz), 152.96 (d, ²J(¹³C, ¹⁹F) = 8.2 Hz), 150.28, 141.32, 137.30, 131.82 (d, ⁴J (¹³C, ¹⁹F) = 1.4 Hz), 130.38 (d, ³J(¹³C, ¹⁹F) = 5.1 Hz), 126.97 (d, ³J(¹³C, ¹⁹F) = 4.6 Hz), 121.63 (d, ²J(¹³C, ¹⁹F) = 15.6 Hz), 110.45 (d, ²J(¹³C, ¹⁹F) = 21.0 Hz), 106.78, 97.10, 61.83, 61.28, 57.30 ppm; ¹⁹F-NMR (565 MHz, Acetone-d₆) δ -106.18 ppm; HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculated for C₁₈H₁₅BrFO₆: 425.0031, observed: 425.0030.

2-(3-Bromo-2-(difluoromethoxy)phenyl)-5-hydroxy-3,7,8-trimethoxy-4H-chromen-4-one (1g)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.7. to afford compound 1g as a yellow solid (30 mg, 11%, recrystallization: hexane/EtOAc); R_f 0.27 (hexane/EtOAc = 3/2); m.p. 162.4 °C; ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 12.28 (s, 1H), 8.02 (dd, J = 8.1, 1.6 Hz, 1H), 7.76 (dd, J = 7.7, 1.6 Hz, 1H), 7.50 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.32 – 6.79 (m, 1H), 6.66 (s, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 3.70 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 178.27, 158.55, 156.56, 153.63, 148.40, 145.32 (t, ³J(¹³C, ¹⁹F) J = 3.6 Hz), 139.17, 136.30, 130.90, 128.56, 128.40, 127.02, 117.17 (t, ¹J(¹³C, ¹⁹F) = 264.0 Hz) 116.98, 105.00, 96.16, 60.91,

60.07, 56.63 ppm; ¹⁹F-NMR (**282 MHz, DMSO**-*d*₆) δ -80.65 ppm; HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculated for C₁₉H₁₆BrF₂O₇: 473.0042, observed: 473.0044.

2-(3-Chloro-5-fluoro-2-hydroxyphenyl)-5-hydroxy-3,7,8-trimethoxy-4H-chromen-4-one (1h)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.7. to afford compound 1h as a yellow solid (101 mg, 34%, recrystallization: hexane/EtOAc); $R_f 0.34$ (hexane/EtOAc = 3/2); m.p. 245.0 °C; ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d_6) δ 12.36 (s, 1H), 10.09 (s, 1H), 7.63 (dd, J = 8.2, 3.2 Hz, 1H), 7.38 (dd, J = 8.4, 3.2 Hz, 1H), 6.65 (s, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 3.70 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ 178.6, 162.4 (d, ¹J(¹³C, ¹⁹F) = 238.4 Hz), 158.3, 156.5, 154.2 (d, ⁴J(¹³C, ¹⁹F) = 1.9 Hz), 148.7, 147.9 (d, ⁴J(¹³C, ¹⁹F) = 2.6 Hz), 139.5, 128.4, 122.3 (d, ³J(¹³C, ¹⁹F) = 11.2 Hz), 120.0 (d, ³J(¹³C, ¹⁹F) = 8.9 Hz), 119.3 (d, ²J(¹³C, ¹⁹F) = 25.7 Hz), 115.9 (d, ²J(¹³C, ¹⁹F) = 23.9 Hz), 105.2, 95.9, 61.0, 60.2, 56.6 ppm; ¹⁹F-NMR (565 MHz, DMSO-d_6) δ -122.8 ppm; HRMS (ESI) *m*/*z* [M+H]⁺ calculated for C₁₈H₁₅ClFO₇: 397.0490, observed: 397.0487.

2-(3-Bromo-5-fluoro-2-hydroxyphenyl)-5-hydroxy-3,7,8-trimethoxy-4*H*-chromen-4-one (1i)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.7. to afford compound 1i as a yellow solid (137 mg, 53%, recrystallization: hexane/EtOAc); $R_f 0.38$ (hexane/EtOAc = 3/2); m.p. 251.4 °C; ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d_6) δ 12.36 (s, 1H), 10.04 (s, 1H), 7.74 (dd, J = 7.9, 3.2 Hz, 1H), 7.41 (dd, J = 8.4, 3.2 Hz, 1H), 6.65 (s, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 3.70 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ 178.6, 158.3, 156.5, 154.9, 154.3 (d, ¹J(¹³C, ¹⁹F) = 239.8 Hz), 154.2 (d, ⁴J(¹³C, ¹⁹F) = 2.0 Hz), 148.7, 139.5, 128.4, 122.2 (d, ²J(¹³C, ¹⁹F) = 25.4 Hz), 119.6 (d, ³J(¹³C, ¹⁹F) = 8.8 Hz), 116.4 (d, ²J(¹³C, ¹⁹F) = 23.7 Hz), 111.9 (d, ³J(¹³C, ¹⁹F) = 10.6 Hz), 105.2, 95.9, 61.0, 60.1, 56.6 ppm; ¹⁹F-NMR (565 MHz, DMSO-d_6) δ -123.0 ppm; HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculated for C₁₈H₁₅BrFO₇: 440.9985, observed: 440.9982.

2-(3-Bromo-2-hydroxy-5-methylphenyl)-5-hydroxy-3,7,8-trimethoxy-4H-chromen-4-one (1j)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.7. to afford compound 1j as a yellow solid (120 mg, 12%, recrystallization: hexane/EtOAc); $R_f 0.40$ (hexane/EtOAc = 3/2); m.p. 251.8 °C; ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 12.43 (s, 1H), 9.76 (s, 1H), 7.60 – 7.53 (m, 1H), 7.23 (dd, J = 2.2, 0.8 Hz, 1H), 6.63 (s, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.71 (s, 3H), 3.69 (s, 3H), 2.27 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (136 MHz, DMSO-d_6) δ 179.05, 158.62, 156.91, 156.10, 149.88, 149.18, 139.85, 135.95, 130.55, 130.32, 128.89, 119.73, 111.80, 105.67, 96.22, 61.34, 60.53, 56.98, 19.87 ppm; HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculated for C₁₉H₁₈BrO₆: 421.0281, observed: 421.0284.

2-(4-Chloro-2-hydroxyphenyl)-5-hydroxy-3,7,8-trimethoxy-4*H*-chromen-4-one (1k)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.7. to afford compound 1k as a yellow solid (169 mg, 45%, recrystallization: hexane/EtOAc); R_f 0.29 (hexane/EtOAc = 1/1); m.p. 240.7 °C; ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ 12.41 (s, 1H), 10.62 (s, 1H), 7.46 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.03 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 6.62 (s, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.72 (s, 2H), 3.70 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-d₆) δ 178.9, 158.7, 157.1, 157.0, 156.4, 149.1, 139.6, 136.5, 132.5, 128.8, 119.4, 117.1, 116.6, 105.5, 96.3, 61.4, 60.6, 57.0 ppm; HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculated for C₁₈H₁₆ClO₇: 379.0585, observed: 379.0579.

2-(4-Chloro-3-hydroxyphenyl)-5-hydroxy-3,7,8-trimethoxy-4*H*-chromen-4-one (11)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.7. to afford compound 11 as a yellow solid (122 mg, 32%, recrystallization: hexane/EtOAc); R_f 0.28 (hexane/EtOAc = 3/2); m.p. 48.0 °C; ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ 12.35 (s, 1H), 10.74 (s, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.57 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.49 – 7.56 (m, 1H), 6.62 (s, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.82 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 178.5, 158.4, 156.4, 154.2, 153.2, 147.9, 138.9, 130.3, 129.7, 128.4, 122.8, 119.7, 115.8, 104.7, 95.9, 61.2, 60.0, 56.5 ppm; HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculated for C₁₈H₁₆ClO₇: 379.0585, observed: 379.0581.

2-(2,3-Dichlorophenyl)-5-hydroxy-3,7,8-trimethoxy-4H-chromen-4-one (1m)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.7. to afford compound 1m as a yellow solid (197 mg, 50%, recrystallization: hexane/EtOAc); $R_f 0.32$ (hexane/EtOAc = 4/1); m.p. 184.8 °C; ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.24 (s,1H), 7.90 (dd, J = 8.1, 1.6 Hz, 1H), 7.74 (dd, J = 7.7, 1.6 Hz, 1H), 7.59 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 6.68 (s, 1H), 3.93 (s, 4H), 3.72 (s, 3H), 3.69 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 178.4, 158.6, 156.6, 154.7, 148.3, 139.1, 132.8, 132.4, 131.4, 130.6, 130.3, 128.8, 128.4, 105.1, 96.3, 61.1, 60.4, 56.7 ppm; HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculated for C₁₈H₁₅Cl₂O₆: 397.0246, observed: 397.0241.

2-(3-Chlorophenyl)-5-hydroxy-3,7,8-trimethoxy-4*H*-chromen-4-one (1n)



The reaction was performed according to the general procedure 2.4.7. to afford compound 1n as a yellow solid (63 mg, 17%, recrystallization: hexane/EtOAc); R_f 0.40 (hexane/EtOAc = 4/1); m.p. 188.3 °C; ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ 12.30 (s, 1H), 8.02 (t, J = 1.9 Hz, 1H), 7.99 (dt, J = 7.4, 1.6 Hz, 1H), 7.61 – 7.72 (m, 2H), 6.64 (s, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.81 (s, 3H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 178.5, 158.5, 156.4, 153.7, 148.0, 139.1, 133.4, 132.1, 130.9, 130.8, 128.4, 127.6, 126.8, 104.8, 96.0, 61.0, 60.1, 56.6 ppm; HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculated for C₁₈H₁₆ClO₆: 363.0635, observed: 363.0628.

3. ¹H-NMR-Spectra at different pH values of CF and BF



Figure S1: ¹H-NMR-Spectra of chlorflavonin's aromatic protons (6-8 ppm) at pH of 2.0-12.5. A-D are the four aromatic protons. Chemical shift in ppm (parts per million).



Figure S2: Titration curves (chemical shift in ¹H-NMR spectra vs. pH value) of chlorflavonin's four aromatic protons plotted with Origin software (OriginLab Corporation, USA)



Figure S3: ¹H-NMR-Spectra of bromflavonin's aromatic protons (6-8 ppm) at pH of 2.0-12.5. A-D are the four aromatic protons. Chemical shift in ppm (parts per million).



Figure S4: Titration curves (chemical shift in ¹H-NMR spectra vs. pH value) of bromflavonin's four aromatic protons plotted with Origin software (OriginLab Corporation, USA).

4. Results of relative free energy calculations

Seven structurally diverse chlorflavonin derivatives with substitutions of ring B that likely bind to AHAS in the predicted binding site1 were chosen to establish a quantitative structure-activity relationship model. Note that the estimated changes in activity among these derivatives are likely < 3 kcal mol⁻¹, which requires using a precise free energy estimation, as is possible with the thermodynamic integration (TI) approach [15,16]. For setting up, performing, and analyzing the TI computations, the TI module of the FEW workflow[9] within Amber21[10] was used. All calculations have converged (Figure S4 and Table S3), and the computed relative free energies ($\Delta\Delta G$) are generally in qualitative agreement with the corresponding relative free energies calculated from difference in minimal inhibitory concentrations (MIC₉₀) (Figure S7). This suggests that changes in MIC₉₀ are predominantly determined by differences in the derivatives' affinities. Furthermore, such computations may be used for suggesting further structural changes to obtain more active chlorflavonin derivatives. Exceptions are the transitions 1 -> 1i and 1 -> 1d, where the $\Delta\Delta G$ indicates more favorable binding in contrast to the change in MIC₉₀. To explore these cases further, the solubility and octanol/water partition coefficient of all seven derivatives were computed (Table S4) with the QikProp module[14] of the Schrödinger suite. Compounds 1i and 1d have the lowest predicted solubility and highest octanol/water partition coefficient among the derivatives, suggesting that differential membrane permeability might underlie the deviation between $\Delta\Delta G$ and the change in MIC₉₀.

Transition	$\Delta\Delta G$ (for replica) ^[a]	ΔΔ G [a][b]	Cycle closure hysteresis ^[a]
1 -> 1a	-0.84	-0.71±0.12	0.15
	-0.80		
	-0.47		
1a -> 1c	4.01	2.99±0.51	
	2.42		
	2.52		
1 -> 1c	2.52	2.13±0.28	
	1.60		
	2.28		
1 -> 1i	-0.64	-0.88±0.12	0.56
	-1.03		
	-0.97		
1i -> 1d	0.24	0.12±0.06	
	0.03		
	0.09		
1 -> 1d	-1.07	-1.32±0.31	
	-1.93		
	-0.95		
1 -> 1f	1.39	0.70±0.43	0.21
	0.81		

Table S3. Relative free energy of binding calculated with the FEW free energy workflow.[9] All values of cycle closure hysteresis are below the threshold of chemical accuracy (1 kcal mol⁻¹).[17]

	-0.09	
1-> 1b	0.69	0.98±0.37
	0.54	
	1.72	
1b -> 1f	-0.20	0.49±0.45
	0.32	
	1.34	

^[a] In kcal mol⁻¹. ^[b] Mean ± standard error of the mean (SEM). The SEM was computed according to the laws of error propagation.

Table S4. Predicted solubility and octanol/water partition coefficient computed with QikProp [14] for chlorflavonin derivatives included in the relative free energy computations.

Compound	QPlogS ^[a]	QPlogPo/w ^[b]
1	-4.13	3.35
1a	-4.24	3.43
1b	-3.79	3.07
1c	-4.36	3.51
1d	-5.07	3.80
1f	-4.13	3.19
1i	-4.48	3.58

^[a] Predicted aqueous solubility, log *S*. *S* in mol dm⁻³ is the concentration of the solute in a saturated solution that is in equilibrium with the crystalline solid. ^[b] Predicted octanol/water partition coefficient.



Figure S5. Average $dV/d\lambda$ over three replicas of free energy calculations of complexes with respect to the simulation time (10 ns per λ step and 30 ns per λ step). Error bars denote the standard deviation from the three replicas.







Figure S6. Ensemble-averaged $dV/d\lambda$ after 10 ns per λ step (ligand in solvent) and 30 ns per λ step (complex in solvent) of sampling time for transitions of chlorflavonin derivatives. The standard error of the mean in all cases is < 0.1 kcal mol⁻¹.



Figure S7. Comparison of predicted relative free energy of binding ($\Delta\Delta G$ predicted) with the corresponding relative free energy of binding calculated from difference in minimal inhibitory concentration ($\Delta\Delta G$ calculated from MIC₉₀) for the transitions V0 \rightarrow V1 shown on the x-axis. The latter was estimated by $-RT \ln (MIC_{90}^{V0}/MIC_{90}^{V1})$ with T = 300 K, assuming that MIC₉₀ correlates to the inhibitory constant of the enzyme. Error bars in $\Delta\Delta G$ predicted denote the standard error of the mean (SEM); * higher than the value (MIC₉₀^{V1} > 100 µM), ** value uncertain (MIC₉₀^{V0} and MIC₉₀^{V1} > 100 µM).

5. Spectral Copies of ¹H-, ¹³C- and ¹⁹F-NMR Data

2-(3-chloro-2-hydroxyphenyl)-5-hydroxy-3,7,8-trimethoxy-4*H*-chromen-4-one (1)



75 MHz, ¹³C-NMR in DMSO-*d*₆

2-(3-bromo-2-hydroxyphenyl)-5-hydroxy-3,7,8-trimethoxy-4*H*-chromen-4-one (1a)





2-(3-fluoro-2-hydroxyphenyl)-5-hydroxy-3,7,8-trimethoxy-4*H*-chromen-4-one (1b)







5-hydroxy-2-(2-hydroxy-3-iodophenyl)-3,7,8-trimethoxy-4*H*-chromen-4-one (1c)







75 MHz, ¹³C-NMR in DMSO-d₆

5-hydroxy-2-(2-hydroxy-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3,7,8-trimethoxy-4*H*-chromen-4-one (1d)









5-hydroxy-2-(2-hydroxy-3-methylphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4*H*-chromen-4-one (1e)



75 MHz, ¹³C-NMR in DMSO-*d*₆



2-(3-bromo-2-fluorophenyl)-5-hydroxy-3,7,8-trimethoxy-4H-chromen-4-one (1f)

126 MHz, ¹³C-NMR in Acetone- d_6



-100 -110 f1 (ppm) 10 -10 -20 -90 -120 -130 -140 -150 -160 -170 -180 -190 -210 Ó -30 -40 -50 -60 -70 -80 -200



2-(3-bromo-2-(difluoromethoxy)phenyl)-5-hydroxy-3,7,8-trimethoxy-4H-chromen-4-one (1g)



300 MHz, ¹H-NMR in DMSO-*d*₆





0

-10

-20 -30

-40

-50 -60

10

-70 -80 -90 -100 -110 -120 -130 -140 -150 -160 -170 -180 -190 -200 -210 f1 (ppm)

2-(3-chloro-5-fluoro-2-hydroxyphenyl)-5-hydroxy-3,7,8-trimethoxy-4*H*-chromen-4-one (1h)







2-(3-bromo-5-fluoro-2-hydroxyphenyl)-5-hydroxy-3,7,8-trimethoxy-4*H*-chromen-4-one (1i)



600 MHz, ¹H-NMR in DMSO-*d*₆





2-(3-bromo-2-hydroxy-5-methylphenyl)-5-hydroxy-3,7,8-trimethoxy-4H-chromen-4-one (1j)





2-(4-chloro-2-hydroxyphenyl)-5-hydroxy-3,7,8-trimethoxy-4*H*-chromen-4-one (1k)




2-(4-chloro-3-hydroxyphenyl)-5-hydroxy-3,7,8-trimethoxy-4*H*-chromen-4-one (11)



75 MHz, ¹³C-NMR in DMSO-*d*₆

2-(2,3-dichlorophenyl)-5-hydroxy-3,7,8-trimethoxy-4*H*-chromen-4-one (1m)







2-(3-chlorophenyl)-5-hydroxy-3,7,8-trimethoxy-4*H*-chromen-4-one (10)

75 MHz, ¹³C-NMR in DMSO-*d*₆

6. References

- 1. Christensen, H. Preparation of Salicylaldehydes via the Ortho-Lithio Derivatives of Methoxymethyl-Protected Phenols. *Synthetic Communications* **1975**, *5*, 65-78, doi:10.1080/00397917508063518.
- 2. Takeuchi, D.; Chiba, Y.; Takano, S.; Osakada, K. Double-Decker-Type Dinuclear Nickel Catalyst for Olefin Polymerization: Efficient Incorporation of Functional Co-monomers. *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, *52*, 12536-12540, doi:https://doi.org/10.1002/anie.201307741.
- Bischof, D.; Tripp, M.W.; Hofmann, P.E.; Ip, C.-H.; Ivlev, S.I.; Gerhard, M.; Koert, U.; Witte, G. Regioselective Fluorination of Acenes: Tailoring of Molecular Electronic Levels and Solid-State Properties. *Chemistry – A European Journal* 2022, 28, e202103653, doi:<u>https://doi.org/10.1002/chem.202103653</u>.
- Badetti, E.; Lloveras, V.; Amadio, E.; Di Lorenzo, R.; Olivares-Marín, M.; Tesio, A.Y.; Zhang, S.; Pan, F.; Rissanen, K.; Veciana, J.; et al. Organic Polyradicals as Redox Mediators: Effect of Intramolecular Radical Interactions on Their Efficiency. ACS Applied Materials & Interfaces 2020, 12, 45968-45975, doi:10.1021/acsami.0c09386.
- 5. Ohno, S.; Qiu, J.; Miyazaki, R.; Aoyama, H.; Murai, K.; Hasegawa, J.-y.; Arisawa, M. Ni-Catalyzed Cycloisomerization between 3-Phenoxy Acrylic Acid Derivatives and Alkynes via Intramolecular Cleavage and Formation of the C–O Bond To Give 2,3-Disubstituted Benzofurans. *Organic Letters* **2019**, *21*, 8400-8403, doi:10.1021/acs.orglett.9b03170.
- Li, L.; Wang, F.; Ni, C.; Hu, J. Synthesis of gem-Difluorocyclopropa(e)nes and O-, S-, N-, and P-Difluoromethylated Compounds with TMSCF₂Br. *Angewandte Chemie International Edition* 2013, 52, 12390-12394, doi:10.1002/anie.201306703.
- 7. *ROCS*, 3.4.2.1; OpenEye Scientific Software: Santa Fe, NM, 2020.
- 8. Rehberg, N.; Akone, H.S.; Ioerger, T.R.; Erlenkamp, G.; Daletos, G.; Gohlke, H.; Proksch, P.; Kalscheuer, R. Chlorflavonin Targets Acetohydroxyacid Synthase Catalytic Subunit IlvB1 for Synergistic Killing of Mycobacterium tuberculosis. *ACS Infect Dis* **2018**, *4*, 123-134, doi:10.1021/acsinfecdis.7b00055.
- 9. Homeyer, N.; Gohlke, H. FEW: A workflow tool for free energy calculations of ligand binding. *Journal of Computational Chemistry* **2013**, *34*, 965-973, doi:10.1002/jcc.23218.
- 10. Case, D.A.; Cheatham III, T.E.; Darden, T.; Gohlke, H.; Luo, R.; Merz Jr., K.M.; Onufriev, A.; Simmerling, C.; Wang, B.; Woods, R.J. The Amber biomolecular simulation programs. *Journal of Computational Chemistry* **2005**, *26*, 1668-1688, doi:10.1002/jcc.20290.
- Wang, J.; Cieplak, P.; Kollman, P.A. How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? *Journal of Computational Chemistry* 2000, 21, 1049-1074, doi:10.1002/1096-987X(200009)21:12<1049::AID-JCC3>3.0.CO;2-F.
- 12. Kruskal, J.B. On the shortest spanning subtree of a graph and the traveling salesman problem. *Proceedings of the American Mathematical Society* **1956**, *7*, 48-50.
- 13. Hawkins, P.C.D.; Skillman, A.G.; Nicholls, A. Comparison of Shape-Matching and Docking as Virtual Screening Tools. *Journal of Medicinal Chemistry* **2007**, *50*, 74-82, doi:10.1021/jm0603365.
- 14. *QikProp*, Release 2021-4; Schrödinger: New York, NY, 2021.
- 15. Kaus, J.W.; Pierce, L.; Walker, R.C.; McCammont, J.A. Improving the Efficiency of Free Energy Calculations in the Amber Molecular Dynamics Package. *Journal of chemical theory and computation* **2013**, *9(9)*, doi:10.1021/ct400340s.

- 16. Homeyer, N.; Stoll, F.; Hillisch, A.; Gohlke, H. Binding Free Energy Calculations for Lead Optimization: Assessment of Their Accuracy in an Industrial Drug Design Context. *Journal of chemical theory and computation* **2014**, *10 (8)*, 3331-3344, doi:10.1021/ct5000296.
- 17. Ioannidis, H.; Drakopoulos, A.; Tzitzoglaki, C.; Homeyer, N.; Kolarov, F.; Gkeka, P.; Freudenberger, K.; Liolios, C.; Gauglitz, G.; Cournia, Z.; et al. Alchemical Free Energy Calculations and Isothermal Titration Calorimetry Measurements of Aminoadamantanes Bound to the Closed State of Influenza A/M2TM. *Journal of chemical information and modeling* **2016**, *56 5*, 862-876.

4.2. Literaturübersicht zur Darstellung β-thia-isosteren Fosmidomycin-Analoga

Die Vorarbeiten zur Synthese der β -thia-isosteren Fosmidomycin-Analoga lieferte DR. CLAUDIA LIENAU im Rahmen Ihrer Promotion, indem sie zwei mögliche Syntheserouten 31).277 etablierte (Schema Für beide Synthesestrategien wurden aus Diethylbenzylphosphonaten (LXIV) durch Deprotonierung des a-Kohlenstoffes mittels *n*-Butyllithium und elementarem Schwefel die entsprechenden α -Mercaptophosphonate LXV hergestellt (Schema 31).²⁷⁸⁻²⁸⁰ Bei der ersten Synthesestrategie wurden die entsprechenden a-Mercaptophosphonate LXV mit 2-Chlor-N-hydroxy-N-methylacetamid oder 2-Chlor-Nhydroxy-acetamid im basischen Milieu zu den Hydroxamsäuren LXVI S-alkyliert (Schema 31, Syntheseroute 1). Trimethylsilylbromid (TMSBr)-vermittelte Phosphonsäureester-Spaltung lieferte die Phosphonohydroxamsäuren LXVII in insgesamt drei Schritten. Bei der zweiten Syntheseroute erfolgte die S-Alkylierung der α -Mercaptophosphonate LXV mit Trimethylsilylbromacetat und anschließend wurde eine saure Hydrolyse zu den Carbonsäuren LXVIII durchgeführt (Schema 31, Syntheseroute 2). Nachfolgende Kupplungsreaktion gelang nach Aktivierung der Carboxylgruppe von LXVIII durch Chlorameisensäureisobutylester mit O-Tritylhydroxylamin zu den O-Trityl-geschützten Hydroxamsäuren LXIX, die nach saurer Hydrolyse Hydroxamsäuren LXX lieferten. die freien Die TMSBr-vermittelte



Schema 31: Syntheserouten zur Darstellung von β -thia-isosteren Fosmidomycin-Analoga LXVII nach LIENAU.²⁷⁷

(a) 0.13 Äq. S₈, 1.1 Äq. *n*-BuLi, THF, -78 °C – RT, (b) 1.00 Äq. 2-Chlor-*N*-hydroxy-*N*-methylacetamid oder
2-Chlor-*N*-hydroxyacetamid, 1.00 Äq. Na₂CO₃, DMF, 0 °C – RT; (c) i) TMSBr, CH₂Cl₂, 0 °C – RT, 48 h; ii) H₂O, THF, RT, 45 min; (d) i) 1.25 Äq. K₂CO₃, 1.0 Äq. TMS-Bromacetat, DMF, 0 °C – RT, 30 min; ii) 1 м HCl; (e)
1.1 Äq. 4-Methylmorpholin, 1.1 Äq. Chlorameisensäureisobutylester, 1.0 Äq. O-Tritylhydroxylamin, THF, -20 °C – RT, 16 h; (f) 8.0 Äq. TFA, 2.0 Äq. Triethylsilan, CH₂Cl₂, RT, 2 h. ²⁷⁸

Phosphonsäureester-Spaltung stellt auch bei dieser fünf-schrittigen Syntheseroute den letzten Schritt dar.

Problematisch an beiden Syntheserouten ist die Synthese und Stabilität der α -Mercaptophosphonate **LXV**. Zum einem hat *n*-Butyllithium eine geringe Kompatibilität mit möglichen Schutzgruppen oder funktionellen Gruppen am α -Phenyl-Ring. Zum anderen sind die isolierten α -Mercaptophosphonate **LXV** oxidationsempfindlich und instabil, wodurch nur eine kurzfristige Lagerung unter Stickstoff-Atmosphäre bei -20 °C möglich ist.²⁷⁷

Die Vermeidung von *n*-Butyllithium und anderen lithiumorganischen Verbindungen stellt ein größeres Problem dar. Eine literaturbekannte Möglichkeit bietet die Synthese von α -Mercaptophosphonaten **LXV** ausgehend von α -Hydroxyphosphonaten **LXXI**, deren Hydroxygruppe mit Nosylchlorid oder Mesylchlorid zu den α -Sulfonaten **LXXII** aktiviert wird.^{281,282} Diese α -Sulfonate **LXXII** können anschließend durch Kaliumthiocyanat nukleophil substituiert werden. Die resultierenden α -Thiocyanate **LXXIII** können mit Natriumborhydrid zu α -Mercaptophosphonaten **LXV** reduziert werden.^{281,282}



Schema 32: Darstellung von α-Mercaptophosphonaten LXV nach GULEA *et al.* und LASSAUX *et al.*^{281,282}
(a) 1.0 Äq Diisopropyl- oder Diethylphosphonat, 5.0 Äq. Et₃N, (b) 1.2 Äq. Nosylchlorid, 2.0 Äq. Et₃N, kat.
4-DMAP, CH₂Cl₂, 0 °C – RT, 18 h; (c) 4.0 Äq. KSCN, kat. [18]Krone-6, ACN, Reflux, 40 h; (d) i) 5.0 Äq. NaBH₄, EtOH, RT, 2 h; ii) 2 м HCI.

4.3. Literaturbekannte Darstellungen von Siderophoren und –fragmenten

4.3.1. 2-Chlor-3,4-dihydroxybenzoesäure LXXVIII

Die literaturbekannten Synthesen von 2-Chlor-3,4-dihydroxybenzoesäure **LXVIII** sind in Schema 33 zusammengefasst. Die drei Syntheserouten verlaufen über 2-Chlor-3,4methoxybenzoesäure (**LXXVII**) als Zwischenstufe, welche ausgehend von den drei kommerziell verfügbaren Edukten **LXXIV-LXXVI** synthetisiert werden kann.



Schema 33: Literaturbekannte Darstellung von 2-Chlor-3,4-dihydroxybenzoesäure (LXXVIII) durch Oxidation eines Benzylalkohols (A), Oxidation eines Benzaldehyds (B) oder Chlorierung (C).

(a) O₃, ACN, 35 °C, 9 h, 75 % nach ZHANG *et al.*²⁸³; (b) H₂NSO₃H, NaClO₂, 1,4-Dioxan, 0 °C – RT, 96 % nach Aoki *et al.*²²⁸; (c) KMnO₄, H₂O nach ALMEIDA *et al.*²⁸⁴; (d) i) *n*-BuLi, THF, -78 °C; ii) LTMP, Hexachlorethan, THF, -78 °C – 60 °C, 40 % nach CHAU *et al.*²⁸⁵; (e) BBr₃, CH₂Cl₂, 0 °C – RT nach NISHITANI *et al.*²⁸⁶

Zum einen kann 2-Chlor-3,4-methoxybenzylalkohol (LXXIV) durch Ozon zur Carbonsäure LXXVII oxidiert werden (Schema 33, A).²⁸³ Da dafür ein Ozongenerator notwendig ist, schied diese Option aus. Alternativ kann 2-Chlor-3,4-dimethoxybenzaldehyd (LXXV) mittels LINDGREN-²²⁸ oder Kaliumpermangnat-Oxidation²⁸⁴ zu LXXVII oxidiert werden (Schema 33, B). Als dritte Möglichkeit kann, ausgehend von 3,4-Dimethoxybenzosäure (LXXVI) durch Reaktion mit *n*-Butyllithium, eine ortho-Lithiierung durchgeführt und durch Zugabe von Hexachlorethan die ortho-Position mit einer Ausbeute von 40 % chloriert werden (Schema 33, C). Aufgrund der milden Reaktionsbedingungen und ausgezeichneter Ausbeute von 96 % ist die LINDGREN-Oxidation ist die effizientere Methode zur Darstellung von LXXVII. Im Folgeschritt können die Methyl-Schutzgruppen Bortribromid 2-Chlor-3.4mittels entfernt werden, um

dihydroxybenzoesäure (**LXXVIII**) zu erhalten, wobei die Patentvorschrift von NISHITANI *et al.* keine Reaktionsbedingungen angibt (Schema 33).²⁸⁶

4.3.2. Azotochelin (N², N⁶-Bis(2, 3-dihydroxybenzoyl)-L-lysin) LXXXI

Zur Darstellung von Azotochelin (*N*²,*N*⁶-Bis(2,3-dihydroxybenzoyl)-L-lysin) (**LXXXI**) wurden bereits zwei Vorschriften publiziert (Schema 34).^{287,288} Im Jahr 2000 gelang SCHNABELRAUCH *et al.* die Synthese ausgehend von L-Lysin (**LXXIX**) und zwei Äquivalenten 2,3-Bisbenzyloxybenzoesäurechlorid (**LXXX**) im Basischen mittels einer zweifachen Acylierung. Die Benzyl-Schutzgruppe wurde hydrogenolytisch mit Palladium auf Aktivkohle und Wasserstoff entfernt, sodass Azotochelin (**LXXXI**) über zwei Schritte in einer Gesamtausbeute von 45 % dargestellt werden konnte (Schema 34, **A**).²⁸⁷

Da 2,3-Bis-benzyloxybenzoesäurechlorid (**LXXX**) allerdings nicht kommerziell verfügbar ist, müsste dieses zuvor aus 2,3-Dihydroxybenzoesäure hergestellt werden. Nachteilig an dieser Syntheseroute ist die Verwendung von 3 Äquivalenten Natronlauge, welche die Racemisierung von L-Lysin (**LXXIX**) begünstigt.²⁸⁹



Schema 34: Literaturbekannte Darstellung von Azotochelin (LXXXI) nach SCHNABELRAUCH *et al.*²⁸⁷ (A) und MIYANAGA *et al.* (B).²⁸⁸

(a) 3.0 Äq. 3 M NaOH_(aq.), THF/H₂O, 0 °C – RT, 4 h, 53 %; (b) 10 mol% Pd/C, H₂, EtOH/AcOH (10/1 v/v), RT, 24 h, 85 %; (c) 3.50 Äq. BOP-Reagenz, 3.50 Äq. HOBt, 2.00 Äq. DIPEA, DMF, RT, 14 h, 57 %; (d) 10 mol% Pd/C, H₂, MeOH, RT, 3 h, 34 %; (e) 1 M NaOH_(aq.), MeOH, RT, 2 h, 99 %.

Eine weitere Möglichkeit publizierten MIYANAGA *et al.* (Schema 34, **B**).²⁸⁸ Zwei Äquivalente 2,3-Bis-benzyloxybenzoesäure (**LXXXIII**) wurden mit L-Lysinmethylester (**LXXXII**) gekuppelt, welches die Schützung der Carboxylgruppe von L-Lysin als Ester erforderte. Als

Benzotriazolyloxytris(dimethylamino)phosphoniumhexafluoro-Kupplungsreagenz wurde phosphat (BOP) gewählt. Danach wurden die Benzyl-Schutzgruppen hydrogenolytisch und der Methylester basisch entfernt, sodass Azotochelin (LXXXI) über drei Schritte in einer Gesamtausbeute von 19 % gewonnen werden konnte (Schema 34). Zu beachten ist jedoch, dass auch 2,3-Bis-benzyloxybenzoesäure (LXXXIII) zunächst aus 2,3-Dihydroxybenzoesäure hergestellt werden muss. Zudem ist die Verwendung des BOP-Reagenz kritisch zu betrachten, da dieses das kanzerogene Hexamethylphosphorsäuretriamid (HMPT) freisetzt. Dementsprechend sollte BOP durch ein weniger toxisches Kupplungsreagenz ersetzt werden.

4.3.3. Mycobactine

Die strukturelle Diversität der Mycobactine **LXXXIV** wurde in Kapitel 2.4.4.1 beschrieben und das Grundgerüst ist in Schema 35 dargestellt. Bei den Resten R¹ und R² der (*S*)-2-(2-Hydroxyphenyl)-4,5-dihydrooxazole-4-carbonsäure (HPOC) **LXXXV** handelt es sich um Wasserstoffatome oder Methylgruppen, sodass die Synthesen für beide Analoga in die Literaturübersicht mit einbezogen werden.



Schema 35: Retrosynthetische Zerlegung von Mycobactinen in vier Bausteine. R^1 und R^2 = H oder Me, R^3 = Alkyl oder Alkenyl, R^4 und R^5 = H oder Alkyl.

Für den Acylrest R³ von *N*⁶-Hydroxy-L-lysin **LXXXVI** kommen verschiedene aliphatische Reste in Frage, wobei der Aufbau der Hydroxamsäuregruppe unabhängig vom aliphatischen Rest R³ ist. Folglich wurden in die Literaturübersicht alle aliphatischen Reste R³ einbezogen.

Das zentrale Strukturelement bei den Mycobactinen ist ein Carbonsäureester. Da diese allerdings metabolisch nicht stabil sind, sollte bei der Synthese der Analoga dieses

Strukturelement durch eine Peptidbindung ersetzt werden. Die Reste R⁴ und R⁵ des Propionsäureamids zeigen bei den natürlich vorkommenden Mycobactinen eine große strukturelle Vielfalt. Zudem soll dieser Baustein im Vergleich zu den literaturbekannten Synthesen stark modifiziert werden, sodass die Synthese dieses Strukturelementes in der Literaturübersicht nicht besprochen wird. Das (*S*)-3-Amino-1-hydroxyazepan-2-on-Strukurelement (AHAO) **LXXXVIII** kommt in allen Mycobactinen vor und erlaubt keine Strukturvariation. Zusammenfassend wird in der folgenden Literaturübersicht die Synthese von HPOCs **LXXXV**, *N*⁶-Hydroxy-L-lysinen **LXXXVI** und des AHAOs **LXXXVIII** sowie die Verknüpfung der jeweiligen Bausteine zu Mycobactinsäure- und Cobactin T-Analoga und Amid-verbrückten Mycobactin-Analoga beschrieben.

Die in der Literaturübersicht vorgestellten Synthesen beginnen jeweils mit günstig erwerbbaren Edukten und berücksichtigen nicht die Synthese dieser Edukte, selbst wenn diese von den Autoren durchgeführt worden sind. Nicht berücksichtigt wurden aufgrund ihrer Komplexität Festphasensynthesen zur Darstellung von Mycobactinen.²⁹⁰⁻²⁹² Neben der Synthese der einzelnen Bausteine ist vor allem die Auswahl der Schutzgruppen von zentraler Bedeutung, da diese für zielgerichtete und effiziente Synthesen orthogonal zueinander entfernbar sein müssen. Folglich wurden alle in der Literatur verwendeten Schutzgruppen in die Literaturübersicht einbezogen, um bei der Syntheseplanung eine optimale Auswahl der Schutzgruppen zu ermöglichen.

4.3.3.1. Literaturbekannte Darstellungen der (geschützten) (*S*)-2-(2-Hydroxyphenyl)-4,5-dihydrooxazole-4-carbonsäure (HPOC)-Analoga LXXXV

HU und MILLER publizierten 1997 ausgehend von L-Serinbenzylester Hydrochlorid (LXXXIX) und 2-(Benzyloxy)benzoesäure (XC) die Synthese der (S)-2-(2-Hydroxyphenyl)-4,5dihydrooxazol-4-carbonsäure LXXXV (HPOC),^{293,294} welche auch von anderen Gruppen angewendet wurde (Schema 36, A).²⁹⁵ Die Kupplung der beiden Edukte erfolgte mit 3-(Ethyliminomethylidenamino)-*N*,*N*-dimethyl-propan-1-amin Hydrochlorid (EDC+HCI) und Triethylamin als Hilfsbase in Dichlormethan unter Argonatmosphäre und lieferte das Intermediat XCI in einer Ausbeute von 90 % (Schema 36, A1). Die anschließende dehydratisierende Cyclisierung mit BURGESS-Reagenz in THF lieferte das doppelt Benzylgeschützte Zwischenprodukt XCII in einer Ausbeute von 66 % (Schema 36, A2), während die anschließende Hydrogenolyse mit Palladium auf Aktivkohle unter Wasserstoffatmosphäre quantitativ verlief (Schema 36, A3). Somit konnte die HPOC LXXXV mit einer Gesamtausbeute von 59 % über drei Schritte erhalten werden.²⁹³



Schema 36: Literaturbekannte Darstellung der (S)-2-(2-Hydroxyphenyl)-4,5-dihydrooxazol-4-carbonsäuren LXXXVa und LXXXVb über Kupplungsreaktion und dehydratisierende Cyclisierung.

Nachfolgende Gruppen variierten diese etablierte Synthesestrategie insofern, dass entweder 2-(Benzyloxy)benzoesäure (XCa) oder Salicylsäure (XCb) als Edukte eingesetzt wurden und mit L-Serin (LXXXIXa) oder L-Threonin (LXXXIXb) sowie deren Methyl- oder Benzylester (LXXXIXc-f) EDC-vermittelt zu den Intermediaten XCI gekuppelt wurde (Schema 36, A1). Bei diesem Kupplungsschritt wurde EDC mit den Hilfsbasen Diisopropylethylamin (DIPEA) oder Triethylamin allein 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol oder additiv (HOAt) oder 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) sowie 4-Dimethylaminopyridin (4-DMAP) verwendet. Es zeigte sich, dass die Ausbeuten unabhängig von den exakten Bedingungen bei 75 % bis 85 % lagen und somit keinen großen Unterschied zeigten. KIKKERI et al. verwendeten als einzige Gruppe eine Kombination aus N.N-Diisopropylcarbodiimid (DIC) und HOBt, wobei die Ausbeute nur bei 64 % lag (Schema 36, B1).²⁹⁶ Bei den anschließenden dehydratisierenden Cyclisierung des L-Serinester XCIa kamen BURGESS-Reagenz²⁹³⁻²⁹⁵, Ammoniummolybdat Tetrahydrat,²⁹⁷ Perfluor-1-octan-sulfonylfluorid (PFOSF) und Diethylaminoschwefeltrifluorid (DAST)²⁰¹ zum Einsatz, während für die L-Threoninester eine Kombination aus Ammoniummolybän(IV)oxid und Pentafluorbenzoesäure²⁹⁸ beschrieben wurde (Schema 36, **A2**). Besonders hervorzuheben ist hier die Synthese von SAKAKURA *et al.*, da diese durch die dehydratisierende Cyclisierung des L-Threoninesters (**XCIb**) mittels Ammoniummolybän(IV)oxid und Pentafluorbenzoesäure lediglich zwei Schritte zur Darstellung von **LXXXVb** benötigten (Schema 36, **C2**).²⁹⁹

Im letzten Schritt folgte das Entfernen der Methylester-, bzw. Benzylester- und Benzylether– Schutzgruppen von den Verbindungen **XCII** (Schema 36, **A3**). Die Benzylgruppen konnten durch Hydrogenolyse mit Palladium auf Aktivkohle und Wasserstoff simultan in ausgezeichneten Ausbeuten entfernt werden.^{293-297,300,301} Die Methylester hingegen wurden mittels Lithiumhydroxid in Methanol/Wasser^{298,299} oder mit Natriumhydrid in Tetrahydrofuran (THF)²⁰¹ verseift (Schema 36, **A3**). Die MILLER Gruppe erprobte neben der Verwendung von Methyl- auch Isopropylester, bei denen es allerdings während der basischen Verseifung durch die langsame Reaktionsgeschwindigkeit zur partiellen Racemisierung kam.³⁰² In den folgenden Jahren wurde daher auf den Einsatz einer Isopropyl-Schutzgruppe verzichtet.



Schema 37: Literaturbekannte Darstellung der (*S*)-2-(2-Hydroxyphenyl)-4,5-dihydrooxazole-4-carbonsäuren LXXXVa und LXXXVc mittels PINNER-Reaktion oder Acylierung.

SHAPIRO³⁰³ und KAPLAN³⁰⁴ beschrieben eine weitere Syntheseroute ausgehend von 2-Cyanophenolen **XCIII** (Schema 37, **A**). Die 2-Cyanophenole **XCIII** wurden mit Acetylchlorid und Methanol in das entsprechende PINNER-Salz **XCIV** übergeführt (54 % - 65 %) und mit L-Serinmethylester Hydrochlorid³⁰⁴ oder L-Serinbenzylester Hydrochlorid ³⁰³ und Triethylamin

in Dichlorethan zu den geschützten HPOCs **XCII** cyclisiert. Die Entschützung der Carboxylgruppe gelang mit Lithiumhydroxid in THF/Wasser (50 %) oder hydrogenolytisch (quantitativ), sodass die Darstellung der HPOCs **LXXXV** in drei Schritten mit einer Gesamtausbeute von 12 % (**LXXXVa**) bzw. 33 % (**LXXXVc**) möglich war.³⁰⁴

Im Jahr 2021 publizierten CHAN und GROVES eine weitere Vorschrift, bei der sie Salicylsäure (**XC**) mittels Thionylchlorid in das Carbonsäurechlorid (**XCV**) überführten und mit dieser L-Serin acylierten. Das so gewonnene ungeschützte Intermediat **XCI** konnte unter Verwendung von DAST zur ungeschützten HPOC **LXXXVa** cyclisiert werden, wodurch das avisierte Produkt **LXXXVa** in drei Schritten mit einer Gesamtausbeute von 18 % erhalten werden konnte (Schema 37, **B**).

4.3.3.2. Literaturbekannte Darstellungen der (geschützten) N⁶-Acyl-N⁶-hydroxy-Llysin-Analoga LXXXVI

Die erste Synthese eines N^6 -Acyl- N^6 -hydroxy-L-lysins (**LXXXVI**) beschrieben MAURER und MILLER im Jahr 1982.³⁰⁵ Sie verwendeten (*S*)-2-Amino-6-hydroxycapronsäure **XCVI** als Edukt und führten zunächst die *tert*-Butyloxycarbonyl (Boc)- und die Methyl-Schutzgruppe ein (Schema 38, **A1-2**).





Im Anschluss wurde die Hydroxygruppe mittels APPEL-Reaktion in das entsprechende Bromid **XCVII** konvertiert (Schema 38, **A3**). Eine intermolekulare MITSUNOBU-Reaktion mit *N*-Acetyl-O-Benzylhydroxylamin lieferte N^6 -Acetyl- N^6 -benzyloxy-L-lysinmethylester **LXXXVIa** in 14 % Ausbeute über vier Schritte (Schema 38, **A4**).

Im weiteren Verlauf führten die Syntheserouten über N⁶-Hydroxy-L-lysine (C) als wichtige Intermediate. Die MILLER Gruppe synthetisierten dieses in mehreren Publikationen ausgehend von Benzyloxycarbonyl (Cbz)-L-Lysin (XCVII), indem sie die Carboxylgruppe zunächst mit Thionylchlorid/Methanol zum Methylester geschützt haben (Schema 38, B1).^{293,294,306} Anschließend wurde das primäre Amin mit Aceton kondensiert und mittels Dimethyldioxiran (DMDO) zum Nitron XCIX oxidiert (Schema 38, B2-3). Durch Umsetzung des Nitrons XCIX mit NH₂OH•HCl oder wässrige Hydrolyse wurde XCIX in das entsprechende Hydroxylamin Ca übergeführt (Schema 38, B4). Das instabile Hydroxylamin Ca wurde ohne Reinigung mit einem Überschuss Palmitinsäurechlorid in Aceton acyliert, sodass ein N,O-diacyliertes Nebenprodukt entstand, welches durch basische Aufarbeitung zum N-acylierten Produkt LXXXVIb gepalten wurde (Schema 38, B5). Nachfolgend erprobten die Autoren zwei Synthesestrategien. Zum einen wurde die Cbz-Schutzgruppe direkt hydrogenolytisch entfernt, sodass der Methylester LXXXVIc über sechs Schritte in 29 % Ausbeute erhalten wurde (Schema 38, B6).²⁹³ Zum anderen wurde die Hydroxamsäuregruppe β -(Trimethylsilyl)ethoxymethyl (SEM)-geschützt und anschließend die Cbz-Schutzgruppe entfernt, welches das SEM- und Methyl-geschützte Intermediat LXXXVId in 26 % Gesamtausbeute lieferte (Schema 38, C6-7).^{293,294}

Da die Verwendung von DMDO erhebliche Schwierigkeiten mit sich bringt, entwickelten WALZ und MILLER eine Synthesestrategie, bei welcher *m*-Chlorperbenzoesäure (*m*-CPBA) als Oxidationsmittel verwendet wurde (Schema 38, **D**). *N*²-Cbz-L-Lysin (**XCVIII**) wurde mit frisch destilliertem Benzaldehyd zum Azomethin kondensiert und mit *m*-CPBA zum Oxaziridin oxidiert. Die Zugabe von Trifluoressigsäure (TFA) führte zur Isomerisierung zum Nitron **CI** in einer Ausbeute 66 % über zwei Schritte (Schema 38, **D1-3**). Durch nachfolgende Sequenz bestehend aus Hydroxylaminolyse, Veresterung mit Thionylchlorid in Methanol sowie Acylierung mit Palmitinsäure lag die Gesamtausbeute von **LXXXVIb** über 7 Schritte ebenfalls bei 29 % (Schema 38, **D**).

Basierend auf dieser Synthesestrategie etablierten GHOSH *et al.* ein alternatives Schutzgruppenkonzept (Schema 39, **A**).²⁹⁸ Analog zu den vorherigen Strategien wurde das Nitron **CI** durch Zugabe von Hydroxylamin aminolysiert und die Carboxylgruppe in Thionylchlorid/Methanol verestert. Das Hydroxylamin wurde nun allerdings doppelt Bocgeschützt anstatt mit Palmitinsäurechlorid acyliert und die Cbz-Schutzgruppe entfernt, um **LXXXVIe** zu erhalten (Schema 39, **A**).

200



Schema 39: Fortsetzung der literaturbekannte Darstellungen von (geschützten) N⁶-Acyl-N⁶-hydroxy-L-lysin-Analoga (LXXXVI).

Die Instabilität der nicht geschützten intermediär auftretenden N^6 -Hydroxy-L-lysine **C** wurde von den genannten Autoren vielfach beschrieben,^{293,294,298,302,307} sodass eine Dibenzoylperoxid (DBPO)-vermittelte Oxidation in Natriumhydrogencarbonat-Pufferlösung (pH-Wert 10.5) zur Darstellung des stabilen Benzoyl-geschützten N^6 -Hydroxy-L-lysins (**Ca**) durch WU *et al.* eine verbesserte Möglichkeit zur Oxidation des terminalen Amins darstellt (Schema 39, **B**). Die Autoren testeten auch Carbamidperoxid, H₂O₂/Tetra-*n*-butylammoniumiodid (TBAI) und *tert*-Butylhydroperoxid (TBHP)/TBAI als mögliche Oxidationsmittel, welche aber alle nicht erfolgreich waren.³⁰¹ Eine deutlich verkürzte Synthese publizierte CHAN *et al.* durch selektive Oxidation des N^6 -Carbamat-Stickstoffes von N^6 -Boc- N^2 -Cbz-L-Lysinmethylester (**CII**) mit Methyl-(trifluormethyl)dioxiran (TFD),²⁰¹ welches im Vergleich zu DMDO ein höheres Oxidationspotential aufweist (Schema 39, **C**). Folgende FINKELSTEIN-analoge selektive *O*-Alkylierung erfolgte mit Benzylbromid/TBAI und Natriumhydrid in THF (Schema 39, **C2**).²⁰¹ Auch wenn diese zweistufige Synthese von LXXXVIg mit einer Ausbeute von 54 % sehr effizient erscheint, sollte bedacht werden, dass N^6 -Boc- N^2 -Cbz-L-Lysinmethylester (**CII**) nicht kommerziell verfügbar ist und die Arbeit mit TFD sehr gefährlich und aufwendig ist.²⁰¹

4.3.3.3. Literaturbekannte Darstellungen der (geschützten) (S)-3-Amino-1hydroxyazepan-2-on-Analoga LXXXVIII

In den frühen 1980er Jahren veröffentlichte die MILLER Gruppe die ersten Synthesen von (S)-3-LXXXVIII).302,308 (AHAO, Racemische Amino-1-hydroxyazepan-2-on 2-Amino-6hydroxycapronsäure XCVI wurde zunächst enzymatisch getrennt und die gewünschte (S)-2-Amino-6-hydroxycapronsäure ((S)-XCVI) Boc-geschützt (Schema 40, A1-2).³⁰⁸ Die Carboxylgruppe wurde anschließend mit O-Benzylhydroxylamin EDC-vermittelt bei pH 4.5 (80 %)³⁰⁸ oder EEDQ ((2-Ethoxy-1-ethoxycarbonyl-1,2-dihydrochinolin) und Et₃N in THF/Wasser (60%)³⁰² gekuppelt (Schema 40, A3). Die Cyclisierung gelang durch eine MITSUNOBU-Reaktion, bei der die N-Alkylierung des Hydroxamats XCVIIa mit Hilfe von Triphenylphosphan und Diethylazodicarboxylat (DEAD) in THF mit Ausbeute von 43 % stattfand (Schema 40, A4).³⁰⁸ Diese Synthesestrategie schied für dieses Projekt aus, da (S)-2-Amino-6-hydroxycapronsäure ((S)-XCVI) im kommerziellen Erwerb zu teuer ist oder über enzymatische Trennung hätte gewonnen werden müssen. Zudem zeigte die intramolekulare MITSUNOBU-Reaktion nur moderate N-Selektivität, sodass das (*E*)und (*Z*)-*N*-Benzyloxyimidate als Nebenprodukte entstanden, die sich nur schwer abtrennen ließen.

Die MILLER Gruppe etablierte später die AHAO-Synthese ausgehend vom kommerziell verfügbaren N²-Cbz-L-Lysin (XCVI) (Schema 40, B).²⁹³ Dieses wurde zunächst in tert-Butylacetat mit Perchlorsäure zum tert-Butylester verestert, das terminale Amin mit DMDO zum Nitron oxidiert und zum Hydroxylamin Cb hydrolysiert (Schema 40, B1-3). Eine säurekatalysierte Desalkylierung des tert-Butylesters mit TFA in Dichlormethan und anschließende intramolekulare Kupplung durch langsames Zutropfen der Carbonsäure zu einem N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)/4-DMAP/4-DMAP•HCI-System ermöglichte die Cyclisierung zum Cbz-geschützten (S)-3-Amino-1-hydroxyazepan-2-on LXXXVIIIb (Schema 40, **B4-5**). Die freie Hydroxamsäuregruppe wurde anschließend tert-Butyldiphenylsilylether (TBDPS)-geschützt, sodass LXXXVIIIc über sechs Schritte in 30 % Ausbeute gewonnen werden konnte (Schema 40, B6). Die Autoren versuchten statt TBDPS ebenfalls die tert-Butylmethylsilylether (TBDMS)-Schutzgruppe, dieser Ester war jedoch in der anschließenden Kupplung nicht stabil. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass sich Silylester neben Fluorid auch durch saure Hydrolyse spalten lassen. Aufgrund der geringeren sterischen Hinderung bei der TBDMS-Schutzgruppe ist diese anfälliger für saure Hydrolyse als die TBDPS-Schutzgruppe.²⁹³



Schema 40: Literaturbekannten Darstellungen von geschützten (S)-3-Amino-1-hydroxyazepan-2-on-Analoga.

Später wurde mithilfe der 2007 etablierten *m*-CPBA-Oxidation ausgehend von Nitron **CI** eine Hydrolyse und intramolekulare Cyclisierung mit EDC/HOAt/NaHCO₃ in stark verdünnter basischer Lösung durchgeführt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an einer Umkehrphase konnte das Cbz-geschützte (*S*)-3-Amino-1-hydroxyazepan-2-on **LXXXVIIIb** in 55 % Ausbeute isoliert werden (Schema 40, **C4-5**).^{307,309} GHOSH *et al.* nutzte bei demselben Syntheseweg von **LXXXVIIIb** für die intramolekulare Cyclisierung erstmals ein *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N*,*N*,*N'*,*N'*-tetramethyluronium-hexafluor-phosphat (HATU)/DIPEA-System (Schema 40, **C5**). Da die anschließende HATU-Kupplung zur Synthese des Cobactin T-Bausteins mit freier Hydroxamsäuregruppe allerdings nicht glückte, wurde die Hydroxamsäuregruppe nach bekannter Methode TBDPS-geschützt, sodass **LXXXVIIIc** über drei Schritte ausgehend von **CI** in einer Ausbeute von 48 % dargestellt werden konnte (Schema 40, **C4-6**).²⁹⁸

Wie bereits im vorherigen Kapitel beschrieben, gelang WU *et al.* die Darstellung des lagerstabilen Benzoyl-geschützten *N*⁶-Hydroxy-L-lysins **Ca**, welches nach saurer Hydrolyse mit TFA über 10 Stunden zu einem System aus EDC/4-DMAP/4-DMAP•HCl (je 5.00 Äq) getropft wurde, was zur intramolekularen Cyclisierung führte. (Schema 40, **D3-4**). Folglich konnte das Benzoyl-geschützte AHA **LXXXVIIId** über vier Schritte in 44 % Ausbeute isoliert werden.

Eine innovative Methode verwendete YANG *et al.*³¹⁰ und nach deren Vorlage später CHAN *et al.*²⁰¹, indem der Ringaufbau durch Ringschluss-Metathese ermöglicht wurde (Schema 40, **E**). Ausgehend von Fmoc-L-Allylglycin (**CIII**) wurde EDC/HOBt/4-Methylmorpholin-vermittelt an *O*-Tritylhydroxylamin³¹⁰ oder *O*-Benzylhydroxylamin Hydrochlorid²⁰¹ gekuppelt (Schema 40, **E1**). Interessanterweise zeigte sich trotz basischer Bedingungen keine nennenswerte Degradation der Fmoc-Schutzgruppe. Tetrakis(triphenylphosphin)palladium-katalysierte *N*-Alkylierung mit Allylmethylcarbonat lieferte die doppelt geschützten Intermediate **CIVa-b** (Schema 40, **E2**). Für beide Reaktionsschritte wurden jeweils Ausbeuten von 86 % bis 90 % erzielt.^{201,310} Die Ringschluss-Metathese von **CIVa-b** vollzog sich durch GRUBBS II (Benzyliden[1,3-bis(2,4,6-trimethylphenyl)-2-

imidazolidinyliden]dichlor(tricyclohexylphosphan)ruthenium)-Katalyse zu den ungesättigten (*S*)-3-Amino-1-hydroxyazepan-2-onen **LXXXVIIIe-f** in sehr guter Ausbeute (Schema 40, **E3**).³¹⁰ YANG *et al.* konnten nach intensiver Optimierung der Reaktionsbedingungen die Doppelbindung von **LXXXVIIIe** ohne den Verlust der Trityl-Schutzgruppe mit Platin auf Aktivkohle selektiv zu **LXXXVIIIg** hydrieren (Schema 40, **E4**).³¹⁰ CHAN hydrierte die Doppelbindung von **LXXXVIIIg** erst im späteren Verlauf der Synthesesequenz beim simultanen Entfernen der Benzyl-Schutzgruppe durch Palladium-katalysierte Hydrierung. Allerdings beschrieben die Autoren große Probleme bei der Reinigung, da die freiwerdende Hydroxamsäuregruppe den Palladium-Katalysator stark komplexierte.²⁰¹

204

4.3.3.4. Literaturbekannte Darstellungen der (geschützten) Mycobactinsäure-Analoga CV und CVI

Die MILLER Gruppe kuppelte das freie Amin **LXXXVIc** mit HPOC **LXXXVa** durch Aktivierung der Carboxylgruppe mittels EDC/HOAt in DMF (Schema 41, **A**).^{294,300} Die Schützung der Carboxylgruppe von **LXXXVIc** ist an dieser Stelle essentiell, um eine intramolekulare Kupplung zu verhindern. Anschließende Verseifung des Methylester mit Lithiumhydroxid lieferte die vollkommen ungeschützte Mycobactinsäure **CVa** in 59 % Ausbeute (Schema 41, **A2**).



Schema 41: Literaturbekannten Synthesen von Mycobactinsäure-Analoga CV und CVI.

Bemerkenswert ist die gute Ausbeute der Kupplungsreaktion, obwohl die Hydroxamsäuregruppe von **LXXXVIc** nicht geschützt wurde. Dies demonstriert, dass sowohl die phenolische Hydroxygruppe als auch die Hydroxamsäuregruppe nicht zwangsläufig geschützt sein müssen. Die Autoren resümierten sogar, dass die Abwesenheit einer Benzyl-Schutzgruppe in 2'-Postion der HPOC **LXXXVa** zur guten Ausbeute der Kupplungsreaktion aufgrund geringerer sterischer Hinderung beitrug.^{294,300} Zuvor waren zahlreiche Versuche, die

XXCII 2'-Benzylether-geschützte HPOC mit Kupplungsreagenzien diversen an unterschiedliche Amine zu kuppeln, gescheitert.³⁰² Beim späteren Versuch, die Mycobactinsäure CVa mit Cobactin T zu verestern, zeigte sich keine nennenswerte Produktbildung, sodass die Autoren im zweiten Versuch die SEM-geschützte Hydroxamsäure (LXXXVId) mit der HPOC LXXXVa analog zum ersten Versuch zum SEM-geschützten **B**).^{293,294} Mycobactinsäure-Analogon CVb umsetzten (Schema 41. Diese Schutzgruppenstrategie wurde unter geringfügigen Modifikationen der Äquivalente und Reaktionszeiten im Wesentlichen in den darauffolgenden Jahren eingesetzt. In einer Publikation erwähnte die MILLER Gruppe noch eine Vorschrift, bei der sie ein DCC/4-DMAP/4-DMAP•HCI-System verwendeten, was aber zu einer Ausbeute von weniger als 5 % führte.²⁹⁴ Mit einer veränderten Schutzgruppenstrategie konnte WU die HPOC LXXXVa mit dem Amin LXXXVIf EDC/HOBt-vermittelt kuppeln und die tert-Butyl-Schutzgruppe im stark Sauren mit TFA entfernen (Schema 41, C).³⁰¹

Eine deutliche Veränderung der Synthesestrategie publizierten GHOSH *et al.*, da diese den langkettigen Acylrest erst nach der Kupplung der HPOC **LXXXVb** mit dem Di-Boc-geschützten *N*⁶-Hydroxy-L-lysin (**LXXXVle**) einführten (Schema 41, **D**). Anschließendes TFA-vermitteltes Entfernen der Boc-Schutzgruppe und Kupplung an (*Z*)-Hexadec-2-ensäure mittels deutlichem Überschuss an HATU/DIPEA lieferte ein *N*,*O*-diacyliertes Mycobactinsäure-Intermediat (Schema 41, **D2-3**). Die *O*-Acylgruppe wurde durch DIPEA in Methanol und der Methylester mit Lithiumhydroxid in THF/Wasser entfernt, wodurch das ungesättigte Mycobactinsäure-Analogon **CVI** über fünf Schritte in 34 % Ausbeute dargestellt werden konnte (Schema 41, **D4**). Die Autoren beschrieben, dass die vergleichsweise geringe Ausbeute durch Isomerisierung des Alkens in dem Acylrest zustande kam.²⁹⁸ Auch wenn diese Isomerisierung für gesättigte Acylreste keine Nebenreaktion darstellt, ist dieser Syntheseweg mit seinen fünf Stufen deutlich länger als die zuvor genutzten Synthesewege (Schema 41, **A-C**).

4.3.3.5. Literaturbekannte Darstellungen der (geschützten) (S)-3-Amino-1hydroxyazepan-2-on-Analoga CVII

Für die Synthese von Cobactin T-Bausteinen untersuchte die MILLER Gruppe zunächst verschiedene Kupplungssysteme (Schema 42, **A-C**). Im Jahr 1983 veröffentlichte die MILLER Gruppe eine EEDQ-vermittelte Kupplung ausgehend von *N*-Boc-O-Benzyl-2-oxoazepan **XLXXXVIIIa** (Schema 42, **A**). Nach Entfernen der Boc-Schutzgruppe konnte O-Benzyl-Cobactin T **CVIIa** in einer Ausbeute von 79 % gewonnen werden (Schema 42, **A**). Ein alternatives Schutzgruppenkonzept beschrieb dieselbe Gruppe etwa zehn Jahre später ausgehend von *N*-Cbz-O-TBDPS-azepan-2-on **LXXXVIIIc**. Nach dem hydrogenolytischen Entfernen der Cbz-Schutzgruppe, erfolgte die Kupplung an β -Hydroxycarbonsäuren mit

206



Schema 42: Literaturbekannte Darstellungen von Cobactin T-Analoga (CVII).

DCC/4-DMAP/4-DMAP•HCI (63 %)²⁹³ oder DCC/4-DMAP•HCI (40-60 %)²⁹⁴ zu den O-TBDPSgeschützten Cobactin T-Analoga **CVIIb-c** (Schema 42, **B2**).

Eine signifikante Verbesserung bei diesem Schritt konnte durch die Verwendung von EDC/HOAt²⁹⁴ (Schema 42, **C2**) erzielt werden, bei der die Ausbeute in drei Beispielen (**CVIIce**) bei 88 % bis 91 % lag. Die Autoren postulierten, dass die Verwendung von HOAt die Reaktion beschleunige und somit die kompetitive intramolekulare Veresterung von Cbz-L-Serin, bzw. Cbz-L-Threonin unterdrücke. Zugabe von DIPEA zum EDC/HOAt-System (Schema 42, **B2**) bei der Kupplung von **LXXXVIIIc** mit (2*S*,3*R*)-3-Hydroxy-2methylpentansäure führte zu einer Verringerung der Ausbeute auf 55 % ebenso wie der Wechsel auf HATU/DIPEA zu einer Reduktion der Ausbeute auf 50 % (Schema 42, **B2**). Bei den Kupplungen and Cbz- β -Alanin oder Boc-Dap-(Cbz)-OH wurde im Anschluss die Cbz-Schutzgruppe hydrogenolytisch entfernt, um die *O*-TBDPS-geschützten Cobactin T-Analoga **CVIIf-g** zu erhalten (Schema 42, **B3**)

Weithin zeigte die MILLER Gruppe, dass eine Kupplung mit freier Hydroxamsäuregruppe wie bei **LXXXVIIIb** unter selbigen Bedingungen möglich ist, wenn die Reaktionslösung einen leicht sauren pH-Wert aufweist, damit die Hydroxamsäuregruppe assoziiert vorliegt und somit kaum nukleophil ist (Schema 42, **C**).^{294,307} Auch die anschließende EDC-vermittelte Veresterung mit einer ungeschützten Mycobactinsäure (**CVa**) gelang in sehr guten Ausbeuten, was die Hypothese unterschützt, dass freie Hydroxamsäuregruppen und phenolische Hydroxygruppen die Kupplungsreaktion in leicht saurem Milieu nicht stören.²⁹⁴

Die Verwendung der Benzoyl-Schutzgruppe für die Hydroxamsäuregruppe ist im EDC/HOBt-System ebenfalls möglich, wie WU *et al.* durch die Kupplung von mit 3-(*N*-Cbz)-2-(*N*-Boc)-2,3diaminobuttersäure zeigten (Schema 42, **D**).³⁰¹ Allerdings beschrieben die Autoren auch die Problematik der Instabilität der Benzoyl-Schutzgruppe bei dem primären Amin **LXXXVIIIh** während der Hydrogenolyse von **LXXXVIIId**. Die Autoren postulierten, dass die Basizität der freiwerdenden Aminogruppe in Methanol ausreiche, um die Benzoyl-Schutzgruppe zu entfernen.³⁰¹ Dieses Problem wurde durch den Zusatz von 20 % TFA während der Hydrogenolyse gelöst, wodurch das TFA-Salz **LXXXVIIIh** in quantitativer Ausbeute gewonnen werden konnte (Schema 42, **D3**). Die zweite Hydrogenolyse zum gewünschten Produkt **CVIIi** wurde nach der Kupplung an *N*²-Boc-*N*³-Cbz-2,3-diaminobuttersäure unter gleichen Bedingungen durchgeführt, wobei die Boc-Schutzgruppe trotz des hohen Anteils an TFA nach fünf Stunden bei Raumtemperatur erhalten blieb.³⁰¹

4.3.3.6. Literaturbekannte Darstellungen der Amid-verbrückten Mycobactin-Analoga CVIII

In der Publikation von XU und MILLER wurden erstmals zwei Amid-verbrückte Mycobactin-Analoga **CVIIIa** und **CVIIIb** beschrieben (Schema 42, **A**).²⁹⁴ Die Synthese erfolgte durch Kupplung der ungeschützten Mycobactinsäure **CVa** mit den TBDPS-geschützten Cobactin T-Analoga **CVIIf** oder **CVIIg** im EDC/HOAt-System. Das Entfernen der TBDPS-Schutzgruppe mit 1 M Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) in THF verhinderte eine gleichzeitige Hydrolyse der Boc-Schutzgruppe (Schema 42, **A2**).



Schema 43: Literaturbekannte Darstellungen von Amid-verbrückten Mycobactin-Analoga.

Beide Mycobactin-Analoga **CVIIIa** und **CVIIIb** wurden so in einer isolierten Ausbeute von 85 % über zwei Schritte erhalten.²⁹⁴ Zum Zielmolekül **CVIIIa** kamen WU *et al.* durch Verwendung der Benzoyl-geschützten Mycobactinsäure **CVc** und dem *N*-Boc-geschützten Cobactin T-Analogon **CVIIi** (Schema 42, **B**). Die Kupplung erfolgte mit je 1.5 Äquivalenten HOBt und EDC bei Raumtemperatur und einer Reaktionszeit von 4 h (Schema 42, **B1**). Die beiden Benzoyl-Schutzgruppen wurden anschließend mit 7 M Ammoniak in Methanol-Lösung entfernt (Schema 42, **B2**).³⁰¹

5. Ergebnisse und Diskussion der Synthese und präklinischen Evaluation von Chlorflavonin und Bromflavonin-Analoga

5.1. Darstellung von literaturbekannten Verbindungen

Zunächst sollte die Synthese von Chlor- (**1a**) und Bromflavonin (**1b**) in großem Maßstab mithilfe der von BERGER etablierten Syntheseroute reproduziert werden, um größere Substanzmengen für die präklinische Evaluation der Substanzen zu generieren. Zudem sollte die Anwendbarkeit der neu etablierten Syntheseroute am Beispiel des antiinfektiv-wirksamen Flavonoids Ternatin (**1c**) demonstriert werden (Schema 44).



Schema 44: Darstellung von Chlorflavonin (1a), Bromflavonin (1b) und Ternatin 1c.

(a) 1.20 Äq. MOM-Cl, 2.00 Äq. DIPEA, CH₂Cl₂, 0 °C − RT, 16 h; (b) i) 5.00 Äq. NaOH_(aq.), EtOH, 50 °C, 24 h; ii) 2.50 Äq. H₂O₂, 0 °C − RT, 16 h; (c) 1.50 Äq. CH₃I, 2.25 Äq. Cs₂CO₃, DMF, RT, 2 h; (d) 6.40 Äq. 1 M HCl_(aq.), MeOH, 50 °C, 4 h; (e) 2.00 Äq. Ag₂CO₃, 1.10 Äq. Selectfluor [®], 5 mol% [RuCl₂(*p*-Cymol)]₂, 3.00 Äq. TFA, TFAA, 80 °C, 16 h.

Die Einführung der Methoxymethyl (MOM)-Schutzgruppe bei den Hydroxybenzaldehyden **2a-c** erfolgte mit Chlormethoxymethylether mittels nukleophiler Substitution in Dichlormethan unter Verwendung von *N*,*N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) als Base, sodass die MOM-geschützten Aldehyde **3a-c** in ausgezeichneten Ausbeuten von über 90 % erhalten wurden (Schema 44).

Die ALGAR-FLYNN-OYAMADA-Reaktion gelang nachfolgend als konsekutive Ein-Topf-Synthese, indem das Acetophenon 4 und die entsprechenden MOM-geschützten Benzaldehyde **3a-c** in Ethanol gelöst und durch Zugabe von wässriger 5 M Natronlauge bei 50 °C für 24 h zu den entsprechenden Chalkonen in einer CLAISEN-SCHMIDT-Reaktion kondensiert wurden. Abkühlen des Reaktionsansatzes mittels Eisbad auf 0 °C und tropfenweise Zugabe von 30 %iger Wasserstoffperoxid-Lösung führte nach 16 h Rühren bei Raumtemperatur zu den gewünschten Flavonolen 6a-c. welche nach säulenchromatographischer Isolierung in Ausbeuten von 18 % bis 35 % erhalten wurden (Schema 44). Die anschließende Methylierung mit Methyliodid in DMF unter Verwendung von Cäsiumcarbonat als Base lieferte nach 1-4 h die 3-Methoxyflavonole 7a-c mit sehr guten Ausbeuten von 79 % bis 97 %. Die Entschützung der phenolischen 2'-Hydroxygruppe von den 3-Methoxyflavonolen **7a-c** erfolgte acidolytisch in Methanol durch Zugabe von 1 M Salzsäure bei 50 °C für 4 h, sodass die entschützten 2'-Hydroxyflavonole 8a-c in guten Ausbeuten von 69 % bis 97 % nach säulenchromatographischer Isolierung gewonnen werden konnten (Schema 44).

Im letzten Schritt wurde die 5-Hydroxygruppe mittels Ruthenium(II/IV)-katalysierter ortho-C(sp²)-H-Hydroxylierung eingeführt (Schema 44). Als Additiv fungierte bei dieser Reaktion Silbercarbonat, welches im Überschuss zugegeben wurde, um aus Dichlor(p-cymol)ruthenium(II)-Dimer die kationische Ruthenium(II)-Spezies A freizusetzen, welche durch zwei Moleküle Trifluoracetat stabilisiert wird. Zur anschließend ablaufenden Metallkatalyse postulierte die ACKERMANN Gruppe folgenden Katalysezyklus (Schema 45).³¹¹ ³¹² Nach Koordination der kationischen Ruthenium(II)-Spezies **A** an den dirigierenden Carbonylsauerstoff von 8b und Abspaltung eines Moleküls Trifluoressigsäure, erfolgt die ortho-Metallierung des Flavonols 8b und C-H-Aktivierung zum fünfgliedrigen Ruthena(II)cyclus C (Schema 45). 1-Chlormethyl-4-fluor-1,4-diazonia bicyclo[2.2.2]octanebis(tetrafluorborat) (Selectfluor[®])-vermittelte Oxidation liefert den Ruthena(IV)cyclus **D**, welcher nach Carboxylinsertion, bzw. Hydroxylierung das Intermediat E liefert. Durch reduktive Eliminierung des Flavonol-Trifluoracetats 9b' wird die katalytisch aktive, kationische Ruthenium(II)-Spezies A regeneriert.^{311 312}

211



Schema 45: Adaptierter postulierter Katalysezyklus für die *ortho*-C(sp²)-H-Hydroxylierung nach Rogge *et al.* basierend auf mechanistischen Untersuchungen von Massignan *et al.*^{311,312}

Chlor- und Bromflavonin (**1a-b**) wurden hinsichtlich ihrer chemischen und metabolischen Stabilität sowie Löslichkeit evaluiert. Zudem wurden die pK_s -Werte mittels ¹H-NMR-Titration bestimmt und die Ergebnisse in das Design der weiteren Analoga einbezogen. Ternatin (**1c**) wurde auf seine antimykobakteriellen Eigenschaften hin untersucht.

5.2. Strukturvariation der B-Region

Zur weiteren Elaboration der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen der antimykobakteriell wirksamen Flavonoide mit Blick auf die B-Region sollte ergänzend zu den Untersuchungen von BERGER Analoga hergestellt werden, wobei die Acidität der phenolischen 2'-Hydroxygruppe im Fokus stand. Die Ergebnisse der *Docking*-Experimente basierend auf einem Homologie-Modell postulieren eine Salzbrücke zwischen der 2'-Hydroxygruppe und Lys197, wobei der B-Ring in einer lipophilen Seitentasche lokalisiert ist (Abbildung 17).⁶



Chlorflavonin (1)

Abbildung 17: Zweidimensionale Ansicht der Interaktion zwischen Chlorflavonin (1a) und der katalytischen
 Untereinheit IIvB1 der Acetohydroxysäure Synthase (AHAS) basierend auf einem *Mt* H37Rv IIvB1 Homologie-Modell. Das Homologie-Modell wurde mithilfe der AHAS-Enzyme von *Saccharomyces cerevisiae* and
 Arabidopsis thaliana (PDB: 1T9C und 1YBH) als Template erstellt. Grau dargestellte Aminosäuren gehören zur
 Proteinkette A und blaue zur Proteinkette B.

BERGER hatte in der *para*-Position zur 2'-Hydroxygruppe von Chlor- und Bromflavonin ein Fluoratom eingeführt, um die Acidität des Phenols zu erhöhen und die Interaktion zu Lys197 zu verstärken.³¹³ Nachteilig könnte sich die erhöhte Acidität allerdings auf die Permeabilität der Verbindung auswirken, welches zu einer verringerten Wachstumshemmung führen könnte. Bei Einführung eines Chlor- oder Bromatoms (**3e-g**) in *para*-Position wird die Acidität durch deren negativen induktiven Effekt (-I-Effekt) zwar auch erhöht, jedoch könnte deren lipophiler Charakter die verschlechterte Permeabilität kompensieren (Kapitel 5.2.1). Gleichzeitig könnte die zunehmende Atomgröße im Vergleich zu Fluor bessere Interaktionen in der lipophilen Seitentasche mit den Aminosäure Met512, Val 513, Ala592 und Ala593 ermöglichen. Neben elektronenziehenden Substituenten wie Brom und Chlor, sollte mit einer Methylgruppe auch ein elektronenschiebender Rest in 5'-Position eingeführt werden. Diese Verbindungen sollten mithilfe der von BERGER etablierten Syntheseroute dargestellt werden.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass der Verzicht der 2'-Hydroxygruppe von Chlorflavonin zu einem vollständigen Verlust der inhibitorischen Aktivität gegen *Mt* führt.³¹³ Der Austausch von Hydroxy- und Alkoxy-Substituenten gegen Fluor stellt einen häufigen bioisosteren Austausch in der medizinischen Chemie dar.³¹⁴⁻³¹⁶ Fluor- und Sauerstoffatome haben eine ähnliche Größe und hohe Elektronegativität, welche ihnen ähnliche Eigenschaften verleiht. Allerdings kann Fluor nicht als Wasserstoffbrücken-Donator fungieren und ist aufgrund der höheren Elektronegativität und geringen Größe des Fluoratoms weniger polarisierbar. Auf der anderen Seite kann sich durch die Einführung eines Fluoratoms die metabolische Stabilität im Vergleich zur Hydroxygruppe erhöhen, da die Chinon-Bildung im Phase I-Metabolismus und eine Glucuronidierung in Phase II bei Fluor im Gegensatz zu Sauerstoff nicht möglich ist.^{317,318} Basierend auf diesen Überlegungen, sollte die 2'-Hydroxygruppe gegen ein Fluoratom ausgetauscht werden (Kapitel 5.2.2).

Während der biosostere Austausch einer Hydroxygruppe gegen Fluor gängig ist, beschäftigten sich ZAFRANI *et al.* mit der Möglichkeit phenolische Hydroxygruppen gegen eine Difluormethoxygruppe auszutauschen, welche als lipohiler Wasserstoff-Donator fungieren sollte (Kapitel 5.2.3).^{319,320}

5.2.1. Variation des Substitutionsmusters des B-Ringes

Während die 3,5-dihalogenierten Aldehyde **2e-g** kommerziell verfügbaren waren, musste 3-Brom-2-hydroxy-5-methyl-benzaldehyd (**2d**) aus dem kommerziell verfügbaren 2-Hydroxy-5-methylbenzaldehyd durch Bromierung mit elementarem Brom in Eisessig bei 0 °C hergestellt werden (Schema 46). Die MOM-Schützung der 3,5-disubstituierten Aldehyde **2d-g** gelang in ausgezeichneten Ausbeuten von 90 % bis 96 % (Schema 46). Die Darstellung des 2'-Brom-5'-Methyl-Analogons (**1d**) erfolgte in Anlehnung an die von BERGER etablierte Syntheseroute (Schema 47).



Schema 46: Bromierung von 2-Hydroxy-5-methylbenzaldehyd und Einführung der MOM-Schutzgruppe.
(a) 1.10 Äq. Br₂, AcOH, 0 °C, 1 h; (b) 1.20 Äq. MOM-Cl, 2.00 Äq. DIPEA, CH₂Cl₂, 0 °C – RT, 16 h.



Schema 47: Darstellung von 5'-Methylbromflavonin 1d.

(a) i) 5.00 Äq. NaOH_(aq.), EtOH, 50 °C, 24 h; ii) 2.50 Äq. H₂O₂, 0 °C − RT, 16 h; (b) 1.50 Äq. CH₃I, 2.25 Äq.
 Cs₂CO₃, DMF, RT, 2 h; (c) 6.40 Äq. 1 м HCl_(aq.), MeOH, 50 °C, 4 h; (d) 2.00 Äq. Ag₂CO₃, 1.10 Äq. Selectfluor[®], 5 mol% [RuCl₂(*p*-cymol)]₂, 3.00 Äq. TFA, TFAA, 80 °C, 16 h.

Die ALGAR-FLYNN-OYAMADA–Reaktion mit den 3,5-dihalogenierten Benzaldeyden **3e-g** und dem 2'-Hydroxyacetophon **4** gestaltete sich schwierig. Zwar konnten die intermediären Chalkone **8a-c** fast quantitativ isoliert werden, allerdings erfolgte nach Zugabe von Wasserstoffperoxid keine oxidative Cyclisierung zu den entsprechenden Flavonolen **5a'-c'** (Schema 48).





Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Literatur, da ZHAO et al. ebenfalls keinen Reaktionsumsatz bei mehrfachhalogenierten Chalkonen beobachten konnten.²⁶¹ Die Autoren postulierten, dass die negative Ladung des Phenolates aufgrund der elektronenziehender Halogene zu stark delokalisiert und somit die Nukleophilie des Phenolates stark reduziert sei. Folglich könne der nukleophile Angriff an das β -Kohlenstoffatom nicht stattfinden.²⁶¹ Für die Synthese der Flavonole 5a'c' wurden zwar umfassende Variationen bezüglich der Basenäquivalente, eingesetzte Basen und Oxidationsmittel wie Dibenzoylperoxid, m-Chlorperbenzoesäure und Carbamidperoxid erprobt. Jedoch zeigte keine dieser Bedingungen in der Reaktionskontrolle mittels Dünnschichtchromatographie ein Produkt, welches wie für Flavonole üblich bei 366 nm blau fluoreszierte, noch eine Färbung mit Eisen(III)chlorid-Lösung, was auf das Misslingen der oxidativen Cyclisierung zum Flavonol hindeutete. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die Synthese der 3',5'-dihalogenierten Flavonole **5a'-c'** nicht weiterverfolgt.

5.2.2. Bioisosterer Austausch der 2'-Hydroxygruppe

Für einen bioisosteren Austausch der 2'-Hydroxgruppe wurde das kommerziell verfügbare 3-Brom-2-fluoraldehyd (**2g**) als Edukt eingesetzt. Da bei 3-Brom-2-fluorbenzaldehyd (**2g**) keine Schutzgruppe eingeführt werden muss, ließ sich das Zielmolekül **1e** über drei Schritten in einer Gesamtausbeute von 0.4 % darstellen (Schema 49).



Schema 49: Darstellung des Analogons 1e.

(a) i) 5.00 Äq. NaOH_(aq.), EtOH, 50 °C, 24 h; ii) 2.50 Äq. H₂O₂, 0 °C − RT, 16 h; nicht sauber isoliert; (b) 1.35 Äq.
 Dimethylsulfat, 1.35 Äq. K₂CO₃, Aceton, RT, 16 h; (c) 2.00 Äq. Ag₂CO₃, 1.10 Äq. Selectfluor[®], 5 mol% [RuCl₂(p-cymol)]₂, 3.00 Äq. TFA, TFAA, 80 °C, 16 h.

Eine besondere Herausforderung zeigte sich bei der Durchführung der AFO. Zum einen fand die oxidative Cyclisierung wie auch schon bei den 3,5-dihalogenierten Benzaldehyden **3e-g** nur unvollständig statt, zum anderen wurde als Nebenreaktion eine nukleophile aromatische Substitution des Fluoratoms zum Ethoxy-substituierten Derivat **5f** beobachtet (Schema 49). Da das Reaktionsgemisch aus **5e** und **5f** im Verhältnis 4:1 mittels Säulenchromatographie und Umkristallisation nicht separiert werden konnte, wurde das Produktgemisch mit Dimethylsulfat unter Verwendung von Kaliumcarbonat als Base methyliert.³²¹ Die Isolierung von **6e** war mittels Säulenchromatographie möglich, sodass **6e** über zwei Schritte mit einer Ausbeute von 7 % gewonnen werden konnte (Schema 49). Auch die abschließende Ruthenium-katalysierte C-H-Aktivierung zum 5-Hydroxyflavonol **1e** verlief mit einer Ausbeute von 6 % sehr schlecht, da aufgrund unzureichender Löslichkeit des Eduktes **6e** in Trifluoressigsäureanhydrid keine vollständige Eduktumsetzung stattfand (Schema 49).

5.2.3. Derivatisierung der 2'-Hydroxygruppe

Zur Darstellung der OCF₂H-Gruppe aus Phenolen sind in der Literatur zahlreiche Reagenzien reaktiven Carbenspezies schrieben, zur Generierung der darunter die Fluorchlorkohlenwasserstoffe Chlordifluormethan (CICF₂H)³²² und Fluoroform (CHF₃)^{323,324} Difluormethyltriflat (CHF₂OTf)³²⁵, 2-Chlor-2,2-difluoracetophenon³²⁶, Bromdifluoressigsäure (BrCF₂COOH)³²⁷ und Fluorsulfonyldifluoressigsäure (FSO₂CF₂COOH).^{328,329} Problematisch bei diesen Reagenzien sind jedoch die teilweise schlechten Ausbeuten, begrenzte Substrattoleranz, harsche Bedingungen, schwer händelbare Gase oder ozonabbauende Eigenschaften.³³⁰ Im Gegensatz zu diesen Reagenzien ist Diethylbromdifluormethylphosphonat (BrCF₂P(O)(OEt)₂) eine kommerziell verfügbare, leicht händelbare Flüssigkeit, welche ebenfalls zur Einführung der CF₂H-Gruppe genutzt werden kann. ZAFRANI et al. entwickelten eine Methode, bei der sie Diethylbromdifluormethylphosphonat und Kaliumhydroxid in Acetonitril/Wasser als zur Carbengenerierung einsetzten, um Phenole zu difluormethylieren (Schema 50).³³¹



Schema 50: Postulierter Reaktionsmechanismus der Difluormethylierung von Phenolen mit Diethylbromdifluormethylphosphonat (BrCF₂P(O)(OEt)₂) nach ZAFRANI *et al.*³³¹ und (Bromdifluormethyl)trimethylsilan (TMSCF₂Br) nach Li *et al.*³³²

Bei dieser Reaktion greift das Hydroxidion das Phosphonat nukleophil an, wobei es unter Abspaltung von Phosphorsäurediethylester zum C-P-Bindungsbruch kommt, sodass intermediär ein trihalogeniertes Carbanion (**CX**) entsteht. Nach α -Eliminierung von Bromid entsteht Difluorcarben (**CXI**), welches von einem Phenolatsauerstoff nukleophil angegriffen wird, sodass das Difluormethoxycarbanion **CXIII** entsteht. Die Zugabe von Wasser induziert die Protonierung zum Phenol **7f**.



Schema 51: Darstellung des 2'-Difluormethoxy-Bromflavonin-Analogons 1f.
(a) 2.00 Äq. Diethylbromdifluormethylphosphonat, 20.0 Äq KOH, ACN/H₂O, -78 °C – RT, 1 h, 30 %; (b) 2.50 Äq. TMSCF₂Br, 6.00 Äq. KOH, CH₂Cl₂, 0 °C – RT, 78 %; (c) 2.00 Äq. Ag₂CO₃, 1.10 Äq. Selectfluor[®], 5 mol% [RuCl₂(*p*-cymol)]₂, 3.00 Äq. TFA, TFAA, 80 °C, 16 h, 11 %.

Aufgrund von ausreichender Substanzverfügbarkeit wurde die Bromflavonin-Vorstufe **8b** als Edukt für die Difluormethylierung gewählt. Die Darstellung gelang nach einer Vorschrift von ZAFRANI *et al.* mit einer Ausbeute von 30 % (Schema 51).³³¹

Da es hinsichtlich der Ausbeute bei dieser Reaktion noch Optimierungsbedarf gab, wurde (Bromdifluormethyl)trimethylsilan (TMSCF₂Br) als alternativer Carbenpräkursor gewählt. Li *et al.* haben die Difluormethylierung von Phenolen mittels TMSCF₂Br intensiv optimiert und

konnten für divers substituierte, insbesondere halogenierte, Phenole sehr gute bis ausgezeichnete Ausbeuten erzielen.³³² Zur Generierung des Difluorcarbens waren sechs Äquivalente Kaliumhydroxid notwendig und eine Kühlung auf 0 °C ausreichend, um Zielverbindung **7f** in einer Ausbeute von 78 % zu synthetisieren (Schema 51). Die anschließende C-H-Aktivierung lieferte **1f** in einer Ausbeute von 11 % (Schema 51).

5.3. Strukturvariationen in der 3-Position

Zunächst sollten die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen in der 3-Position durch Vergrößerung des Substituenten untersucht werden (Kapitel 5.3.1). Dafür sollte der 3-Methoxy-Substituent zu einer Ethoxy-, Isopropoxy- und Benzyloxygruppe expandiert werden. Da Benzylether zudem Schutzgruppen für Alkohole darstellen, könnte diese Schutzgruppe im letzten Schritt entfernt werden, um ein 3-Hydroxy-Analogon von Bromflavonin zu erhalten. Darüber hinaus sollten Substituenten eingeführt werden, die potentiell die Wasserlöslichkeit erhöhen (Kapitel 5.3.1). Problematisch könnte sich in Bezug auf metabolische Stabilität von Chlor- und Bromflavonin die *O*-Desalkylierung als häufige Phase I-Metabolisierung darstellen. Für Flavonoide stellt dies ein häufiges Problem dar, da die *O*-desalkylierten Produkte möglicherweise eine reduzierte oder fehlende Bioaktivität zeigen.³³³ Eine Untersuchung von Chlor- und Bromflavonin mit dem online-Tool *XENOSITE*^{®334} zeigte, dass die drei Methoxygruppen wahrscheinliche Angriffsstellen für die Metabolisierung durch die CYP-Enzyme 3A4, 2C9 und 2D6 sind (Tabelle 2).



 Tabelle 2: Berechnete mögliche Metabolisierungsstellen von BF durch die CYP-Enzyme 3A4, 2C9 und 2D6 mit

 Hilfe von XENOSITE.³³⁴

Blau = wenig wahrscheinlich, grün = wahrscheinlich, rot = sehr wahrscheinlich.

Vor allem die Exposition gegenüber den katalytischen Zentren der Enzyme machen eine oxidative *O*-Desalkylierung im Rahmen des Phase I-Metabolismus wahrscheinlich.³³⁴ Um die Wahrscheinlichkeit der oxidativen *O*-Desalkylierung zu minimieren, können Wasserstoffgegen Fluoratome bioisoter ausgetauscht werden,³¹⁴⁻³¹⁶ sodass 3-Difluormethoxy und 3-Trifluormethoxy-Analoga von Bromflavonin synthetisiert werden sollten (Kapitel 5.3.2).

Zu Beginn dieser Promotion wurde Chlorflavonin als Leitstruktur verwendet, welche jedoch von Bromflavonin abgelöst wurde. Dies ist sowohl durch die bessere *in vitro* Aktivität im

phänotypischen Ganzzell-Assay als auch die deutlichen geringeren Kosten des Eduktes 3-Brom-2-hydroxybenzaldehyd im Vergleich zu dessen chlorierten Pendant zu begründen.

5.3.1. Einführung von (funktionalisierten) 3-Alkoxyresten

Die Synthese der 3-Ethoxy-Analoga **1g** und **1h** sowie des 3-Isopropoxy-Analogons **1i** erfolgte gemäß der etablierten Syntheseroute von BERGER ausgehend von den Flavonolen **5a** und **5b**. Die Deprotonierung der 3-Hydroxygruppe von **5a** oder **5b** erfolgte mit Cäsiumcarbonat in DMF, sodass nach Zugabe von Ethylbromid oder 2-Brompropan in einer WILLIAMSON-Ether-Synthese-artigen Reaktion die 3-Alkoxy-Analoga **6g-i** in befriedigenden Ausbeuten von 54 % bis 77 % isoliert werden konnten (Schema 52).



j: $R^1 = Br, R^2 = (CH_2)_2OH; 22\%$

Schema 52: Darstellung der 3-Methoxy-Analoga 1g-j.

(a) für **6g-i**: 1.50 Äq. Alkylbromid, 2.25 Äq. Cs₂CO₃, DMF, RT, 4 h; (b) für **6j**: 1.10 Äq. 2-Bromethanol, 2.50 Äq. K₂CO₃, DMF, RT, 21 h (b) 6.40 Äq. 1 м HCl_(аq.), MeOH, 50 °C, 4 h; (d) 2.00 Äq. Ag₂CO₃, 1.10 Äq. *Selectfluor*[®], 5 mol% [RuCl₂(*p*-cymol)]₂, 3.00 Äq. TFA, TFAA, 80 °C, 16 h.

Ein anschließendes acidolytisches Entfernen der MOM-Schutzgruppe lieferte die freien Phenole **7g-j**, die durch Ruthenium(II)-katalysierte C-H-Aktivierung zu den 5'-Hydroxy-
Flavonoiden 1g-j umgesetzt wurden (Schema 52). In analoger Weise wurde das 2-Hydroxyethoxy-Analogon 1j hergestellt, allerdings wurde die O-Alkylierung zum Intermediat 6 in DMF unter Verwendung von Kaliumcarbonat nach einer modifizierten Vorschrift von ZHONG *et al.* durchgeführt (Schema 52).³³⁵ Das 2-Hydroxyethoxy-Analogon **1**j sollte aufgrund des zusätzlichen Wasserstoffbrücken-Donators, bzw. -akzeptors besser wasserlöslich sein. Weiterhin sollte zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit mit 2-Dimethylaminoethylbromid ein 2-Dimethylaminoethoxy-Rest in 3-Position eingeführt werden (Schema 53). Alkylierung des Flavonols 5b mit 2-Dimethylaminoethylbromid und Cäsiumcarbonat in DMF zeigte nur einen Reaktionsumsatz, auf eine Bromwasserstoff-Eliminierung geringen was von 2-Dimethylaminoethylbromid zurückzuführen sein könnte (Schema 53).



Schema 53: Darstellung des 3-Dimethylaminoethoxy-Analogons 1k.

(a) 1.50 Äq. 2-Dimethylaminoethylbromid, 2.25 Äq. Cs₂CO₃, DMF, RT, 4 h; (b) i) 1.20 Äq.
2-Dimethylaminoethanol, 1.20 Äq. DIAD, 1.20 Äq. PPh₃, THF, 0 °C – RT; ii) 6.40 Äq. 1 M HCl_(aq.), MeOH, 50 °C, 4 h; (c) 2.00 Äq. Ag₂CO₃, 1.10 Äq. *Selectfluor*[®], 5 mol% [RuCl₂(*p*-cymol)]₂, 3.00 Äq. TFA, TFAA, 80 °C, 16 h.

Daher wurde als Alternative die MITSUNOBU-Reaktion nach XIONG *et al.*³³⁶ gewählt, die ohne den Einsatz einer Base durchführbar ist (Schema 53). Das Flavonol **5b** fungiert dabei als acide Komponente und 2-Dimethylaminoethanol als Alkoholkomponente. Die Reaktion wurde mit je 1.20 Äquivalenten Diisopropylazodicarboxylat (DIAD) und Triphenylphosphan durchgeführt. Zwar konnte das Produkt **6k** mithilfe von ¹H-NMR-Spektroskopie identifiziert werden, allerdings konnte DIAD säulenchromatographisch nicht entfernt werden. Erst nach dem acidolytischen Entfernen der MOM-Schutzgruppe konnte das Phenol **7k** in 95 % Reinheit isoliert werden. Die anschließende Ruthenium-katalysierte C-H-Aktivierung lieferte das 5-Hydroxyflavonol **1k** nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (*n*-Hexan/Ethylacetat) und C₁₈-Kieselgel (Wasser/Acetonitril) in 13 % Ausbeute (Schema 53).

Darüber hinaus sollte die Darstellung eines 3-Benzyloxy-Analogons **1I** nach der etablierten Syntheseroute erfolgen. Allerdings erwies sich die Alkylierung mit Benzylbromid und Cäsiumcarbonat in DMF als problematisch, da die dünnschichtchromatographische Reaktionskontrolle mehrere Nebenprodukte zeigte. Folglich wurde eine alternative Vorschrift von DzIUBA *et al.*³³⁷ verwendet, wobei die Autoren ein Flavonol in einem Zweiphasensystem aus Toluol und Wasser mit [18]Krone-6 als Phasentransferkatalysator alkylierten.



Schema 54: Versuche zur Darstellung des 3-Benzyloxy-Chlorflavonin-Analogons 1I. (a) 2.50 Äq. BnBr, 10 mol% [18]Krone-6, 5.00 Äq. KOH_{aq}, Toluol, RT, 20 h; (b) 10.0 Äq. 1 м HCl_(аq.), MeOH, RT, 16 h; (c) 2.00 Äq. Ag₂CO₃, 1.10 Äq. *Selectfluor*[®], 5 mol% [RuCl₂(*p*-cymol)]₂, 3.00 Äq. TFA, TFAA, 80 °C, 16 h.

In wässriger Kaliumhydroxidlösung wird das Flavonol **5a** deprotoniert. Das so entstandene Alkoholat substituiert das Bromid nukleophil, sodass das Produkt **6**I nicht mehr in der wässrigen Phase löslich ist und in der Toluolphase akkumuliert (Schema 54). Für die anschließende Hydrolyse des MOM-Ethers wurden leicht modifizierte Bedingungen gewählt, sodass die Reaktion bei Raumtemperatur für 16 h mit 10 Äquivalenten 1 M Salzsäure durchgeführt wurde und das Produkt **7**I in ausgezeichneter Ausbeute gewonnen werden konnte (Schema 54). Die anschließende C-H-Aktivierung zeigte sowohl nach 24 h als auch 48 h keinen Reaktionsumsatz, was auf sterische Hinderung bei der Koordinierung der kationischen Ruthenium(II)-spezies an den Carbonylsauerstoff (Schema 45) zurückzuführen sein könnte. Dementsprechend konnte das angestrebte 3-Benzyloxy-Analogon **1**I nicht erhalten werden.

5.3.2. Darstellung von fluorierten 3-Methoxy-Bromflavonin-Analoga

Analog zur Darstellung des 2'-Difluormethoxy-Analogons **1m** (Kapitel 5.2.2) wurde die 3-Hydroxygruppe des Flavonols **5b** mit Diethylbromdifluormethylphosphonat $(BrCF_2P(O)(OEt)_2)$ in einer Ausbeute von 38 % nach ZAFRANI *et al.*³³¹ alkyliert (Schema 55). Um die Ausbeute der Reaktion zu verbessern, wurde nach einer modifizierten Vorschrift von LI *et al.*³³² (Bromdifluormethyl)trimethylsilan (TMSCF_2Br) als Difluorcarbenpräkursor eingesetzt, womit Verbesserung der Ausbeute auf 58 % erzielt werden konnte (Schema 55).



1m

 Schema 55: Darstellung des 3-Difluormethoxy-Analogons 1m.

 (a) 2.00 Äq Diethylbromdifluormethylphosphonat, 2.00 Äq. Cs₂CO₃, ACN, 0 °C – RT, 48 h; (b) 2.00 Äq.

 TMSCF₂Br, 6.00 Äq. KOH, CH₂Cl₂, 0 °C – RT, 16 h; (c) 6.40 Äq. 1 м HCl_(aq.), MeOH, 50 °C, 4 h;(d) 2.00 Äq.

 Ag₂CO₃, 1.10 Äq. Selectfluor[®], 5 mol% [RuCl₂(p-cymol)]₂, 3.00 Äq. TFA, TFAA, 80 °C, 16 h.

Weiterhin sollte eine Trifluormethylierung der freien 3-Hydroxygruppe von Flavonol 5b durchgeführt werden. Die ersten Synthesen von Trifluormethoxyethern in 1950er Jahren wurde ermöglicht, indem zunächst funktionalisierte Methoxygruppen wie Trichlormethoxygruppen mittels Halogenaustausch unter Verwendung von SbF₃/SbF₅³³⁸ oder Tetrachlorkohlenstoff/Flusssäure³³⁹ di- oder trifluormethyliert wurden (Schema 56, **A**). Diese Synthesen erfolgten unter harschen Bedingungen und ergaben schlechte Ausbeuten, welche dadurch zu erklären sind, dass mehrere C-F-Bindungen geknüpft werden müssen. Eine weitere Möglichkeit führt über Phenylfluoroformat³⁴⁰ oder Xanthogenate³⁴¹⁻³⁴³, die allerdings einen starken Überschuss an Flusssäure oder teuren Fluorierungsreagenzien erfordern (Schema 56, B). Einige Gruppen etablierten Methoden, bei der sie Phenole zunächst difluormethylierten und anschließend eine Monofluorierung als nukleophile Substitution durchführten (Schema 56, **C**). Als Intermediate können dabei ArOCF₂X mit funktionellen Gruppen wie Brom³⁴⁴, Chlor^{345,346}, Methylthioether³⁴⁷ oder Carboxylgruppen^{348,349} verwendet werden, wobei die Bedingung auch als harsch einzustufen sind. Eine Ausnahme stellt die Methode von ZHOU *et al.* dar, da die Decarboxylierung unter milden Bedingen stattfand und die Fluorierung mittels *Selectfluor* II[®] und katalytischen Mengen Silber gelang.³⁴⁸

Klassische Ether-Synthesen erfolgen in einer nukleophilen Substitution, bei der das Phenolat als Nukleophil fungiert. Dementsprechend muss als Reaktionspartner ein Elektrophil, also formal betrachtet CF_3^+ zur Verfügung stehen. Dies stellt ein herausforderndes Unterfangen dar, da sich bevorzugt nukleophile CF_3^- -Anionen statt der weniger stabilen CF_3^+ -Kationen bilden.³⁵⁰ Die Bildung der CF_3^+ -Kationen kann durch harsche Bedingungen wie beispielsweise mit Flusssäure in Tetrachlorkohlenstoff,³³⁹ Photoirradiation bei -100 °C³⁵¹, Oxonium Verbindungen wie *O*-(Trifluormethyl)dibenzofuranium³⁵² oder mit TOGNI's Reagenz II (1-Trifluormethyl)-1,2-benziodoxol-3(1*H*)-on) erfolgen,³⁵¹ jedoch lieferten diese Methoden nur schlechte Ausbeuten bei gleichzeitiger Bildung substanzieller Nebenproduktmengen (Schema 56, **D**).³⁵³



Schema 56: Synthesestrategien zur Darstellung von Trifluormethoxyethern.

Als weitere Methode etablierten LIU *et al.* eine direkte Silber-katalysierte oxidative *O*-Trifluormethylierung mit dem RUPPERT-PRAKASH Reagenz (CF₃SiMe₃) als CF₃-Quelle unter Verwendung exogener Oxidantien (Schema 56, **E**). Diese Methode zeigte eine hohe Toleranz gegenüber weiteren funktionellen Gruppen wie Estern, Nitrilen, Amiden, Ketonen, Ethern und Halogeniden, sodass diese für die Darstellung des 3-trifluormethylierten Bromflavonin-Analogons gewählt wurde.

Analog zur Publikation wurde die O-Trifluormethylierung mit dem RUPPERT-PRAKASH Reagenz, Silbertriflat, 2-Fluorpyridin, *Selectfluor*[®], *N*-Fluorbenzolsulfonimid (NFSI) und Cäsiumfluorid in einer Mischung aus Toluol und Benzotrifluorid bei Raumtemperatur durchgeführt. LIU *et al.* postulierten, dass sich bei der Reaktion *in situ* aus Silber(I)triflat **A**, Trifluormethyltrimethylsilan und Cäsiumfluorid die Silber(I)methyltrifluorid Spezies **B** bildet (Schema 57). Die CF₃-Gruppe verhält sich in diesem Fall als σ -Elektronendonator und ist somit elektrophil, sodass sich nach oxidativer Addition von *Selectfluor*[®] und/oder NFSI der [Silber(III)-F-CF₃]-Komplex **C** bildet. Ein Ligandenaustausch von Fluorid zu Phenolat liefert den Komplex **D**. Anschließende reduktive Eliminierung ermögliche die Ausbildung der O-CF₃-Bindung zum Trifluormethylether **E**.



Schema 57: Postulierter Reaktionsmechanismus der O-Trifluormethylierung von Phenolen nach LIU et al. 350

Zunächst wurden die Reaktionsbedingungen unverändert übernommen, wobei nach säulenchromatographischer Reinigung zwei nicht voneinander trennbare Verbindungen isoliert wurden. Die Auswertung der ¹H- und ¹⁹F-NMR-Spektren ergab, dass sich neben dem gewünschten trifluormethylierten Produkt **6n** auch ein trifluormethyliertes und sulfoniertes Nebenprodukt **6o** durch Reaktion mit NFSI gebildet hat (Schema 58).



Schema 58: Versuche zur Darstellung eines Trifluormethoxy-Analogons 6n.
(a) 5.00 Äq. TMSCF₃, 5.00 Äq. AgOTf, 2.00 Äq. Selectfluor[®], 2.00 Äq. NFSI, 6.00 Äq CsF, 5.00 Äq. 2-Fluoropyridin, Toluol/Benzotrifluorid (1/2 v/v), RT, 12 h.

Um zu analysieren, an welcher Stelle die Sulfonierung stattgefunden hat, wurde das Gemisch in THF aufgenommen, mit einem Äquivalent 1 M Lithiumhydroxid versetzt und für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Dies führte zur gewünschten Hydrolyse des Sulfonates, allerdings zeigte sich anhand der chemischen Verschiebung des Hydroxy-Signals, dass es sich um das 3-Sulfonat **60** handelte und die Trifluormethylierung unter Substitution der MOM-Schutzgruppe an 2^c-Position stattgefunden hat. Die Sulfonat-Bildung wurde von den Autoren als Nebenreaktion bei Phenolen mit elektronenschiebenden Substituenten ebenfalls beobachtet und konnte durch Zusatz von 2,4-Di-*tert*-butylphenol nahezu vollständig unterdrückt werden.³⁵⁰ Dementsprechend wurde die Reaktion mit zwei Äquivalenten 2,4-Di*tert*-butylphenol wiederholt, wobei der Reaktionsumsatz auch nach 48 h nicht vollständig war (Schema 58). Die Separation von Edukt und Produkt gelang säulenchromatographisch an Kieselgel mit *n*-Hexan/Ethylacetat nicht, sodass die MOM-Schutzgruppe acidolytisch bei 50 °C in Methanol mit 6 M Salzsäure entfernt wurde (Schema 59).



Schema 59: Entfernen der MOM-Schutzgruppe des 3-Trifluormethoxy-Analogons 6n. (a) 6.40 Äq. 1 м HCl_(аq.), MeOH, 50 °C, 4 h.

Dabei zeigte sich, dass die Trifluormethoxygruppe unter diesen Bedingungen nicht stabil war und sich zu über 90 % das desalkylierte Flavonol **5b**" bildete. Da im Folgenden die C-H-Aktivierung ebenfalls mit drei Äquivalenten Trifluoressigsäure im stark Sauren bei 80 °C durchgeführt werden müsste und die Trifluormethoxygruppe sehr wahrscheinlich unter diesen Bedingungen nicht stabil sein würde, wurde diese Reaktion nicht weiter optimiert.

5.4. Strukturvariationen der A-Region

Wie bereits in Kapitel 5.3 beschrieben wurde, ist die oxidative O-Desalkylierung der Methoxygruppen im Rahmen des Phase I-Metabolismus wahrscheinlich.³³⁴ Besonders problematisch in Bezug auf potentielle Toxizität ist die 8-Methoxygruppe. Entsteht nach oxidativer Desalkylierung das Intermediat **CIX** mit einer 1,4-Hydrochinon Partialstruktur, kann diese im weiteren Verlauf der Metabolisierung zum 1,4-Benzochinon **CX** oxidiert werden (Schema 60).³⁵⁴ Bei zweifacher O-Desalkylierung der 7- und 8-Methoxygruppe entsteht ein Brenzcatechin, das zu einem 1,2-Benzochinon **CXIII** oxidiert werden kann (Schema 60). Benzochinone sind als MICHAEL-Akzeptoren reaktive Verbindungen, die mit Nukleophilen wie Thiolen, die beispielsweise in L-Cystein und Gluthation vorkommen, im Rahmen einer einer 1,4-reduktiven elektrophilen Addition reagieren können, wobei das Chinon zum Hydrochinon oder Brenzcatechin reduziert wird. ³⁵⁴ Ebenso ist eine Reaktion mit Stickstoff-Nukleophilen von L-Lysin, L-Histidin, *N*-terminalen Aminosäuren oder Purin- und Pyrimidinbasen der DNA möglich, was zytotoxische Effekte induzieren kann.³⁵⁴



Schema 60: Mögliche Metabolisierung des A-Ringes im Rahmen des Phase I-Metabolismus.

Um die Bildung der Benzochinone **CX** und **CXII** unwahrscheinlicher zu machen, sollten die 7- und 8-Methoxygruppen weggelassen werden (Kapitel 5.4.1). Zudem sollte die 8-Methoxygruppe durch eine Methylgruppe ausgetauscht werden, da so die Chinon-Bildung nicht möglich ist. Auf der anderen Seite sollte die 5-Hydroxygruppe durch weitere funktionelle Gruppen ersetzt werden, die die Chinon-Bildung ebenfalls unmöglich machen. Dazu sollte die breite Anwendung der *late-stage* C-H-Aktivierung von Chromen-*4H*-on Grundgerüsten als

elegantes und effizientes Werkzeug der medizinalchemischen Strukturoptimierung etabliert werden (Kapitel 5.4.2).

5.4.1. Variation des Substitutionsmusters

Für die Darstellung des Analogons mit unsubstituiertem A-Ring (**1r**) konnte das kommerziell erhältliche 2'-Hydroxyacetophenon verwendet worden (Schema 61).



Schema 61: Darstellung der 4'-Methoxyacetetophenonen 4a und 4b mittels selektiver partieller Methylierung. (a) 1.00 Äq Dimethylsulfat, 1.00 Äq. K₂CO₃, Aceton, RT, 16 h.

Für die Darstellung des 7-Methoxy-Analogons (**7q**) wurde 2',4'-Dihydroxyacetophenon als Edukt verwendet und in Aceton mit Kaliumcarbonat als Hilfsbase und einem Äquivalent Dimethylsulfat selektiv an 4'-Position in ausgezeichneter Ausbeute von 95 % zu Intermediat **4a** methyliert (Schema 61). Analog dazu wurde 2'-Hydroxy-3'-methyl-4'-methoxyacetophenon **4b** in einer exzellenten Ausbeute von 99 % dargestellt (Schema 61).

Nach der AFO mit 3-Brom-2-(methoxymethoxy)benzaldehyd (**3b**), Methylierung und Entfernen der MOM-Schutzgruppe wurden die Intermediate **7p-r** in 8 % bis 13 % über drei Schritte erhalten (Schema 62). Die anschließende C-H-Aktivierung gelang zwar für alle drei Analoga, allerdings stellte sich bei der säulenchromatographischen Reinigung von Produkt **1p** heraus, dass sich dieses unter intensiver Rotfärbung zersetzte. Dementsprechend konnten nur Verbindung **1p** und **1r** in ausreichender Reinheit für die biologische Testung gewonnen werden (Schema 62).



Schema 62: Syntheseroute zur Darstellung der A-Ring-Analoga 1p-r.

n.i. = nicht isoliert. *Ausbeute über drei Schritte

(a) i) 5.00 Äq. NaOH_(aq.), EtOH, 50 °C, 24 h; ii) 2.50 Äq. H₂O₂, 0 °C − RT, 16 h; (b) 1.50 Äq. CH₃I, 2.25 Äq.
 Cs₂CO₃, DMF, RT, 1 h; (c) 6.40 Äq. 1 м HCl_(aq.), MeOH, 50 °C, 4 h; (d) 2.00 Äq. Ag₂CO₃, 1.10 Äq. Selectfluor[®], 5 mol% [RuCl₂(*p*-cymol)]₂, 3.00 Äq. TFA, TFAA, 80 °C, 16 h.

5.4.2. Übergangsmetall-katalysierte C(sp²)-H-Aktivierungen zur Modifikation der 5-Position

Des Weiteren sollte die 5-Position mittels *late stage* C(sp²)-H-Aktivierung funktionalisiert werden, da solche Funktionalisierung eine effiziente Methode zur Modifikation des Grundgerüstes und damit zur Elaboration der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen darstellen.³⁵⁵ Der ACKERMANN Gruppe gelang die Ruthenium(II)-katalysierte Aminierung von Aryl-*tert*-butylketonen mittels *N*-Tosyloxyphthalimiden, welche anschließend durch Hydrazinolyse in das entsprechenden Amine überführt werden konnten.³⁵⁶ Diese Methode könnte analog zur Aminierung des Flavonoids **7b** angewendet werden (Schema 63, a).



Schema 63: Mögliche Syntheserouten zur Darstellung von 5-Amino-Bromflavonin-Analoga. (a) 5 mol% [RuCl₂(*p*-cymol)]₂, 20 mol% AgSbF₆, 50 mol% Cu(OAc)₂•H₂O, Dioxan, 100 °C nach RAGHUVANSHI *et al.*³⁵⁶; (b) 10 mol% [Ru(OAc)₂(*p*-cymol)], 20 mol% AgSbF₆, TFE, 40 °C, 24 h, N₂ nach CHOI *et al.*³⁵⁷; (c) 5 mol% [RuCl₂(*p*-cymol)]₂, 40 mol% AgSbF₆, 50 mol% Cu(OAc)₂•H₂O, CHCl₃, 100 °C nach PAN *et al.*³⁵⁸; (d) 5 mol% [CoCp*(CO)l₂], 10 mol% AgBF₄, DCE, 80 °C nach SHI *et al.*³⁵⁹; (e) 5 mol% [CoCp*(CO)l₂], 20 mol% AgSbF₆, 30 mol% K₂CO₃, 1,4-Dioxan, 100 °C nach WANG *et al.*³⁶⁰; (f) 5 mol% [RuCl₂(*p*-cymol)]₂, 20 mol% AgSbF₆, DCE, 40 °C nach PARK *et al.*³⁶¹

Die einfache Synthese von *N*-Tosyloxyphthalimid (**8**) sowie die kommerzielle Verfügbarkeit weiterer Reagenzien machen diese Strategie zur Aminierung des Chromen-4*H*-on-Gerüstes sehr attraktiv. Unter sehr ähnlichen Bedingungen, wenn auch bei höherer Katalysatorbeladung, könnte auch die Darstellung eines Sulfonamids **CXV** aus den entsprechenden Sulfonsäureaziden nach einer Methode von ZHANG gelingen (Schema 63,

b)).³⁵⁸ Die ACKERMANN Gruppe etablierte eine analoge Synthese von Sulfonsäureamiden mithilfe eines kommerziell nicht verfügbaren Ruthenium(II)-diacetat-Katalysators (Schema 63, c)).

Da Sulfonsäureazide im Allgemeinen als reaktiv gelten, was bei dem mehrfach substituierten Edukt **7b** für die geplante Reaktion ein Problem darstellen könnte, sollte diese Möglichkeit ein Mittel der zweiten Wahl sein. Im Jahr 2017 publizierten gleich drei Arbeitsgruppen Möglichkeiten zur C(sp²)-H-Aminierung mit Dioxazolonen als Aminquelle, welche auf zur Darstellung des Anilids **CXVI** angewendet werden könnten (Schema 63, d-f)).³⁶¹ PARK *et al.* verwendeten das kommerziell verfügbare Dichlor-(*p*-cymol)-Ruthenium(II)-Dimer³⁶¹ unter milden Bedingungen (Schema 63, d), während SHI *et al.*³⁵⁹ und WANG *et al.*³⁶⁰ einen nicht kommerziell verfügbaren Cobalt(III)-Katalysator [Cp*Co(CO)I₂] einsetzten (Schema 63, e-f)). Problematisch bei diesen Methoden ist jedoch, dass die entstehende Amid-Funktionalität der Verbindung **CXVI** ihrerseits als dirigierende Gruppe fungieren kann, welche sogar besser an den Katalysator koordiniert als die Carbonylfunktion des Chromen-4*H*-ons. Folglich könnte es zu einer Zweifachaminierung des Eduktes **7b** kommen, da Mehrfachaminierungen bereits von PARK *et al.* beschrieben wurde.³⁶¹

Dementsprechend wurde als erstes Aminierungsreagenz *N*-Tosyloxyphthalimid (**8**) gewählt (Schema 63, a), dessen Synthese aus *N*-Hydroxyphthalimid und *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (*p*-TsCl) im basischen Milieu erfolgt. Anschließend wurde nach einer Vorschrift von RAGHUVANSHI *et al.* ³⁵⁶ das Edukt **7b** mit 5 mol% Dichlor-(*p*-cymol)-Ruthenium(II)-Dimer, 20 mol% Silberhexafluorantimonat und 0.50 Äquivalenten Kupferacetat-Monohydrat in 1,4-Dioxan bei 100 °C für 16 h erhitzt (Schema 64).



7b

Schema 64: Darstellung des 5-Phthaloyl-Bromflavonin-Analogons **9a**. (a) 1.10 Äq. *p*-TsCl, 2.00 Äq. DIPEA, 1,4-Dioxan, RT, 1 h; (b) 5 mol% [RuCl₂(*p*-cymol)]₂, 20 mol% AgSbF₆, 0.50 Äq. Cu(OAc)₂•H₂O, 1,4-Dioxan, 100 °C, 24 h.

Das ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung **9a** deutete auf die Bildung eines Phthaloylgeschützten Flavonoids **9a** hin (Abbildung 18). Zum einen treten bei einer chemischen Verschiebung von δ 7.81 und 7.99 zwei Multipletts auf, die den Phthaloyl-Kernen H⁵ und H⁶ zuzuordnen sind. Zum anderen zeigt sich bei einer chemischen Verschiebung von δ 6.99 ein Singulett, welches dem Proton H¹ zugeordnet werden kann. Dieses Singulett wird von einem Triplett überlagert, welches durch das H³-Proton erzeugt wird. Bei einer chemischen Verschiebung von δ 7.71 und 7.74 zeigen sich zwei Dubletts vom Dublett, die von den Protonen H⁴ bzw. H² stammen.



Abbildung 18: ¹H-NMR Spektrum der Verbindung 9a aufgenommen in Chloroform-d (293 K, 300 MHz)

Die Reaktionskontrolle mittels HPLC und DC zeigte allerdings viele Nebenprodukte, was auf partielle Zersetzung des Eduktes oder die Bildung weitere Nebenprodukte schließen ließ. Um eine Zersetzung der Edukte zu unterdrücken, wurde die Temperatur auf 80 °C herabgesetzt, wobei sich allerdings nach 48 h keine Umsetzung der Edukte zeigte. Da die Gesamtausbeute von 2 % nicht zufriedenstellend war und die Produktmenge eine Hydrazinolyse zum gewünschten Produkt **9c** nicht zuließ, sollte die C-H-Aminierung mit dem reaktiveren Tosylazid versucht werden. Um eine tiefergehende Optimierung der Reaktionsbedingungen zu ermöglichen, wurde diese Optimierung im Rahmen einer Laborrotation am Institut für Organische und Biomolekulare Chemie der Georg-August-Universität in der Arbeitsgruppe von PROF. DR. LUTZ ACKERMANN durchgeführt. Das Tosylazid wurde von der ACKERMANN Gruppe nach KIM *et al.*³⁶² hergestellt und für diese Optimierungsstudie zur Verfügung gestellt.



Tabelle 3: Optimierung der Reaktionsbedingungen zur Darstellung von Verbindung 9b.

Zoilo	Katalysator	Äq.	I M	Additiv	Т	Produkt
Zelle	[mol%]	Azid		[mol%]	[°C]	[%] ^a
1	$[RuCl_2(p-cymol)]_2$ (2.5)	1 20	DCE	$AgSbF_{6}(10)$	100	38
		1.20	DOL	Cu(OAc) ₂ •H ₂ O (30)	100	00
2	[Ru(OAc) ₂ (<i>p</i> -cymol)] (10)	1.20	TFE	AgSbF ₆ (20)	70	43
2	[Pu(OAc), (pcymol)] (10)	1 20	TEE	$AaShE_{2}(20)$	80	68
5		1.20		Agobi 6(20)	00	(38) ^b
1	[Pu(OAc), (p,cymol)] (10)	1 20	1,4-	$AaShE_{2}(20)$	80	38
4		1.20	Dioxan	$AySDF_6(20)$	80	50
5	[Ru(OAc) ₂ (<i>p</i> -cymol)] (10)	1.20	DCE	$AgSbF_6(20)$	80	41
6	[Ru(OAc) ₂ (<i>p</i> -cymol)] (10)	2.00	TFE	AgSbF ₆ (20)	80	17
7	[Ru(OAc) ₂ (<i>p</i> -cymol)] (10)	1.20	TFE	-	80	0

^a Die Ausbeute wurde mittels quantitativer ¹H-NMR Spektroskopie unter Verwendung von CH₂Br₂ als internem Standard bestimmt. ^b Isolierte Ausbeute nach Chromatographie.

Zunächst wurde nach einer Vorschrift von PAN et al. Dichlor-(p-cymol)-ruthenium(II)-Dimer als Silberhexafluorantimonat Katalysator und sowie Kupferdiacetat als Additive in 1,2-Dichlorethan bei 100 °C verwendet (Tabelle 3, Zeile 1).³⁵⁸ Nach 16 h wurde der Reaktionsansatz mittels LC-MS auf das Vorhandensein des gewünschten Produkts 9b hin untersucht. Dabei zeigte sich, dass 9b zwar gebildet wurde, allerdings, wie auch bei der Synthese von 9a mit N-Hydroxyphthalimid bei 100 °C, viele Nebenprodukte auftraten. CHOI et al. optimierten die C-H-Aminierung Pivaloyl-geschützter Indole unter Verwendung eines Ruthenium-Diacetat-Katalysators [Ru(OAc)₂(p-cymol)],³⁶³ welcher von der ACKERMANN Gruppe nach einer Vorschrift von Lo et al. hergestellt wurde, sodass diese Reaktion bei 40 °C in 2,2,2-Trifluorethanol (TFE) durchgeführt werden konnte.

In Anlehnung an die optimierten Bedingungen von CHOI *et al.* wurde die avisierte Reaktion mit 10 mol% [Ru(OAc)₂(*p*-cymol)] in Kombination mit Silberhexafluorantimonat bei 70 °C in TFE durchgeführt (Tabelle 3, Zeile 2). Die Bestimmung der Ausbeute mittels quantitativer ¹H-NMR-Spektroskopie unter Verwendung von Dibrommethan als internem Standard zeigte, dass das gewünschte Produkt **9b** zu 43 % gebildet wurde und die dünnschichtchromatographische

Reaktionskontrolle Nebenprodukte. zeigte wenig Durch die Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 80 °C konnte die ¹H-NMR-Ausbeute auf 68 % verbessert und das Produkt 9b nach säulenchromatographischer Isolierung in einer Ausbeute von 38 % gewonnen werden (Tabelle 3, Zeile 3). Da die Reaktionskontrolle mittels DC allerdings auch die Bildung von Nebenprodukten zeigte, wurde auf eine weitere Erhöhung der Temperatur im Zuge der Optimierungsstudie verzichtet. Neben TFE wurden bei gleichen Additiven und Temperatur 1,2-Dichlorethan und 1,4-Dioxan als Lösemittel verwendet (Tabelle 3, Zeile 4+5), wobei die ¹H-NMR-Ausbeute allerdings nur bei 38 % und 41 % lag. Ebenso führte eine Erhöhung der Äquivalente an Tosylazid von 1.20 auf 2.00 bei 80 °C in TFE zu einer Reduktion der ¹H-NMR-Ausbeute auf 17 % (Tabelle 3, Zeile 6). Zuletzt wurde untersucht, ob Silberhexafluorantimonat als Additiv weglassen werden kann, was jedoch nicht zur Bildung des gewünschten Produktes 9b führte (Tabelle 3, Zeile 7). Dieser Befund lässt auf Grundlage mechanistischer Untersuchungen von CHOI et al. und deren postulierten Katalysezyklus der Carboxylat-vermittelten Ruthenium(II)-katalysierten C-H-Aminierung begründen (Schema 65).³⁵⁷. Zunächst erfolgt die Überführung des Präkatalysators [Ru(OAc)₂(p-cymol)] durch Silberhexafluorantimonat in den aktiven kationischen Ruthenium(II)-Carboxylat-Komplex A, an welchen Tosylazid unter Stickstoffabspaltung komplexiert, um ein Ruthenium-Amid-Intermediat B zu bilden. Vermutlich geschieht die anschließende C-H-Aktivierung durch eine basenvermittelte interne elektrophile Substitution (BIES-Typ), sodass die Ruthenium(II)-Spezies **D** entsteht, welche sich in das Ruthenium(II)-Amido-Intermediat **E** durch Amidoinsertion umwandelt. Letztlich führt eine Protodemetallierung zum Produkt 9b und Regenerierung des aktiven Katalysators A.^{364,365}



Schema 65: Postulierter Reaktionsmechanismus der Ruthenium(II)-katalysierten C-H-Aminierung nach CHOI et al.³⁵⁷

Die Strukturaufklärung der Verbindung 9b erfolgt in Kapitel 5.5.

Tosylate eignen sich als Schutzgruppen für Amine, da diese sich einfach einführen und entfernen lassen.³⁶⁶ Verbindung **9b** wurde in konzentrierter Schwefelsäure gelöst und für 20 Minuten bei Raumtemperatur gerührt, bis das Edukt vollständig umgesetzt war. Nach säulenchromatographischer Reinigung konnte das Amin **9c** mit einer Ausbeute von 83 % isoliert werden (Schema 66). Durch anschließende Acylierung des Amins **9c** mit Acetylchlorid oder Trifluoressigsäureanhydrid und basischer Aufarbeitung konnten die Verbindungen **9d** und **9e** in guten Ausbeuten von 70 % und 72 % erhalten werden (Schema 66).



Schema 66: Darstellung der Verbindungen 9d und 9e.

(a) H₂SO₄, RT, 20 min; (b) i) 10.0 Äq. CH₃COCl, CH₂Cl₂, RT, 2 h, ii) 10.0 Äq. LiOH, THF/H₂O, RT, 3 h; (c) i) 20.0 Äq. TFAA, THF,0 °C – RT, 2 h, ii) gesättigte NaHCO₃-Lösung, EtOAc, RT, 4 h.

Zur weiteren Elaboration der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen sollte die von CHOI *et al.* etablierte Alkenylierung mit Methylacrylat mittels [Ru(OAc)₂(p-cymol)]-Katalyse durchgeführt werden. Unter Verwendung von zwei Äquivalenten Kupferdiacetat als Additiv konnte das Acrylat **9f** mit einer Ausbeute von 61 % isoliert werden (Schema 67).



Schema 67: Ruthenium-katalysierte C(sp²)-H-Alkenylierung zur Synthese von Verbindung 9f.
(a) 1.00 Äq. Methylacrylat, 10 mol% [Ru(OAc)₂(p-Cymol)], 20 mol% AgSbF₆, 2.00 Äq. Cu(OAc)₂, TFE, 80 °C, 16 h, N₂; (b) 1.00 Äq. LiOH, THF/H₂O, RT, 1 h.

Bei der anschließenden Verseifung des Methylesters konnte die entsprechende Carbonsäure **9g** nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel und C₁₈-Kieselgel nicht in ausreichender Reinheit von 95 % gewonnen werden, sodass dieser Ansatz nicht weiterverfolgt wurde (Schema 67). Für einen bioisosteren Austausch der 5-Hydroxygruppe sollte letztlich eine *ortho*-C(sp²)–H Fluorierung zur Darstellung eines 5-Fluor-Bromflavonin-Analogons **9h** durchgeführt werden. Da Ketone nur schwach dirigierende Gruppen sind, erfolgt die Fluorierung in der Literatur zumindest über die Bildung von transienten dirigierenden Gruppen wie Oximen.³⁶⁷ Da die Carbonylfunktion des (4*H*)-Chromen-4-on allerdings in einem Ring inkorporiert ist, ist die Reaktion mit Hydroxylaminen im Sinne einer S_N2t sterisch gehindert. Dementsprechend wurde eine modifizierte Vorschrift von WU *et al.* gewählt, bei der Palladium(II)chlorid als Katalysator, *N*-Fluorbenzolsulfonimid (NFSI) als Fluorierungsmittel und Silbernitrat als Promoter in 1,2-Dichlorethan für 16 h bei 80 °C.³⁶⁸ Die Auswertung des HPLC- und LC-MS-Chromatogramms belegte, dass das Edukt **7b** nicht umgesetzt wurde.



Schema 68: Versuch zur Palladium-katalysierte C(sp²)–H-Fluorierung Darstellung von **9h**. (a) 10 mol% PdCl₂, 40 mol% AgNO₃, 2.00 Äq. NFSI, DCE, 80 °C, 24 h, N₂.

5.5. Strukturaufklärung von *N*-(2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4-oxo-4*H*-chromen-5-yl)-4-methylbenzolsulfonamid (9b)

Die Strukturaufklärung des Flavonols **9d** erfolgte durch Auswertung der ¹H-, ¹³C- und APT-Spektren ergänzt durch die zweidimensionalen NMR-Experimente ¹H,¹H-COSY, ¹H,¹H-NOESY, ¹H,¹³C-HSQC und ¹H,¹³C-HMBC. Zudem wurde die Strukturaufklärung von Chlorflavonin nach REHBERG *et al.* zu Vergleichszwecken herangezogen.⁶

5.5.1. Zuordnung der Wasserstoffkerne

Beginnend im Hochfeld zeigt sich ein Singulett bei einer chemischen Verschiebung von δ 2.40, welches sich den Methylprotonen H¹⁰ des Tosylrests zuordnen lässt (Abbildung 19). Bei einer chemischen Verschiebung von δ 3.85 – 3.99 zeigen sich drei Singuletts, die durch die drei Methoxy-Protonen erzeugt werden (Abbildung 19). Die Zuordnung der Kerne gelang mittels ¹H,¹H-COSY- und ¹H,¹H-NOESY-Experimenten (Abbildung 20).



Abbildung 19: ¹H-NMR-Lokantensatz und Ausschnitt des ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung **9b** aufgenommen in Chloroform-*d* (293 K, 400 MHz)

Das Singulett bei einer chemischen Verschiebung von δ 3.85 zeigt im ¹H,¹H-COSY- und ¹H,¹H-NOESY-Spektrum keinen Kreuzpeak, während das Singulett bei einer chemischen Verschiebung von δ 3.89 im ¹H,¹H-NOESY-Spektrum einen Kreuzpeak zu dem aromatischen Proton H⁵ aufweist (Abbildung 20). Das Singulett bei einer chemischen Verschiebung von

 δ 3.99 wiederum zeigt im ¹H,¹H-NOESY-Spektrum einen Kreuzpeak zum Proton H⁴, sodass die Zuordnung des Signals zu den Methoxy-Protonen H³ eindeutig ist (Abbildung 20). Folglich gehört das Signal bei einer chemischen Verschiebung von δ 3.85 zu den Methoxy-Protonen H² und das Signal bei δ 3.89 zu den Methoxy-Protonen H¹.



Abbildung 20: Auswertung des ¹H, ¹H-COSY- und ¹H, ¹H-NOESY-Spektrums von Verbindung 9b.

Im aromatischen Bereich zeigen sich distinkte Signale, sodass zunächst die Tosyl-Protonen H⁸/H⁸ und H⁹/H⁹, die aufgrund ihrer sind chemisch und magnetisch Äquivalenz ein Signal mit einem Integral von zwei erzeugen, zugeordnet werden. Beide Wasserstoffkerne liegen in einem [AX]₂-Spinsystem vor und erzeugen charakteristische Multipletts bei einer chemischen Verschiebung von δ 7.24 – 7.30 und δ 7.80 – 7.87. Das Signal mit einer chemischen Verschiebung von δ 7.80 – 7.87 kann aufgrund des Kreuzpeaks zu den Methyl-Protonen H¹⁰ im ¹H,¹H-COSY-Spektrum den Protonen H⁸/H^{8'} zugewiesen werden, sodass das Signal mit einer chemischen Verschiebung von δ 7.24 – 7.30 auf die Protonen H⁹/H^{9'} zurückzuführen ist (Abbildung 20).

Das Triplett mit ${}^{3}J_{H,H} = 7.9$ Hz bei einer chemischen Verschiebung von δ 7.00 kann aufgrund seiner Multiplizität und jeweils einem Kreuzpeak zu diesem Signal und den Signalen der Protonen H⁵ und H⁷ im ¹H,¹H-COSY-Spektrum dem Proton H⁶ zugeordnet werden (Abbildung 20). Die Kreuzpeaks des Singuletts bei einer chemischen Verschiebung von δ 7.32 zu den Protonen H³ und H¹¹ legen den Schluss nahe, dass dieses Signal durch das Proton H⁴ hervorgerufen wird (Abbildung 20). Da das Dublett mit ${}^{3}J_{H,H} = 7.9$ Hz bei einer chemischen Verschiebung von δ 7.67 einen Kreuzpeak im ¹H,¹H-NOESY-Spektrum zu den Methoxy-Protonen H¹ aufweist, kann dieses Signal dem Proton H⁵ zugeordnet werden. Somit verbleibt das Dublett mit ${}^{3}J_{H,H} = 7.9$ Hz bei einer chemischen Verschiebung von δ 7.76, welches dem Proton H⁷ zugeordnet werden kann. Der Kreuzpeak des Singuletts bei einer chemischen Verschiebung von δ 12.12 zu dem Proton H⁴ im ¹H,¹H-NOESY-Spektrum erlaubt eine Zuordnung zum Sulfonamid-Proton H¹¹, sodass das Singulett bei einer chemischen Verschiebung von δ 8.00 dem phenolischen Proton H¹² entstammt.

5.5.2. Zuordnung der Kohlenstoffkerne

Der Methylkohlenstoffkern C²³ der Verbindung **9b** erzeugt ein hochfeldverschobenes Signal bei einer chemischen Verschiebung von δ 21.7 (Abbildung 21). Die positiven Signale im APT-NMR-Spektrum klassifizieren dieses Signal als primären Kohlenstoffkern, ebenso wie die Signale bei einer chemischen Verschiebung von δ 56.7, 61.8 und 62.2, welche auf die drei Methoxygruppen zurückzuführen sind.



Abbildung 21: ¹³C-NMR-Lokantensatz der Verbindung 9b.

Die Zuordnung der drei Signale gelingt durch Auswertung des ¹H,¹³C-HSQC-Spektrums, da das Signal bei einer chemischen Verschiebung von δ 56.7 einen Kreuzpeak zu den Methoxy-Protonen H³ zeigt, entspricht dieses Signal dem Kohlenstoffkern C¹⁸, während das Signal bei einer chemischen Verschiebung von δ 61.8 einen Kreuzpeak zu den Methoxy-Protonen H¹ ergibt. Dementsprechend ist das Signal bei einer chemischen Verschiebung von δ 61.8 dem Kohlenstoffkern C¹⁶ zuzuordnen und der verbleibende Kohlenstoff C¹⁷ erzeugt das Signal bei einer chemischen Verschiebung von δ 62.2.

Im nächsten Schritt wurden die tertiären Kohlenstoffkerne mittels APT-NMR-Spektrum identifiziert und die Zuordnung anhand des ¹H,¹³C-HSQC-Spektrums vorgenommen (Abbildung 22).



Abbildung 22: Ausgewählter Bereich des ¹H,¹³C-HSQC-Spektrums von Verbindung 9d und Markierung der relevanten Kreuzpeaks. Aufgenommen in Chloroform-*d* (293 K, 400 MHz)

Das ¹H, ¹³C-HSQC-Spektrum ermöglicht die Zuordnung des Kohlenstoffkerns C⁶ dem Signal bei einer chemischen Verschiebung von δ 98.3, da dieses Signal einen Kreuzpeak zum Proton H⁴ zeigt (Abbildung 22). Der Kreuzpeak im ¹H, ¹³C-HSQC-Spektrum des Signales bei einer chemischen Verschiebung von δ 121.9 zum Triplett des Proton H⁵ erlaubt die Zuordnung des Signals zum Kohlenstoffkern C¹⁴ (Abbildung 22). Das Signal bei einer chemischen Verschiebung von δ 127.5 kann durch den entsprechenden Kreuzpeak zu den Protonen H⁸/H^{8'} im ¹H, ¹³C-HSQC-Spektrum den Kohlenstoffkernen C²⁰/C^{20'} zugeordnet werden, während sich für die Kohlenstoffkerne C²¹/C^{21'} eine Zuordnung zum Signal bei einer chemischen Verschiebung von δ 129.9 ergibt (Abbildung 22). Diese Zuordnung wird durch einen Kreuzpeak im ¹H, ¹³C-HMBC-Spektrum zu den Methylprotonen H¹⁰ bekräftigt (Abbildung 23, gelb). Der tertiäre Kohlenstoffkern bei einer chemischen Verschiebung von δ 129.4 kann anhand des Kreuzpeaks zum Proton H⁵ im ¹H, ¹³C-HMBC-Spektrum dem Kohlenstoffkern C¹⁵ zugeordnet werden (Abbildung 22).

Weiterhin zeigt das ¹H,¹³C-HSQC-Spektrum einen Kreuzpeak für das Proton H⁷, allerdings kann nicht genauer differenziert werden, durch welches Signal im ¹³C-NMR-Spektrum der Kreuzpeak erzeugt wird, da drei Signale bei einer chemischen Verschiebung von δ 136.53, 136.55 und 136.60 überlagern (Abbildung 22).

242



Abbildung 23: Erster ausgewählter Bereich des ¹H,¹³C-HMBC-Spektrums von Verbindung **9d** und farbliche Markierung der relevanten Kreuzpeaks. Aufgenommen in Chloroform-*d* (293 K, 400 MHz)

Im nächsten Schritt sollen die verbleibenden Chromen-4*H*-2-on-Kohlenstoffkerne zugeordnet werden. Die quartären Kohlenstoffkerne C², C⁷ und C⁸ konnten durch entsprechende Kreuzpeaks im ¹H,¹³C-HMBC-Spektrum zu den jeweiligen Protonen der Methoxygruppen zugeordnet (Abbildung 23, rot). Somit wird das Signal bei einer chemischen Verschiebung von δ 132.0 dem Kohlenstoffkern C⁸ und das Signal bei einer chemischen Verschiebung von δ 138.7 dem Kohlenstoffkern C² zugewiesen. Die Methoxy-Protonen H³ zeigen einen Kreuzpeak im ¹H,¹³C-HMBC-Spektrum zu dem stark tieffeldverschobenen Signal bei einer chemischen Verschiebung von δ 138.7 dem Kohlenstoffkern C² zugewiesen. Die Methoxy-Protonen H³ zeigen einen Kreuzpeak im ¹H,¹³C-HMBC-Spektrum zu dem stark tieffeldverschobenen Signal bei einer chemischen Verschiebung von δ 157.5, sodass dieses Signal dem Kohlenstoffkern C⁷ zuzuordnen ist (Abbildung 23, rot). Eine ebenfalls eindeutige Zuordnung kann für den Carbonylkohlenstoffkern C³ vorgenommen werden, da dieser durch räumliche Nähe zum Sauerstoff die größte Tieffeldverschiebung erfährt und dem Signal mit einer chemischen Verschiebung von δ 176.6 zuzuschreiben ist.

Für die weitere Zuordnung der Chromen-4*H*-2-on-Kerne werden die Kreuzpeaks mit aromatischen Protonen im ¹H,¹³C-HMBC-Spektrum herangezogen (Abbildung 24). Zu dem Proton H⁴ können zwei Kreuzpeaks im ¹H,¹³C-HMBC-Spektrum identifiziert werden (Abbildung 24, grün). Die Signale haben eine chemische Verschiebung von δ 106.5 und 150.3 und zeigen keine weiteren Kreuzpeaks im ¹H,¹³C-HMBC-Spektrum, sodass diese durch die quartären Kohlenstoffkernen C⁴ oder C⁹ erzeugt werden. Der Kohlenstoffkern C⁹ ist durch das benachbarte Sauerstoffatom stark entschirmt, sodass der Kohlenstoffkern C⁹ das Signal bei einer chemischen von δ 150.3 erzeugt und der Kohlenstoffkernen C⁴ das Signal bei einer chemischen Verschiebung von δ 106.5. Dem Kohlenstoffkern C¹ kann aufgrund eines Kreuzpeaks zum Proton H⁵ im ¹H,¹³C-HMBC-Spektrum das Signal bei einer chemischen Verschiebung von δ 154.0 zugewiesen werden.

Als nächstes sollen die quartären Kohlenstoffkerne C¹⁹ und C²² des Tosylrests zugeordnet werden. Das Signal mit einer chemischen Verschiebung von δ 144.3 zeigt einen Kreuzpeak im ¹H,¹³C-HMBC-Spektrum zu der Methylgruppe des Tosylrests (Abbildung 23, gelb) und zu den aromatischen Protonen H⁹/H^{9'} (Abbildung 24, gelb) und wird somit durch den Kohlenstoffkern C²² erzeugt. Da die Tosylkerne C²⁰-C²³ eindeutig zugeordnet werden können, kann der der verbleibende Kreuzpeak im ¹H,¹³C-HMBC-Spektrum für die Identifikation des Kohlenstoffkerns C¹⁹ herangezogen werden. Die Tosyl-Protonen H⁸/H^{8'} zeigen einen Kreuzpeak mit einem der Signale bei einer chemischen Verschiebung bei δ 136.53, 136.55 und 136.6, sodass eines dieser Signale dem Kohlenstoffkern C¹⁹ zugeordnet werden kann (Abbildung 24, orange).



Abbildung 24: Zweiter ausgewählter Bereich des ¹H,¹³C-HMBC-Spektrums von Verbindung **9d** und farbliche Markierung der relevanten Kreuzpeaks. Aufgenommen in Chloroform-*d* (293 K, 400 MHz)

Als letztes sollte die Zuordnung der Kohlenstoffkerne des Phenylringes vorgenommen werden. Für das Signal mit einer chemischen Verschiebung von δ 113.7 können drei relevante Kreuzpeaks im ¹H,¹³C-HMBC-Spektrum zu den Protonen H⁵, H⁶ und dem phenolischen OH¹²-Proton (Abbildung 24, blau) identifiziert werden, was eine Zuordnung des Signals zum Bromsubstituierten Kohlenstoffkern C¹² erlaubt. Ebenso konnten für das Signal mit einer chemischen Verschiebung von δ 119.3 zwei Kreuzpeaks beobachtet werden, die durch ³J_{C,H}-Kopplung zu den Protonen H⁶ und H¹² bedingt sind (Abbildung 24, rot). Folglich wird das Signal mit einer chemischen Verschiebung von δ 119.3 durch den Kohlenstoffkern C¹⁰ erzeugt. Weiterhin kann das tieffeldverschobene Signal bei einer chemischen Verschiebung von δ 151.9 durch drei Kreuzpeaks eindeutig zugeordnet werden (Abbildung 24, violett). Zum einen koppelt der Kohlenstoffkern C¹¹ über eine ²J_{C,H}-Kopplung mit dem phenolischen OH-Proton sowie über eine ³J_{C,H}-Kopplung jeweils zu den Protonen H⁵ und H⁷.

Folglich gelang die eindeutige Zuweisung alle Kohlenstoffkerne mit Ausnahme der Kohlenstoffkerne C⁵, C¹³ und C¹⁹, deren Signale bei einer chemischen Verschiebung von δ 136.53, 136.55 und 136.60 liegen.

5.6. Präklinische Evaluation der Chlor- und Bromflavonin-Analoga

Im folgenden Kapitel werden die präklinischen Eigenschaften der dargestellten Chlor- und Bromflavonin-Analoga beschrieben. Dabei werden die Ergebnisse der inhibitorischen Aktivität gegenüber des virulenten *M. tuberculosis* Stammes H37Rv unter Berücksichtigung qualitativer Daten zur IIvB1-Inihibition diskutiert. Für ausgewählte Inhibitoren wurde zudem die Zytotoxizität gegenüber der Zelllinie THP-1 (humane monocytische Leukämiezellen) bestimmt und, sofern möglich, Selektivitätsindices berechnet. Für die Leitstrukturen Chlor- und Bromflavonin wurde außerdem die chemische und metabolische Stabilität sowie pK_s-Werte relevanter funktioneller Gruppen in die abschließende Beurteilung einbezogen werden.

<u>Methoden</u>

Die Bestimmung der **minimalen Hemmkonzentration (MHK**₉₀) erfolgte in Kooperation mit dem Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durch DR. ANNA-LENE KIFFE-DELF aus der Arbeitsgruppe von PROF. DR. RAINER KALSCHEUER mittels *Microbroth Dilution Assay*.

Die Kultivierung von *M. tuberculosis* H37Rv und Bestimmung der MHK₉₀-Werte erfolgte wie zuvor beschrieben.³¹³ Die MHK₉₀-Werte ergaben sich aus einer Dreifachbestimmung mithilfe einer geometrischen zweifach Verdünnungsreihe von 100 bis 0.05 µM einer 10 mM DMSO-Stammlösung des zu testenden Inhibitors. Als Positivkontrolle wurde Rifampicin und als Blindprobe DMSO verwendet. Diese Daten wurden bereits von DR. KIFFE-DELF in ihrer Dissertation veröffentlicht.³⁶⁹

Die Bestimmung der **inhibitorischen Aktivität gegenüber IIvB1**, der katalytischen Untereinheit des AHAS-Enzyms, erfolgte in Kooperation mit dem Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durch DR. ANNA-LENE KIFFE-DELF aus der Arbeitsgruppe von PROF. DR. RAINER KALSCHEUER mittels kolorimetrischem Assay.

Die IIvB1-Inhibition wurde mit einem modifizierten Assay nach CHOI *et al.*¹⁶⁶ bestimmt und die Durchführung bereits beschrieben.³⁶⁹ Die Bildung des roten Farbkomplexes wurde in einem vorgeheizten Tecan Infinite F200 Pro Reader bei 37 °C bei einer Wellenlänge von 492 nm in einem kinetischen Kreislauf vermessen. Diese Daten wurden bereits von DR. KIFFE-DELF in ihrer Dissertation veröffentlicht.³⁶⁹ Da keine Dosis-Wirkungs-Linearität zwischen der Konzentration des Inhibitors (0.1 μ M – 100 μ M) und der Hemmung der katalytischen Aktivität von IIvB1 (%), wurde die inhibitorische Aktivität im Vergleich zur Kontrolle geschätzt.

Die Bestimmung der **Zytotoxizität** gegen verschiedene humane Zelllinien (MRC-5, HEK-293, THP-1) erfolgte in Kooperation mit dem Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durch DR. KIFFE-DELF aus der Arbeitsgruppe von PROF. DR. KALSCHEUER und wurde bereits beschrieben. Material und Methoden wurden von DR. KIFFE-DELF beschrieben.³⁶⁹ Das prozentuale Wachstum wurde im Vergleich zu der DMSO-Blindprobe (100 % Wachstum) und der sterilen Kontrolle Triton X-100 (0 % Wachstum) berechnet. Diese Daten wurden bereits von DR. KIFFE-DELF in ihrer Dissertation veröffentlicht.³⁶⁹

Die *consensus* LogP-Werte (**cLogP**) wurden mithilfe des Web-Programmes SwissADME am 01.02.2024 berechnet und die Daten gemäß CC-BY 4.0 Creative Commons 4.0 International Lizenz genutzt.³⁷⁰

5.6.1. Antimykobakterielle in vitro Aktivität und Zytotoxizität

5.6.1.1. Evaluation der B-Ring-Analoga

Zur Analyse der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen werden neben den im Rahmen dieser Promotion neu synthetisierten Derivaten **1d-r** und **9b-f** auch die von BERGER dargestellten Derivate (**CF**, **BF** und **AB1-12**) sowie Dechlorflavonin (**DC**) in die Analyse einbezogen, um initialen Hypothesen bezüglich der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen zu konkretisieren. Ein Teil dieser Ergebnisse wurde bereits publiziert.^{313,369}

Die Leitstruktur Chlorflavonin ist ein potenter Wachstumsinhibitor von *M. tuberculosis in vitro* mit einer niedrigen mikromolaren MHK₉₀ von 1.56 μ M (Tabelle 4). Die qualitative Auswertung eines kolorimetrischen IIvB1-Assays zeigte zudem, dass **CF** über 90 % der katalytischen Aktivität von IIvB1 im Vergleich zur Kontrolle inhibierte (Tabelle 4).³⁶⁹ Bromflavonin (**BF**) zeigte

eine verbesserte antimykobakterielle Aktivität mit einem MHK₉₀-Wert von 0.78 μ M³¹³ bei ähnlicher IIvB1-Inhibition (Tabelle 4).

$H_3C_0 \rightarrow 0$ $H_3C^0 \rightarrow 0$	HOFF	HO	HOBr	но
	AB1	CF	BF	AB2
MHK ₉₀ [μM]	> 100	1.56	0.78	> 100
IIvB1 Inhibition [%]	> 90	> 90	> 90	-
THP-1 IC₅₀ [µM]	> 100	100	> 100	> 100
SI (THP-1 IC ₅₀ /MHK ₉₀)	n.b.	64	> 128	n.b.
cLogP	2.79	3.01	3.09	3.13

Tabelle 4: Inhibition des *Mt* Wachstums, der IIvB1-Aktivität, Zytotoxizität gegen THP-1 Zellen sowie cLogP-Werte von halogenierten **CF**-Analoga. n.b. = nicht bestimmbar.

Das Bromatom in 3'-Position erhöht die Lipophilie (cLogP) im Vergleich zum Chloratom (Tabelle 4). Dies könnte zu einer besseren Interaktion mit Leu65, Met512 und Val513 der im Homologie-Modell⁶ vorhergesagten lipophilen Seitentasche führen. Das Bromatom ist mit einem VAN-DER-WAALS (VDW)-Radius von 1.85 Å etwas größer als das Chloratom (1.75 Å) und besitzt vergleichbare elektronische Eigenschaften.³⁷¹ Beide Halogene sind in der C-X-Bindung partiell-negativ geladen. Aufgrund einer anisotropen Verteilung der Ladungsdichte im Halogenatom kann durch das jeweilige niedrig-liegende C-X- σ *-Orbital ergibt sich ein lokales positives elektronenpaaren oder elektronenreichen π -Systemen stattfinden kann.^{372,373} Sowohl das Brom- als auch das Chloratom könnten aufgrund des σ -Lochs mit der elektronenreichen Indol-Seitenkette von Trp516 über eine Halogenbindung wechselwirken.

Um abschließende Aussagen bezüglich der Enzyminhibition machen zu können, bedarf es der Etablierung eines quantitativen IIvB1-Assays, der die Bestimmung von IC₅₀-Werten zulässt oder einer Co-Kristallstruktur zur Analyse der Enzym-Liganden-Interaktion. **BF** zeigt eine bessere Ganzzellaktivität als **CF**, diese muss jedoch nicht zwangsläufig durch die bessere Aktivität am Enzym bedingt sein, da in zellbasierten Assays weitere Faktoren wie Löslichkeit, Permeabilität sowie chemische und metabolische Stabilität eine Rolle spielen.

Das 3'-fluorierte (**AB1**) und 3'-iodierte (**AB2**) Analogon zeigen jeweils keine Wachstumshemmung gegenüber *Mt* (Tabelle 4). Während **AB2** nicht bezüglich seiner inhibitorischen Eigenschaften auf der Enzymebene getestet wurde, zeigte sich das fluorierte Analogon **AB1** vergleichbar potent zu **CF** und **BF** (Tabelle 4).

Das σ -Loch ist für Fluor-Substituenten nicht beschrieben,³⁷² trotzdem inhibiert auch die 3'-Fluor-Verbindung **AB1** über 90 % der katalytischen IIvB1-Aktivität. Da der Fluor-Substituent zudem deutlich kleiner ist (1.47 Å)³⁷¹ als Chlor und Brom ist fraglich, ob diese Größe ausreicht, um die lipophile Seitentasche optimal auszufüllen. Die inhibitorische Aktivität könnte folglich durch stärkere Polarisierung des Phenylrings aufgrund des negativen induktiven Effektes und daraus resultierenden besseren Wechselwirkung zu Trp516 oder der gesteigerten Acidität der phenolischen 2'-Hydroxygruppe zustande kommen. Letzteres könnte die fehlende Wachstumsinhibition gegenüber *Mt* erklären, da der stärker elektronenziehende Fluor-Substituent den pK_s-Wert im Vergleich zu Chlor und Brom stärker herabsetzt. Damit liegt ein größerer Anteil des Inhibitors im gepufferten Nährmedium mit einem pH-Wert von 6.6 ± 0.2³⁷⁴ von *Mt* dissoziiert vor, was eine Aufnahme ins Zytosol erschweren könnte. Zudem ist **AB1** mit einem cLogP-Wert von 2.79 hydrophiler als CF und BF, was ebenso eine Einschränkung der passiven Diffusion bedingen kann.

Für das iodierte Analogon **AB2** ist es schwierig konkrete Aussagen zu treffen, da dieses Derivat nicht auf seine IIvB1-Inhibition hin untersucht wurde. Prinzipiell könnte die Größe des Iodatoms zu sterischer Hinderung bei der Enzym-Liganden-Interaktion führen.

Weiterhin wurde die Zytotoxizität der halogenierten Flavonoide untersucht (Tabelle 4). Chlorflavonin zeigte eine schwache Hemmung der Monozyten-Zelllinie THP-1 mit einem IC_{50} -Wert von 100 µM, sodass sich ein Selektivitätsindex (SI) gegenüber *Mt* von 64 ergibt (Tabelle 4). Die drei weiteren halogenierten Analoga (**BF**, **AB1-2**) zeigten keine Zytotoxizität im Bereich von bis zu 100 µM, sodass sich für **BF** ein SI von über 128 ergibt (Tabelle 4).

Neben dem Austausch des Halogens in 3'-Position wurde der Austausch durch mögliche (Bio-)lsostere untersucht (Tabelle 5).

 Tabelle 5: Inhibition des Mt Wachstums, der IlvB1-Aktivität, Zytotoxizität gegen THP-1 Zellen sowie cLogP-Werte

 von Dechlorflavonin (DC) und 3'-alkylierten CF-Analoga.

$H_3C_0 \rightarrow H_3C^{O}CH_3$		нонн	HO CF ₃	HO CH ₃	HO H ₃ C CH ₃	но
	BF	DC	AB3	AB4	AB5	AB6
MHK ₉₀ [μM]	0.78	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
IIvB1 Inhibition [%]	> 90	50*	75-90	≤ 50	-	-
THP-1 IC₅₀ [µM]	> 100	-	100	-	-	-
cLogP	3.09	2.47	3.45	2.79	3.42	2.83

*Schwache Inhibition der katalytischen Aktivität bei einer Konzentration von 50 µM bestimmt von REHBERG et al.⁶

Die Einführung von Alkyl- oder Alkin-Substituenten in 3'-Position (**AB3-6**) führt zum Verlust der *in vitro* Wachstumshemmung von *Mt* (Tabelle 5). Das 3'-Trifluormethyl- (**AB3**) und das 3'-Methyl-substituierte Analogon **AB4** wurden auf ihre IIvB1-Inhibition hin untersucht, wobei sich herausstellte, dass **AB4** das Enzym nicht inhibiert, während **AB3** zu einer moderaten Inhibition (75 % bis 90 %) der katalytischen Aktivität führt (Tabelle 5). Ein Vergleich der VDW-Radii des Chlor- oder Bromatoms mit dem Methyl-Substituenten (2.0 Å)³⁷⁵ des inaktiven Analogon **AB4** und dem CF₃-Substituenten (2.7 Å)³⁷⁵ des moderat aktiven Analogon **AB3** zeigt, dass die Aktivität eher durch die elektronischen Eigenschaften als durch den sterischen Anspruch bedingt ist. Während CH₃-Gruppen einen schwachen positiven induktiven Effekt besitzen, weisen Halogen-Substituenten abhängig von ihrer Elektronegativität (EN) einen negativen induktiven Effekt auf. Dieser negative induktive Effekt ist auch im Fall der CF₃-Gruppe (EN = 3.46) stark ausgeprägt.^{376,377} Zudem sind Methyl- und Trifluormethyl-Gruppen im Gegensatz zu Halogenen nicht in der Lage, aufgrund der nicht vorhandenen σ-Löcher, zusätzliche elektrostatische Wechselwirkungen mit Trp516 einzugehen.

Die beiden alkylierten (**AB5**) und alkinylierten Verbindungen (**AB6**) zeigen im Ganzzellassay keine Aktivität, sodass diese beiden Verbindungen nur einen unzureichenden Beitrag zur Struktur-Aktivitäts-Beziehung leisten. Die Analyse der Verbindungen **AB1-AB6** sowie **CF** und **BF** zeigt, dass ein 3'-Substituent, der die Elektronendichte des aromatischen Systems reduziert, für eine potente IIvB1-Inhibition notwendig ist.

H ₃ C ₀ H ₃ C ₁₀ H ₃ H ₃ H ₃ C ₁₀ H ₃ H ₃ H ₃ C ₁₀ H ₃		HOCI	CI	H	CI CI
H ₃ C ²	CF	AB7	AB8	AB9	AB10
MHK ₉₀ [μM]	1.56	> 100	> 100	> 100	> 100
IIvB1 Inhibition [%]	> 90	75-90	≤ 50	≤ 50	≤ 50
THP-1 IC₅₀ [µM]	100	-	-	-	-
cLogP	3.01	3.00	3.01	3.38	3.89
TPSA [Ų]	98.36	98.36	98.36	-	-

Tabelle 6: Inhibition des *Mt* Wachstums, der IIvB1-Aktivität, Zytotoxizität gegen THP-1 Zellen sowie cLogP- und TPSA-Werte von regioisomeren **CF**-Analoga.

Die biologische Evaluation der CF-Regioisomere **AB7** und **AB8** zeigte einen vollständigen Verlust der antimykobakteriellen Wachstumsinhibition im Vergleich zur Leitstruktur (Tabelle 6). Das 2'-Hydroxy-4'-Chlor-Analogon **AB7** zeigt noch eine moderate IIvB1-Inhibition von 75 % bis 90 % (Tabelle 6). Dies legt den Schluss nahe, dass der Chlor-Substituent in 4'-Position die lipophile Seitentasche von IIvB1 weniger gut ausfüllt als der Chlor-Substituent in 3'-Position. Zudem könnte die Acidität der phenolischen 2'-Hydroxy-Gruppe von Verbindung **AB7** im

Vergleich zu **CF** reduziert sein, da sich der elektronenziehende Substituent in *meta*-statt *ortho*-Position zum Phenol befindet. Zwar ist die Inhibition von IIvB1 durch **AB7** im Vergleich zu **CF** reduziert, da **CF** selber allerdings auf zellulärer Ebene einstellig mikromolar aktiv ist, sollte **AB7** zumindest eine schwache Wachstumshemmung von *Mt* zeigen. Dass **AB7** nicht antimykobakteriell wirkt obwohl Parameter, welche die passive Diffusion beeinflussen wie die Lipophilie (cLogP) und polare Oberfläche (TPSA) von **CF** und **AB7** nahezu identisch sind (Tabelle 6), könnte auf eine stark substratspezifische aktive Aufnahme von **CF** und **BF** hindeuten.

Die Notwendigkeit der 2'-Hydroxy-3'-Halogen-Substitution im B-Ring wird weiterhin dadurch bestätigt, dass das Analogon mit 3'-Hydroxy-4'-Chlor-Phenylring (**AB8**) nicht zu einer Inhibition von IlvB1 führt (Tabelle 6). Weiterhin wurde die 2'-Hydroxygruppe durch ein Wasserstoff-(**AB9**) oder Chloratom (**AB10**) ersetzt, welche zum Verlust der IlvB1-Inhibition sowie der *Mt* Wachstumshemmung führen (Tabelle 6). Diese Beobachtungen unterstützen die aus den *Docking*-Experimenten⁶ abgeleitete Hypothese, dass die phenolische 2'-Hydroxygruppe eine Salzbrücke zu Lys197 ausbildet und stark zur Enzym-Liganden-Interaktion beiträgt.

Im nächsten Schritt wurde die Relevanz dieser Salzbrücke zu Lys197 weiter untersucht, indem die Acidität der 2'-Hydroxygruppe variiert wurde. Zum einen wurde in 5'-Position ein elektronenziehender Fluor- (**AB11-12**) oder ein elektronenschiebender Methyl-Substituent (**1d**) eingeführt (Tabelle 7). Ein Fluor-Substituent kann den pK_s-Werte der phenolischen Hydroxygruppe um etwa 0.1-0.3 log-Einheiten senken, während der Methyl-Substituent zu einer entsprechenden Erhöhung führt.^{378,379}

Bei erhöhter Acidität der phenolischen 2'-Hydroxygruppe läge ein größerer Stoffmengenanteil des Inhibitors als dissoziiertes Phenolat vor, welches im Vergleich zum assoziierten Phenol, stärke elektrostatische Wechselwirkungen in Form einer Salzbrücke zu Lys197 in der Bindungstasche eingehen könnte. Auf der anderen Seite könnte der höhere Anteil des Phenolates zu einer verminderten Permeabilität im Ganzzellassay führen. Ein schwach elektronenschiebender 5'-Methyl-Substituent führt zu einer Reduktion der Acidität der phenolischen 2'-Hydroxygruppe. Dadurch wäre die Enzym-Liganden-Interaktion abgeschwächt, aber die Permeabilität unter Umständen besser als bei den fluorierten Analoga AB11-12.³⁸⁰ Zudem könnten beide Substituenten zu einer verbesserten metabolischen Stabilität beitragen, da Chinon-Bildung durch Oxidation der 5-Position nicht mehr möglich ist (Schema 69).318



Schema 69: Mögliche Metabolisierung des B-Ringes durch Chinon-Bildung und Vermeidung dieser Metabolisierung durch Einführung von Substituenten in 5'-Position

Die Ergebnisse des IIvB1-Assays zeigen, dass die drei 5'-substituierten Verbindungen **AB11-12** und **1d** IIvB1 nicht inhibieren (Tabelle 7). Dieser Befund ist vor allem für die fluorierten Verbindungen **AB11-12** ungewöhnlich, da sich der VDW-Radius von Fluor (1.35 Å) nur marginal von Wasserstoff (1.2 Å) unterscheidet³⁸¹ und der Fluor-Wasserstoff-Austausch einen der meist-angewendeten monovalenten isosteren Austausche darstellt.^{371,382} Diese Ergebnisse wiederlegen teilweise die Hypothese, dass die Salzbrücke zu Lys197 bei größerem Stoffmengenanteil an Phenolat gestärkt wird. Um diesen Befund genauer zu untersuchen, ist es notwendig eine Co-Kristallstruktur von **CF** oder **BF** mit dem Enzym aufzulösen, um die Aminosäuren im katalytisch-aktiven Zentrum zu identifizieren, die Enzym-Liganden-Interaktionen zu analysieren und die Hypothese der Salzbrücke mit Lys197 zu verioder falsifizieren.

OH O H ₃ C _O CH ₃ H ₃ C ^O	CF	BF	HO CI AB11	HO Br AB12	HO Br 1d
ΜΗΚ 90 [μ Μ]	1.56	0.78	> 100	> 100	> 100
IIvB1 Inhibition [%]	> 90	> 90	≤ 50	≤ 50	≤ 50*
THP-1 IC₅₀ [µM]	100	> 100	-	-	> 100
cLogP	3.01	3.09	3.32	3.42	3.44

Tabelle 7: Inhibition des *Mt* Wachstums, der IIvB1-Aktivität, Zytotoxizität gegen THP-1 Zellen sowie cLogP-Werte von 5'-substituierten **CF** und **BF**-Analoga.

* Die Verbindung präzipitierte während des Assays.

Dass auch das Analogon mit 5'-Methyl-Substituent (**1d**) keine Aktivität gegen IIvB1 zeigt (Tabelle 7), deutet darauf hin, dass ein Substituent in dieser Position sterische Hinderung durch Abstoßung zu Ala592 und Ala593 induziert und die Bindung an IIvB1 nicht mehr möglich

ist. Es ist allerdings zu berücksichtigen, dass Verbindung **1d** während des IlvB1-Assays aufgrund schlechter Löslichkeit präzipitierte. Dadurch könnte die Enzyminhibition von **1d** vermindert sein.

Die bisherigen Ergebnisse betonen insgesamt die Wichtigkeit der 2'-Hydroxygruppe von **CF** und **BF** für die Enzym-Liganden-Interaktion und somit die inhibitorische Aktivität gegenüber IIvB1. Mit Blick auf die *in vivo* Pharmakokinetik könnte die 2'-Hydroxygruppe von **CF** und **BF** allerdings im Phase II-Metabolismus schnell glucoronidiert oder sulfoniert und die Inhibitoren rasch renal eliminiert werden,^{317,318,383,384} welches zu einer geringen Plasmahalbwertszeit und hohen Clearance führen könnte. Um die metabolische Stabilität zu verbessern, ist ein bioisoterer Austausch der 2'-Hydroxygruppe interessant. Zu diesem Zweck wurde der Austausch gegen einen Fluor-Substituenten als klassisches Bioisoster und einen Difluormethoxy-Substituenten als weniger etabliertes Bioisoster untersucht (Tabelle 8).

H_3C_0 H_3C' CH_3 H_3C'	BF	F Br 1e	F ₂ HC of Br Br 1f
MHK ₉₀ [μM]	0.78	> 100	> 100
IIvB1 Inhibition [%]	> 90	≤ 50*	-
THP-1 IC₅₀ [µM]	> 100	> 100*	-
cLogP	3.09	3.76	4.03

Tabelle 8: Inhibition des *Mt* Wachstums, der IlvB1-Aktivität, Zytotoxizität gegen THP-1 Zellen sowie cLogP-Werte von 2'-Hydroxy isosteren **BF**-Analoga.

* Die Verbindung präzipitierte während des Assays.

Das 2'-Fluor-substituierte Analogon (**1e**) zeigte weder im Ganzzell- noch im IlvB1-Assay Aktivität (Tabelle 8). Zwar sollte berücksichtigt werden, dass der IlvB1-Assay in diesem Fall nur begrenzte Aussagekraft hat, da die Verbindung während des Assays präzipitierte, allerdings unterstreicht dieser Befund die schlechte Wasserlöslichkeit der Verbindung, welche sie zu einem wenig geeigneten Kandidaten zur weiten Optimierung macht. Für das 2'-Difluormethoxy-substituierte Analogon (**1f**) wurde ermittelt, dass diese Verbindung keine wachstumshemmenden Eigenschaften von *Mt* aufweist. Die Ergebnisse des IlvB1-Assays von **1f** stehen noch aus, sodass die Verifizierung der Difluormethoxygruppe als lipophiles Bioisoster der Hydroxylgruppe noch aussteht.

5.6.1.2. Evaluation der 3-Alkoxy-Bromflavonin-Analoga

Zur weiteren Untersuchung der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen sollte der Substituent in der 3-Position untersucht werden. Zunächst wurde Chlorflavonin (**CF**) mit dessen Analoga mit Wasserstoffatom (**AB13**) und Ethoxy-Substituent (**1g**) in 3-Position verglichen (Tabelle 9).

Tabelle 9: Inhibition des *Mt* Wachstums, der IIvB1-Aktivität, Zytotoxizität gegenüber THP-1 Zellen sowie cLogP-Werte von **CF** und Analoga mit Variation der 3-Position. n.b. = nicht bestimmbar.

H ₃ C ₀ U	۲ ^н	∀⁰`Сн ₃	∀ ⁰ , CH ₃
H ₃ C HO Y CI	AB13	CF	1g
MHK ₉₀ [μM]	6.25	1.56	> 100
IIvB1 Inhibition [%]	75-90	> 90	> 90
THP-1 IC₅₀ [μM]	> 100	100	100
SI (THP-1 IC ₅₀ /MHK ₉₀)	16	64	n.b.
cLogP	2.98	3.01	3.34

Das Analogon mit Wasserstoffatom in 3-Position (AB13) weist im Vergleich zu CF eine vierfach reduzierte Wachstumshemmung (MHK₉₀ = 6.25 μ M) und erniedrigte IIvB1-Inhibition 9). Die *Docking*-Ergebnisse postulieren eine Wechselwirkung auf (Tabelle des 3-Methoxysauerstoffs mit der basischen Seitenkette von Lys197, welche der 3-Wasserstoff-Substituent von AB13 nicht eingehen kann. Mit dem vergrößerten 3-Ethoxy-Substituent (1g) hingegen kann die Wechselwirkung zu Lys197 stattfinden, sodass das 1g (Tabelle 9) und das 3-Ethoxy-substituierte BF-Analogon 1h (Tabelle 10) die IIvB1 Untereinheit im ähnlichen Ausmaß wie CF und BF inhibieren. Trotz der vergleichbaren IIvB1-Hemmung sind 1g und 1h keine Wachstumsinhibitoren von Mt. Dieser Befund ist interessant, da sich die physikochemischen Eigenschaften von 1g, 1h, CF und BF nicht wesentlich unterschieden und auch die chemische und metabolische Stabilität vergleichbar sein sollte. Eine eingehendere Analyse und Vergleich von weiteren physikochemischen und pharmakokinetische Eigenschaften insbesondere Permeabilität könnten weitere Erklärungen zum Verlust der wachstumshemmenden Aktivität von 1g und 1h liefern. Zurzeit deuten die Ergebnisse auf eine substratspezifische Aufnahme von CF und BF hin.

Neben dem 3-Ethoxy-Substituten (**1h**) wurde auch ein sterisch anspruchsvollerer 3-Isopropoxy-Substituent (**1i**) eingeführt, welches zu einem Aktivitätsverlust gegen IIvB1 führte (Tabelle 10). Bei Vergrößerung des Ethoxy-Substituenten um eine Hydroxy- (**1j**) oder Dimethylaminogruppe (**1k**), wird steigt die Hemmung der katalytischen Aktivität von IIvB1 auf über 90 % (Tabelle 10). Dies könnte auf eine schmale Seitentasche in der Nähe der 3-Position hindeuten, welche durch lineare 3-Substituenten (**1h**, **1j-k**) adressiert werden kann. Dass allerdings auch **1h** und **1j-k** keine mykobakterielle Wachstumshemmung zeigen, stützt die Hypothese, dass **BF** und **CF** im Gegensatz zu den Analoga **1h** und **1j-k** aktiv aufgenommen werden.

berechnete cLogP-werte w	berechnete cLogP-weite von 5-Alkoxy-substituiene DF -Analoga.							
			Y ⁰ , CH₃		Y ⁰ ~0+	, ↓ 0, № , С H ₃		
Br	BF	1m	1h	1i	1j	1k		
MHK ₉₀ [μM]	0.78	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100		
IIvB1 Inhibition [%]	> 90	≤ 50	> 90	≤ 50	> 90	> 90		

100

3.42

100

2.63

3.70

100

3.17

THP-1 IC₅₀ [µM]

cLogP

> 100

3.09

3.69

 Tabelle 10: Inhibition des *Mt* Wachstums, der IlvB1-Aktivität, Zytotoxizität gegenüber THP-1 Zellen sowie

 berechnete cLogP-Werte von 3-Alkoxy-substituierte **BF**-Analoga.

Mit dem Austausch der 3-Methoxygruppe gegen eine 3-Difluormethoxygruppe (**1m**) wurde eine Modifikation mit gleichem sterischen Anspruch vorgenommen, die zur Erhöhung der metabolischen Stabilität führt.^{315,316,318} Zudem können Difluormethoxygruppen als lipophiler Wasserstoffbrücken-Donatoren fungieren.^{319,320} Sollte die OCF₂H-Gruppe in Verbindung **1m** ausreichend acide sein, könnte die Salzbrücke zu Lys197 im Vergleich zu **BF** verstärkt sein. Da Verbindung **1m** jedoch mit unter 50 % eine signifikante Reduktion der IIvB1-Inhibition aufweist, stellt dies die postulierte Salzbrücke zu Lys197 in Frage. Wie bereits im vorherigen Kapitel 5.6.1.1 angeführt, ist zur Untersuchung der postulierten Salzbrücke zu Lys197 eine Co-Kristallstruktur essentiell.

Zusammenfassend zeigen einige Inhibitoren mit größeren Substituenten (**1g**, **1h**, **1j**, **1k**) i 3-Position zwar eine Inhibition der IIvB1-Aktivität, führen jedoch zu einer Reduktion der Wachstumshemmung von *Mt*. Diese Disparität muss im Zuge der weiteren präklinischen Entwicklung eingehender untersucht werden.

5.6.1.3. Evaluation der A-Ring-Analoga

Die *Docking*-Experimente postulieren eine Wasserstoffbrückenbindung der 5-Hydroxygruppe zum Rückgrat von Phe147. Um diese Interaktion zu untersuchen, wurde dieser zunächst durch ein elektronisch neutrales Wasserstoffatom ersetzt (**7b**, Tabelle 11).

Tabelle 11: Inhibition des *Mt* Wachstums, der IIvB1-Aktivität, Zytotoxizität gegenüber THP-1 Zellen sowie cLogP-Werte von **BF** und **BF**-Analoga **7b** und **9c** mit Variation der 5-Position.

	$H_{3}C_{0}$	$H_3C_0 \rightarrow H_3C_0 + H$	$H_{3}C_{0} \rightarrow H_{3}C_{0} \rightarrow H_{3}C_{0} \rightarrow H_{3}C_{0} \rightarrow H_{0} \rightarrow H_{1}C_{1} \rightarrow H_{1}C_{$
	7b	BF	9c
MHK ₉₀ [μM]	100	0.78	50
llvB1 Inhibition [%]	50-75	> 90	> 90
THP-1 IC₅₀ [μM]	-	> 100	-
cLogP	3.29	3.09	2.87

Dabei zeigte sich neben dem Verlust der inhibitorischen Wirkung gegen *Mt* (MHK₉₀ = 100 μ M) auch eine Reduktion der IlvB1-Inhibition auf 50 % bis 75 %. Die Ergebnisse des Docking-Experimentes postulieren eine Wasserstoffbrückenbindung der 5-Hydroxygruppe von CF zum Rückgrat von Phe147 sowie eine Kationen- π -Interaktion des A-Rings mit Arg318. Die 5-Hydroxygruppe führt aufgrund des positiven mesomeren Effektes zur Erhöhung der Elektronendichte im Aromaten und könnte die Kationen-π-Interaktion des A-Ringes zu Arg318 verstärken. Um weiterführend zu untersuchen, ob die Wasserstoffbrückenbindung der 5'-Hydroxygruppe und die Kationen- π -Interaktion essentiell ist, wurde die 5'-Hydroxygruppe durch eine Aminogruppe substituiert (9c, Tabelle 11). Hydroxy- und Aminogruppen können als Biosostere fungieren, da beide sowohl Wasserstoffbrücken-Akzeptoren als auch -Donatoren sind.³⁸¹ Mit einem VDW von 1.79 Å ist die Aminogruppe größer als die Hydroxygruppe (1.53 Å)³⁸¹, bei einer deutlich reduzierten EN des Stickstoffs von 2.61 im Vergleich zum Sauerstoff der Hydroxygruppe mit einer EN von 3.51.³⁷⁶ Sowohl Bromflavonin als auch das Analogon mit 5-Aminogruppe (9c) sind potente Inhibitoren von IlvB1. Die Verbindung 9c zeigt mit einem MHK₉₀-Wert von 50 µM eine schwache antimykobakterielle Wirkung (Tabelle 11). Auch in diesem Fall scheint die Aufnahme bzw. Permeabilität ein zentrales Problem zu sein.

H ₃ C ₀ CH ₃		∧N, CH3	∧N ^O L _{CF3}	CH3 CH3 CH3	CH3 OCH3
H ₃ C ^{-O} HO ⁻ Br	BF	9d	9e	9b	9f
MHK ₉₀ [μM]	0.78	> 100	> 100	> 100	> 100
IIvB1 Inhibition [%]	> 90	≤ 50	-	-	-
cLogP	3.09	3.09	3.85	4.14	3.62

Tabelle 12: Inhibition des *Mt* Wachstums, der IIvB1-Aktivität, Zytotoxizität sowie cLogP–Werte von 5-substierten **BF**-Analoga.

Zur weiteren Untersuchung der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen wurde die 5-Aminogruppe von **9c** acetyliert (**9d**), trifluoracetyliert (**9e**) und tosyliert (**9b**) sowie durch einen 5-Acrylmethylester-Substituenten ersetzt und im Ganzzellassay untersucht (Tabelle 12). Alle vier Verbindungen zeigen keine Hemmung des *Mt* Wachstums (Tabelle 12).

Als einzige Verbindung dieser Reihe wurde **9d** auch auf seine IIvB1-Inhibition hin untersucht und war inaktiv. Auch wenn Anilide potentielle Prodrug-Strukturelemente (*Promoieties*) für aromatische Amine sind, ist deren therapeutische Anwendung als *Promoieties* aufgrund der sehr guten chemischer und metabolischen Stabilität dieser Stoffklasse und damit geringer Freisetzung der Wirkform begrenzt.^{385,386} Während der Durchführung des IIvB1-Assays ist eine enzymkatalysierte Aktivierung des Acetamids **9d** durch Carboxylesterasen³⁸⁷, Peptidasen oder Proteasen³⁸⁸ zum Amin **9c** nicht zu erwarten. Ebenso hydrolysieren Acetamide unter den Assay-Bedingungen bei pH 6.6 innerhalb einer halben Stunde nicht signifikant.³⁸⁵ Daraus ist abzuleiten, dass das Amid **9d** selbst kein Inhibitor von IIvB1 darstellt.

Die **BF**-Analoga **9b**, **9e** und **9f** waren im Ganzzellassay inaktiv, während die Evaluation der IIvB1-Inhibition noch aussteht (Tabelle 12). Da die bisherigen Ergebnisse illustrieren, dass bereits sechs Verbindungen (**AB1**, **1g-h**, **1j-k** und **9c**) potente IIvB1-Inhibitoren sind, ohne das Wachstum der Mykobakterien einzuschränken, muss die IIvB1-Inhibition von **9b**, **9e** und **9f** bestimmt werden, um diese Verbindungen in die SAR einzubeziehen.

Abschließend sollte die Rolle der Methoxy-Substituenten in 7- und 8-Position untersucht werden, weil die *Docking*-Experimente eine Kationen-π-Interaktion des A-Ringes mit Arg318 postulieren (Tabelle 13).⁶ Diese Interaktion kann durch Variation der Substituenten am A-Ring beeinflusst werden.
$R^1 \xrightarrow{OH} O \\ R^2 \xrightarrow{HO} \\ Br$	$H_{3}C_{0}$ $H_{3}C^{0}$ $H_{3}C^{0}$ BF	$H_{3}C_{0} \xrightarrow{OH}_{CH_{3}}$	H H H H
ΜΗΚ 90 [μ Μ]	0.78	> 100	> 100
IIvB1 Inhibition [%]	> 90	-	≤ 50
THP-1 IC₅₀ [µM]	> 100	-	-
cLogP	3.09	3.45	3.11

Tabelle 13: Inhibition des *Mt* Wachstums, der IIvB1-Aktivität, Zytotoxizität gegenüber THP-1 Zellen sowie cLogP-Werte von **BF** und **BF**-Analoga mit variiertem Substitutionsmuster am A-Ring.

Zur Verstärkung der Kationen- π -Interaktion, sollte das π -Systems des A-Rings möglichst elektronenreich sein. Methoxy-Substituenten weisen einen positiven mesomeren Effekt auf, durch welchen die π -Elektronendichte im A-Ring erhöht wird. **BF** ist mit den beiden Methoxygruppen in 7- und 8-Position ein potenter IIvB1-Inhibitor. Dagegen hemmt das Analogon **1r** mit Wasserstoffatomen in 7- und 8-Position IIvB1 nicht (Tabelle 13). Wasserstoffatome weisen keinen mesomeren oder induktiven Effekt auf, sodass der A-Ring nicht besonders elektronenreichen ist.

Bei dem Analogon **1q** wurde der 8-Methoxy- durch einen 8-Methyl-Substituenten ersetzt. Methylgruppen erhöhen die Elektronendichte eines Aromaten durch ihren positiven induktiven Effekt nur schwach im Vergleich zum positiven mesomeren Effekt einer Methoxygruppe. Um die Hypothese, dass ein elektronenreicher A-Ring sei für eine potente IlvB1-Inhibition notwendig ist, zu unterstützen, sollte die Aktivität von **1q** im Vergleich zu **BF** reduziert sein. Die Evaluation der IlvB1-Inhibition von **1q** ist zum jetzigen Zeitpunkt noch ausstehend.

5.6.2. Physikochemische Eigenschaften

Da die antimykobakteriellen Eigenschaften der Leitstrukturen sehr vielversprechend sind, sollten die Wasserlöslichkeit und die pK_s-Werte als physikochemische Parameter der Leitstrukturen bestimmt werden, damit diese im weiteren präklinischen Optimierungsprozess neben der Aktivität gezielt verbessert werden können.

Die Wasserlöslichkeit eines Arzneistoffes spielt bei oraler Applikation eine zentrale Rolle, um die gewünschte Konzentration des Arzneimittels im systemischen Kreislauf zu erreichen und die erforderliche pharmakologische Wirkung zu erzielen.³⁸⁹⁻³⁹¹ Folglich sollte die Wasserlöslichkeit der Leitstrukturen mit einer validierten Methode untersucht werden und die Wasserlöslichkeit ausgewählter IIvB1-Inhibitoren in Relation zu den Leitstrukturen gesetzt werden.

Des Weiteren sollten die pK_s-Werte der Leitstrukturen mittels ¹H-NMR-Titration bestimmt werden, um die mögliche Dissoziation der phenolischen 2'-Hydroxygruppe von Chlor- und Bromflavonin im Nährmedium (pH 6.6) und unter physiologischen Bindungen (pH 7.4) sowie deren Vermögen die postulierte Salzbrücke zu Lys197 auszubilden, abzuschätzen.

<u>Methoden</u>

Die **Löslichkeitsmessungen** von Chlor- und Bromflavonin wurden in Kooperation von dem Drug Discovery and Development Centre (H3D), University of Cape Town, Südafrika von DR. VINAYAK SINGH, DR. MATHEW NJOROGE und PROF. DR. KELLY CHIBALE durchgeführt. Die Löslichkeitsmessungen erfolgten bei einem pH-Wert von 6.5 mittels angepasster miniaturisierter Schüttelmethode im 96-Well-Plattenformat.³⁹² Die Durchführung und Auswertung wurden bereits beschrieben und die Ergebnisse publiziert.³¹³

Die **relativen Löslichkeitsbestimmungen** von den Bromflavonin-Analoga (**9c, 1g, 7d**) erfolgte in Kooperation mit DR. MOHANRAJ GOPALSWAMY aus der Arbeitsgruppe von PROF. DR. HOLGER GOHLKE am Forschungszentrum Jülich GmbH.

Die ¹H-NMR-Spektren wurden bei 298 K mit einem Bruker Avance III HD Spektrometer bei 600 MHz aufgenommen. Das H₂O-Signal wurde mittels Anregungs-Sculpting mit Gradient unterdrückt. Die Basislinie wurde vor Integration der Signale korrigiert. 3-(Trimethylsilyl)-1-Propansulfonsäure-Natrium (DSS) wurde als interner Standard für die chemische Verschiebung (δ = 0 ppm) verwendet und das Integral des Signals auf 10.0 H normiert.

Von den Testverbindung wurde jeweils eine 250 μ M Stammlösung in DMSO-d₆ hergestellt und 40 μ L dieser Stammlösung zu 360 μ L einer Stammlösung bestehend aus 50 mM Kaliumhydrogenphosphat-Puffer (pH 7.4), 10 % (*v*/*v*) D₂O und 0.01 % 3-(Trimethylsilyl)-1-Propansulfonsäure-Natrium in ein Eppendorf Tube gegeben. Die Suspensionen wurden 3 h lang bei 37 °C auf einem Kreisschüttler (250 min⁻¹) geschwenkt. Anschließend wurden die Suspensionen zentrifugiert, 200 μ L der überstehenden Lösung in ein NMR-Tube überführt und das ¹H-NMR-Spektrum aufgenommen. Die relative Auswertung der Löslichkeiten erfolgte durch den Vergleich der Integrale der aromatischen Protonen der Testverbindungen in Relation zu Bromflavonin.

Die Bestimmung der pK_s -Werte erfolgte mittels ¹H-NMR-Titration in Kooperation mit DR. MOHANRAJ GOPALSWAMY aus der Arbeitsgruppe von PROF. DR. HOLGER GOHLKE am Forschungszentrum Jülich GmbH. Die Berechnung der pK_s-Werte wurde von Dr. GOPALSWAMY vorgenommen. Es wurden 23 Proben mit jeweils einer Konzentration von 200 μ M von Chlor- und Bromflavonin hergestellt, deren pH-Wert von 2.0 bis 13.0 in 0.5 log-Stufen variierte. Die Durchführung wurde bereits beschrieben.³¹³



Abbildung 25: Markierung der Reporterprotonen A (blau) und B-D (rot) in Ausschnitten der ¹H-NMR-Spektren von Chlor- (blau) und Bromflavonin (rot) im Bereich mit einer chemischen Verschiebung von δ 6.5-12.5 aufgenommen in DMSO- d_{δ} (289 K, 300 MHz).

Zur Bestimmung des pK_S-Wertes der 2'-Hydroxygruppe wurden die chemischen Verschiebungen der Signale der Protonen B-D und für die 5-Hydroxygruppe die chemischen Verschiebungen des Protons A herangezogen (Abbildung 25). Die pK_S-Werte wurden aus den chemischen Verschiebung der assoziierten und dissoziierten Form und deren korrespondierenden Stoffmengenanteile mittels HENDERON-HASSELBALCH-Gleichung nach einer Methode von GIFT *et al.*³⁹³ berechnet. Die Graphen wurden mit der Origin Software (Origin Pro 2019, v9.6.0.172, OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) erstellt. Diese Ergebnisse wurden bereits publiziert.³¹³

<u>Ergebnisse</u>

Die Bestimmung der Wasserlöslichkeit von Chlor- und Bromflavonin mittels miniaturisierter Schüttelmethode konnte nicht vorgenommen werden, da die Wasserlöslichkeit der Verbindung unterhalb der Nachweisgrenze von 5 µM, also unter 0.002 g/L lag (Tabelle 15). Somit werden beide Wirkstoffe nach *Pharmacopoea Europaea* (Ph.Eur.) und *United States Pharmacopeia* (USP) als "praktisch unlöslich" eingestuft. Die Wasserlöslichkeit von mehr als 40 % der zugelassenen Arzneimittel wird allerdings als "praktisch unlöslich" eingestuft.^{394,395}



Abbildung 26: ¹H-NMR-Spektren der Verbindungen **BF** (violett), **9c** (blau), **1g** (grün) und **7d** (rot) in Kaliumhydrogenphosphat-Puffer bei einem pH-Wert von 7.4 (298 K, 600 MHz) unter Verwendung von 3-(Trimethylsilyl)-1-Propansulfonsäure-Natrium als internem Standard.

Zur Beurteilung der Löslichkeiten wurde zunächst ein ¹H-NMR-Spektrum von **BF** in Kaliumhydrogenphosphat-Puffer bei einem pH-Wert von 7.4 aufgenommen (Abbildung 26). Die Signale von **BF** waren erst bei 20-facher Vergrößerung sichtbar, was die schlechte Wasserlöslichkeit bestätigt (Abbildung 26). Die Verbindung **1g** mit einer zusätzlichen Hydroxygruppe zeigte eine deutlich verbesserte Löslichkeit um etwa Faktor 415 (Tabelle 14).

	H ₃ C ₀ H ₃ C ⁰ H ₃ C ⁰ H ₀ H ₀ H ₁ C ¹ H	H ₃ C O HO H ₃ C Br	H ₃ C ₀ H ₃ C ⁰ H ₀ Br
Verbindung	9c	1g	7b
Löslichkeitsverbesserung um Faktor ^a	915 ± 230	415 ± 102	4106 ± 1060

Tabelle 14: Löslichkeitsverbesserungen der Verbindungen 9c, 1g und 7b im Vergleich zu BF.

^a Mittelwerte ± Standardabweichung (n=4) nach der Formel Faktor = <u>Integral eines Protons</u> <u>Korrespondieres Integral von BF</u>

Die Verbindung **9c** mit einer 5-Aminogruppe anstatt der 5-Hydroxygruppe war um etwa Faktor 915 besser wasserlöslich als **BF** (Abbildung 26 und Tabelle 14). Obwohl die Verbindung **7d** keinen Wasserstoffbrückendonator oder –akzeptor in 5-Position aufweist, ist diese Verbindung von den untersuchten IIvB1-Inhibitoren die am besten wasserlösliche Verbindung (Abbildung 26 und Tabelle 14). Die intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung zwischen der 5-Hydroxygruppe und dem Carbonylsauerstoff führt zu einer starken intermolekularen Anziehung und damit schlechten Wasserlöslichkeit wie sie bereits für Flavonoide beschrieben wurde.³⁹⁶

Die ¹H-NMR-Titration (Abbildung 27) ergab, dass der pK_s -Wert der 2'-Hydroxygruppe bei 6.74 für Bromflavonin und 6.80 für Chlorflavonin liegt (Tabelle 15). Somit liegen die Verbindungen im Nährmedium von *M. tuberculosis* bei einem pH-Wert von 6.6 annährend zu 50 % dissoziiert vor.

	Chlorflavonin	Bromflavonin
pK _{S1} (2'-OH)	6.80 ± 0.07	6.74 ± 0.04
рК _{S2} (5-ОН)	10.40 ± 0.03	10.30 ± 0.04



Abbildung 27: ¹H-NMR-Titration von Chlorflavonin.

 (A) Ausschnitt des ¹H-NMR-Spektrums von Chlorflavonin (1a) bei einer chemischen Verschiebung von δ6.00-8.00 bei pH-Werten von 2.5-12.5. A-D sind die vier aromatischen Protonen. (B) Titrationskurven (Chemische Verschiebung im ¹H-NMR Spektrum gegen pH-Wert) der vier aromatischen Protonen A-D, welche mit der Origin Software (OriginLab Corporation, USA) berechnet wurden.

5.6.3. Chemische und metabolische Stabilität

In der (prä-)klinischen Entwicklung ist die chemische Stabilität ein zentraler Aspekt, um die Qualität, Wirksamkeit und Unbedenklichkeit eines Arzneimittels zu gewährleisten.^{397,398} Darunter versteht man die Fähigkeit einer Verbindung, beliebig lange im Festkörper oder in Lösung unverändert bestehen zu können. Darüber hinaus ist die metabolische Stabilität ist ein wichtiger Aspekt bei der Entwicklung von Arzneimitteln. Sie bezieht sich auf die Fähigkeit von Verbindungen, durch den humanen oder pathogenen Stoffwechsel nicht verändert zu werden.^{397,398} Diese metabolische Beständigkeit müssen Wirkstoffe gegenüber den humanen und bei Infektionserkrankungen pathogenen Stoffwechselprozessen aufweisen. Für die in vitro metabolischen Stabilität werden Mikrosomen Bestimmung der als Enzymquelle herangezogen, da diese die wichtigsten Enzyme des Arzneimittelstoffwechsels wie beispielsweise Cytochrom P450 (CYP) und UDP-Glucuronosyltransferase (UGT) exprimieren.³⁹⁹

Die Evaluation der metabolischen Stabilität liefert entsprechende Informationen über die intrinsische Clearance, die wiederum zur Berechnung von weiteren pharmakokinetischen Parametern wie der Bioverfügbarkeit und der Halbwertszeit genutzt werden kann. Da diese Parameter für die Bewertung von Arzneimitteln und die Compliance der Patienten von großer Bedeutung sind, ist die Optimierung der chemischen und metabolischen Stabilität ein zentraler Aspekt der präklinischen Wirkstoffentwicklung.⁴⁰⁰

<u>Methode</u>

Die Bestimmung der **chemischen Stabilität** von **CF** und **BF** wurde von DR. BERGER im Rahmen seiner Promotion nach einer Vorschrift von LEVEN *et al.* durchgeführt.⁴⁰¹ Die Stabilitätsmessung erfolgte bei 20 °C in Phosphatpuffer bei pH-Werten von 7.4 und 2.0, die nach Herstellungsvorschriften der Ph. Eur. 10.1 hergestellt wurden.

Die Probenvorbereitung erfolgte, indem 0.4 mg Testsubstanz in 0.25 mL einer Formulierung aus Tween® 20 und Ethanol (7/3 v/v) gelöst und mit 1.75 mL des respektiven Phosphatpuffers versetzt wurde. Diese Stammlösung wurde kontinuierlich auf dem IKA KS 260 basic Kreisschüttler (250 min⁻¹) bei 25 °C geschwenkt und nach 1, 3, 6, 24 und 48 h deren Reinheit mittels HPLC-UV/Vis (254 nm, n=1) unter Anwendung eines Normalisierungsverfahrens bestimmt. Diese Ergebnisse wurden bereits publiziert.³¹³

Die **metabolische Stabilität in** *M. tuberculosis* **Zellen** erfolgte durch das Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf von DR. ANNA-LENE KIFFE-DELF und PROF. DR. RAINER KALSCHEUER mittels Stabilitätsassay. Eine wachsende *M. tuberculosis* H37Rv Zellkultur wurde wie bereits beschrieben behandelt³⁶⁹ und jeweils die Testsubstanz **CF** und **1g** zugegeben, sodass eine 100 µM Lösung der

Testsubstanz in der Zellkultur entstand. Als Negativkontrolle wurde **CF** ohne Mykobakterien im Nährmedium vermessen. Die Bestimmung der Metaboliten erfolgte nach 0, 24, 72 und 196 h nach entsprechender Probenvorbereitung mittels HPLC-UV/Vis (340 nm, n=1). Diese Daten wurden bereits von DR. KIFFE-DELF in ihrer Dissertation veröffentlicht.³⁶⁹

Der **metabolische Stabilität in Lebermikrosomen** wurde in Kooperation von dem Drug Discovery and Development Centre (H3D), University of Cape Town, Südafrika von DR. VINAYAK SINGH, DR. MATHEW NJOROGE und PROF. DR. KELLY CHIBALE mit einem Ein-Punkt-Test nach DI *et al.* durchgeführt.^{313,402} Die Halbwertszeit, die Clearance und das Verhältnis der hepatischen Ausscheidung wurden anhand von Standardgleichungen nach DI *et al.* und OBACH *et al.* bestimmt.^{402,403} Diese Ergebnisse wurden bereits publiziert.³¹³

Ergebnisse

Die physikochemische Evaluation zeigte, dass sowohl Chlor- als auch Bromflavonin in wässriger Lösung unter physiologischen Bedingungen des Blutes bei pH 7.4 und im sauren Milieu des Magens bei pH 2.0 über einen Zeitraum von 48 h bei 20 °C stabil sind (Tabelle 16).

Tabelle 16: Chemische Stabilität von Chlor- und Bromflavonin.

	Chlorflavonin	Bromflavonin
Chemische Stabilität pH 7.4ª	> 99 %	> 99 %
Chemische Stabilität pH 2.0ª	> 99 %	> 99 %

^a 0.4 mg Substanz wurde in einer Formulierung aus Tween ® 20, Ethanol und Phosphat-Puffer gelöst und die Reinheit bei 254 nm nach 0, 1, 3, 6, 24 and 48 h mittels HPLC bestimmt.

Die metabolische Stabilität von Chlorflavonin und dem strukturell sehr ähnlichen 3-Ethoxy-Analogon **1g** bei Inkubation mit *M. tuberculosis* Zellen wurde über einen Zeitraum von 8 Tagen untersucht. Es zeigte sich, dass sich im HPLC-Chromatogramm beider Substanzen, dass nach 8 Tagen Inkubation eine Substanz gebildet hat, die nicht in der Blindprobe vorhanden war und auf einen Metaboliten oder ein Zersetzungsprodukt von **CF** und **1g** hindeutet. Folglich könnte *Mt* in der Lage sein, **CF** und **1g** in einem sehr langsamen Prozess abzubauen. Diese mögliche langsame Metabolisierung hat keinen Einfluss auf die gemessenen MHK₉₀-Werte. Dieser Rückschluss wird zudem dadurch unterstützt, dass Chlorflavonin einen bakteriostatischen Effekt gegenüber *Mt* aufweist, der über einen Zeitraum von drei Wochen stabil war.⁶

Die metabolische Stabilität von Chlor- und Bromflavonin in Lebermikrosomen von Mensch, Ratte und Maus ist in Tabelle 17 zusammengefasst.

Verbindung	Lebermikrosomen- spezies ª	Verbleibende Verbindung nach 30 min [%]	Vorhergesagte <i>in</i> <i>vivo</i> intrinsische Clearance ^b (CL _{int, app}) [mL/min/mg]	Hepatisches Extraktionsverhältnis (Е _Н) ^ь
Chlorflavonin	Mensch	48	76.3	0.78
	Ratte	50	103	0.55
	Maus	47	250	0.74
	Mensch	60	53.4	0.72
Bromflavonin	Ratte	41	134.5	0.61
	Maus	45	261.3	0.74

Tabelle 17: Mikrosomale Stabilität von Chlor- und Bromflavonin.

^a Die Testverbindungen wurde in einer Konzentration von 1 μM in Leber Mikrosomen von Mensch, Ratte und Maus (0.4 mg/mL) für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden mittels LC-MS/MS hinsichtlich der Abnahme der Testsubstanz untersucht. ^b Halbwertszeit, Clearance und hepatische Extraktionsverhältnis wurden mit Hilfe von Standardgleichungen nach DI *et al.* und OBACH *et al.* berechnet.^{402,403}

Der prozentuale Anteil der Verbindungen nach 30 Minuten Inkubationszeit lag im Fall von **CF** bei 47 % bis 50 % und von **BF** bei 41 % bis 60 %. Um die Konsequenzen der moderaten *in vitro* metabolischen Stabilität besser beurteilen zu können, sollten die Metaboliten identifiziert werden, da es sich bei den Metaboliten sowohl um inaktive als auch potente(re) Verbindungen handeln könnte. Zudem ermöglicht die Identifikation der Metaboliten eine zielgerichtete Optimierung der metabolisch-instabilen funktionellen Gruppen und Strukturelemente im weiteren Prozess der präklinischen Strukturoptimierung.

6. Ergebnisse und Diskussion der Synthese und präklinischen Evaluation von β -thia-isosteren Fosmidomycin-Analoga

Bisher wurden, wie in Kapitel 2.4.3 ausführlich beschrieben, umfangreiche Untersuchungen der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von Fosmidomycin-Analoga anhand der Inhibition von M. tuberculosis, E. coli und P. falciparum DXR sowie bakteriellem und plasmodialem Wachstum aufgestellt. Zwar zeigten einige Verbindungen, darunter die α -Phenylphosphonohydroxamsäuren **CL1** und **CB1**, nanomolare Inhibition der DXR-Orthologe, allerdings vermögen diese Inhibitoren nicht das Wachstum von Bakterien zu hemmen (Tabelle 18). Mit dem neuen Verbindungstyp MAMK89 konnte von der KURZ Gruppe ein Inhibitor identifiziert werden, der EcDXR und PfDXR im nanomolaren Bereich inhibiert und dabei signifikant lipophiler (\triangle clogP \approx 2) ist als die Verbindung CL1 und CB1.

HO,		HO U O O HO HO CH ₃	HO,	
	CL1 ^a	CB1 ^a	MAMK89 ^b	
IC ₅₀ <i>Mt</i> DXR [nM] ^c	3.1	200	3000	
IC ₅₀ <i>Ec</i> DXR [nM] ^c	8.2	243	35	
IC ₅₀ <i>Pf</i> DXR [nM] ^d	24	24	30	
cLogP ^e	0.16	0.24	2.13	

Tabelle 18: IC50-Werte der Leitstrukturen gegenüber MtDXR, EcDXR und PfDXR sowie cLogP-Werte.

^{*a*} entnommen von KUNFERMANN *et al.*²³⁵; ^{*b*} entnommen von ABDULLAZIZ *et al.*²³⁴; ^{*c*} n = 2; ^{*d*} n = 3; ^{*e*} berechnet mit SwissADME.³⁷⁰

Durch die erhöhte Lipophilie von **MAMK89** könnte der Inhibitor in der Lage sein, die Zellwand von GRAM-negativen Bakterien oder Mykobakterien zu überwinden. Allerdings zeigte **MAMK89** mit einem IC₅₀-Wert von 3000 nM einen rapiden Aktivitätsverlust gegenüber *Mt*DXR. Da die Einführung eines Schwefelatoms in β -Position des Linkers (**CL1**) zu einer 64-fachen Steigerung der *Mt*DXR-Inhibition im Vergleich zum entsprechenden Carba-Analogon **CB1** führt, sollte das entsprechende β -thia-isosteres Analogon von **MAMK89** dargestellt werden. Der neue lipophile β -thia-isostere Verbindungstyp (Strukturtyp 1) könnte ebenso wie mutmaßlich **MAMK89**, aufgrund der erhöhten Lipophilie die passive Diffusion ins Zytosol der Bakterien fördern. Zu diesem Zweck sollte eine neue Synthesestrategie etabliert werden, die die effiziente Darstellung β -thia-isosterer Fosmidomycin-Analoga mit *N*-substituierter Hydroxamsäuregruppe erlaubt.

6.1. Darstellung β-thia-isosterer Fosmidomycin-Analoga des Strukturtyps 1

Um eine optimierte Synthesestrategie zur Darstellung der β -thia-isosteren Fosmidomycin-Analoga mit *N*-Arylalkyl-substituierter Hydroxamsäuregruppe (Strukturtyp 1, Schema 70) zu etablieren, sollte die Carbonsäure **LXVIII** als Schlüsselintermediat dargestellt werden. Das Entfernen der Phosphonsäureethylester-Schutzgruppe sollte möglichst im letzten Schritt erfolgen, da die freien Phosphonsäuren hydrophil sind und einer säulenchromatographischen Isolierung mittels Umkehrphase erfordern (Schema 70, **A**). Die Synthese der *O*-geschützten Hydroxamsäuren **CXV** sollte ausgehend von der Carbonsäure **LXVIII** und *O*-geschützten *N*-Arylalkylhydroxylaminen **CXVII** erfolgen, sodass das Entfernen der Hydroxamsäure-Schutzgruppe unmittelbar vor der Entschützung der Phosphonsäure erfolgen kann (Schema 70, **A**).



Schema 70: Retrosynthese zur Darstellung *N*-Arylalkyl-substituierter β-thia-isosteren Fosmidomycin-Analoga vom Strukturtyp 1. Discon. = engl. disconnection = Bindungsbruch, FGI = engl. functional group interconversion = Umwandlung einer funktionellen Gruppe, SG = Schutzgruppe.

Zum Aufbau einer Hydroxamsäuregruppe kann eine Carboxylgruppe mittels Kupplungsreagenz aktiviert und anschließend im Basischen mit einem Hydroxylamin versetzt werden. Problematisch ist die partielle Deprotonierung der Hydroxygruppe des Hydroxylamins im basischen Milieu, welche in Konkurrenz zum Hydroxylamin die aktivierte Carboxylgruppe angreifen kann. Um diese Nebenreaktion zu unterdrücken, erscheint die Verwendung einer

Schutzgruppe für die Hydroxygruppe des Hydroxylamins **CXVII** wie Benzyl (Bn), Tetrahydropyranyl (THP) oder Triphenylmethyl (Trityl) sinnvoll (Schema 70, **A**).

Die Synthese der Carbonsäure **LXVIII** sollte ebenfalls in Anlehnung an die etablierte Syntheseroute 2 (Schema 31) von LIENAU möglich sein, wobei auf eine Isolierung der α -Mercaptophosphonate **LXV** verzichtet werden sollte (Schema 70, **B**). In der angestrebten konsekutiven Ein-Topf-Reaktion sollte die TMS-Schutzgruppe der Carbonsäure **CXVI** durch salzsaure Aufarbeitung entfernt werden. Die *S*-Alkylierung mit TMS-Bromacetat (**CXVII**) sollte ebenfalls im Ein-Topf-Verfahren erfolgen.

Zur Darstellung *O*-geschützter *N*-Arylalkylhydroxylamin Hydrochloride **CXVII** sollte die Hydroxylamin-Funktionalität einfach geschützt sein, damit eine Zweifach-Alkylierung der Hydroxylamin-Funktionalität vermieden wird. Ausgehend von kommerziell erhältlichen *O*-geschützten Hydroxylaminen **CXXI** können diese mit Di-*tert*-butyldicarbonat (Boc₂O) einfach zu den Intermediaten **CXX** geschützt und anschließend im Basischen mit Arylalkylhalogeniden zu **CXIX** alkyliert werden (Schema 70, **C**). Das Entfernen der Boc-Schutzgruppe liefert die entsprechenden *O*-geschützten *N*-monoalkylierten Hydroxylamin Hydroychloride **CXVII** (Schema 70, **C**).

6.1.1. Darstellung der Carbonsäure 13 und *O*-Benzyl-*N*-(3-phenylpropyl)hydroxylamin Hydrochlorid 17

Für den ersten Schritt zur Darstellung der Carbonsäure **13** wurde eine etablierte Vorschrift von MIKOLAJCZYK *et al.* genutzt.²⁷⁹ Diethylbenzylphosphonat (**10**) wurde mittels *n*-Butyllithium bei -78 °C in THF zum Benzylanion deprotoniert und mit elementarem Schwefel versetzt (Schema 71).



Schema 71: Synthese der Carbonsäure 13 im konsekutiven Ein-Topf-Verfahren. (a) i) 1.10 Äq. *n*-BuLi, 0.125 Äq. S₈, THF, -78 °C, 1 h; ii) -20 °C, 1 h; iii) RT, 1 h (b) 1.60 Äq. TMS-Bromacetat, 1.00 Äq. K₂CO₃, 0 °C, 1 h; (c) 1 м HCl_(aq.).

Durch einen nukleophilen Angriff des Carbanions an Schwefel entsteht das Thiolat **11**. Langsames Erwärmen auf -20 °C führt zur allmählichen Erhöhung der Löslichkeit des Schwefels, sodass die Bildung von Disulfiden als mögliche Nebenreaktion unterdrückt wird.²⁷⁹ Nach Erwärmen auf Raumtemperatur wurden dem Ansatz ein Äquivalent Kaliumcarbonat sowie tropfenweise Trimethylsilylbromacetat, welches kommerziell verfügbar ist, zugegeben. Das Thiolat **11** vermag das Bromid in einer S_N2-Reaktion nukleophil zu substituieren, sodass die TMS-geschützte Carbonsäure **12** *in situ* erhalten werden konnte (Schema 71). Nachdem der Ansatz 1 h lang gerührt wurde bei 0° C 1 M Salzsäure zugegeben, welche zur Hydrolyse des Silylesters führte, sodass die Carbonsäure **13** nach Säure-Base-Extraktion in einer Gesamtausbeute von 57 % über drei Schritte gewonnen werden konnte (Schema 71). Die neuetablierte konsekutive Ein-Topf-Reaktion ermöglicht die Synthese und Aufarbeitung des Schlüsselintermediates **13** ausgehend von kommerziell verfügbaren und günstigen Edukten innerhalb von 5 h im Multigramm-Maßstab.



Schema 72: Darstellung von *O*-Benzyl-*N*-(3-phenylpropyl)hydroxylamin Hydrochlorid (17). (a) 1.10 Äq. Boc₂O, 1.10 Äq. Et₃N, EtOH, RT, 16 h; (b) 1.00 Äq. NaH, 1.00 Äq. 1-Brom-3-Phenylpropan, THF, N₂, 0 °C – RT, 16 h; (c) 10.0 Äq. 4 м HCl/Dioxan, Et₂O, RT, 16 h.

Die Synthese von O-Benzyl-N-(3-phenylpropyl)hydroxylamin Hydrochlorid (17) erfolgte in Anlehnung an die Syntheseroute von ABDULLAZIZ et al. (Schema 72).234,404 Ausgehend von O-Benzylhydroxylamin (14) wurde die Mono-Boc-Schützung in Ethanol mit Triethylamin als Hilfsbase durch portionsweise Zugabe von Di-tert-butyldicarbonat durchgeführt, um eine Zweifach-Alkylierung der Hydroxylamin-Funktionalität zu unterdrücken. Das gewünschte N-Boc-O-Benzylhydroxylamin 15 konnte in einer Ausbeute von 94 % nach säulenchromatographischer Isolierung gewonnen werden (Schema 72). Durch N-Alkylierung von N-Boc-O-Benzylhydroxylamin 15 in DMF mit Natriumhydrid als Base und Zutropfen des Alkylanz 1-Brom-3-Phenylpropan unter Eisbadkühlung konnte das Phenylpropoxycarbamat 16 in einer Ausbeute von 82 % gewonnen werden (Schema 72). Das anschließende Entfernen der Boc-Schutzgruppe gelang durch Zugabe einer Lösung von Chlorwasserstoff in 1,4-Dioxan (4 M), wobei O-Benzyl-N-(3-phenylpropylhydroxylamin Hydrochlorid (17) als farbloser Feststoff mit einer ausgezeichneten Ausbeute von 99 % präzipitierte (Schema 72).

6.1.2. Versuche zur Darstellung der O-Benzyl-N-phenylpropylhydroxamsäure 18

Nachfolgend sollte die Kupplung der Carbonsäure 13 mit O-Benzyl-N-(3-Hydrochlorid phenylpropyl)hydroxylamin (17) erfolgen. Da die Nukleophilie von Hydroxylamino- im Verglich zu Aminogruppen aufgrund des elektronenziehenden Effektes des benachbarten Sauerstoffatoms herabgesetzt ist, empfiehlt sich für diese Reaktion der Einsatz eines Kupplungsreagenz, um die Carboxylgruppe zum Aktivester zu aktivieren.^{405,406}

	Eto + +	• HCI	Kupplungsreagenz (Additiv) Base) .ösemittel, RT, 16 h	EtO EtO	0 N 0E	Bn
	Kupplungsreagenz	Additiv	Base	IM	Edukt	Produkt
Lono	Rapplangerougenz	Additiv	Duot	2.00	[%] ª	[%] ^a
1	1.0 Äg. HATU		3.0 Äg. DIPEA	DMF	9	35
•			0.07.4.2.1.2.1	2	Ū	(12) ^b
2	1.0 Äq. HBTU		3.0 Äq. DIPEA	CH_2CI_2	4	81
3	1.1 Äq. COMU		2.0 Äq. DIPEA	DMF	17	5
4	1.0 Äq. DIC	1.0 Äq. HOAt		DMF	14	38
5	1.1 Äq. EDC•HCl	1.1 Äq. HOAt	2.2 Äq. Et₃N	CH_2CI_2	2	87
6	1.4 Äq. DCC	0.1 Äq. 4-DMAP	1.4 Äq. Et₃N	CH_2CI_2	7	57
						85
1	1.5 Aq. CDI			IHF	4	(84) ^b

Tabelle19:OptimierungderKupplungsreaktionderCarbonsäure13undO-Benzyl-N-(3-phenylpropyl)hydroxylaminphenylpropyl)hydroxylaminHydrochlorid17.

Bn

^a Bestimmung des Reaktionsumsatzes durch den Vergleich der AUC im HPLC-Chromatogramm. ^b Isolierte Ausbeute.

Zunächst wurde die Synthese mit HATU und DIPEA in DMF analog zu den Kupplungsreaktionen der Carba-Analoga nach ABDULLAZIZ *et al.* durchgeführt.^{234,404} Die Carbonsäure **13** wurde mit HATU und DIPEA in DMF vorgelegt und für 10 Minuten gerührt. Dies führte zur Aktivierung der Carboxylgruppe durch Bildung eines reaktiven Azabenzotriazol (OAt)-Esters **CXIII** (Schema 73, **A**), welcher anschließend durch das Hydroxylamin **17** nukleophil substituiert wurde.^{407,408}

Die Reaktionskontrolle mittels HPLC zeigte fast vollständigen Eduktumsatz und das Auftreten vieler nicht identifizierbarer Nebenprodukte, sodass die gewünschte *N*- und *O*-alkylierte Hydroxamsäure **18** nur in schlechter Ausbeute von 12 % isoliert werden konnte (Tabelle 19, Zeile 1). Zur Verbesserung der Ausbeute und damit einhergehenden Reduktion der Nebenprodukte wurden verschiedene Literaturvorschriften mit unterschiedlichen Kupplungsreagenzien gewählt, deren Reaktivität möglichst divers sein sollte. Die Reaktionen wurden jeweils bei Raumtemperatur durchgeführt und der Umsatz nach 16 h mittels HPLC analysiert (Tabelle 19).





A O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N*,*N*,*N'*,*N'*-tetramethyluronium-hexafluorphosphat (HATU) und 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl-uronium-hexafluorophosphat (HBTU), **B** 1-Cyano-2-ethoxy-2-oxoethylidenaminooxy)dimethylamino-morpholino-carbenium-hexafluorophosphat (COMU), **C** *N*,*N*-Diisopropylcarbodiimid (DIC), 1-Ethyl-3-(3-dimeth-ylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid (EDC+HCl) oder Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), **D** 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol (HOAt), **E** 4-Dimethylaminopyridin (4-DMAP) oder **F** 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI).

Im HATU ist Analogon 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-Vergleich zu dessen tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU) weniger reaktiv (Schema 73, A),^{408,409} sodass dieses ebenfalls erprobt wurde (Tabelle 19, Zeile 2). Zwar war der Reaktionsumsatz hervorragend und im HPLC-Chromatogramm kaum Nebenprodukte zu sehen, allerdings ergab sich für diesen Ansatz ein Problem bei der Reinigung. Als Nebenprodukt, welches sich nicht mit der HPLC erfassen lässt, entsteht im Verhältnis 1:1 zum Produkt Tetramethylharnstoff, welcher die Abgangsgruppe bei der Bildung des OBt-Esters CXXIII darstellt.⁴⁰⁸ Tetramethylharnstoff ließ sich säulenchromatographisch und mittels Umkristallisation nicht vollständig von dem Produkt 18 abtrennen. Weiterhin wurde (1-Cyano-2-ethoxy-2oxoethylidenaminooxy)dimethylamino-morpholino-carbenium-hexafluorophosphat (COMU) als Uronium-basiertes Kupplungsreagenz getestet, welches weniger reaktiv als HATU und HBTU ist (Schema 73, **B**).^{409,410} COMU zeigte von allen getesteten Kupplungsreagenzien den geringsten Eduktumsatz bei einer Produktbildung von 4 % (Tabelle 19, Zeile 3).

Weiterhin wurden N,N'-Diisopropylcarbodiimid (DIC) und EDC+HCl in Kombination mit HOAt^{407,411} gewählt (Tabelle 19, Zeile 4-5). EDC und DIC sind Carbodiimide, die mit Carbonsäuren CXXII zu O-Acylisoharnstoffen CXXV reagieren (Schema 73, C). Diese können zum einen direkt mit einem Hydroxylamin gekuppelt oder durch HOAt zum reaktiveren OAt-Ester CXXIII stärker aktiviert werden (Schema 52, D).⁴⁰⁷ Dementsprechend sollte die Kombination aus Carbodiimid und HOAt eine geringere Reaktivität als HATU aufweisen.⁴⁰⁹ Im Falle von EDC•HCI wurde zusätzlich Triethylamin verwendet, um die Bildung des O-Acylisoharnstoffe CXXV zu erleichtern (Tabelle 19, Zeile 5). Bei DIC/HOAt konnte Produktbildung im Vergleich zu HATU nicht signifikant verbessert werden, jedoch war der Eduktumsatz schlechter als bei der Verwendung von HATU. Bei Verwendung von EDC+HCl/HOAt/Et₃N hingegen zeigte sich nahezu vollständiger Eduktumsatz bei einer Produktbildung von 87 %. Probleme traten jedoch bei dieser Reagenzien-Kombination bei der Isolierung des Produktes 18 auf, da sich ein nicht weiter identifiziertes Nebenprodukt gebildet hatte, welches säulenchromatographisch nicht entfernt werden konnte. In einem folgenden Ansatz wurde Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in Kombination mit katalytischen Mengen 4-Dimethylaminpyridin (4-DMAP) verwendet (Tabelle 19, Zeile 6). Auch in diesem Fall kommt es intermediär zur Bildung eines O-Acylisoharnstoffs CXXV (Schema 73, C),⁴⁰⁹ der durch Reaktion mit 4-DMAP zum N-Acylpyridiniumion CXXVI umgesetzt wird (Schema 73, E).409 Sowohl der Anteil des restlichen Eduktes als auch die Produktbildung waren mit 7 %, bzw. 57 % signifikant schlechter als bei EDC•HCl/HOAt/Et₃N (Tabelle 19, Zeile 6).

Letztlich wurde als Kupplungsreagenz noch 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI) eingesetzt, da sich dieses im Vergleich zu den zuvor eingesetzten Reagenzien durch seine Simplizität auszeichnet. Bei der Aktivierung der Carbonsäuren **CXXII** zum Imidazoliden **CXXVII** (Schema 73, **F**) und der anschließenden Kupplungsreaktion entstehen als Nebenprodukte CO₂ und zwei Äquivalente Imidazol⁴⁰⁹, welche durch saure Extraktion einfach entfernt werden können. Die Reaktionskontrolle mittels HPLC zeigte nahezu vollständigen Eduktumsatz und eine Produktbildung von 85 %, welches auch der Ausbeute nach Extraktion mit 1 M Salzsäure und säulenchromatographischer Isolierung entsprach (Tabelle 19, Zeile 7).

273



Schema 74: Avisiertes Entfernen der Benzylschutzgruppe unter Verwendung verschiedener Methoden. (a) 10 mol% Pd/C, H₂, MeOH, 24 h (b) 1.10 Äq. Pd/C, H₂, MeOH, 24 h (c) 1.00 Äq. BBr₃, CH₂Cl₂, -50 °C, 30 min.

Im nächsten Schritt sollte die Benzyl-Schutzgruppe von Verbindung 18 mit 10 mol% Palladium auf Aktivkohle hydrogenolytisch entfernt werden. Dabei zeigte sich auch nach 24 h nach mehrmaligem Auffüllen des Wasserstoffballons kein Reaktionsumsatz (Schema 74). In einem nächsten Versuch wurden 1.10 Äquivalente Palladium verwendet, allerdings zeigte sich auch hier nach 24 h keine Umsetzung des Edukts (Schema 74). Da dieser Reaktionsschritt für die Carba-Analoga nahezu quantitativ abläuft, liegt der Schluss nahe, dass die Thioethergruppe Inaktivierung des Katalysators führt. Thioether zeigen ein zur ausgeprägtes Koordinationsvermögen zu Palladium,⁴¹² was dessen katalytische Aktivität in dieser Reaktion einschränken könnte. Als nächste Option wurde eine Bortribromid-vermittelte Debenzylierung in Dichlormethan bei -50 °C als alternative Entschützung erprobt, wobei ein komplexes Gemisch aus Edukt, N-desalkyliertem und O- und N-desalkyliertem Nebenprodukt sowie dem gewünschten O-desalkyliertem Produkt entstand, welches nicht in ausreichender Reinheit isoliert werden konnte (Schema 74).

6.1.3. Darstellung der Phosphonohydroxamsäure 20

Da die Möglichkeiten zum Schützen des Hydroxylamin-Sauerstoffs begrenzt sind,⁴¹³ sollte im nächsten Ansatz getestet werden, ob auf den Einsatz einer Hydroxy-Schutzgruppe für die Kupplungsreaktion verzichtet werden könnte. Um dies zu untersuchen, wurde *N*-(3-Phenylpropyl)hydroxylamin **17a** als Intermediat hergestellt (Schema 75).



Schema 75: Darstellung von N-(3-phenylpropyl)hydroxylamin (17a).

Ausgehend von Hydroxylamin Hydrochlorid (**14a**), wurden die Hydroxy- und die Hydroxylaminogruppe jeweils Boc-geschützt, indem das Edukt in einer Mischung aus Cyclohexan und Methyl-*tert*-butylether (5:1 v/v) gelöst und mit Triethylamin und Di-*tert*-butyldicarbonat versetzt wurde (Schema 75). *tert*-Butyl-((*tert*-butoxycarbonyl)oxy)carbamat (**15a**) wurde anschließend mit 1-Brom-3-phenylpropan unter Verwendung von Natriumhydrid als Base in DMF alkyliert. DMF wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Intermediat **16a** im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wurde in THF aufgenommen und mit einer Lösung von Chlorwasserstoff in 1,4-Dioxan (4 M) versetzt, sodass beide Boc-Schutzgruppen simultan entfernt und *N*-(3-Phenylpropyl)hydroxylamin **17a** über zwei Schritte in einer Ausbeute von 63 % dargestellt werden konnte (Schema 75).



Schema 76: Darstellung des *N*-Phenylpropyl β-thia-isosteren Fosmidomycin-Analogons 20.
(a) 1.50 Äq. CDI, 1.10 Äq. *N*-Phenylpropylhydroxylamin Hydrochlorid (17a), THF, RT, 16 h; (b) 5.00 Äq. TMSBr, CH₂Cl₂, 0 °C – RT, 48 h; (c) H₂O, THF, RT, 45 min.

⁽a) 2.10 Äq. Et₃N, 2.00 Äq. Boc₂O, Cyclohexan/Methyl-*tert*-butylether (5:1 *v*/*v*), 0 °C, 6 h; (b) i) 1.00 Äq. 1-Brom-3-phenylpropan, 1.00 Äq. NaH, DMF, N₂, 0 °C - RT, 16 h; (ii) 10.0 Äq. 4 м HCl/Dioxan, Et₂O, RT, 16 h.

Die CDI-vermittelte Kupplung der Carbonsäure **13** mit *N*-(3-Phenylpropyl)hydroxylamin (**17a**) wurde mit den optimierten Bedingungen durchgeführt und verlief mit einer Ausbeute von 49 %, ohne dass die Bildung O-acylierter Nebenprodukte beobachtet wurde (Schema 76). Im letzten Schritt erfolgte die TMSBr-vermittelte Desalkylierung des Phosphonsäurediethylesters im konsekutiven Ein-Topf-Verfahren in Anlehnung an BRÜCHER *et al.*⁴¹⁴⁻⁴¹⁶ mit 10 Äquivalenten TMSBr unter Stickstoffatmosphäre in wasserfreiem Dichlormethan (Schema 76). Der intermediär gebildete Silylester wurde nach 48 h durch Zugabe von wenigen Tropfen Wasser zu der entsprechenden Phosphonohydroxamsäure 20 hydrolysiert (Schema 76), wobei als Nebenprodukte Trimethylsilylalkohol und Ethylbromid entstanden. Das Lösemittel wurde mithilfe eines Stickstoffgegenstroms entfernt, das Rohprodukt in wenig Dichlormethan gelöst und bei Raumtemperatur an 100 mg Kieselgel adsorbiert. Die Aufreinigung erfolgte durch säulenchromatographische Reining an 300 mg Kieselgel mit einem Gradienten bestehend aus Cyclohexan und Ethylacetat. Zunächst wurden etwa 20 Säulenvolumen (SV) Cyclohexan als Eluent verwendet, um das Ethylbromid zu entfernen. Anschließend wurde das Elutionsmittel zu Cyclohexan/Ethylacetat (1/1 v/v) verändert, sodass das Produkt mit nicht abgetrenntem orangenen Trimethylsilylalkohol von der Säule kam. Anschließend wurde mit 500 SV Ethylacetat der restliche Teil des Produkt von der Säule eluiert. Die orangenen Fraktionen wurden verworfen, die weiteren Fraktionen vereint und das Lösemittelvolumen mittels Stickstoffgegenstrom auf ca. 5 mL reduziert. Die Zugabe von Cyclohexan und Lagerung im Tiefkühlschrank bei -20 °C für 24 h führte zur Präzipitation der Phosphonohydroxamsäure 20. welche nach Filtration in einer Ausbeute von 43 % isoliert werden konnte. Zusammenfassend gelang die Synthese der Zielstruktur **20** nach intensiver Optimierung über drei Schritte durch konvergente Syntheseführung mit einer Gesamtausbeute von 13 %.

6.2. Darstellung β -thia-isosterer Fosmidomycin-Analoga des Strukturtyps 2

Eine eingehende Analyse der Kristallstruktur von *Pf*DXR und *Mt*DXR zeigte, dass der α -Phenyl-Ring der Fosmidomycin-Analoga an der Oberfläche des Enzyms lokalisiert und gegenüber dem Lösemittel exponiert ist (Abbildung 28). Die Bindetasche kann durch Bewegen einer flexiblen Seitenkette des Enzyms geöffnet und geschlossen werden. Bei Bindung der Fosmidomycin-Analoga mit substituierten α -Phenyl-Ringen an das katalytische Zentrum des Enzyms, befindet sich die flexible Seitenkette in einer offenen Konformation. Die offene Konformation führt zu einer geringeren sterischen Hinderung von Substituenten am α -Phenyl-Ring.



Abbildung 28: Übereinander gelegte Kristallstrukturen von *Pf*DXR (hellblau, PDB 3WQQ)⁴¹⁶ und *Mt*DXR (grau, PDB 2Y1D) in Komplex mit einem DXR-Inhibitor.

Diese Kristallstrukturanalyse legt den Schluss nahe, dass große lipophile Substituenten am α -Phenyl-Ring eingeführt werden könnten, welche möglicherweise zusätzliche VAN-DER-WAALS-Interaktionen mit der Enzymoberfläche eingehen. Um diese Hypothese zu untersuchen, sollen längere (Aryl-)Alkylketten über verschiedene Verbindungseinheiten darstellt werden. Als Verbindungseinheit für diesen Strukturtyp 2 wurden dabei ein Ether-(Kapitel 6.2.1) und ein Anilid-Strukturmotiv (Kapitel 6.2.2) gewählt.

6.2.1. α-(Alkoxyphenyl)-β-thia-isosterer Fosmidomycin-Analoga

Um eine neue Synthesestrategie zur Darstellung α -Alkoxyphenyl-substituierter β -thia-isosterer Fosmidomycin-Analoga zu etablieren, sollte wie schon in Kapitel 6.1 beschrieben, die Phosphonsäureethylester-Schutzgruppe von **CXXIX** im letzten Schritt entfernt werden (Schema 77). Die Synthese der Hydroxamsäuren **CXXIX** sollte ausgehend von substituierten Carbonsäuren **XCCCI** und *N*-Methylhydroxylamin Hydrochlorid (**CXXX**) analog zu der in Kapitel 6.1.2 beschrieben CDI-Kupplung erfolgen (Schema 77).



Schema 77: Retrosynthetische Überlegung zur Darstellung α-Phenyl-β-thia-isosterer Fosmidomycin-Analoga. Discon. = *engl. disconnection* = Bindungsbruch, FGI = *engl. functional group interconversion* = Umwandlung einer funktionellen Gruppe. SG = Schutzgruppe.

Um die Carbonsäuren **XCCCI** ausgehend von α -Mercaptophosphonaten **CXXXIII** über eine S-Alkylierung zu synthetisieren, bedarf es einer Schutzgruppe für die Carboxylgruppe des Alkylanz **CXXXIV** wie TMS, Methyl oder *tert*-Butyl (Schema 77). Im Vergleich zur etablierten Syntheseroute (Schema 31) von LIENAU sollte die Darstellung der α -Mercaptophosphonate **CXXXIII** aus einem leicht zugänglichen α -Hydroxyphosphonaten **CXXXVI** über eine nukleophile Substitution zum α -Thiocyanophosphonat **CXXXVI** und anschließender Reduktion gewonnen werden. Die entsprechenden α -Hydroxyphosphonate **CXXXVI** können aus Phosphonsäurediethylester (**CXXXVII**) und substituierten Benzaldehyden **CXXXVIII** hergestellt werden. Als Modellverbindung zur Etablierung der neuen Synthesestrategie wurde zunächst Benzaldehyd gewählt, um mögliche Nebenreaktionen mit funktionellen Gruppen auszuschließen.

6.2.1.1. Versuche zur Darstellung von Diethyl (phenyl(thiocyanato)methyl) phosphonat

Zunächst wurde die Synthese von Diethyl(hydroxy(phenyl)methyl)phosphonat (**22a**) durchgeführt, bei der zwei verschiedene Vorschriften verwendet wurden (Schema 78).



Schema 78: Versuch zur Darstellung von a-Mercaptophosphonat 22-SH.

(a) 1.10 Äq. Phosphonsäurediethylester, 2.20 Äq. Et₃N, 0 °C, 1 h; (b) 1.00 Äq. Phosphonsäurediethylester, 1.00 Äq. MgO; RT, 1 h; (c) 2.00 Äq. NH₄SCN, 2.00 Äq. DDQ, 2.00 Äq PPh₃, CH₂Cl₂, RT, 24 h.⁴¹⁷

Benzaldehyd (21a) wurde mit einem leichten Überschuss an Phosphonsäurediethylester und 2.20 Äquivalenten Triethylamin in Dichlormethan für eine Stunde bei Raumtemperatur umgesetzt, welches das gewünschte Produkt 22a nach säulenchromatographischer Isolierung in 91 % lieferte. Alternativ wurden äquimolare Mengen Magnesiumoxid, Benzaldehyd (21a) und Phosphonsäurediethylester für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Verdünnen des Reaktionsansatzes mit Ethylacetat und Waschen der organischen Phase mit 1 M Salzsäure konnte 22a in einer exzellenten Ausbeute von 99 % isoliert werden. Aufgrund der effizienter Atomökonomie, den Verzicht auf Lösemittel und der schnelleren Aufarbeitung wurde die Magnesiumoxid-mediierte PUDOVIK-Reaktion als neue allgemeine Arbeitsvorschrift (AAV) etabliert. Das α-Hydroxyphosphonat 22a sollte mithilfe eines 2,3-Dichlor-5,6-dicyano-(DDQ)/Triphenylphosphan (TPP)-Systems 1,4-benzochinon durch Zugabe von Ammoniumthiocyanat in das α -Thiocyanophosphonat **22-SCN** überführt werden (Schema 78). Die Autoren postulierten für diese Reaktion, dass DDQ und TPP ein zwitterionisches Addukt bildet, an welches an die α -Hydroxygruppe von **22a** bindet. Die so aktivierte α -Hydroxygruppe kann im Folgenden durch das Thiocyanat-Anion nukleophil substituiert werden (Schema 79).417



Schema 79: Postulierter Reaktionsmechanismus einer 2,3-Dichlor-5,6-dicyano-1,4-benzochinon (DDC)/Triphenylphospan (TPP)-vermittelten nukleophilen Substitution.⁴¹⁷

Die Reaktionskontrolle mittels Dünnschichtchromatographie zeigte das Auftreten vieler Nebenprodukte und die säulenchromatographische Reinigung lieferte keine reinen Fraktionen, da sich DDQ nicht entfernen ließ. Da das Entfernen von DDQ auch nach Optimierung der Reaktionsbedingungen mutmaßlich als schwierig erwiesen hätte, wurde dieser Ansatz nicht weiterverfolgt.

Stattdessen wurde das α -Hydroxyphosphonat **22a** mit *p*-Toluolsulfonsäurechlorid im Basischen mit 4-DMAP als Katalysator über 24 h bei Raumtemperatur zu dem α -Tosylphosphonat **23a** in einer guten Ausbeute von 69 % umgesetzt (Schema 80).



Schema 80:Versuch zur Darstellung des α-Mercaptophosphonats **22-SH** nach GULEA *et al.*²⁸¹ (a) 1.20 Äq. *p*-TsCl, 0.10 Äq. 4-DMAP, 2.50 Äq. Et₃N, CH₂Cl₂, 0 °C – RT; (b) 4.00 Äq. KSCN, 0.39 Äq. [18]Krone-6, ACN.

Da das Tosylat eine wesentlich bessere Abgangsgruppe als Hydroxid-Ionen darstellen, sollte die Umsetzung von **23a** mit vier Äquivalenten Kaliumthiocyanat in Acetonitril bei Raumtemperatur stattfinden (Schema 80).²⁸¹ Um die Bildung des Thiocyanat-Anions zu begünstigen wurde [18]Krone-6 als Kryptand für Kalium zugegeben.²⁸¹ Nach 24 h zeigten sich auch bei dieser Reaktion viele Nebenprodukte, sodass das gewünschte α -Thiocyanophosphonat **22-SCN** nicht isoliert werden konnte.

6.2.1.2. Darstellung von α-(Alkoxyphenyl)-β-thia-isosterer Fosmidomycin-Analoga

Zwar war die Darstellung des α-Mercaptophosphonats **22-SH** über das α-Thiocyanophosphonat **22-SCN** nicht erfolgreich (Kapitel 6.2.1.1), allerdings konnten aus diesen Versuchen Erkenntnisse für neue retrosynthetische Analysen herangezogen werden. Da die nukleophile Substitution des α-Tosylphosphonat **23a** unter vollständigem Eduktumsatz stattfand, könnte die nukleophile Substitution des Tosylates **23a** direkt mit Methylthioglycolat (**CXL**) durchgeführt werden, um somit zur Methyl-geschützten Carbonsäure **CXXXII** zu gelangen (Schema 77).



Schema 81: Retrosynthetische Überlegung zur Darstellung der Methyl-geschützten Carbonsäure CXXXII. Discon. = engl. disconnection = Bindungsbruch.

Für den weiteren Verlauf dieses Projektes wurden verschiedene substituierte Benzaldehyde mit langkettigen lipophilen Substituenten (21d-g) als Edukte für die Darstellung der α -Hydroxyphosphonate **23** gewählt (Schema 82). Die Alkoxybenzaldehyde (**21d-g**) wurden ausgehend von 3- oder 4-Hydroxybenzaldehyd (21b-c) mit 1-Bromhexan oder N-(6-Bromhexyl)phthalimid unter Verwendung von Kaliumcarbonat als Base in Acetonitril alkyliert. Die anschließende PUDOVIK-Reaktion mit Phosphonsäurediethylester und Magnesiumoxid gelang in guten bis ausgezeichneten Ausbeuten (Schema 82). Probleme breiteten bei dieser Reaktion die (6-Phthaloyl)hexoxy-substituierten Verbindungen 21f-g, da diese im Verlauf der Reaktion fest wurden und die Homogenisierung des Reaktionsansatz ausblieb. Dieses Problem konnte gelöst werden, indem der Feststoff mehrmals in Dichlormethan im Ultraschallbad suspendiert und das Lösemittel unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer vollständig entfernt wurde. Dieser Prozess wurde bis zum vollständigen Eduktumsatz wiederholt.



(a) 1.00 Äq. 1-Bromhexan oder 1.00 Äq. *N*-(6-Bromhexyl)phthalimid, 2.00 Äq. K₂CO₃, ACN, Reflux, 24 h; (b)
 1.00 Äq. Phosphonsäurediethylester, 1.00 Äq. MgO, RT, 1 h; (c) 1.20 Äq. *p*-TsCl, 0.10 Äq. 4-DMAP, 2.50 Äq. Et₃N, CH₂Cl₂, 0 °C – RT, 18 h.

Die anschließende Tosylierung zu den *a*-Tosylphosphonaten **23b** und **23c** in Dichlormethan mit Tosylchlorid und katalytischen Mengen 4-DMAP verlief in guten bis ausgezeichneten Ausbeuten (Schema 82). Bei der geplanten Tosylierung der *para*-substituierten *a*-Hydroxyphosphonate **22c** und **22e** zeigte sich in den ¹H-NMR-Spektren der isolierten Produkte, dass es sich nicht um Tosylate handeln konnte, da die entsprechenden Signale des Phenylrings und der Methylgruppe nicht vorhanden waren (Abbildung 29). Dennoch waren signifikante Verschiebungen der aromatischen Signale sowie des Dubletts vom *a*-Proton im Vergleich zum jeweiligen Edukt zu erkennen, sodass der Schluss nahelag, dass es sich nicht um die Edukte handeln könne. Dies bestätigt auch der Vergleich der ³¹P-NMR-Spektren der jeweiligen *a*-Hydroxyphosphonate **22c** und **22e** und **22e** und er gebildeten Produkte **24a** und **24b**. Das Signal der isolierten Produkte **24a** und **24b** lag in den ³¹P-NMR-Spektren bei einer chemischen Verschiebung von δ 17.46, während die Signale der *a*-Hydroxyphosphonaten **22c** und **22e** bei einer chemischen Verschiebung von δ 21 – 22 lagen. Die Auswertung von hochaufgelösten Elektronensprayionisation (ESI)- und Elektronenionisation (EI)-Massenspektren bestätigten die Hypothese, dass es sich um die *a*-Chlorphosphonate **24a** und **24b** handelte.



Die α-Chlorphosphonate **24a** und **24b** müssen bereits *in situ* aus den entsprechenden α-Tosylphosphonaten durch Nukleophile Substitution der Tosylgruppe durch die frei gewordenen Chlorid-Ionen entstanden sein, da bereits die dünnschichtchromatographische Reaktionskontrolle deutlich unterschiedliche R_f-Werte im Vergleich zu den *meta*-substituierten Verbindungen **23b** und **23c** aufwiesen und sich die R_f-Werte nach der Extraktion mit 1 M Salzsäure nicht änderten.

Diese *in situ*-Substitution wurde in der Literatur vielfach beschrieben und lässt sich dadurch begründen, dass elektronenschiebende Alkoxy-Substituenten das intermediär gebildete Benzylkation nach Abspaltung des Tosylates unter S_N1-Bedingungen stabilisieren (Schema 83).^{418,419}



Schema 83: Bildung eines mesomeriestabilisierten Carbokations am Beispiel eines *para*-Alkoxy-substituierten *α*-Tosylphosphonats.

Aufgrund dieses Sachverhaltes wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass Substituenten in *para*-Position die Reaktivität des benzylischen Kohlenstoffs und damit einhergehend den Verlauf der nukleophilen Substitution nach S_N1 - oder S_N2 -Mechanismus stärker beeinflussen als die Polarität des Lösemittels und der verwendeten Base.⁴¹⁸ Folglich ist es unwahrscheinlich, bei den *para*-Alkoxy-substituierten **24a** und **24b** das entsprechende Tosylat zu isolieren, sodass hierzu keine weiteren Versuche unternommen und der nachfolgende Reaktionsschritt mit den α -Chlorphosphonaten **24a** und **24b** durchgeführt wurde (Schema 84).





Sowohl die *α*-Tosylphosphonate **23b** und **23c** als auch die *α*-Chlorphosphonate **24a** und **24b** wurden durch Methylthioglycolat und Cäsiumcarbonat als Hilfsbase in DMF nukleophil substituiert (Schema 84). Die Ausbeuten für die reaktiveren *α*-Tosylphosphonate **23b** und **23c** lagen bei 55 %, bzw. 75 %, während die *α*-Chlorphosphonate **24a** und **24b** schlechtere Ausbeuten von 54 % und 29 % lieferten (Schema 84). Die Hydrolyse des Methylesters der Verbindungen **25a** und **25b** gelang mit wässriger Lithiumhydroxid-Lösung in ausgezeichneten Ausbeuten (Schema 84). Für das Phthaloyl-substituierte Analogon **25c** wurde die Hydrolyse des Methylesters bei Raumtemperatur erprobt, wobei sich nach 30 Minuten neben dem Edukt drei weitere (Neben-)Produkte im HPLC-Chromatogramm zeigten, welche massenspektrometrisch (LC-MS) näher untersucht wurden (Schema 85). Während noch 23 % des Edukt **25c** vorhanden waren, wurde das gewünschte Produkt **26c** nur zu 14 % gebildet. Die beiden Nebenprodukte



Schema 85: Hydrolyse der Carbonsäure **25c** und quantitative Auswertung der Reaktionsprodukte mittels LC-MS-Untersuchung. (a) 1.00 Äq. LiOH, THF/H₂O (1/1 *v/v*), RT, 30 min.

konnten als der Methylester mit geöffnetem Phthalimid (**25c**⁴) mit 35 % sowie die Carbonsäure mit geöffnetem Phthalimid (**26c**⁴) mit 27 % identifiziert werden (Schema 85). Folglich findet die Hydrolyse des Phthalimids schneller statt als die Hydrolyse des Methylesters.

Daraufhin wurde eine Optimierungsstudie zur Entschützung der Carboxygruppe durchgeführt und der Anteil des nicht-umgesetzten Eduktes sowie die Produktbildung mittels HPLC-Reaktionskontrolle untersucht (Tabelle 20).

	$EtO \xrightarrow{P} S \xrightarrow{O} CH_3$ $EtO \xrightarrow{O} \xrightarrow{O} CH_3$ $O \xrightarrow{O} \xrightarrow{O} \xrightarrow{O} \xrightarrow{O} CH_3$ $O \xrightarrow{O} \xrightarrow{O} \xrightarrow{O} \xrightarrow{O} \xrightarrow{O} \xrightarrow{O} \xrightarrow{O} O$			Base t		$ \begin{array}{c} 0\\ OH\\ O+\\ O+\\ O+\\ O+\\ O+\\ O+\\ O+\\ O+\\ O+\\ O+$	
Zeile	Äq. Reagenz	LM	T [°C]	t [h]	Edukt [%]ª	Produkt [%]ª	NP [%]ª
1	1.00 LiOH	THF	0	0.5	23	14	63
2	5.00 BBr ₃	CH_2CI_2	-10 – RT	16	49	0	51
3	5.00 H ₃ PO ₄	Toluol	RT	6	94	3	3
4	5.00 H ₃ PO ₄	Toluol/H ₂ O	110	2	51	8	41
5	3.20 1 м HCI _(аq.)	AcOH	50°C	6	0	96	4

Tabelle 20: Optimierte Bedingungen zum Entfernen der Methyl-Schutzgruppe zur Darstellung von Verbindung 26c.

^a Bestimmung der prozentualen Anteile an Edukt, Produkt und Nebenprodukte durch den Vergleich der AUC im HPLC-Chromatogramm.

Zum einen wurde eine Bortribromid-vermittelte Demethylierung in Dichlormethan bei -10 °C untersucht (Tabelle 20, Zeile 2), bei welcher das gewünschte Produkt **26c** nicht erhalten wurde. Beim Versuch, eine saure Hydrolyse mit fünf Äquivalenten Phosphorsäure in Toluol bei Raumtemperatur oder in einem Toluol/Wasser-Gemisch bei 90 °C in der Mikrowelle durchzuführen, konnte ebenfalls keine zufriedenstellende Eduktumsetzung beobachtet werden (Tabelle 20, Zeile 3+4). Letztlich war die saure Hydrolyse mit 1 M Salzsäure in Eisessig die erfolgreichste Methode, da das Edukt vollständig umgesetzt und nur geringe Mengen Nebenprodukt gebildet wurden. (Tabelle 20, Zeile 5). Das acidolytische Entfernen der Methylester-Schutzgruppen von den Verbindungen **25c-d** lieferte die Carbonsäuren **26c-d** in guten bis sehr guten Ausbeuten (Schema 86).



(a) 3.20 Äq. 1 м HCl_(aq.), AcOH, 60 °C, 5 h.

Die CDI-vermittelte Kupplung der Carbonsäuren **26a-d** mit *N*-Methylhydroxylamin Hydrochlorid lieferte die entsprechenden Hydroxamsäuren **27a-d** in 47 % bis 94 % Ausbeute (Schema 87). Die abschließende TMSBr-Spaltung der Phosphonsäurediethylester wurde analog zu der Vorschrift von KUNFERMANN mit 10 Äquivalenten TMSBr in Dichlormethan durchgeführt (Schema 87).²⁷⁸



Schema 87: Darstellung der α-Phenyl-substituierten Phosphonohydroxamsäuren 28a-b.
(a) 1.10 Äq. *N*-Methylhydroxylamin Hydrochlorid, 1.50 Äq. CDI, THF, RT, 16 h; (b) i) 10.0 Äq. TMSBr, CH₂Cl₂,
0 °C – RT, 48 h, ii) H₂O, THF, RT, 45 min.

Bei der säulenchromatographischen Reinigung mit *n*-Hexan und Ethylacetat an Kieselgel konnten die Phosphonohydroxamsäuren **28a-d** allerdings nicht sauber isoliert werden. Keine Phosphonohydroxamsäure **28a-d** kristallisierte durch Zugabe von *n*-Hexan zu einer gesättigten Ethylacetat-Lösung im Tiefkühlschrank bei -20 °C aus, stattdessen bildeten sich braune Öle, deren HPLC-Reinheit unter 90 % lag.



(A) ¹H-NMR-Spektrum von Verbindung 28a nach RP-Säulenchromatographie aufgenommen in DMSO-d₆ bei 293 K und 600 MHz. (B) Repräsentatives ¹H-NMR-Spektrum einer sauberen Phosphonohydroxamsäure aufgenommen in DMSO-d₆ (293 K, 600 MHz) Die Kristallisation glückte weder mit Diethylether, Tetrahydrofuran oder einem Zwei-Phasen-System aus Ethylacetat und Cyclohexan. Folglich wurde eine C₁₈-Umkehrphasen-Flashchromatographie versucht. Zwar lag die HPLC-Reinheit der Verbindungen bei \geq 95 %, dennoch zeigte das ¹H-NMR-Spektrum für die Signale des *α*-Protons, der Methylengruppe und der *N*-Methylgruppe Unstimmigkeiten (Abbildung 30, **A**).

Während das α -Proton im ¹H-NMR-Spektrum in der Regel ein Dublett bei einer chemischen Verschiebung von δ 4.0-4.3 erzeugt und die *N*-Methylgruppe ein Singulett bei einer chemischen Verschiebung von δ 3.0, zeigen sich die Methylenprotonen als zwei eindeutige Dubletts bei einer chemischen Verschiebung von etwa δ 3.2 und 3.5 (Abbildung 30, **B**). Nach der Umkehrphasen-Säulenchromatographie von Verbindung **28d** zeigten sich stattdessen beispielsweise zwei Dubletts bei einer chemischen Verschiebung 30, **A**). Ebenso hatte das Signal der *N*-Methyl-Protonen nur ein Integral von 1.5 H während bei einer chemischen Verschiebung 30, **A**).

Zur Erklärung dieses Befundes wurden zwei Hypothesen aufgestellt: Zum einen könnte es sich um *E*/*Z*-Konformere der Hydroxamsäuregruppe handeln, da diese aufgrund ihres partiellen Doppelbindungscharakters eine eingeschränkte Drehbarkeit der C=N-Bindung aufweist (Schema 88, Hypothese 1).

A Hypothese 1



Schema 88: Hypothesen zur Erklärung der doppelten Signale im ¹H-NMR Spektrum der Verbindung 28a. (A) Hypothese 1 stützt sich auf die *E*/*Z*-Isomerie der *N*-Methylhydroxamsäure. (B) Hypothese 2 beschreibt die mögliche wässrige Hydrolyse der Hydroxamsäuregruppe während der Umkehrphasen-Flashchromatographie.

Zum anderen könnte es durch Hydrolyse der Hydroxamsäuregruppe zu einer Carbonsäure (**28a**') und *N*-Methylhydroxylamin gekommen sein (Schema 88, Hypothese 2). Durch die Auswertung des LC-MS-Chromatogramms wurde die Hypothese 2 zunächst nicht widerlegt, da sowohl die Masse der *N*-Methylhydroxamsäure **28a** als auch der Carbonsäure **28a**' detektiert wurde. Allerdings bestätigt dieser Befund die Hypothese 2 nicht, da die Detektion der Carbonsäure **28a**' auch ein Artefakt aufgrund der Ionisierung sein könnte.

Folglich wurde die Hypothese 1 mittels ¹H-NMR-Spektroskopie näher untersucht. BROWN *et al.* beschrieben, dass sich bei *N*-methylierten Hydroxamsäuren das Verhältnis der *E*/*Z*-Isomere und damit die Intensität der Signale der *N*-Methyl- und Methylenprotonen in Abhängigkeit vom Lösemittel ändere.⁴²⁰ Während polar-protische Lösemittel die *Z*-Konformation stabilisieren, begünstigen unpolar-aprotische Lösemittel die *E*-Konformation. Folglich wurden ¹H-NMR-Spektren von Verbindung **28a** in Deuteriumoxid, DMSO-*d*₆, Methanol-*d*₄, Tetrahydrofuran-*d*₈ und Pyridin-*d*₄ aufgenommen, wobei sich keine Änderung der Integrale der entsprechenden Protonen zeigte.



Abbildung 31: ¹H-NMR-Spektren der Verbindung **28c** in DMSO- d_6 bei 300 MHz und 20 °C, 40 °C, 60 °C und 80 °C.

Da in der Literatur allerdings in Deuteriumoxid und DMSO- d_6 nahezu vollständig die Z-Isomere vorlagen und in diesem Beispiel das Verhältnis von 1:1 bestehen blieb, wurde geschlussfolgert, dass es die Signalaufspaltung wahrscheinlich nicht durch *E*/*Z*-Isomere bedingt ist. Weiterhin wurde für Verbindung **28c** in DMSO- d_6 eine Koaleszenzstudie

durchgeführt, bei der die ¹H-NMR-Spektren bei 25 C, 40 °C, 60 °C und 80 °C aufgenommen wurden (Abbildung 31).

Handelte es sich bei den doppelten Signalsätzen um E/Z-Isomere mit einer Rotationsbarriere bei Raumtemperatur, sollten sich die chemische Verschiebungen der Signale beim Erwärmen einem Durchschnittswert annähern und die Signale beim Erreichen der Koaleszenztemperatur zusammenfallen.⁴²¹ Bei Verbindung **28c** konnte keine signifikante temperaturabhängige Verschiebung der Signale beobachtet werden, welches ebenfalls gegen die Hypothese der E/Z-Isomere spricht (Abbildung 31).

Da die Hypothese 1 folglich unwahrscheinlich erschien, könnte das Singulett bei einer chemischen Verschiebung von δ 2.8 auf die Methylprotonen des Hydrolyseprodukts *N*-Methylhydroxylamin zurückzuführen sein (Abbildung 32, **A**).



A Verbindung 28c

Abbildung 32: Ausschnitt der ¹H-NMR-Spektren der Verbindung 28c in DMSO-*d*₆ (293 K, 600 MHz).
 (A) Reine Verbindung 28c, (B) Verbindung 28c mit Zusatz von *N*-Methylhydroxylamin und (C) Verbindung 28c mit Zusatz von *N*-Methylhydroxylamin und Deuteriumoxid.

Bei Zugabe von *N*-Methylhydroxylamin zur ¹H-NMR-Probenlösung von Verbindung **28c** zeigte sich bei einer chemischen Verschiebung von δ 2.8 ein Multiplett, welches durch Kopplung zu dem NH-Proton zustande kommt (Abbildung 32, **B**). Um diese Kopplung zu unterdrücken, wurde Deuteriumoxid zugegeben, um das NH-Proton gegen Deuterium auszutauschen. Das

daraus resultierende ¹H-NMR-Spektrum zeigte nur ein Singulett bei einer chemischen Verschiebung von δ 2.8 und ein Wassersignal bei δ 3.55 (Abbildung 32, **C**). Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese der Hydrolyse.

Infolgedessen wurde bei weiteren Reinigungsversuchen auf den Einsatz von Wasser und Methanol verzichtet, da die N-Methylhydroxamsäure-Struktur bereits instabil gegenüber schwachen Nukleophilen ist. Als alternative Reinigungsmethode für die Phosphonohydroxamsäuren 28a-d wurde isokratische eine C₁₈-Umkehrphasen-Chromatographie mit Tetrahydrofuran versucht, allerdings konnte so der Trimethylsilylalkohol nicht entfernt werden, da beide Verbindungen keine Retention auf der C₁₈-Säule zeigten. Als nächstes wurde die Überlegung angestellt, ob Trimethylsilylalkohol und Ethylbromid als unvermeidliche Nebenprodukte der TMSBr-Spaltung durch Suspendieren in n-Pentan entfernt werden können. Dazu wurde das Rohprodukt mit *n*-Pentan überschichtet und 5 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Das Lösemittel wurde abdekantiert und im Vakuum getrocknet. Dieser Vorgang wurde zehnmal wiederholt und das Produkt anschließend mit wenig Wasser lyophilisiert, sodass die Verbindungen 28a-d in sehr guten Ausbeuten von 78 % bis 84 % gewonnen werden konnten.

6.2.2. α -(Amidophenyl)- β -thia-isosterer Fosmidomycin-Analoga

Zur Darstellung eines Strukturtyps mit amidischer Verbindungseinheit sollte eine weitere Syntheseroute zur Darstellung α -(Amidophenyl)- β -thia-isosterer Fosmidomycin-Analoga (**CXLI**) etabliert werden. Zu diesem Zweck wurde folgende retrosynthetische Überlegung angestellt (Schema 89). Die Entschützung der Phosphonsäuren von den Zielmolekülen **CXLI** sollte wie zuvor im letzten Schritt, nach dem Aufbau der *N*-Methylhydroxamsäuren **CXLII** aus der entsprechenden Carbonsäuren **CXLII** und *N*-Methylhydroxylamin Hydrochlorid (**CXXX**) durchgeführt werden (Schema 89).



Schema 89: Retrosynthetische Überlegung zur Darstellung α -(Amidophenyl)- β -thia-isosterer Fosmidomycin-Analoga **X**. Discon. = *engl. disconnection* = Bindungsbruch, FGI = *engl. functional group interconversion* = Umwandlung einer funktionellen Gruppe.

Der Synthese des Anilid-Strukturmotives von kann ausgehend von Anilinen und Carbonsäuren oder Carbonsäurederivaten erfolgen. Dieser Schritt sollte möglichst spät in der Synthese erfolgen, um die Gesamtanzahl der Syntheseschritte zum Aufbau einer Substanzbibliothek zu minimieren. Folglich sollten die Carbonsäuren **CXLIII** durch einen acidolytisch entfernbaren Methylester geschützt werden (**CXLIV**) (Schema 89). Dies ermöglicht im nächsten Schritt den selektiven Aufbau des Anilid-Strukturmotives aus Anilinen **CXLV** und Carbonsäuren oder Carbonsäurechloriden **CXLVI**. Die Aniline **CXLV** können aus den entsprechenden Nitroverbindungen **CXLVII** durch Reduktion dargestellt werden. Wie in Kapitel 6.2.1.2 beschrieben kann das 2-(Methylthio)essigsäuremethylester-Strukturmotiv durch Reaktion der α -Tosylphosphonate **CXLVIII** und Methylthioglycolat (**CXL**) dargestellt werden. Die α -Tosylphosphonate **CXLVIII** können ausgehend von Nitrobenzaldehyden **CLI** über eine PUDOVIK-Reaktion mit anschließender Tosylierung der α -Hydroxyphosphonate **CL** gewonnen werden (Schema 89).
6.2.2.1. Versuche zur Darstellung von α -(Amidophenyl)- β -thia-isosterer Fosmidomycin-Analoga

Die Darstellung von α -(Amidophenyl)- β -thia-isosterer Fosmidomycin-Analoga erfolgte ausgehend von den Edukten 3-Nitrobenzaldehyd (**21h**) oder 4-Nitrobenzaldehyd (**21i**) und Diethylphosphonsäureester. Die Edukte wurden zunächst in einer PUDOVIK-Reaktion zu den α -Hydroxyphosphonaten **22f** und **22g** in exzellenter Ausbeute von 97 % und 98 % umgesetzt (Schema 90).



Schema 90: Versuch zur Darstellung der 3-Amino- und 4-Aminophenyl-substituierten Phosphonsäureester.
(a) 1.00 Äq. Phosphonsäurediethylester, 1.00 Äq. MgO, CH₂Cl₂, 40 °C, 1 h; (b) 1.20 Äq. *p*-TsCl, 0.10 Äq.
4-DMAP, 2.50 Äq. Et₃N, CH₂Cl₂, 0 °C – RT, 18 h; (c) 1.20 Äq. *p*-TsCl, 0.10 Äq. 4-DMAP, 2.50 Äq. Et₃N, CH₂Cl₂, 0 °C – RT, 18 h.

Die Reaktion der α-Hydroxyphosphonate **22f** und **22g** mit Tosylchlorid unter Verwendung von 4-DMAP als Katalysator und Triethylamin als Base lieferten die jeweiligen α-Tosylphosphonate **23d** und **23e** in 90 % Ausbeute (Schema 90). Bei der nukleophilen Substitution der Tosylgruppe durch Methylthioglycolat entstand für das *para*-substituierte Tosylat **23e** die gewünschte Verbindung **24d**⁴, jedoch war 4-Nitrobenzylphosponsäurediethylester. (**10b**) das Hauptprodukt der Reaktion und für das *meta*-substituierte Tosylat **23d** wurde annährend quantitativ 3-Nitrobenzylphosponsäurediethylester (**10a**) anstatt des gewünschten Methylesters **24d**⁴ (Schema 90) gebildet.



Schema 91: Versuche zur Reduktion der α-Tosylphosphonate **23d** und **23e**. (a) 10 mol% Pd/C, H₂, MeOH, RT, 24 h; (b) 3.00 Äq. SnCl₂, EtOH/HCl, Reflux, 24 h; (c) 5.00 Äq. NH₄Cl, 5.00 Äq. Fe, EtOH/H₂O, 85 °C, 24 h.

Folglich wurde versucht, die Nitrogruppe der α -Tosylphosphonate **23d** und **23e** zu reduzieren, um den Acylrest auf Stufe der α -Tosylphosphonate einzuführen. Für die Reduktion der Nitrogruppe von **23d-e** wurde Wasserstoff mit Palladium auf Aktivkohle⁴²², Zinnchlorid-Dihydrat und Salzsäure⁴²³ oder Eisen und Ammoniumchlorid⁴²⁴ verwendet, jedoch zeigte sich bei keiner dieser Bedingungen Eduktumsatz (Schema 91). Ebenso zeigte sich bei dem Versuch die α -Hydroxyphosphonate **22f** und **22g** unter gleichen Bedingen zu reduzieren, kein Eduktumsatz (Schema 92).



Schema 92: Versuche zur Reduktion der *α*-Hydroxyphosphonate **22f** und **22g**. (a) 10 mol% Pd/C, H₂, MeOH, RT, 24 h; b) 3.00 Äq. SnCl₂, EtOH/HCl, Reflux, 24 h; c) 5.00 Äq. NH₄Cl, 5.00 Äq. Fe, EtOH/H₂O, 85 °C, 24 h.

6.2.2.2. Darstellung von α -(Amidophenyl)- β -thia-isosterer Fosmidomycin-Analoga

Die vorangegangenen Versuche, die Amid-Bindung möglichst spät in der Syntheseroute aufzubauen, waren nicht erfolgreich, sodass eine neue Retrosynthese ausgearbeitet wurde (Schema 93), die an die vorherige Retrosynthese (Schema 89) anlehnt. Der wesentliche Unterschied bestand darin, die Anilid-Struktur bereits auf Stufe der α -Hydroxyphosphonate **CLIII** durch Kupplung oder Acylierung der Aniline **CLIV** mit Carbonsäuren bzw. durch Carbonsäurechloride **CXLVI** aufzubauen. Die Aniline **CLIV** können durch Reduktion der entsprechenden α -Hydroxy- α -(nitrophenyl)phosphonate **CL** dargestellt werden. Die Synthese von α -Hydroxy- α -(nitrophenyl)phosphonaten **CL** wurde von SARDARIAN *et al.* beschrieben.⁴²⁵



Schema 93: Retrosynthetische Überlegung zur Darstellung α -(Amidophenyl)- β -thia-isosterer Fosmidomycin-Analoga. Discon. = *engl. disconnection* = Bindungsbruch, FGI = *engl. functional group interconversion* = Umwandlung einer funktionellen Gruppe.

Die Synthese α -(Amidophenyl)- β -thia-isosterer Fosmidomycin-Analoga begann mit 3- oder 4-Nitrobenzaldehyd (**21i-h**), die jeweils in einer PUDOVIK-Reaktion mit exzellenten Ausbeuten in die α -Hydroxyphosphonate **22f-g** übergeführt wurden (Schema 94). Da es sich bei den α -Hydroxyphosphonaten **22f-g** um Feststoffe handelte, die sich bereits nach wenigen Minuten Reaktionszeit bildeten, wurde der komplette Reaktionsansatz fest und konnte durch Rühren nicht mehr homogenisiert werden. Um eine Homogenisierung und damit vollständigen Reaktionsumsatz zu erzielen, wurde dem Ansatz wenig Dichlormethan zugegeben, die Suspension im Ultraschallbad behandelt und das Lösemittel vollständig am Rotationsverdampfer entfernt. Dieses Vorgehen wurde mehrere Male wiederholt, bis der entsprechende Nitrobenzaldehyd (21i-h) vollständig umgesetzt wurde. Nachfolgende Reduktion der Nitrogruppe mit Palladium auf Aktivkohle unter Wasserstoffatmosphäre lieferte die entsprechende Aniline 22h-i ebenfalls in exzellenten Ausbeuten (Schema 94). Da die Aniline 22h-i nicht lagerstabil waren, wurden diese zügig mit Capronsäurechlorid in Aceton unter Verwendung von Kaliumcarbonat als Hilfsbase zu den α -Hexanamidophenyl- α -hydroxyphosphonaten 22j oder 22k in befriedigenden Ausbeuten von 50 % bis 54 % acyliert (Schema 94).



Schema 94: Synthese des α-Tosyl- (23f) und der α-Chlorphosphonate (24c-d).
(a) 1.00 Äq. Phosphonsäurediethylester, 1.00 Äq. MgO, CH₂Cl₂, 40 °C, 1 h; (b) 10 mol% Pd/C, H₂, MeOH, RT, 24 h; (c) 1.00 Äq. K₂CO₃, 1.05 Äq. Capronsäurechlorid, Aceton, 0 °C – RT, 1 h; (d) 1.05 Äq. Boc₂O, 1.10 Äq. DIPEA, CH₂Cl₂, RT, 16 h; (e) 1.20 Äq. *p*-TsCl, 0.10 Äq. 4-DMAP, 2.50 Äq. Et₃N, CH₂Cl₂, 0 °C – RT, 18 h.

Darüber hinaus wurde Diethyl((4-aminophenyl)(hydroxy)methyl)phosphonat **22i** mit 1.05 Äquivalenten Di-*tert*-butyldicarbonat in Dichlormethan versetzt, sodass das *N*-Bocgeschützte α -Hydroxyphosphonat **22i** mit einer Ausbeute von 53 % erhalten wurde (Schema 94). Die α -Hydroxyphosphonate **22j-I** wurden in Dichlormethan mit *p*-Toluolsulfonsäurechlorid und katalytischen Mengen 4-DMAP umgesetzt, sodass für das *meta*-substituierte α -Hydroxyphosphonat **22j** das α -Tosylphosphonat **23f** entstand und für die *para*-substituierten





 α -Hydroxyphosphonate **22k-I** die entsprechenden α -Chlorphosphonate **24c-d** gebildet wurden (Schema 94).

Die anschließende nukleophile Substitution des Chloratoms (23f) und der Tosylgruppe (24c-d) durch Methylthioglycolat lieferte die Carbonsäureester 25e-g in ausgezeichneten Ausbeuten von 88 % bis 98 % (Schema 95). Die Verseifung des Methylesters erfolgte mittels Lithiumhydroxid in Tetrahydrofuran und Wasser in guter bis ausgezeichneter Ausbeute (Schema 95). Die CDI-vermittelte Kupplungsreaktion mit N-Methylhydroxylamin zu den N-Methylhydroxamsäuren 27e-g verlief mit Ausbeuten von 28 % bis 44 % deutlich schlechter als bei den Hexoxy-substituierten α-Phenyl-Analoga (28a-d). Für die N-Methylhydroxamsäuren 27e und 27f wurde die TMSBr-vermittelte Desalkylierung der Phosphonsäurediethylester durchgeführt. Auch hier zeigten sich im Vergleich zu den Hexoxy-Analoga 28a-d Schwierigkeiten. Während die TMSBr-Spaltung der Hexoxy-Analoga 28a-d vollständigen Eduktumsatz ohne Nebenprodukte zeigten, waren im HPLC-Chromatogramm der Phosphonohydroxamsäuren 28e-f deutlich Nebenprodukte zu erkennen. Folglich war eine Reinigung der Phosphonohydroxamsäuren **28e-f** durch wiederholtes Suspendieren in *n*-Pentan und anschließendes Lyophilisieren zum Entfernen von Trimethylsilylalkohol und Ethylbromid nicht ausreichend. Daher wurde als Reinigungsmethode eine C₁₈-Umkehrphasen-Säulenchromatographie gewählt, obwohl eine Hydrolyse der *N*-Methylhydroxamsäure-Struktur zu einer Carboxylgruppe im wässrigen Fließmittel stattfinden könnte. Die Phosphonohydroxamsäuren **28e-f** konnten auf diese Weise zwar von den weiteren Verunreinigungen abgetrennt werden, allerdings fand tatsächlich eine partielle Hydrolyse der *N*-Methylhydroxamsäure-Struktur statt (Schema 96). Da die Phosphonohydroxamsäuren **28e-f** und die Phosphonocarbonsäuren **29e-f** bei der HPLC die gleiche Retentionszeit und bei der LC-MS-Analyse keine Basislinientrennung der Peaks zeigten, konnte die Hydrolyse nicht quantifiziert, sondern nur auf ca. 10 % geschätzt werden. Eine Abtrennung der Carbonsäuren **29a-f** war nicht möglich, sodass keine sauberen NMR-Spektren der Verbindungen **28e-f** aufgenommen werden konnten.





Da die Phosphonocarbonsäuren **29a-b** im Vergleich zu den Phosphonohydroxamsäuren **28e-f** inaktiv sind,⁴²⁶ wurde dennoch entschieden, die Phosphonohydroxamsäuren **28e-f** mit einer Reinheit von etwa 90 % der biologischen Testung zu unterziehen.

6.3. Strukturaufklärung der α-Hydroxyphosphonate 22c und 22b

Die Strukturaufklärung der α-Hydroxyphosphonate **22c** und **22b** erfolgte durch Auswertung der ¹H-, ¹³C- und DEPT-135-Spektren ergänzt durch die zweidimensionalen NMR-Experimente wie ¹H, ¹H-COSY, ¹H, ¹H-NOESY, ¹H, ¹³C-HSQC und ¹H, ¹³C-HMBC.

6.3.1. Zuordnung der Wasserstoffkerne

Einige Protonen koppeln sowohl homonuklear als auch heteronuklear mit dem ³¹P-Atom. Durch das Chiralitätszentrum am α -C-Atom der α -Hydroxyhosphonate verhalten sich einige Protonen diastereotop zueinander, was zusätzlich zur Komplexität der ¹H-NMR-Spektren beiträgt. Am Beispiel der *para*-(**22c**) und *meta*-substituierten (**22b**) α -Hydroxyphosphonate soll die Zuordnung der Protonensignale exemplarisch erfolgen.



Abbildung 33: ¹H-NMR-Lokantensatz und ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung 22c aufgenommen in Chloroform-*d* (293 K, 300 MHz).

Bei dem *para*-substituierten *α*-Hydroxyphosphonat **22c** zeigt sich beginnend im Hochfeld ein Multiplett bei einer chemischen Verschiebung von δ 0.92, welches sich den H¹³-Protonen der terminalen Methylgruppe zuordnen lässt (Abbildung 33). Die Methyl-Protonen H¹ und H^{1⁺} zeigen sich als zwei Tripletts mit jeweils ${}^{3}J_{H,H} = 7.1$ Hz bei einer chemischen Verschiebung von δ 1.23 und δ 1.29 (Abbildung 33). Die Aufspaltung als Triplett ist auf homonukleäre ${}^{3}J_{H,H}$ -Kopplung mit den Methylenprotonen H², bzw. H^{2⁺} zurückzuführen. Aufgrund des Chiralitätszentrums sind die Protonen H¹ und H¹⁺ magnetisch nicht äquivalent und zeigen sich als zwei distinkte Signale. Die Methylenprotonen H¹² und H¹¹ ergeben ein Multiplett bei einer chemischen Verschiebung von δ 1.31 – 1.37, ebenso wie die Methylenprotonen H¹⁰ bei δ 1.38 – 1.55 und H⁹ bei δ 1.79 (Abbildung 33). Eine deutliche Tieffeldverschiebung zeigen die Methylenprotonen H⁸, die ein Triplett mit ³J_{H,H} = 6.6 Hz bei einer chemischen Verschiebung von δ 3.96 ergeben. Die Methylenprotonen H² und H² sind analog zu den Methylprotonen H¹ und H¹ magnetisch nicht äquivalent und zeigen durch homonukleare Kopplung zu den H¹, bzw. H¹-Protonen und heteronukleare Kopplung mit dem Phosphorkern eine komplexe Aufspaltung als Multiplett bei einer chemischen Verschiebung von δ 3.87 – 4.17. Das *para*-substituierte α -Hydroxyphosphonat **22c** besitzt einen symmetrisch substituierten α -Phenyl-Ring, sodass die Protonen H⁴/H⁴' und H⁶/H⁶' jeweils ein Signal ergeben. Die H⁶-Protonen geben ein Multiplett bei einer chemischen Verschiebung von δ 6.84 – 6.95. Die Feinaufspaltung ist durch die homonukleare ³J_{H,H}-Kopplung zu den Protonen H⁴/H^{4'} und schwache heteronukleare ⁵J_{H,P}-Kopplung bedingt. Die H⁴-Protonen erzeugen ein Multiplett bei einer chemischen Verschiebung von δ 7.35 – 7.47, welches durch ³J_{H,H}-Kopplung zu den H⁶-Protonen, ⁴J_{H,H}-Kopplung zum Proton H³, die ⁴J_{H,P}-Kopplung und die magnetische Nicht-Äquivalenz bedingt ist.



Chloroform-d (293 K, 300 MHz)

Die Protonensignale des Hexoxy-Restes sowie des Ethylesters der Verbindung **22b** zeigen analoge Signale zur *para*-substituierten Verbindung **22c** (Abbildung 34). Da das Spektrum der Verbindung **22b** in wasserfreiem Chloroform-*d* aufgenommen wurde, war das Signal des H¹⁴-Protons der Hydroxygruppe sehen. Dieses H¹⁴-Proton war bei Verbindung **22c** nicht zu sehen, weil im ¹H-NMR-Spektrum von **22c** geringe Mengen Wasser vorhanden waren, welches zu einem Protonen-Deuterium-Austausch führte. Dieses H¹⁴-Proton zeigt sich als Dublett vom

Dublett bei einer chemischen Verschiebung von δ 4.99 mit Kopplungskonstanten von ${}^{3}J_{H,P} = 11.1$ Hz und ${}^{3}J_{H,H} = 5.3$ Hz. Im Vergleich zur Verbindung **22c** zeigt sich das CH-Proton H³ von Verbindung **22b** bei einer chemischen Verschiebung von δ 4.77 als Dublett vom Dublett mit Kopplungskonstanten von ${}^{1}J_{H,P} = 8.9$ Hz und ${}^{3}J_{H,H} = 5.6$ Hz. Die ${}^{3}J_{H,H}$ Kopplung ist wie in diesem Fall nur sichtbar, wenn das Lösemittel wasserfrei ist, da im wässrigen ein Deuterium-Protonen-Austausch stattfindet (Abbildung 33). Für die Zuordnung der aromatischen Protonen müssen zusätzlich das ${}^{1}H,{}^{1}H$ -COSY- und ${}^{1}H,{}^{1}H$ -NOESY-Spektrum herangezogen werden (Abbildung 35).



Abbildung 35: Auswertung der ¹H,¹H-COSY- und ¹H,¹H-NOESY-Spektren von Verbindung 22b.

Bei Betrachtung des ¹H,¹H-COSY-Spektrums ergibt sich ein Kreuzpeak des Multipletts bei einer chemischen Verschiebung von δ 7.20 – 7.28 zu den Multipletts bei δ 6.78 – 6.89 und δ 6.96 – 7.03, sodass dieses Signal dem H⁶-Proton zugeordnet werden kann. Im ¹H,¹H-NOESY-Spektrum lässt sich ein Kreuzpeak zwischen dem Signal bei einer chemischen Verschiebung von δ 7.20 – 7.28 und dem Multiplett bei δ 6.96 – 7.03 erkennen. Da das Multiplett bei einer chemischen Verschiebung von δ 6.78 – 6.89 im ¹H,¹H-NOESY-Spektrum einen Kreuzpeak zu den H⁸-Methylenprotonen zeigt, ist dieses Signal dem H⁷-Proton zuzuordnen. Folglich muss das Signal bei einer chemischen Verschiebung von δ 6.96 – 7.03 nach Ausschlussverfahren zum H⁵-Proton gehören. Das verbleibende Multiplett bei einer chemischen Verschiebung von δ 7.03 - 7.08 zeigt nur im ¹H,¹H-NOESY-Spektrum ein Kreuzpeak zu den Methylenprotonen H⁸, sodass dieses Signal durch das Proton H⁴ erzeugt wird.

6.3.2. Zuordnung der Kohlenstoffkerne von Verbindung 22c und 22b

Im ¹³C-NMR-Spektrum der Verbindung **22c** zeigen sich alle erwarteten Signale der Kohlenstoffkerne, welche sich mittels Interpretation des DEPT-135-Spektrums sowie der entsprechenden ¹H,¹³C-HSQC- und ¹H,¹³C-HMBC-Spektren eindeutig den entsprechenden Kohlenstoffkernen zuordnen lassen. Zunächst erfolgt die Zuordnung der Kohlenstoffkerne des Hexoxyrestes, anschließend der Ethoxygruppen und letztlich der aromatischen Kohlenstoffkerne.





Der primäre Kohlenstoffkern C¹³ der Verbindung **22c** zeigt bei einer chemischen Verschiebung von δ 14.0 ein Singulett (Abbildung 35). Die Singuletts bei chemischen Verschiebungen von δ 22.6, 25.7, 29.2 und 31.6 können mittels DEPT-135-Spektrum als Signal von sekundären Kohlenstoffkernen identifiziert und den Kohlenstoffkerne C9-C12 des Hexoxy-Rest zugeordnet werden. Die Kohlenstoffkerne C¹¹ und C¹² liefern sowohl einen Kreuzpeak im ¹H,¹³C-HSQC-Spektrum zum Multiplett bei einer chemischen Verschiebung von δ 1.31 – 1.37 im ¹H-Spektrum zu den jeweiligen direkt gebundenen Proton H¹¹ bzw. H¹² als auch einen Kreuzpeak im ¹H,¹³C-HMBC-Spektrum zu dem Signal der CH₃-Gruppe des Hexoxy-Restes (Abbildung 37, rot). Das Singulett bei einer chemischen Verschiebung von δ 25.7 zeigt einen Kreuzpeak im ¹H.¹³C-HSQC-Spektrum zum Multiplett bei einer chemischen Verschiebung von δ 1.38 – 1.55 im ¹H-Spektrum, sodass sich dieses Signal dem Kohlenstoffkern C¹⁰ zuordnen lässt. Das Signal bei einer chemischen Verschiebung von δ 29.2 kann durch einen Kreuzpeak im ¹H,¹³C-HSQC dem Kohlenstoffkern C⁹ zugeordnet werden. Die Nähe zur Ethergruppe sowie der auftretende Kreuzpeak zu dem Triplett der Protonen H⁸ im ¹H,¹³C-HSQC-Spektrum ermöglichen die Zuordnung des Signals bei einer chemischen Verschiebung von δ 68.0 zu dem Kohlenstoffkern C⁸.



Abbildung 37: ¹H,¹³C-HMBC-Spektrum der Verbindung 22c.

Die Methyl- und Methylengruppen des Phosphonsäureesters sind chemisch und magnetisch nicht äquivalent. Zudem zeigt sich durch heteronukleare ¹³C-³¹P-Kopplung jeweils eine Aufspaltung des Signals in Dubletts. Dementsprechend konnten die zwei Dubletts mit ³*J*_{C,P} = 3.0 Hz bei einer chemischen Verschiebung von δ 16.36 und δ 16.43 den Kohlenstoffkernen C¹ und C¹ zugeordnet werden (Abbildung 35).

Der Kreuzpeak im ¹H, ¹³C-HSQC-Spektrum zwischen den direkt gebundenen H¹/H¹-Protonen der beiden Tripletts bei einer chemischen Verschiebung von δ 1.07 und δ 1.24 im ¹H-NMR-Spektrum sowie ein Kreuzpeak im ¹H, ¹³C-HMBC-Spektrum zu den Signalen der Methylenprotonen H²/H² des Ethylesters bestätigen diese Zuordnung (Abbildung 37, orange). Die Dubletts mit ²J_{C,P} = 7.4 Hz bei einer chemischen Verschiebung von δ 63.0 und ²J_{C,P} = 7.0 Hz bei einer chemischen Verschiebung von δ 63.2 lassen sich durch einen Kreuzpeak im ¹H, ¹³C-HMBC-Spektrum den Kohlenstoffkernen C² uordnen (Abbildung 37, violett). Der Kohlenstoffkern C³ erfährt durch die räumliche Nähe zum Phosphoratom eine Tieffeldverschiebung und zeigt sich als Dublett mit ¹J_{C,P} = 161.0 Hz, sodass eine Zuordnung zum Signal bei einer chemischen Verschiebung von δ 70.4 bereits aufgrund der großen, für die ¹J-Kopplung typische Kopplungskonstante, möglich ist (Abbildung 35). Dies wird zusätzlich durch den Kreuzpeak zum Dublett bei einer chemischen Verschiebung von δ 4.95 des H³-Protons im ¹H, ¹³C-HSQC-Spektrum belegt.

Aufgrund der symmetrischen Substitution des Phenylringes zeigen sich im aromatischen Bereich des ¹³C-Spektrums vier Dubletts, wobei die Aufspaltung jeweils durch ¹³C-³¹P-Kopplung bedingt ist. Das DEPT-135-Spektrum zeigt, dass es sich bei den Signalen mit einer chemischen Verschiebung von δ 114.3 und δ 128.4 um tertiäre Kohlenstoffkerne und bei den Signalen mit einer chemischen Verschiebung von δ 128.3 und δ 159.1 um guartäre Kohlenstoffkerne handelt. Die Kreuzpeaks im ¹H,¹³C-HSQC ermöglichen die Zuordnung des Dubletts mit einer chemischen Verschiebung von δ 114.3 und ${}^{4}J_{C,P}$ = 2.3 Hz zu den Kohlenstoffkernen C⁶/C^{6⁴} und das tieffeldverschobene Dublett mit einer chemischen Verschiebung von δ 128.4 und ${}^{3}J_{C,P}$ = 6.1 Hz zu den Kohlenstoffkernen C⁵/C⁵. Der quartäre Kohlenstoffkern C⁴ erzeugt ein Dublett mit einer chemischen Verschiebung von δ 128.3 und $^{2}J_{C.P}$ = 2.0 Hz, der sich durch einen Kreuzpeak im ¹H,¹³C-HMBC zum Proton H³ zuordnen lässt (Abbildung 37, blau). Die größte Tieffeldverschiebung erfährt der Kohlenstoffkern C⁷ bei einer chemischen Verschiebung von δ 159.1 und ${}^{5}J_{C,P}$ = 2.8 Hz aufgrund der räumlichen Nähe zum Sauerstoffatom. Im ¹H,¹³C-HMBC-Spektrum wurde die Zuordnung des C⁷-Kerns zusätzlich durch einen Kreuzpeak zu den Methylenprotonen H⁸ sowie H⁴/H⁴ und H⁶/H⁶ bestätigt (Abbildung 37, grün).

Die Auswertung des ¹³C-NMR-Spektrums von Verbindung **22b** zeigt, dass die Signale der Kohlenstoffkerne des Hexoxy- ($C^{10}-C^{15}$) und der Ethoxyreste ($C^{1/1^{\circ}}-C^{2/2^{\circ}}$) sowie der α -Kohlenstoffkern C³ hinsichtlich der chemischen Verschiebung und Aufspaltung mit denen der Verbindung **22c** übereinstimmen und im Folgenden nicht erneut zugeordnet werden. Die Zuordnung der aromatischen Kohlenstoffkerne erfolgte mittels Interpretation des DEPT-135-Spektrums sowie der entsprechenden ¹H, ¹³C-HSQC- und ¹H, ¹³C-HMBC-Spektren.



Abbildung 38: ¹³C-NMR-Lokantensatz und Ausschnitt des ¹³C-NMR-Spektrums der Verbindung **22b** bei einer chemischen Verschiebung δ 80 - 160 aufgenommen in Chloroform-*d* (293 K, 75 MHz)

Das Dublett mit ${}^{3}J_{C,P} = 5.7$ Hz bei einer chemischen Verschiebung von δ 113.0 zeigt im ¹H, ¹³C-HSQC-Spektrum einen Kreuzpeak zum Multiplett bei einer chemischen Verschiebung von δ 7.03 - 7.08 sowie im ¹H, ¹³C-HMBC-Spektrum einen Kreuzpeaks zu den Protonen H⁵-H⁷, sodass das Dublett dem tertiären Kohlenstoffkern C⁵ zugeordnet werden kann (Abbildung 38). Durch einen Kreuzpeak im ¹H, ¹³C-HSQC-Spektrum zu dem Multiplett bei einer chemischen Verschiebung von δ 6.96 – 7.03 konnte das Dublett mit ${}^{5}J_{C,P} = 3.1$ Hz bei einer chemischen Verschiebung von δ 114.5 als C⁷-Kern identifiziert werden. Diese Zuordnung wird durch Kreuzpeaks im ¹H, ¹³C-HMBC-Spektrum zu den Protonen H⁴, H⁵ und H⁶ unterstrichen. Das Dublett mit ${}^{3}J_{C,P} = 5.9$ Hz bei einer chemischen Verschiebung von δ 119.3 zeigte im ¹H, ¹³C-HSQC-Spektrum Kreuzpeaks zu den Protonen H⁴ und H⁵. Folglich handelt es sich bei dem Signal mit einer chemischen Verschiebung von δ 119.3 um den Kohlenstoffkern C⁹. Als letzter tertiärer Kohlenstoffkern lässt sich das Dublett mit ${}^{4}J_{C,P} = 2.5$ Hz bei einer chemischen Verschiebung von δ 119.3 um den Kohlenstoffkern C⁹. Als letzter tertiärer Kohlenstoffkern lässt sich das Dublett mit ${}^{4}J_{C,P} = 2.5$ Hz bei einer chemischen Verschiebung von δ 119.3 um den Kohlenstoffkern C⁹. Als letzter tertiärer Kohlenstoffkern Lässt sich das Dublett mit ${}^{4}J_{C,P} = 2.5$ Hz bei einer chemischen Verschiebung von δ 129.1 dem Kern C⁸ zuordnen, was durch einen Kreuzpeak im ¹H, ¹³C-HSQC-Spektrum zu dem Proton H⁶ gestützt wird. Bei den Dubletts bei

einer chemischen Verschiebung von δ 138.1 mit ${}^{2}J_{C,P}$ = 1.9 Hz und δ 159.1 mit ${}^{4}J_{C,P}$ = 2.6 Hz handelt es sich quartäre Kohlenstoffkerne. Beide Kerne zeigen im ${}^{1}H,{}^{13}C$ -HMBC-Spektrum einen Kreuzpeak zum Proton H⁶. Aufgrund des elektronenziehenden Effektes des Hexoxy-Restes ist der C⁶-Kern stärker abgeschirmt, sodass das am weitesten tieffeldverschobene Signale bei einer chemischen Verschiebung von δ 159.1 dem C⁶-Kern zuzuordnen ist. Folglich wird das Signal bei einer chemischen Verschiebung von δ 138.1 durch den Kohlestoffkern C⁴ erzeugt.

6.4. Präklinische Evaluation der β-thia-isosteren Fosmidomycin-Analoga

Im folgenden Kapitel werden Enzymaktivitäten der dargestellten β -thia-isosteren Fosmidomycin-Analoga gegenüber den DXR-Orthologen von *M. tuberculosis (Mt*DXR), *E. coli (Ec*DXR) und *P. falciparum (Pf*DXR) diskutiert. Anschließend erfolgt die Betrachtung der *in vitro* Wachstumshemmung gegenüber Stämmen von *M. tuberculosis* (H37Rv), *E. coli* (25922) und Chloroquin-sensitiven (3D7) sowie mehrfach-resistenten (Dd2) *P. falciparum* Stämme. Zudem soll für ausgewählte Beispiele die chemische Stabilität diskutiert werden und eine Kristallstrukturanalyse von Verbindung **28a** im Komplex mit *Pf*DXR erfolgen.

<u>Methoden</u>

Die Bestimmung der **Enzyminhibition (IC**₅₀) gegen die DXR-Orthologe von *Mycobacterium tuberculosis*, *Plasmodium falciparum* und *Escherichia coli* erfolgte in Kooperation mit dem Institut für Lebensmittelchemie, Universität Hamburg durch DR. BORIS ILLARIONOV aus der Arbeitsgruppe von PROF. Dr. MARKUS FISCHER mittels photometrischer Assays. Die Genexpression und Proteinreinigung von *Mt*DXR, *Pf*DXR und *Ec*DXR wurde nach einer publizierten Methode durchgeführt.²³⁴

Die Bestimmung der **Minimalen Hemmkonzentrationen (MHK**₉₀) gegenüber dem virulenten *M. tuberculosis* H37Rv Stamm erfolgte in Kooperation mit dem Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durch M.Sc. VIOLETTA KRISILIA aus der Arbeitsgruppe von PROF. DR. RAINER KALSCHEUER mittels *Microbroth Dilution Assay* (vgl. Kapitel 5.6). Die Kultivierung von *M. tuberculosis* H37Rv und Bestimmung der MHK₉₀-Werte erfolgte wie zuvor beschrieben.³¹³

Die Bestimmung der **Minimalen Hemmkonzentration (MHK**₉₀) gegenüber dem *E. coli* 25922 Stamm erfolgte in Kooperation mit dem Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durch HEIKE GOLDBACH-GECKE aus der Arbeitsgruppe von PROF. DR. RAINER KALSCHEUER mittels *Microbroth Dilution Assay* nach Clinical and Laboratory Standards Institute Guideline.⁴²⁷ Die Bestimmung der *in vitro* Wachstumsinhibitionen (IC₅₀) gegen die asexuelle *Plasmodium falciparum* Stämme *Pf*3D7 (Chloroquin-sensitiv) und *Pf*Dd2 (mehrfachresistent) erfolgte in Kooperation mit dem Institut für Tropenmedizin, Eberhard-Karls-Universität Tübingen durch DR. LAIS PESSANHA DE CARVALHO und DR. JANA HELD mittels *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) nach einer publizierten Methode.^{234,428}

6.4.1. Target-basiertes *in vitro* Screening gegenüber DXR-Ortologen und phänotypische *in vitro* Aktivität

Zur Einordnung der Ergebnisse dieser Arbeit, sollen die bisherigen Erkenntnisse der SAR bezogen auf Substituenten am Hydroxamsäure-Stickstoff kurz dargestellt werden. In der Vergangenheit wurde überwiegend angenommen, dass *N*-Formyl- oder *N*-Acetylhydroxylamin- sowie (*N*-Methyl-)Hydroxamsäure-Strukturen als Metall-bindende Gruppe (MBG) für eine potente Aktivität eines Inhibitors gegenüber DXR-Enzymen notwendig seien (Schema 97).⁴²⁶



Schema 97: Funktionelle Gruppen, die als Metall-bindende Gruppe zur potenten Inhibition von DXR-Enzymen identifiziert wurden.⁴²⁶

LIENAU konnte für die β -thia-isosteren α -Phenyl-substituierten Fosmidomycin-Analoga die Tendenz erkennen, dass *N*-methylierte Hydroxamsäuren gegenüber den DXR-Orthologen aktiver sind als die unsubstituierten Hydroxamsäuren und eine bessere chemische Stabilität aufweisen.^{235,277,278}

Die initiale Hypothese, große *N*-Alkyl-Substituenten an der Hydroxamsäuregruppe würden nicht toleriert werden, wurden zudem durch Untersuchung von BEHRENDT *et al.* bekäftigt,^{415,429,430} da die Einführung von *N*-Ethyl (**CB3**) und *N*-Isopropyl-Substituenten (**CB4**) zu einer sukzessiven Verschlechterung der inhibitorischen Aktivität gegenüber *Pf*DXR und *Ec*DXR führten (Tabelle 21). Unter Einbezug der ebenfalls reduzierten antiplasmodialen Aktivität, wurde folglich angenommen, dass die *N*-Methyl-Hydroxamsäuregruppe die ideale Metall-bindende Gruppe darstellt (Tabelle 21).

	HO,					
	Fosb	CB1	CB2	CB3	CB4	
R		Н	Methyl	Ethyl	<i>i</i> -Propyl	
IC₅₀ <i>Mt</i> DXR [nM] ^a	230	1400 ^c	2000 ^c	-	-	
IC₅₀ <i>Ec</i> DXR [nM] ^ª	220	590 ^d	240 ^d	1500 ^e	inaktiv ^e	
IC₅₀ <i>Pf</i> DXR [nM] ^a	160	12 ^d	3 ^{<i>d</i>}	15 ^e	inaktiv ^e	
IC₅₀ <i>Pf</i> 3D7 [nM] [♭]	880	400 ^c	90 ^c	1200 ^f	-	
IC₅₀ <i>Pf</i> Dd2 [nM] [♭]	810	570°	74 ^c	1300	-	
cLogP ^g	-1.14	0.02	0.24	0.62	0.85	

Tabelle 21: Publizierte IC₅₀-Werte von den reversen α -Phenyl-*N*-Alkyl-Fosmidomycin-Analoga **CB1-4** gegen DXR-Orthologe und antiplasmodiale Aktivität.

^{*a}</sup> <i>n* =3; ^{*b*} n = 2; ^{*c*} entnommen aus KUNFERMANN *et al.*²³⁵; ^{*d*} entnommen aus BEHRENDT *et al.*(2010)⁴²⁹; ^{*e*} entnommen aus BEHRENDT *et al.* (2011)⁴²⁹; ^{*f*} entspricht der Wachstumshemmung von *P. falciparum* in humanen Erythrozyten (*Pf*K1); ^{*g*} berechnet mit SwissADME.³⁷⁰</sup>

ABDULLAZIZ *et al.* konnte zeigen, dass inverse *N*-Phenylalkyl-Fosmidomycin-Analoga sehr potente Inhibitoren von *Ec*DXR und *Pf*DXR sind und damit die initial Hypothese widerlegen (Tabelle 22).²³⁴ Insbesondere die Verbindung **MAMK89** zeigt eine potente Inhibition von *Ec*DXR (IC₅₀ = 35 nM) und *Pf*DXR (IC₅₀ = 30 nM) und ist damit vergleichbar aktiv wie die Leitstruktur **CL1**. Gegen *Mt*DXR führt die Einführung des *N*-Arylalkyl-Substituenten allerdings zu einem Aktivitätsverlust um Faktor 10 (IC₅₀ = 3000 nM) (Tabelle 22).

Mit Ausnahme einiger Prodrugs zeigen außer **Fos** und dessen Acetyl-Analogon FR900098 (MIC = $6.25-12.5 \mu g/mL$) kein weiteres Analogon Wachstumshemmung gegen *E. coli* und kein **Fos**-Analogon ist gegen *Mt* aktiv.^{431,432} Es bestand die Hypothese, dass die Erhöhung der Lipophilie bei neuen Inhibitoren dieses Permeabilitätsproblem adressieren könnte. Obwohl **MAMK89** mit einem cLogP von 2.13 im Vergleich zu **CL1** (cLogP = 0.16) und Fosmidomycin (cLogP = -1.14) lipophiler ist und damit eine passive Diffusion in die Bakterien begünstigt sein könnte, zeigt **MAMK89** keine Wachstumshemmung gegenüber *M. tuberculosis* oder *E. coli* (Tabelle 22). Bei den *P. falciparum* Stämmen scheint der große Substituent die zelluläre Aufnahme sogar zu behindern, da **MAMK89** im Ganzzellassay um Faktor 6 bis 12 schlechter ist als **CB2** (Tabelle 21 und Tabelle 22).

	HO,	HO, P S N, OH	HO HO O HO HO CH ₃	
	MAMK89 ^a	20	CL1 ^b	
IC₅₀ <i>Mt</i> DXR [nM] ^c	3000 ± 200	190 ± 14	280 ± 30	
M t ^d	inaktiv	inaktiv	inaktiv	
IC₅₀ <i>Ec</i> DXR [nM] ^c	35 ± 4	8.1 ± 0.3	8.2 ± 0.8	
E. coli ^d	inaktiv	inaktiv	inaktiv	
IC₅₀ <i>Pf</i> DXR [nM] ^d	30 ± 7	18 ± 5	24 ± 2	
IC₅₀ <i>Pf</i> 3D7 [nM] ^c	550 ± 30	n.b.	30	
IC₅₀ <i>Pf</i> Dd2 [nM] ^c	940 ± 160	n.b.	75	
cLogP ^e	2.13	2.00	0.16	

 Tabelle 22: IC50-Werte von MAMK89, 20 und CL1 gegen DXR-Orthologe sowie antibakterielle und antiplasmodiale

 Aktivität.

^{*a*} entnommen von ABDULLAZIZ *et al.*²³⁴; ^{*b*} entnommen von KUNFERMANN *et al.*²³⁵; ^{*c*} n = 2; ^{*d*} n = 3; ^{*e*} berechnet mit SwissADME.³⁷⁰ n.b. = nicht bestimmt.

Die Thia-Analoga können durch das wasserstoffbrückenakzeptierende Schwefelatom in β -Position im Gegensatz zu den Carba-Analoga eine zusätzliche Interaktion mit Met298 eingehen. Folglich sollte das entsprechende Thia-Analogon von **MAMK89** potenter gegenüber den DXR-Orthologen und die zelluläre Aufnahme durch erhöhte Lipophilie im Vergleich zu **CL1** verbessert sein. Zwar zeigt das Thia-Analogon **20** eine gesteigerte Aktivität gegen alle drei DXR-Orthologe im Vergleich zu **MAMK89** und eine gesteigerte oder vergleichbare Aktivität wie **CL1**, allerdings zeigt auch Verbindung **20** keine bakterielle Wachstumsinhibition (Tabelle 22). Die Evaluation der antiplasmodialen Aktivität ist noch ausstehend.

Aus dieser Untersuchung kann geschlussfolgert werden, dass die Erhöhung der Lipophilie in diesem Maße nicht ausreichend ist, damit der Inhibitor die Zellmembranen effektiv überwindet. In Ergänzung zu den Untersuchungen von ABDULLAZIZ zeigt Verbindung **20**, dass sterisch anspruchsvolle Substituenten am Stickstoff der Hydroxamsäuregruppe zu einer vergleichbaren oder gesteigerten Aktivität im Vergleich zu Fosmidomycin-Analoga mit einem *N*-Methyl-Substituenten (**CB2** und **CL1**) führen können. Zudem stehen diese Ergebnisse mit denen von KUNFERMANN *et al.* im Einklang, dass eine Thioether-Gruppe in β -Position zu einer Aktivitätssteigerung gegenüber *Mt*DXR führt.

6.4.2. Ergebnisse des Target-basierten *in vitro* Screening gegenüber DXR-Orthologen der Verbindungen 28a-f

Frühere Arbeiten von LIENAU zeigten, dass Substituenten am α -Phenyl-Ring die inhibitorische Aktivität gegenüber DXR-Orthologen verbessern können.²⁷⁸ Beispielsweise zeigt die Verbindung **CL2** mit einer Thiomethoxygruppe in 4-Position des α -Phenyl-Rings im Vergleich zu **CL1** eine schwachen Aktivitätssteigerung gegen *Mt*DXR, während die Aktivität gegen *Ec*DXR und *Pf*DXR reduziert ist (Tabelle 23). Im Gegensatz dazu zeigt der Inhibitor mit Methoxy-Substituenten in 3- und 5-Position des α -Phenyl-Rings (**CL3**) einen 15- bis 20-fachen Aktivitätsverlust gegen *Mt*DXR und *Ec*DXR bei schwacher Verbesserung der *Pf*DXR-Inhibition. Um den Einfluss sterisch anspruchsvoller Substituenten am α -Phenyl-Ring auf die DXR-Inhibition näher zu untersuchen, wurden die Verbindungen **28a-f** dargestellt.

Tabelle 23: IC₅₀-Werte der Referenzverbindungen Fos, CL1-3 und der dargestellten Verbindungen 28a-f gegen *Mt*DXR, *Ec*DXR und *Pt*DXR.

	HO, P, S, O, O, O, HO, P, S, O, HO, C, H, S,				
D -	Verbindung	IC ₅₀ <i>Mt</i> DXR ^a	IC ₅₀ EcDXR ^a	IC ₅₀ <i>Pf</i> DXR ^b	
R -		[n M]	[nM]	[nM]	
	Fos ^c	230 ± 20	220 ± 10	160 ± 20	
Н	CL1 ^c	280 ± 30	8.2 ± 0.8	24 ± 2	
4-SCH ₃		100 ± 20	22 ± 5	29 ± 8	
3,5-OCH₃		4400 ± 600	160 ± 30	20 ± 4	
3-Hexoxy	28a	89 ± 3	4.9 ± 0.4	18 ± 0	
4-Hexoxy	28b	92 ± 5	17 ± 1	48 ± 6	
3-Hexanamido	28e ^e	1300 ± 0	100 ± 13	140 ± 17	
4-Hexanamido	28f ^e	1800 ± 71	94 ± 9	100 ± 36	
3-(6-Phthaloylhexoxy)	28c	1700 ± 850	68 ± 4	97 ± 20	
4-(6-Phthaloylhexoxy)	28d	155 ± 7	13 ± 1	21 ± 3	

^a n = 2; ^b n = 3; ^c entnommen von KUNFERMANN *et al.*²³⁵; ^d entnommen von LIENAU *et al.*²⁷⁸; ^e Die Verbindungen weisen eine LC-MS-Reinheit von etwa 90 % auf.

Eine Analyse der inhibitorischen Aktivität gegenüber *Mt*DXR zeigt, dass die Analoga mit einem Hexoxy-Substituenten in *meta*- und *para*-Position (**28a-b**) des α -Phenyl-Rings eine dreifache Aktivitätsteigerung mit IC₅₀-Werten von 89 nM, bzw. 92 nM gegenüber *Mt*DXR im Vergleich zu **CL1** (IC₅₀ = 280 nM) aufweisen. Ebenso konnte die Verbindung mit einem 4-(6-

Phthaloylhexoxy)-Substituenten **28d** die Inhibition von **CL1** der drei DXR-Orthologe übertreffen. Für den sterisch anspruchsvollen 6-Phthaloylhexoxy-Substituenten ist im Fall von *Mt*DXR die Position am α -Phenyl-Ring entscheidend. Befindet sich der 6-Phthaloylhexoxy-Substituent in *meta*-Position (**28c**), verringert sich die Potenz im Vergleich zur *para*-Position (**28d**) um eine Zehnerpotenz auf 1.7 µM. Im Vergleich zu den Ether-verbrückten Analoga **28a-b** zeigt sich bei den Inhibitoren mit Amid-Verbindungseinheit in *meta*- und *para*-Position (**28e-f**) eine drastische Reduktion der inhibitorischen Aktivität um Faktor 14, bzw. 20. Zwar waren die Verbindungen **28e** und **28f** zu etwa 10 % verunreinigt, allerdings dürfte dies allein nicht den Aktivitätsverlust erklären.

Alle Aussagen bezüglich der SAR der Verbindungen **28a-f** sowie **CL1** gegenüber *Mt*DXR sind auf *Ec*DXR und *Pf*DXR übertragbar. Es kann zudem der Schluss gezogen werden, dass diese Klasse am potentesten *Ec*DXR und vergleichbar potent *Pf*DXR inhibiert und die Wirkung gegen *Mt*DXR insgesamt etwas schlechter ist. Somit zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Enzymen, was auf strukturelle Unterschiede innerhalb der hochkonservierten Bindungstasche zurückzuführen ist.^{433,434}

Zusammenfassend ist es gelungen, drei Verbindungen (**28a-b**, **28d**) darzustellen, welche stärkere DXR-Inhibitoren als die Leitstruktur **CL1** und der Naturstoff Fosmidomycin sind.

6.4.3. Ergebnisse der phänotypischen in vitro Aktivitäten von Verbindung 28a-f

Für die Verbindung **CL1** wurde von LIENAU *et al.* ein Caco-2-Permeabilitätstest, welcher als Surrogat für die Permeabilität (= passive Diffusion und aktiver Transport abzüglich des Effluxes) über Membranen herangezogen werden kann,⁴³⁵ durchgeführt. Dieser Assay ergab, dass die Permeabilität von **CL1** schlechter ist als die Permeabilität von Atenolol, welches als Negativkontrolle verwendet wurde, sodass weder aktiver Transport noch passive Diffusion von **CL1** in nennenswertem Maß stattfindet oder die Verbindung instantan effluxiert wird.²⁷⁸ Da die Transporter in humanen, bakteriellen und plasmodialen Membranen und Zellwänden strukturell sehr divers sind, könnte eine Permeabilitätssteigerung durch Erhöhung der Lipophilie erzielt werden.⁴³⁶ Die Verbindungen **CL2** und **CL3** haben im Vergleich zu **CL1** höhere berechnete LogP-Werte, also eine höhere Lipophilie, und zeigen eine geringfügig stärkere antiplasmodiale Aktivität (IC₅₀ = 100-180 nM) als die Leitstruktur **CL1** (Tabelle 24).

HO P S OH HO CH ₃							
R =	Verb.	cLogPª	IC₅₀ <i>Pf</i> Dd2 [♭] [µM]	$\frac{\mathrm{IC}_{50} P f \mathrm{Dd2}}{\mathrm{IC}_{50} P f \mathrm{DXR}}$	IC₅₀ <i>Pf</i> 3D7 [♭] [µM]	$\frac{\mathrm{IC}_{50} Pf 3\mathrm{D7}}{\mathrm{IC}_{50} Pf \mathrm{DXR}}$	
	Fos ^c	-1.14	0.81 ± 0.16 ^e	5	0.88 ± 0.18 ^e	15	
Н	CL1 ^c	0.16	0.26 ± 0.05^{e}	10	0.19 ± 0.08^{e}	8	
4-SCH ₃		0.65	0.18 ± 0.00^{e}	6	0.10 ± 0.06^{e}	3	
3,5-OCH₃		0.38	0.18 ± 0.04	9	0.16 ± 0.01	8	

Tabelle 24: Publizierte IC₅₀-Werte von **CL1-3** gegen *Pf*Dd2 und *Pf*3D7 sowie berechnete Quotienten und cLogP-Werte.

^a berechnet mit SwissADME³⁷⁰; ^b n = 2; ^c entnommen aus KUNFERMANN *et al.*²³⁵; ^d entnommen aus LIENAU *et al.*²⁷⁸.

Ist ein Inhibitor potenter an einem isolierten Enzym, ist zunächst auch eine potentere Ganzzellaktivität zu erwarten. Um diese Korrelation zu nivellieren, kann der Quotient aus der Ganzzellaktivität zu erwarten. Um diese Korrelation zu nivellieren, kann der Quotient aus der Ganzzellinhibition und Enzyminhibition (IC₅₀ [Ganzzellassay] / IC₅₀ [*Pf*DXR]) gebildet werden (Tabelle 24). Liegt der Quotient bei eins, gelangt der Inhibitor quantitativ, bzw. uneingeschränkt zu seinem Target. Hohe Quotienten können auf Permeabilitätsprobleme, aber auch schlechte chemische oder metabolische Stabilität hindeuten. Dieser Quotient kann somit als Surrogat für pharmakokinetischen Eigenschaften herangezogen werden. Eine Analyse der *Pf*Dd2-Quotienten von **CL1** und **CL3** zeigt, dass diese im Vergleich zu **Fos** höherer sind, welches auf eine schlechtere Permeabilität und/oder Stabilität hindeutet, während **CL2** einen ähnlichen Quotienten wie **Fos** aufweist (Tabelle 24). Somit ist der Stoffmengenanteil, der zum Target gelangt und/oder die Stabilität von **Fos** und **CL2** vergleichbar. Im Falle von *Pf*3D7 zeigen **CL1-3** sogar eine verbesserte Permeabilität und/oder Stabilität als **Fos**. Dieser Befund führte zu der Hypothese, eine gesteigerte Lipophilie könne die Permeabilität bei *P. falciparum* verbessern.

Zur Überprüfung dieser Hypothese, wurden die Verbindungen **28a-f** in phänotypischen Ganzzellassays gegen *M. tuberculosis*, *E. coli* und *P. falciparum* getestet (Tabelle 25).

HO HO HO R HO R HO R							
R =	Verb.	cLogP ^a	IC₅₀ <i>Pf</i> Dd2 [♭] [µM]	$\frac{\mathrm{IC}_{50} P f \mathrm{Dd2}}{\mathrm{IC}_{50} P f \mathrm{DXR}}$	IC₅₀ <i>Pf</i> 3D7 [♭] [µM]	$\frac{\mathrm{IC}_{50} Pf 3\mathrm{D7}}{\mathrm{IC}_{50} Pf \mathrm{DXR}}$	
	Fos	-1.14	0.81 ± 0.16 ^e	5	0.88 ± 0.18 ^e	15	
Н	CL1 ^e	0.16	0.26 ± 0.05^{e}	10	0.19 ± 0.08^{e}	8	
3-Hexoxy	28a	1.98	12 ± 4	670	11 ± 3	610	
4-Hexoxy	28b	1.99	5.8 ± 0.2	120	8.0 ± 1.9	170	
3-Hexanamido	28e	1.15	13 ± 9	93	12 ± 2	86	
4-Hexanamido	28f	1.27	14 ± 2	140	> 13	>130	
3-(6-Phthaloylhexoxy)	28c	2.12	9.8 ± 2	100	> 12	>120	
4-(6-Phthaloylhexoxy)	28d	2.08	1.9 ± 0.4	90	2.6 ± 0.3	120	

Tabelle 25: IC₅₀-Werte von CL1 und 28a-f gegen *Pf*Dd2 und *Pf*3D7 sowie berechnete Quotienten und cLogP-Werte.

^a berechnet mit SwissADME^{370; b} n = 2; ^c entnommen aus KUNFERMANN et al.²³⁵

Die lipophilen Verbindungen **28a-f** mit clogP-Werten von 1.15 bis 2.12 zeigen im Vergleich zu **CL1** eine rapide Reduktion der antiplasmodialen Aktivität (Tabelle 25). Insgesamt zeigen die Amid-verbrückten Verbindungen **28e** und **28f** die geringsten antiplasmodialen Aktivitäten ($IC_{50} > 12 \mu M$). Bei einem Vergleich der Ether-verbrückten Verbindungen **28a-d** wird deutlich, dass die *para*-substituierten Verbindungen **28b** und **28d** bessere Wachstumsinhibitoren als die jeweiligen *meta*-substituierten **28a** und **28c** sind. Für alle neuen Verbindungen **28a-f** sind die Quotienten (86-670) viel höher als für **Fos** und **CL1**, welches auf ein Permeabilitätsproblem dieses Verbindungstyps aufgrund der sterisch anspruchsvollen Substituenten hindeuten.

Bei *P. falciparum* müssen neben der Erythrozyten- und Parasitenmembran, die parasitophore Vakuole (PVM) und vier apicoplastäre Membranen⁴³⁷, genauer die Doppelmembran der invadierten Cyanobakterien, die Periplastidmembran (PPM) und die äußere Membran, überwunden werden.^{438,439} Für die Aufnahme von Fosmidomycin und anderen organischen Molekülen in die infizierten Erythrozyten konnte ein sogenannter Parasiten-induzierter *new permeability pathway*, der zur Expression von plasmodialen Oberflächen-Anionenkanälen (PSAC) führt, postuliert werden.⁴³⁹⁻⁴⁴² Darüber hinaus konnten in der PVM der infizierten Erythrozyten eine große Anzahl größenselektiver Nährstoffporen identifiziert werden, welche mit einem Porendurchmesser von 23 Å konstitutiv geöffnet sind und den Transport von kleinen Molekülen wie Aminosäuren und Monosacchariden erlauben.^{443,444} Für den aktiven Transport von organischen Molekülen über die Parasitenmembran kommen zwar einige Transporter und

Carrier in Frage, allerdings könnten diese eine hohe Substratspezifität besitzen.⁴⁴⁵ Die abschließende Aufnahme von Fosmidomycin und seiner Analoga in den Apicoplasten ist nicht vollständig verstanden.⁴⁴⁶

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen, dass eine Steigerung der Lipophilie nicht zwangsläufig zu einer Erhöhung der Membranpermeabilität und damit antiplasmodialen Aktivität führt. Wie bereits dargestellt, sind die *Plasmodien* komplex strukturiert und es bedarf einer genaueren Untersuchung der Aufnahme von DXR-Inhibitoren, um gegebenenfalls aktive Transportmechanismen für die Aufnahme zu identifizieren.

Bei *P. falciparum* ist die DXR im Apicoplasten lokalisiert, während die DXR bei Bakterien im Zytosol vorliegt.⁴⁴⁷ Folglich muss für Bakterien nur die äußere Zellwand überwunden werden. In *E. coli* konnte für Fosmidomycin ein aktiver Transport über die äußere Membran mittels cAMP-abhängigem Glycerin-3-phosphat-Shuttlesystem (GlpT) nachgewiesen werden,^{448,449} der in *Mt* und *Pf* nicht existiert. Fosmidomycin zeigt eine Wachstumshemmung gegenüber *E. coli* mit einem MHK₉₀-Wert von 0.98 - 250 μ M.^{431,450} Die Verbindung **CL1** und die abgeleiteten Analoga **28a-f** zeigen keine Aktivität im getesteten Bereich bis 100 μ M. Dies könnte dafürsprechen, dass **CL1** bereits zu groß für eine GlpT-vermittelte Aufnahme und keine passive Diffusion trotz positivem cLogP-Wert möglich ist (Tabelle 25).

Weder Fosmidomycin noch CL1 hemmen das Wachstum von *M. tuberculosis*.^{277,451-453} Die mykobakterielle Zellwand ist aufgrund seines kovalent-verknüpften Mycolyl-Arabinogalactan-Peptidoglykan (mAGP)-Komplex stark lipophil⁴⁵⁴ und deutlich weniger durchlässig für organische Moleküle als die Zellwand von *E. coli.*⁴⁵⁵ Soweit bekannt, gibt es für die aktive Aufnahme von Fosmidomycin in das mykobakterielle Zytosol keinen Transporter.^{456,457} Dennoch können kleine, stark hydrophile Verbindungen wie das Leitlinien-Antibiotikum Isoniazid mit einem cLogP von -0.35 mittels passiver Diffusion in das Zytosol gelangen.⁴⁵⁸ Folglich könnten auch hydrophile Fosmidomycin-Analoga mittels passiver Diffusion oder über transmembranärer Porine, welche die Aufnahme kleiner Moleküle in Abhängigkeit von Ladung, Lipophilie und Wasserlöslichkeit ermöglichen, in das Zytosol gelangen.⁴⁵⁵ Die fehlende inhibitorische Aktivität könnte neben schlechter Permeabilität aber auch durch den Efflux der Verbindungen verursacht werden. Mykobakterien exprimieren im Verhältnis zu E. coli deutlich mehr Ex- als Importer.⁴⁵⁵ Dies könnte dazu führen, dass bei *M. tuberculosis* die Wirkstoffe direkt effluxiert werden, was eine intrinsischen Resistenz der Mykobakterien gegenüber den Fosmidomycin-Analoga bedingt. Um hier genauer differenzieren zu können, müsste die Aufnahme in die Zelle und darüber hinaus die metabolische Stabilität der Verbindungen 28a-f untersucht werden.

6.4.4. Kristallstrukturanalysen

Co-Kristallstrukturen von Enzymen mit gebundenem Inhibitor ermöglichen es, die Enzym-Liganden-Interaktionen präzise zu analysieren und basierend auf diesen Erkenntnissen neue Inhibitoren rational zu entwickeln. Von der 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat Reduktoisomerase (DXR) gibt es bereits 77 Einträge in der Protein Data Bank, von denen 22 *Mt*DXR, 20 *Pf*DXR und 15 *Ec*DXR Kristallstrukturen ausmachen.⁴⁵⁹⁻⁴⁶¹ Der allgemeine Aufbau der DXR wird in Kapitel 2.4.3 – 3.1 *Crystal Structures* vorgestellt. Je nach Struktur und Eigenschaften können die gebundenen Inhibitoren Konformationsänderungen des Enzyms induzieren, welche beispielsweise zum Auftreten neuer Bindungs- oder Seitentaschen führen.^{235,416,450} Daher liefert jede Kristallstruktur mit neuem Inhibitortyp tiefergehende Erkenntnisse.

Das **Kristallstruktur** von **28b** wurde in Kooperation von der School of Pharmacy, Kitasato University, Tokyo, Japan von M.SC. SANA TADAKA und PROF. DR. NOBUTADA TANAKA erhalten. Die Expression und Reinigung von *Pf*DXR sowie die Erhebung der röngtenkristallographischen Daten und das Auflösen der Co-Kristallstruktur erfolgte wie bereits beschrieben.^{234,235}

6.4.4.1. Kristallstrukturanalyse von CL1

Mit der Kristallstruktur von *Pf*DXR in Komplex mit Mn²⁺, NADPH und **CL1** wurde bereits eine Co-Kristallstruktur mit einer Auflösung von 2.0 Å (PDB 4KP7) publiziert, wobei die Interaktionen ähnlich zu vorher publizierten Inhibitoren in Komplex mit *Pf*DXR sind (Abbildung 39).²³⁵

Die *N*-Methylhydroxamsäure-Struktur von **CL1** chelatisiert das Mn²⁺-Ion, welches zusätzlich durch Asp231, Glu233, and Glu315 von PfDXR insgesamt fünffach koordiniert wird, sodass eine verzerrte trigonal-pyramidale Struktur entsteht (Abbildung 39). Diese Komplexgeometrie stimmt mit der in Fosmidomycin-PfDXR-Mn2+-NADPH Co-Kristallstrukturen beobachteten überein.235,462 Komplexgeometrie Die Phosphonatgruppe CL1 ist von ein Wasserstoffbrückenbindungsnetz zu den hoch konservierten Aminosäuren Ser270, Ser306, Asn311 und Lys312 sowie dem nicht-konservierten Ser269 und zwei Wassermolekülen eingebunden (Abbildung 39). Das Schwefelatom in β -Position interagiert im Gegensatz der Methylengruppe der Carba-Analoga über hydrophobe Interaktionen mit einem hochkonservierten Met298, welche die Methylengruppen der Carba-Analoga nicht eingehen können.



Abbildung 39: Interaktion (gestrichelte Linien) zwischen **CL1**, Mn²⁺ und den Aminosäuren von *Pf*DXR (PDB: 4KP7). VAN-DER-WAALS-Interaktionen sind durch geschwungen Linie dargestellt. Abbildung mit Erlaubnis modifiziert nach KUNFERMANN *et al.*, *J Med Chem*, **2013**, 56, 8151–8162. Copyright 2024 American Chemical Society.

Während bei vorherigen Kristallstrukturen die flexible Seitenkette (*loop* Region) von *Pf*DXR keine spezifischen Interaktionen mit den Inhibitoren eingeht,⁴⁶³ ist die flexible Seitenkette dieser Kristallstruktur gut aufgelöst und stabilisiert die Bindung zu **CL1** durch hydrophobe Interaktionen von Trp296 and Met298. Die flexible Seitenkette, die über dem katalytisch aktiven Zentrum liegt, ist sehr mobil, sodass größere Reste am α -Phenyl-Ring oder annellierte Systeme toleriert werden.

Die Kristallstruktur von *Pf*DXR in Komplex mit Mn²⁺, NADPH und **28a** wurde mit einer Auflösung von 1.28 Å von der TANAKA Gruppe aufgelöst und ist unveröffentlicht (Abbildung 40). Die Interaktionen der *N*-Methylhydroxamsäure-Struktur und Phosphonatgruppe von **28a** mit *Pf*DXR stimmen im Wesentlichen mit denen von **CL1** überein.



Abbildung 40: Interaktion (gestrichelte Linien) zwischen **28a**, Mn²⁺ und den Aminosäuren von *Pf*DXR. VAN-DER-WAALS-Interaktionen sind durch geschwungen Linie dargestellt. Die Kristallstruktur wurde von der TANAKA Gruppe aufgelöst und ist unveröffentlicht.

Im Unterschied zu **CL1** besitzt **28a** einen räumfüllenden 4-Hexoxy-Substituenten am *α*-Phenyl-Ring, sodass die flexible Seitenkette von *Pf*DXR eine offene Konformation einnimmt (Abbildung 41). Diese offene Konformation erlaubt es dem lipophilen Hexoxyrest zusätzliche hydrophobe Interaktionen mit Trp296, Cys338 und Lys295 einzugehen (Abbildung 40).



Abbildung 41: Dreidimensionale Darstellung von *Pf*DXR (grau) mit 28a (blau), Mn²⁺ (violett) und NADPH (rechts unten).

Diese zusätzlichen hydrophoben Interaktionen zwischen **28a** und *Pf*DXR führen allerdings nicht zu einem Aktivitätsgewinn von **28a** (IC₅₀ = 48 nM) gegenüber **CL1** (IC₅₀ = 24 nM). Zwar brachte die Einführung des 4-Hexoxyrestes in Verbindung **28a** insgesamt eine leichte Verschlechterung der Enzyminhibition im Vergleich zu **CL1**, allerdings konnte anhand der neuen Kristallstruktur gezeigt werden, dass voluminöse Substituenten am α -Phenyl-Ring toleriert und zusätzliche Aminosäuren adressiert werden können. In neuen Generationen von DXR-Inhibitoren können diese Aminosäuren durch Variation des Substituenten in 3- und 4-Position des α -Phenyl-Rings gezielt und rational adressiert werden, um die Bindungsaffinität zu DXR zu erhöhen.

6.4.5. Chemische Stabilität von CL1

Eine Analyse der Fraktionen mittels LC-MS-Spektrometrie nach C₁₈-Säulenchromatographie der Verbindung **28a-f** unter Verwendung von Wasser/Acetonitril als Eluent zeigte, dass die *N*-Methylhydroxamsäure-Struktur in die entsprechende Carbonsäuren **29a-f** hydrolysiert sind (Schema 98). Ebenso konnten durch LC-MS-Untersuchungen der Lösungen **28a-f** in Methanol- d_4 nach Aufnahme der ¹H-NMR-Spektren die Bildung der Methylester **30a-f** detektiert werden (Schema 98).



Schema 98: Beobachtete Instabilität der *N*-Methylhydroxamsäuren 28a-f zu den Carbonsäuren 29a-f oder den Methylestern 30a-f.

Die Untersuchung der **chemischen Stabilität** gegenüber den Nukleophilen Wasser und Methanol wurde anhand von **CL1** als Modellsubstanz durchgeführt. Die Probenvorbereitung erfolgte, indem je 1.0 mg **CL1** in 1.0 mL Methanol oder Wasser gelöst wurde. Diese Stammlösung wurde kontinuierlich auf dem IKA KS 260 basic Kreisschüttler (250 min⁻¹) bei 25 °C geschwenkt und nach 0, 6 und 24 h sowie 7, 14 und 21 Tagen deren Reinheit mittels HPLC-UV/Vis (220 nm, n=1) bestimmt. Die verbleibende Substanzmenge wurde durch den Vergleich der AUC vom Substanzpeak (**CL1**) und den neu-auftretenden Peaks bestimmt. Die HPLC-Reinheit der Verbindung **CL1** abhängig von der Zeit ist in Abbildung 42 dargestellt.



Abbildung 42: Stabilität von CL1 in Wasser und Methanol. Die Bestimmung der Reinheit erfolgte mittels UV-Vis-HPLC bei 220 nm (n=1).

Sowohl in Methanol als auch in Wasser zeigte **CL1** nach sechs Stunden eine Reinheit über 95 %, während **CL1** nach 24 h in Wasser eine Reinheit von 94 % aufwies. Bereits nach 7 Tagen waren nur noch 76 % Substanz vorhanden, die sich nach 21 Tagen auf unter 40 % reduziert hat. Ein ähnlicher Trend zeigte sich in Methanol, allerdings weniger ausgeprägt, da nach 21 Tage noch etwa 60 % **CL1** vorhanden war. Diese Untersuchung zeigt, dass **CL1** nicht stabil gegenüber Nukleophilen wie Wasser und Methanol ist. Diese Instabilität wurde bei den Phosphonsäurediethylester-Vorstufen nicht beobachtet, was darauf hindeutet, dass die Protonen der freien Phosphonsäuregruppe autokatalytisch bei der Solvatolyse wirken. LIENAU beobachtete empirisch, dass die *N*-methylierten Hydroxamsäuren stabiler seien als die unsubstituierten Hydroxamsäuren.²⁷⁷ Diese Untersuchung am Beispiel **CL1** belegt jedoch, dass auch *N*-methylierten Hydroxamsäuren instabil sind. Folglich sollte bei der Aufarbeitung von Phosphonohydroxamsäuren auf den Einsatz von Nukleophilen verzichtet werden und die Lagerung unter Ausschluss von Feuchtigkeit und Restlösemittel erfolgen.

7. Synthese der Siderophore und Siderophorfragmente

Neben der Erhöhung der Lipophilie zur Verbesserung der passiven Diffusion durch die bakteriellen Zellwände sollte ein neues Konzept zur aktiven Aufnahme von β -thia-isosteren Fosmidomycin-Analoga erprobt werden. Dieses Konzept bestand in der Konjugation der β -thia-isosteren Fosmidomycin-Analoga an bakterielle Siderophore und Siderophorfragmente, die eine aktive Aufnahme über Siderophor-Importer in das Zytosol der Bakterien ermöglichen könnten. Im ersten Schritt sollte dafür die Synthese von Siderophorfragmenten (Kapitel 7.1 und 7.3) und einem Siderophor (Kapitel 7.2) realisiert werden. Im Anschluss sollte exemplarisch die effiziente Konjugation eines β -thia-isosteren Fosmidomycin-Analogons des Strukturtyps 2 an die dargestellten Siderophore erprobt werden (Kapitel 7.4).

7.1. Darstellung der 2-Chlor-3,4-dihydroxybenzoesäure 32

Die Synthese der Carbonsäure **31** mittels LINDGREN-Oxidation wurde in Anlehnung an AOKI *et al.* durchgeführt mittels Natriumchlorit im leicht sauren Milieu durchgeführt (Schema 99).²²⁸ Dazu wurden jeweils 2.20 Äquivalente einer 1 M Natriumchlorit- und 1 M Amidosulfonsäure-Lösung zu einer Lösung von dem Aldehyd **30** in 1,4-Dioxan gegeben. Die bei der Redoxreaktion entstehende hypochlorige Säure wird durch Amidosulfonsäure neutralisiert, um weitere Nebenreaktionen durch hypochlorige Säure zu vermeiden.⁴⁶⁴ Nach Extraktion mit Ethylacetat wurde die Carbonsäure **31** in einer Ausbeute von 83 % erhalten. Die O-Desalkylierung der Methoxygruppen gelang in Dichlormethan bei 0 °C mit Hilfe von Bortribromid nach einer Vorschrift von AOKI *et al.* (Schema 99). Im Gegensatz zur Literaturvorschrift erfolgte die Aufarbeitung jedoch mit Wasser anstatt Methanol, um das intermediär entstehende Carbonsäurebromid in die Carbonsäure **32** zu überführen. Somit konnte das Zielmolekül **32** über zwei Schritte in einer Gesamtausbeute von 52 % gewonnen werden (Schema 99).



Schema 99: Darstellung des Siderophorfragments 2-Chlor-3,4-dihydroxybenzoesäure 32. (a) 2.20 Äq. H₂NSO₃H, 2.20 Äq. NaClO₂, 1,4-Dioxan, 0 °C – RT; (b) i) 2.50 Äq. 1.6 м BBr₃/*n*-Hexan, CH₂Cl₂, 0 °C – RT, 2 h, ii) H₂O.

7.2. Darstellung von Azotochelin

Die Darstellung von Azotochelin (40) erfolgte in Anlehnung an die Syntheseroute von MIYANAGA et al. (Schema 100).²⁸⁸ Da L-Lysinmethylester und dessen Salze vergleichsweise teuer sind, wurde L-Lysinmethylester Dihydrochlorid (34) durch Umsetzung von L-Lysin (33) mit Thionylchlorid in Methanol hergestellt. Die Synthese des zweiten Edukts 2,3-Bisbenzyloxybenzoesäure (37)erfolgte durch dreifache Benzylierung von 2,3-Dihydroxybenzoesäure (35) mit Benzylbromid und Kaliumcarbonat in Aceton und anschließende Verseifung der Benzylester-Schutzgruppe zu 37 in einer Ausbeute von 75 % über zwei Schritte. Die Aktivierung der Carbonsäure 37 gelang mit je zwei Äquivalenten *N*,*N*'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und *OxymaPure*[®] (Ethyl(hydroxyimino)cyanoacetat). Durch Zugabe von einem Äquivalent L-Lysinmethylester Dihydrochlorid (34) und DIPEA konnte das vollständig geschützte Azotochelin 38 in einer Ausbeute von 73 % isoliert werden.



Schema 100: Darstellung von Azotochelin (40).

(a) 2.00 Äq. SOCl₂, MeOH, 0 °C – Reflux, 3 h; (b) 3.00 Äq. BnBr, 4.00 Äq. K₂CO₃, Aceton, Reflux, 24 h; (c) 4.00 Äq. 5 м NaOH_(aq.), MeOH, Reflux, 4 h; (d) 2.00 Äq DCC, 2.00 Äq. *OxymaPure*[®], 2.00 Äq. DIPEA, DMF, 0 °C – RT, 16 h; (e) 9.00 Äq. 1 м LiOH_(aq.), MeOH/H₂O, RT, 30 min; (f) 10 mol% Pd/C, H₂, MeOH, RT, 8 h.

Im Anschluss mussten die Benzyl- und Methyl-Schutzgruppe entfernt werden, wobei zuerst die Benzylether- und dann die Methylestergruppe oder *vice versa* gespalten werden könnte. Da durch das Entfernen der Benzyl-Schutzgruppen die Polarität und damit die Hydrophilie stark ansteigt, wurde zunächst die Methyl-Schutzgruppe durch milde Verseifung mit einem

Äquivalent Lithiumhydroxid bei Raumtemperatur entfernt, sodass das Intermediat **39** nach Extraktion in 85 % Ausbeute gewonnen wurde. Im letzten Schritt wurden die Benzyl-Schutzgruppen in Methanol hydrogenolytisch unter Bildung von Azotochelin (**40**) gespalten. Das Rohprodukt musste aufgrund der hohen Polarität mittels C₁₈-Umkehrphasen-Chromatographie unter Verwendung von Wasser/Acetonitril als Eluent gereinigt werden, sodass Azotochelin mit einer HPLC-Reinheit von 95 % isoliert werden konnte. Allerdings zeigte das Produkt eine dunkelbraune Färbung und verbreiterte Signale im ¹H-NMR-Spektrum, welche auf das Vorhandensein von magnetisch-aktiven Palladiumkernen hindeuten. Um die komplexierten Pd-Ionen zu entfernen, wurde Azotochelin (**40**) in Ethylacetat aufgenommen und mit gesättigter Ethylendiamintetraessigsäure-Lösung (EDTA) gewaschen, bis die organische Phase farblos war. Anschließend zeigte das ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung **40** scharfe und symmetrische Signale. Durch die mehrfache Extraktion kam es allerdings zu signifikantem Verlust des Produktes, sodass der letzte Schritt nur eine Ausbeute von 33 % aufwies.

7.3. Darstellung von Mycobactin-Fragmenten

7.3.1. Syntheseplanung

Als Zielmolekül wurde ein möglichst simples und wenig substituiertes Mycobactin-Analogon gewählt, welches sich durch drei Amid-Kupplungen unter Verwendung orthogonal entfernbarer Schutzgruppen aufbauen lässt (Schema 101).

Die eingehende Literaturanalyse legte den Schluss nahe, dass eine Schutzgruppe für die phenolische Hydroxygruppe nicht notwendig ist, bzw. sogar störend sein könnte. Die beiden Hydroxamsäuregruppen sind in der Literatur überwiegenden geschützt eingesetzt worden,^{293,294,298,300} sodass die Hydroxamsäuregruppen möglichst mit der gleichen Schutzgruppe versehen sein sollten, um die Schutzgruppe simultan entfernen zu können. Das von WU *et al.* beschriebene β -Aminopropionsäure-Strukturmotiv³⁰¹ sollte um eine α -Aminogruppe zur (*S*)-2,3-Diaminopropionsäure **CLVII** erweitert werden, sodass an dessen α -Aminogruppe von **CLVII** muss zunächst geschützt werden, um eine regioselektive Kupplung der β -Aminogruppe von **CLVII** mit dem Mycobactinsäure-Fragment **CLVI** zu gewährleisten. Folglich ergeben sich als Edukte zur Synthese des Mycobactin-Analogons **CLV** das Mycobactinsäure-Analogon **CLVII** und das Cobactin T-Analogon **CLVII** (Schema 101).



Schema 101: Retrosynthetische Überlegung mit literaturbekannten Schutzgruppen für die jeweiligen funktionellen Gruppen der Edukte. Discon = *engl. disconnection* = Bindungsbruch, SG = Schutzgruppe. Grün = hydrogenolytisch entfernbar, rot = basisch entfernbar, blau = sauer entfernbar, unterstrichen = durch Fluorid entfernbar.

Das Mycobactinsäure-Analogon **CLV** könnte aus der HPOC **LXXXV** und *N*⁶-Hydroxyl-*N*⁶palmitoyl-L-lysin **LXXXVI** dargestellt werden (Schema 101). Zur Darstellung der HPOC **LXXXV** ist die Benzyl-Schutzgruppe eine gute Option, da der Benzylester- und die Benzylethergruppen simultan hydrogenolytisch entfernt werden können (Schema 102).



Schema 102: Retrosynthetische Überlegung zur Darstellung der HPOC CLIX. Discon. = engl. disconnection = Bindungsbruch.

Zum orthogonalen Entfernen der Schutzgruppen von N^6 -Hydroxy- N^6 -palmitoyl-L-lysin LXXXVI wurde eine sauer, basisch und hydrogenolytisch entfernbare Schutzgruppe gewählt. Da die Oxidation der N^6 -Aminogruppe von WU *et al.* mittels Dibenzoylperoxid (CLXIV) neben der Oxidation gleichzeitig die Benzoyl-Schutzgruppe einführt,³⁰¹ sollte diese als Schutzgruppe für die terminale Hydroxamsäuregruppe verwendet werden. Folglich muss für die Carboxylgruppe eine selektiv acidolytisch entfernbare Schutzgruppe wie ein *tert*-Butylester und für die N^2 -Aminogruppe mit Cbz eine hydrogenolytisch entfernbare Schutzgruppe eingeführt werden (Schema 103). Somit lässt sich Verbindung LXXXVI durch Acylierung von CLXII durch Palmitinsäure oder -chlorid CLXIII aufbauen. Die Synthese von LXXXVI wurde von WU *et al.* ausgehend von N^2 -Cbz-L-Lysin (CLXVI), *tert*-Butylacetat CLXVII und DBPO CLXIV beschrieben (Schema 103).³⁰¹



Schema 103: Retrosynthetische Analyse zur Darstellung von *N*⁶-Hydroxyl-*N*⁶-palmitoyl-L-lysin **LXXXVI**. Discon. = *engl. disconnection* = Bindungsbruch.

Da beide Hydroxamsäurengruppen des Mycobactin-Analogons **CLV** sinnvollerweise die gleiche Schutzgruppe haben, ist es geboten, dass die Hydroxamsäuregruppe des (*S*)-3-Amino-1-hydroxyazepan-2-ons **LXXXVIII** ebenfalls Benzoyl-geschützt wird (Schema 104). Als Schutzgruppe für die 3-Aminogruppe wurde Cbz gewählt, da so *N*²-Cbz-L-Lysin **CLXII** abermals als Edukt verwendet werden kann. Der Azepan-2-on-Ring sollte durch einen intramolekularen Ringschluss aus **CLXVIII** aufgebaut werden. Die dafür notwendige freie Carboxylgruppe kann aus dem entsprechenden *tert*-Butylester **CLXII** dargestellt werden. Dies ist besonders effizient, da der *tert*-Butylester **CLXII** ein gemeinsames Edukt für die Synthese des AHAO **LXXXVIII** (Schema 104) und *N*⁶-Hydroxy-*N*⁶-palmitoyl-L-lysin **LXXXVI** (Schema 103) darstellt.



Schema 104: Retrosynthetische Überlegung zur Darstellung des (S)-3-Amino-1-hydroxyazepan-2-ons (AHAO)
LXXXVIII. Discon. = engl. disconnection = Bindungsbruch, FGI = engl. functional group interconversion =
Umwandlung einer funktionellen Gruppe.

7.3.2. Synthese der Mycobactin-Fragmente

Die Synthese der HPOC **45** startete ausgehend von der kommerziell verfügbaren 2-Benzyloxybenzoesäure (**41**), wobei die literaturbekannten Synthesen von MILLER *et al.* und WU *et al.*^{300,301} kombiniert wurden. Das Edukt **41** wurde mit einem Überschuss Oxalylchlorid in das korrespondierende Carbonsäurechlorid **42** übergeführt und ohne Reinigung für die nachfolgende Acylierungsreaktion verwendet (Schema 105).



Schema 105: Synthese der HPOC 45 nach MILLER et al. und WU et al. 300,301

(a) 7.80 Äq. Oxalylchlorid, CH₂Cl₂/Toluol (2/1 *v*/*v*), 0 °C, 30 min; b) 0.90 Äq. L-Serinbenzylester Hydrochlorid, 3.00 Äq. DIPEA, CH₂Cl₂, 0 °C – RT, 16 h; (c) 1.10 Äq. BURGESS-Reagenz, THF, Reflux, 1 h; (d) 10 mol% Pd/C, H₂, MeOH, RT, 20 h.

Durch Reaktion von **42** mit substöchiometrischen Mengen L-Serinbenzylester Hydrochlorid in Anwesenheit von DIPEA wurde das Amid **43** mit einer Ausbeute von 79 % über zwei Schritte dargestellt (Schema 105). Nachdem Versuche der dehydratisierende Cyclisierung mittels PFBSF³⁰¹ und DAST²⁰¹ gescheitert waren, konnte die Benzyl-geschützte HPOC **44** mit Hilfe von BURGESS-Reagenz nach einem Protokoll der MILLER Gruppe^{293,294} in einer Ausbeute von 66 % isoliert werden (Schema 105). Beide Benzyl-Schutzgruppen konnten hydrogenolytisch entfernt werden, sodass die HPOC **45** nach säulenchromatographischer Reinigung und Umkristallisation über vier Schritte in einer Gesamtausbeute von 38 % gewonnen werden konnte (Schema 105). Anzumerken ist, dass die HPOC **45** in Anwesenheit von Wasser schnell hydrolysiert. Dies zeigt sich bereits bei Analyse der Verbindung mittels HPLC, bei welcher Wasser als Eluent verwendet wurde. Folglich konnte die Reinheitsbestimmung von Verbindung **45** mittels HPLC oder LC-MS nicht vorgenommen werden, da die Verbindung **45** bei Verwendung anderer Eluenten keine Retention auf der Säule zeigte. Die erfolgreiche Synthese der HPOC **45** eröffnete die Möglichkeit zur Synthese einer weiteren HPOC **49**, welche sich von 2,3-Dihydroxybenzoesäure (**35**) und L-Threonin ableitet. Die Synthese von 2,3-Bis(benzyloxy)benzoesäure (**37**) wurde in Schema 100 bereits beschrieben. Zu Beginn wurde die Carbonsäure **37** mit Oxalylchlorid zum Carbonsäurechlorid **46** aktiviert, welches ohne weitere Reinigung zur Acylierung von L-Threoninbenzylester Hydrochlorid verwendet wurde (Schema 106).



Schema 106: Synthese der HPOC 49 nach MILLER et al. und WU et al. 300,301

(a) 7.80 Äq. Oxalylchlorid, CH₂Cl₂/Toluol (2:1), 0 °C, 30 min; (b) 0.90 Äq. L-Threoninbenzylester Hydrochlorid,
 3.00 Äq. DIPEA, CH₂Cl₂, 0 °C − RT, 16 h; (c) 1.10 Äq. BURGESS-Reagenz, THF, Reflux, 1 h; (d) 10 mol% Pd/C,
 H₂, MeOH, RT, 20 h.

Das Intermediat **47** wurde unter Verwendung von BURGESS-Reagenz dehydratisierend cyclisiert und die Benzyl-Schutzgruppen hydrogenolytisch mit Palladium auf Aktivkohle und Wasserstoff entfernt. Zusammenfassend gelang die Synthese der HPOC **49** über sechs Schritte in einer Gesamtausbeute von 44 %.

Die HPOCs **45** und **49** können über ihre Carboxylgruppe als Siderophorfragmente direkt an Aminogruppen gekuppelt werden.

Im nächsten Schritt sollte das geschützte Mycobactinsäure-Derivat **55** als Siderophorfragment aufgebaut werden (Schema 107). Zur Darstellung von **55** wurde eine Synthese von $W \cup et al$. modifiziert.³⁰¹ Zunächst wurde die Carboxylgruppe von N^2 -Cbz-L-Lysin **50** durch Rühren mit Perchlorsäure in *tert*-Butylacetat *tert*-Butyl-geschützt.


Schema 107: Darstellung des geschützten Mycobactinsäure-Analogons 55.

(a) 1.50 Äq. HClO₄, *tert*-Butylacetat, RT, 16 h; (b) 1.50 Äq. DBPO, CH₂Cl₂/Phosphatpuffer pH 10.5, RT, 4 h; (c) 1.00 Äq. Palmitinsäurechlorid, 1.00 Äq. K₂CO₃, Aceton, 0 °C – RT, 1 h; (d) i) 1.5 Äq. AcOH, 10 mol% Pd/C, H₂, MeOH, RT, 5 h; ii) 1.50 Äq. EDC•HCl, 1.50 Äq. HOBt, CH₂Cl₂, RT, 4 h.

Die Oxidation der N^6 -Aminogruppe von **51** wurde zunächst nach der Vorschrift von WU *et al.*³⁰¹ durchgeführt. Hierbei wurde eine Lösung von DBPO in Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 10.5 zu einer Lösung von Verbindung **52** in Dichlormethan unter starken Rühren zugetropft wird.³⁰¹ Die Verwendung des Phosphatpuffers ist notwendig, da die Benzoyl-Schutzgruppe bei einem pH-Wert über 10.5 nicht stabil ist, aber die N^6 -Aminogruppe nicht protoniert vorliegen sollte, um eine ausreichende Nukleophilie der N^6 -Aminogruppe zu gewährleisten. Bei der Durchführung des Protokolls von WU *et al.*³⁰¹ wurde nach säulenchromatographischer Reinigung neben der gewünschten Verbindung **52** auch das Nebenprodukt **52**^c im Verhältnis 1:1 gewonnen (Schema 108). Da die DBPO-Lösung zugetropft wird, liegt in der Reaktionslösung ein Überschuss des Amins **51** vor. Die N^6 -Aminogruppe von **51** könnte die Carbonylfunktion der O-Benzoylhydroxylamin-Struktur von **52** angreifen, sodass das Amid **52**^c und das Hydroxylamin **51**^c entstehen. Um einen Überschuss an Verbindung **51** in der Reaktionslösung zu verhindern, wurde das Protokoll dahingehend modifiziert, dass die DBPO-Lösung vorgelegt und eine Lösung von Verbindung **52** zugetropft wurde. Somit konnte die



Verbindung **52** nach säulenchromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 69 % gewonnen werden.

Schema 108: Hypothese zur Bildung der Nebenprodukte 52' und 51'.

Als nächstes wurde die O-Benzoylhydroxylamin-Struktur von **52** mit Palmitinsäurechlorid in Aceton und Kaliumcarbonat als Hilfsbase *N*-acyliert, sodass Intermediat **53** in guter Ausbeute gewonnen wurde (Schema 107). Das hydrogenolytische Entfernen der Cbz-Schutzgruppe wurde in Methanol mit Palladium auf Aktivkohle und Wasserstoff und Zugabe von 1.5 Äquivalenten Essigsäure durchgeführt, da die freie gewordene Aminogruppe den pH-Wert der Reaktionslösung ins Basische verschiebt, was zum partiellen Verlust der Benzoyl-Schutzgruppe führt (Schema 107). Das resultierende freie Amin **54** ist nicht lagerstabil, sodass dieses ohne weitere Charakterisierung für die nachfolgende Amid-Kupplung eingesetzt wurde. Im letzten Schritt dieser Synthesesequenz wurde die HPOC **45** mit EDC/HOBt aktiviert und mit dem Amin **54** versetzt, sodass die geschützte Mycobactinsäure **55** über 5 Schritte in einer Gesamtausbeute von 4 % gewonnen werden konnte.³⁰¹

Der Aufbau des AHAO-Bausteins **57** erfolgte ausgehend von dem dreifach-geschützten L-Lysin **52** nach einer modifizierten Vorschrift von WU *et al.* (Schema 109).³⁰¹ Zunächst wurde die *tert*-Butylschutzgruppe säurekatalysiert mit Trifluoressigsäure in Dichlormethan entfernt und das entstehende Intermediat **56**, nach Entfernen des Lösemittels und Trocknen im Hochvakuum ohne weitere Reinigung für die nächste Reaktion verwendet (Schema 109). Um die intramolekulare Cyclisierung gegenüber der intermolekularen Kupplung zu forcieren, wurde ein äquimolares Gemisch aus EDC•HCI, 4-DMAP und 4-DMAP•HCI vorgelegt. Durch Zugabe von 4-DMAP•HCI bleibt der pH-Wert der Reaktionslösung im Verlauf der Reaktion leicht sauer, um die Hydrolyse der Benzoyl-Schutzgruppe zu verhindern. Zu diesem 40 °C warmen EDC•HCI/4-DMAP/4-DMAP•HCI-Gemisch wurde über einen Zeitraum von 8 h eine Lösung von **56** zugetropft und weitere 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Das lagerstabile *N*-und *O*-geschützte AHAO **57** konnte in einer Ausbeute von 76 % über zwei Schritte isoliert

werden, welche sich im Vergleich zur Literaturausbeute von 62 %³⁰¹ verbesserte (Schema 109).



(a) CH₂Cl₂/TFA (2/1 *v*/*v*), 0 °C – RT, 4 h; (b) 2.70 Äq. EDC•HCl, 2.70 Äq. 4-DMAP, 2.70 Äq 4-DMAP•HCl, DCM, 40 °C, 16 h; (c) 10 mol% Pd/C, H₂, MeOH/TFA (4/1 v/*v*), rt, 1 h.

Die Cbz-Schutzgruppe von **57** wurde im Sauren hydrogenolytisch entfernt und das erhaltene instabile (S)-3-Amino-azepan-2-on **58** ohne weitere Reinigung in der nachfolgenden Kupplungsreaktion verwendet (Schema 109).

Um das Cobactin T-Grundgerüst aufzubauen, kann das Amin **58** an eine (2S)-2,3-Diaminopropansäure gekuppelt werden (Schema 111). Da das Amin **58** eine basischentfernbare Schutzgruppe enthält, müssen die Amino-Schutzgruppen der (2S)-2,3-Diaminopropansäure sauer und hydrogenolytisch entfernbar sein. Folglich wurde (2S)- N^2 -Boc-2,3-diaminopropionsäure **59** als Edukt für eine Acylierung mit Benzylchloroformiat nach MITRA *et al.*⁴⁶⁵ gewählt, um N^3 -Cbz-(2S)- N^2 -Boc-2,3-diaminopropionsäure **60** in befriedigender Ausbeute darzustellen (Schema 110).



Schema 110: Darstellung von N³-Cbz-(2S)-N²-Boc-2,3-diaminopropionsäure 60 nach MITRA et al.⁴⁶⁵
 (a) 1.20 Äq. Benzylchloroformat, 4.00 Äq. NaHCO₃, H₂O/Toluol, RT, 8 h.

Die Carbonsäure **60** sollte anschließend nach der Literaturvorschrift von W∪ *et al.* durch Aktvierung mit EDC/HOAt³⁰¹ gekuppelt werden (Schema 111), welches allerdings zum quantitativen Verlust der Benzoyl-Schutzgruppe führte, sodass das gewünschte Produkt **61** nicht isoliert werden konnte.



Schema 111: Versuche zur Darstellung des Cobactin T-Analogons 65 nach W∪ et al.³⁰¹
 (a) 1.50 Äq. EDC•HCl, 1.50 Äq. HOBt, CH₂Cl₂, RT, 16 h.

Da sich die Benzoyl-Schutzgruppe als sehr labil erwies und sowohl beim Entfernen der Cbz-Schutzgruppe als auch bei Kupplungsreaktionen Probleme bereitete, sollte eine alternative Schutzgruppen Strategie getestet werden, um ein lagerstabiles AHAO herzustellen, welches in nachfolgenden Projekten verwenden werden kann. Zu diesem Zweck wurde die Syntheseroute von WALZ *et al.* herangezogen, welche ebenfalls *N*²-Cbz-L-Lysin **50** als Edukt verwendet (Schema 112).



Schema 112: Darstellung des N-Cbz-O-TBDPS-geschützten AHAO 66.

(a) 1.10 Äq. Benzaldehyd, 1.05 Äq. KOH, 3 Å Molsieb, MeOH, RT, 16 h; (b) 1.20 Äq. *m*-CPBA, MeOH, 0 °C,
2 h; (c) TFA/CH₂Cl₂ (1/1 v/v), RT, 1 h; (d) 1.10 Äq. H₂NOH•HCl, MeOH, 60 °C, 20 min; (e) i) 1.20 Äq. HATU,
1.48 Äq. DIPEA, ACN/DMF (4/1 v/v), RT, 4 h; ii) RT, 20 h; (f) 2.50 Äq. TBDPS-Cl, 4.80 Äq. Imidazol, 40 °C,
24 h.

Zu Beginn wurde N^2 -Cbz-L-Lysin **50** mit Benzaldehyd über Molsieb kondensiert, um das Azomethin **62** darzustellen. Zugabe von *m*-Chlorperbenzoesäure führt in einer PRILESCHAJEWartigen Oxidation zum Aufbau des Oxaziridin **63**, welches durch Zugabe von Trifluoressigsäure zum Nitron 64 isomerisierte (Schema 112).³⁰⁷ Anschließend wurde eine Hydrolyse des Nitrons 64 durch Zugabe von Hydroxylamin induziert, sodass N^2 -Boc- N^6 -hydroxy-L-lysin 65 fast quantitativ erhalten wurde. Da das Hydroxylamin 65 in der Literatur als nicht lagerstabil beschrieben wurde, 293, 294, 302, 306, 307 sollte 65 in einer intramolekularen Cyclisierung direkt umgesetzt werden. Zu diesem Zweck wurde eine modifizierte von GHOSH et al.²⁹⁸ verwendet, bei der Verbindung 65 über einen Zeitraum von 4 h zu einer Lösung aus HATU und DIPEA getropft und anschließend weitere 20 h bei Raumtemperatur gerührt wurde. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und die *tert*-Butyldiphenylsilyl-Schützung (TBDPS) der cyclischen Hydroxamsäure im konsekutiven Ein-Topf-Verfahren durch Zugabe von tert-Butyldiphenylchlorsilan und Imidazol als Hilfsbase durchgeführt. Ausgehend vom lagerstabilen Nitron 64 konnte das geschützte AHAO 66 in einer Ausbeute von 39 % über drei Schritte isoliert werden. Die TBDPS-Schutzgruppe ist weniger säurelabil als die Trimethylsilyl (TMS)oder Triisopropylsilyl (TIPS)-Schutzgruppe, lässt sich im Vergleich zu diesen aber einfacher durch Fluorid abspalten.^{413,466} Dementsprechend stellt die TBDPS-Schutzgruppe eine gute Alternative zur Benzoyl-Schutzgruppe dar, sodass weitere Kupplungsreaktionen des TBDPSgeschützten AHAO 66 an Mycobactin-Bausteine oder Wirkstoffe robuster sein sollten.

7.4. Etablierung einer Synthesestrategie zur Darstellung von β -thia-isosteren Fosmidomycin-Analoga-Siderophor-Konjugaten

Mit 2-Chlor-3,4-dihydroxybenzoesäure (**32**), Azotochelin (**40**), der HPOC **45** und **49** sowie der Carboxyl-geschützten Mycobactinsäure **55** stehen Siderophore und Siderophorfragmente zur Verfügung, die über ihre Carboxylgruppe an die Aminogruppen eines β -thia-isosteren Fosmidomycin-Analogons gekuppelt werden können.

Zur Darstellung von β -thia-isosteren Fosmidomycin-Analoga-Siderophor-Konjugaten sollten Vorarbeiten für die Etablierung einer neuen Synthesestrategie gemacht werden. Folgende retrosynthetische Analyse wurde durchgeführt (Schema 113).



Schema 113: Retrosynthetische Analyse zur Darstellung β -thia-isosterer Fosmidomycin-Analoga-Siderophor-Konjugate. Discon. = *engl. disconnection* = Bindungsbruch, FGA = *engl. functional group addition* = Addition einer funktionellen Gruppe.

Die Phosphonsäure sollte aufgrund ihrer starken Acidität⁴⁶⁷ im letzten Schritt freigesetzt werden, um die Kupplung zwischen der Siderophor-Carbonsäure **CLXXII** und dem β -thiaisosteren Fosmidomycin-Analogon CLXXI möglichst selektiv zu gestalten. Die *N*-Methylhydroxamsäuregruppe ist mit ihrem pKs-Wert von 9-10⁴⁶⁸ deutlich weniger acide, sodass diese bei einer Kupplungsreaktion im neutralen pH-Bereich nicht dissoziiert und damit nur als schwaches Nukleophil vorliegt. Dementsprechend muss die Hydroxamsäuregruppe für die Kupplungsreaktion nicht zwangsläufig geschützt sein und das Intermediat CLXX könnte durch eine Amid-Kupplung aus dem Amin CLXXI und einer Siderophor-Carbonsäure CLXXII dargestellt werden. Für die Synthese des Amins CLXXI bietet sich ein Phthalimid CLXXIII an, wobei die *meta*- und *para*-(6-Phthaloyl)hexoxy-substituierten α -Phenyl-Analoga **27c** und **27d** zuvor bereits im Gramm-Maßstab dargestellt werden konnten (Schema 87).

Die Phthaloyl-Schutzgruppe lässt sich im wässrigen Milieu stark sauer oder stark basisch unter Hitzezufuhr mit ausgewählten Metallhydriden oder Stickstoff-Nukleophilen entfernen.³⁶⁶ Da es im wässrigen Milieu beim Erhitzen mit starken Säuren oder Basen zur Hydrolyse des Phosphonsäurediethylesters sowie der Hydroxamsäuregruppe kommen und die Anwendung von starken Reduktionsmitteln die Hydroxamsäuregruppe reduzieren kann, wurde die Hydrazinolyse für die Entschützung der Aminogruppe von Verbindung **27c** ausgewählt. Aufgrund der guten Löslichkeit von **27c** in Ethanol wurde dieses als Lösemittel verwendet. In der Literatur sind für das Entfernen von Phthaloyl-Schutzgruppen Temperaturbereiche von Raumtemperatur bis 80 °C, Reaktionszeiten bis zu 16 h und bis zu 10 Äquivalenten Hydrazin Monohydrat angegeben.⁴⁶⁹⁻⁴⁷¹ Um geeignete Reaktionsbedingungen zu ermitteln, wurde eine 0.1 molare Lösung von Verbindung **27c** in Ethanol mit einem Äquivalent Hydrazin versetzt und die Reaktion bei 60 °C, 70 °C und 80 °C über einen Zeitraum von 20 h durchgeführt (Tabelle 26, Ansatz 1-3). Die Reaktionskontrolle erfolgte nach 7 und 20 h mittels HPLC und die Flächen (AUC) der Peaks des Edukts **27c**, Produkts **67a** und Carbonsäurehydrazids **67a**' miteinander verglichen. Zudem wurden weitere Nebenprodukte (NP) erfasst, die Intermediate der Hydrolyse darstellten (Tabelle 26).

Tabelle 26: Optimierungsstudie zur der Phthaloyl-Entschützung von Verbindung **27c**. Der Anteil von Edukt, Produkt, Hydrazid und weiterer Nebenprodukte (NP) wurden über den Vergleich der AUC der entsprechenden Peaks im HPLC-Chromatogramm bestimmt.



67a	•
-----	---

Apost	Äq. Hydrazin	Τ	t	Edukt	Produkt	Hydrazid	NP
Ansatz		[°C]	[h]	[%]	[%]	[%]	[%]
1	10	60	7	27	48	2	23
I	1.0	00	20	21	55	6	18
2	10	70	7	21	51	9	19
Z	1.0	70	20	25	49	8	18
3	10	80	7	26	38	10	26
5	1.0	80	20	27	29	8	36
1	2.0	60	7	4	76	7	13
4			20	0	67	30	3
	3.0		1	7	63	4	26
5		60	7	0	76	14	10
			20	0	50	47	3
			1	17	43	1	39
6	2.0	50	3	4	73	7	16
			5	4	77	7	12
			1	13	53	1	33
7	3.0	50	3	9	69	4	18
				5	2	79	11

Bei allen drei Ansätzen wurde das Edukt **27c** nur zu etwa 75 % umgesetzt und eine Verlängerung der Reaktionszeit von 7 h auf 20 h führte nicht zu einer signifikanten Steigerung des Umsatzes. Bei einer Temperatur von 60 °C wurde nach 7 h nur 2 % Hydrazid **67a**' gebildet. Da das Hydrazid **67a**' säulenchromatographisch nicht von der Hydroxamsäure **67a** zu trennen war, sollte die Bildung dieses Nebenproduktes möglichst unterdrückt werden. Um den Eduktumsatz zu erhöhen, wurde die Anzahl der Hydrazin-Äquivalente auf zwei und drei erhöht und die Reaktion bei 60 °C durchgeführt (Tabelle 26, Ansatz 4+5). Beide Ansätze zeigten einem vollständigen Eduktumsatz nach 7 h, allerdings bildete sich nach 20 h auch 30 % bzw. 47 % Hydrazid **67a**', sodass geschlussfolgert wurde, dass die Reaktionszeit deutlich kürzer gewählt werden muss. Um die Bildung des Hydrazid **67a**' zudem verringern, wurde die Temperatur auf 50 °C reduziert und bei dieser Temperatur die Verwendung von zwei und drei Äquivalenten Hydrazin erprobt (Tabelle 26, Ansatz 6+7). Dabei zeigte sich Ansatz 6 als guter Kompromiss, da nach 3-5 h das Edukt fast vollständig umgesetzt und gleichzeitig nur 7 % des Hydrazids **67a**' gebildet wurde.

Das Entfernen der Phthalimid-Schutzgruppe von den Verbindungen **67a** und **67b** wurde im Folgenden mit 2 Äquivalenten Hydrazin bei 50 °C durchgeführt und ab 3 h Reaktionszeit halbstündige Reaktionskontrollen mittels HPLC durchgeführt (Schema 114). Die Reaktion wurde beendet, sobald nur noch etwa 5 % Edukt und maximal 5 % Hydrazid **67a**' vorhanden war.



a: 3-(6-Aminohexoxy), 53 % **b:** 4-(6-Aminohexoxy), 57 %



Die Produkte **67a-b** wurden anschließend säulenchromatographisch mit Dichlormethan/Methanol (30 %) und 1 % Triethylamin gereinigt. Das Lösemittel der Fraktionen wurde mittels Stickstoffgegenstrom entfernt, da bei Anwendungen von Wärme, die Amine **67a-b** unter Abspaltung von *N*-Methylhydroxylamin intramolekular cyclisieren. Da sich das Triethylamin durch den Stickstoffgegenstrom nicht vollständig entfernen ließ, zeigten die NMR-Spektren von **67a-b** signifikante Mengen an Triethylamin. Triethylamin sollte jedoch bei der nachfolgendenden CDI-Kupplung nicht stören, sodass die Amine **67a** und **67b** ohne weitere Reinigung mit 2,3-Dihydroxybenzoesäure oder 2-Chlor-3,4-dihydroxybenzoesäure (**32**) gekuppelt wurden (Schema 115).



Schema 115: CDI-vermittelte Kupplungsreaktion zur Darstellung der Siderophor-Konjugate 68a-c. (a) 1.50 Äq. CDI, 1.10 Äq. 2,3-Dihydroxybenzoesäure oder 2-Chlor-3,4-dihydroxybenzoesäure (32), THF, RT, 16 h.

Die stark hygroskopischen Siderophor-Konjugate **68a-c** konnten nach säulenchromatographischer Reinigung an C₁₈-Kieselgel in schlechten Ausbeuten isoliert werden. Da eine ausreichende Trocknung von **68a-c** zum gegebenen Zeitpunkt nicht möglich war, wurde die abschließende TMSBr-Spaltung nicht durchgeführt, weil diese unter vollkommen wasserfreien Bedingungen stattfinden muss.

8. Ausblick

Sowohl einige Chlor- und Bromflavonin-Analoga als auch die β -thia-isosteren Fosmidomycin-Analoga zeigen eine potente Inhibition des adressierten Targets und stellen weiterhin interessante Leitstrukturen für die präklinische Entwicklung dar.

Um diese zielgerichtet und effizient voranzubringen, ist es für die Chlor- und Bromflavonin-Analoga zunächst wichtig einen IIvB1-Assay zu etablieren, der eine quantitative Auswertung der Enzyminhibition und damit das Aufstellen präziserer Struktur-Aktivitäts-Beziehungen erlaubt. Mit der Etablierung eines solchen Assays beschäftigte sich DR. ANNA-LENE KIFFE-DELF in ihrer Promotion. Es gelang ihr, die katalytische Untereinheit IIvB1 zu exprimieren und zu reinigen, allerdings zeigte die kolormetrische Auswertung eines α -Naphthol-Farbkomplexes auch nach intensiver Untersuchung und Optimierung keine Dosis-Wirkungs-Linearität, sodass die Bestimmung von IC₅₀-Werten nicht möglich war.

Bisher wurde das rationale Design der Analoga basierend auf einem AHAS-Homologie-Modell mit Templaten von *Saccharomyces cerevisiae* and *Arabidopsis thaliana* und anschließenden *Molecular Docking*-Experimenten nach REHBERG *et al.* vorgenommen. Das AHAS-Enzym von *Saccharomyces cerevisiae* and *Arabidopsis thaliana* weisen jeweils eine Sequenzidentität von 44 %, bzw. 45 % und eine Sequenzähnlichkeit von 84 % zur *Mt*AHAS auf⁶, sodass strukturelle Unterschiede zur AHAS von *Mt* wahrscheinlich sind. Eine Co-Kristallstruktur von der katalytischen IIvB1 und regulatorischen IIvN Untereinheit in Komplex mit Chlor- und Bromflavonin (-Analoga) könnte essentiell zum tieferen Verständnis der Enzym-Liganden-Interaktion beitragen und für präzisere weiterführende *Molecular Docking*-Experimente und ein zielorientiertes Inhibitordesign genutzt werden.

Neben der Optimierung der Liganden-Enzym-Interaktion sollten für die nächste Generation der Chlor- und Bromflavonin-Analoga nach Möglichkeit Substituenten eingeführt werden, die die Wasserlöslichkeit erhöhen. Dieser Ansatz wurde durch die Amino-Analoga **9e** und **1k** und das 3-(2-Hydroxy)ethyl-Analogon **1j** bereits exemplarisch realisiert. Da diese Analoga nur eine potente IIvB1-Inhibition ohne *Mt* Wachstumshemmung zeigen, gilt es einen Kompromiss zwischen verbesserter Wasserlöslichkeit / Hydrophilie und guter Permeabilität / Lipophilie zu finden.

Zudem zeigten Chlor- und Bromflavonin nur eine moderate Stabilität in humanen Lebermikrosomen, welche auf eine intensive Metabolisierung durch CYP-Enzyme zurückzuführen ist. Basierend auf diesen Ergebnissen sollten zwei weitere Aspekt untersucht werden: Zum einen sollten die Metaboliten identifiziert werden, um zu untersuchen, ob diese möglicherweise selbst AHAS-Inhibitoren sind und Chlor- und Bromflavonin als Prodrugs angesehen werden könnten. Zum anderen sollte die Stabilität der Verbindungen *ex vivo* in humanem Blutplasma untersucht werden. Die mikrosomale Stabilität untersucht vor allem die Metabolisierung durch CYP-Enzyme, welche vorwiegend in der Leber aber auch im Darmlumen vorkommen. Die Metabolisierung im Zuge des First-Pass-Effektes in der Leber lässt sich im Allgemeinen durch parenterale, sublinguale, rektale oder bukkale Applikation eines Arzneimittels umgehen.⁴⁷²

Viele Flavonoide zeigen wie Chlor- und Bromflavonin eine schlechte Wasserlöslichkeit, die in der Regel zu einer schlechten oralen Bioverfügbarkeit führt.⁴⁷³ Es wurden zahlreiche Strategie entwickelt, um die schlecht wasserlöslichen Flavonoide besser bioverfügbar zu machen und diese könnten auch auf Chlor- und Bromflavonin (-Analoga) angewendet werden (Abbildung 43). Chemische Modifikationen wie Glykosylierung⁴⁷⁴ oder die Maskierung der phenolischen Hydroxygruppen durch die Synthese von Prodrugs⁴⁷⁵⁻⁴⁷⁸ könnten die Wasserlöslichkeit und Permeabilität erhöhen.



Abbildung 43: Möglichkeiten zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit von Flavonoiden.

Auch natürliche⁴⁷⁹⁻⁴⁸¹ und synthetische Adsorptionsverbesserer sowie pharmazeutische Technologien wie Trägerkomplexe^{482,483}, feste Dispersionen^{484,485}, Co-Kristalle^{486,487} und insbesondere Nanotechnologien⁴⁸⁸ sind für Flavonoide intensiv untersucht worden.^{473,489}

Für die weitere Optimierung der Fosmidomycin-Analoga ist eine Untersuchung der metabolischen Stabilität in den entsprechenden Mikroorganismen notwendig. Sollten die Analoga metabolisch stabil sein, ist im Falle von *P. falciparum* eine intensive Untersuchung der Transportmechanismen notwendig, um das Nadelöhr für die Aufnahme in den Apicoplasten zu identifizieren.

Aus medizinalchemischer Perspektive bieten die dargestellten Analoga interessante Ansatzpunkte zur Verbesserung der Permeabilität durch strukturelle Modifikationen. Während die β -thia-isosteren Analoga **CL1-3** mit kleinen Substituenten am α -Phenyl-Ring in ähnlichem Ausmaß wie **Fos** in die Plasmodien aufgenommen und/oder metabolisiert werden, wurden die Inhibitoren mit raumfüllenden Substituenten in *meta*- und *para*-Position des α -Phenyl-Rings (**28a-f**) schlechter aufgenommen oder und/ rascher metabolisiert.

Die neu-etablierte Syntheseroute erlaubt es, eine größere Substanzbibliothek von α -Phenylsubstituierten β -thia-isosteren Analoga darzustellen. Anhand dieser Bibliothek könnte der Effekt des α -Phenyl-Substituenten weitergehend untersucht werden. Zudem können die beiden neuartigen Fosmidomycin-analogen Strukturtypen zu einem weiteren Strukturtyp kombiniert werden und der Einfluss auf die Permeabilität untersucht werden (Schema 116).

<u>Strukturtyp 1</u>





Gegenüber Bakterien, insbesondere *E. coli*, zeigten bisher nur Fosmidomycin und sein Acetyl-Analogon FR900098 eine antibiotische Wirkung, da beide Inhibitoren aktiv über den Glycerol-3-phosphat-Shuttlesystem (GlpT) aufgenommen werden.^{448,449} Aktive Transportportsysteme könnten die effiziente Aufnahme von Fosmidomycin-Analoga ermöglichen. Aus diesem Grund wurde die Synthese von β -thia-isosteren Fosmidomycin-Siderophor-Konjugaten erprobt (Kapitel 7.4). Die abschließende Durchführung der TMSBr-Spaltung der Verbindung **68a-c** sollte bereits drei β -thia-isosteren Fosmidomycin-Siderophorfragment-Konjugate liefern, die auf ihre antibiotischen Eigenschaften hin untersucht werden können (Schema 117).



β-thia-isosteres Fos-Siderophor-Konjugat C

Schema 117: Letzter Schritt zur Darstellung der β -thia-isosteren Fosmidomycin-Siderophorfragment-Konjugate A-C.



Darüber hinaus erlaubt der etablierte Syntheseweg die Darstellung weiterer Konjugate des Amins **67a** mit den dargestellten Siderophor-Carbonsäuren (Schema 118)

Schema 118: Darstellung möglicher β -thia-isosteren Fosmidomycin-Siderophor-Konjugate.

9. Experimentalteil

9.1. Allgemeine Informationen

Sofern keine inerten Bedingungen angegeben wurden, wurden die Reaktionen in einem Rundkolben bei einer Raumtemperatur von 20 °C durchgeführt. Reaktionen bei 0 °C wurden in einem Eis/Wasser-Bad und Reaktionen bei -80 °C in einem Aceton/Trockeneis-Bad durchgeführt.

Wasserfreie Reaktionen wurden in ausgeheizten SCHLENK-Kolben unter Stickstoff- oder Argon-Atmosphäre unter Verwendung der Septum- und Spritzentechnik durchgeführt. Die verwendeten über Molekularsieb getrockneten Lösungsmittel wurden von *Thermo Fisher Scientific Inc.* bezogen. Alle weiteren Lösemittel für Reaktionsansätze wurden in reinster Qualität (*p.a.*) von *Sigma-Aldrich Chemie GmbH* bezogen und ohne weitere Reinigung oder Trocknung verwendet.

Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von Acros Organics BVBA, Alfa Aesar GmbH & Co KG, ApolloScientific, BLDpharm, Carbolution Chemicals GmbH, Carl Roth GmbH, Fluorochem Ltd., Merck KGaA, Sigma-Aldrich Chemie GmbH und VWR International GmbH kommerziell erworben und ohne weitere Aufreinigung verwendet. Als Trockenmittel für organische Phasen nach Extraktionen wurde wasserfreies Natriumsulfat von Honeywell International Inc. verwendet.

Dünnschichtchromatographie (DC)

Reaktionskontrollen sowie die Bestimmung der R_f-Werte erfolgten mit 0.2 mm Kieselgel beschichteten Aluminiumplatten (DC-Fertigfolien ALUGRAM[®] Xtra SIL G/UV₂₅₄) der Firma *Macherey-Nagel GmbH & Co. KG*. Als Elutionsmittel wurden Gemische aus *n*-Hexan oder Cyclohexan und Ethylacetat oder Dichlormethan und Methanol ggf. mit Zusatz von Triethylamin oder Ameisensäure verwendet und die Untersuchungen bei Kammersättigung durchgeführt. Die Laufstrecke betrug 7 cm. Zur Detektion wurde die Fluoreszenzlöschung auf den DC-Platten mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm und 366 nm erfasst. Die DC-Platten wurden mit folgenden Tauchlösungen angefärbt:

- Phenole / Hydroxamsäuren: 1 %ige ethanolische Eisen(III)-chlorid-Lösung
- Amine / Hydroxylamin: Ninhydrin-Lösung (0.30 g Ninhydrin, 3 mL Essigsäure, 100 mL *n*-Butanol)
- Säuren / Basen: Bromkresolgrün-Lösung (0.04 g Bromkresolgrün in 100 mL Ethanol und pH-Wert Einstellung mit 1 M Natronlauge)

 oxidierbare Verbindungen: Kaliumpermanganat-Lösung (3.00 g Kaliumpermanganat, 20.0 g Kaliumcarbonat und 5.00 g Natriumhydroxid-Lösung (5 %, aq.) in 300 mL dest. Wasser)

9.2. Präparative Methoden

Säulenchromatographie (SC)

Bei der manuellen säulenchromatographischen Reinigung wurden Glassäulen mit Kieselgel mit einer Partikelgröße von der Firma *Macherey-Nagel GmbH & Co. KG* befüllt. Auf die stationäre Phase wurde Seesand der Firma *Grüssing GmbH* mit einer Füllhöhe von ca. 1 cm gegeben. Das zu trennende Rohprodukt wurde mit wenig Dichlormethan an Kieselgel der Firma *Macherey-Nagel GmbH & Co. KG* adsorbiert und auf die Säule aufgetragen. Als Eluentengemisch dienten Gemische aus *n*-Hexan und Ethylacetat. Chromatographiert wurde mithilfe von manuell angelegtem leichten Überdruck.

Flashchromatographie

Die Flashchromatographie erfolgte entweder an dem Flash-Chromatographiesystem "Büchi Pure C-810 Flash" der Firma *Büchi Labortechnik AG* oder an dem Gerät "Combi Flash[®] Rf 200" der Firma *Teledyne ISCO Inc.* mit RediSep[®]Rf-Fertigkartuschen der Firma *Teledyne ISCO Inc.* oder FlashPure EcoFlex Silica-Fertigkartuschen der Firma *Büchi Labortechnik AG*. Als Elutionsmittel wurden *n*-Hexan oder Cyclohexan/Ethylacetat oder Dichlormethan/Methanol technischer Qualität ggf. mit Zusatz von Ameisensäure oder Triethylamin verwendet.

C₁₈-Umkehrphasen-Flashchromatographie

Die C₁₈-Umkehrphasen-Flashchromatographie erfolgte an dem Flash-Chromatographiesystem "Büchi Pure C-810 Flash" der Firma *Büchi Labortechnik AG*. Verwendet wurden folgende Fertigkartuschen:

- 86 g C₁₈ Reverse Phase RediSep[™]Rf-Fertigkartuschen der Firma *Teledyne ISCO Inc.*
- 43 g C₁₈ Reverse Phase RediSep[™]Rf-Fertigkartuschen der Firma *Teledyne ISCO Inc.*
- 15.5 g C₁₈ High Performance Gold RediSep[™]Rf-Fertigkartuschen der Firma *Teledyne ISCO Inc.*
- 4 g FlashPure Select C₁₈ 30µm sperical-Fertigkartuschen der Firma Büchi Labortechnik AG.

Als Elutionsmittel wurden eine Mischung aus Wasser, aufbereitet durch eine Milli-Q Anlage der *Firma Merck KGaA*, und Acetonitril HPLC Grade der Firma *Merck KGaA* in verschiedenen Zusammensetzungen verwendet.

9.3. Charakterisierungsmethoden

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die analytischen HPLC-Untersuchungen wurden entweder mit einem AZURA System der Firma *Knauer Wissenschaftliche Geräte GmbH* bestehend aus einer AZURA 6.1L Pumpe, einem AZURA CT 2.1 Säulenofen, einem AZURA UVD 2.1L UV-Detektor und einem *Spark Holland B.V.* OPTIMAS[™] Model 820 Autosampler oder mit einem *Agilent Technologies Inc.* LC 1260 Infinity II System bestehend aus einem G7116A Infinity II Säulenofen, einer G7104C Infinity II Pumpe, einem G7129C Infinity II Vialsampler und einem G7114A Infinity II Detektor durchgeführt. Die Trennung erfolgte auf einer Eurospher II 100 5 C₁₈ (150 x 4 mm)-Säule der Firma *Knauer Wissenschaftliche Geräte GmbH*. Die UV-Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 220 nm oder 254 nm detektiert. Die mobile Phase bestand aus

- Methode A: Wasser + 0.1 % TFA (Eluent A) und Acetonitril + 0.1 % TFA (Eluent B)
- Methode B: Wasser (Eluent A) und Acetonitril (Eluent B)

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	90	10
0.5	90	10
20	0	100
30	0	100
31	90	10
40	90	10

Zur Trennung wurde folgernder Gradient mit einer Flussrate von 1 mL/min verwendet:

Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

Die NMR-Spektren wurden mit den Spektrometern Avance III 300, Avance DRX 500 oder Avance III 600 der Firma *Bruker Corporation* im *"Center for Molecular and Structural Analytics an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf (CeMSA@HHU)*" aufgenommen. Die verwendeten partiell deuterierten Lösungsmittel (Aceton-*d*₆, Acetonitril-*d*₃, Chloroform-*d*, Dimethylsulfoxid-*d*₆, Methanol-*d*₄,) wurden von der Firma *Sigma Aldrich* bezogen. Die chemische Verschiebung der Signale wurde parts per million (ppm) angegeben. Als interner Standard dienten die Resonanzsignale der Restprotonen der verwendeten partiell deuterierten Lösungsmittel⁴⁹⁰:

- $(CD_3)_2CO$ $\delta 2.05$ (¹H-NMR) und $\delta 29.84$ sowie $\delta 206.26$ (¹³C-NMR).
- CD₃CN: δ 1.94 (¹H-NMR) und δ 1.32 sowie δ 118.26 (¹³C-NMR).
- CDCl₃: δ 7.26 (¹H-NMR) und δ 77.16 (¹³C-NMR)
- DMSO- d_6 : δ 2.50 (¹H-NMR) und δ 39.52 (¹³C-NMR).
- CD₃OD: δ 3.31 (¹H-NMR) und δ 49.00 (¹³C-NMR).

Die Multiplizität der ¹H-NMR-Signale ist jeweils angegeben und wurde nach den folgenden Abkürzungen charakterisiert: Singulett (s), breites Singulett (bs), Dublett (d), Triplett (t), Quartett (q), Pentett (p), Heptett (hept.), Dublett vom Dublett (dd), Dublett vom Triplett (dt) und Multiplett (m). Ermittelte Kopplungskonstanten (*J*) wurden in der Einheit Hertz (Hz) angegeben. Bei ¹³C-NMR-Signalen handelt es sich aufgrund der ¹H-Breitbandentkopplung um Singuletts aufgrund der heteronukleäre ¹³C-³¹P- oder ¹³C-¹⁹F-Kopplung um Dubletts. Die Signalzuordnung erfolgte teilweise mit Hilfe von DEPT-135-, ¹H,¹H-COSY-, ¹H,¹H-NOESY-, ¹H,¹³C-HSQC- und ¹H,¹³C-HMBC-Spektren.

Massenspektrometrie (ESI, EI, HRMS-ESI)

Die Aufnahme der Massenspektren erfolgte durch das "*Center for Molecular and Structural Analytics an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf (CeMSA@HHU)*" aufgenommen. ESI-Massenspektren wurden auf einem UHR-QTOF maXis 4G der Firma *Bruker Corporation* und EI-Massenspektren dem Triple Quadrupol-Gerät TSQ 7000 der Firma *Finnigan MAT* aufgenommen.

Schmelzpunktbestimmung

Schmelzpunkte (Smp.) wurden mittels M-565 Schmelzpunktmessgerät der Firma *Büchi* Labortechnik AG bestimmt und sind unkorrigiert.

No.	Code	Name
1a	TAKK189	2-(3-Chlor-2-hydroxyphenyl)-5-hydroxy-3,7,8-trimethoxy-4 <i>H</i> -chromen- 4-on
1b	TAKK184	2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-5-hydroxy-3,7,8-trimethoxy-4 <i>H</i> -chromen- 4-on
1c	TAKK290	5-Hydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4 <i>H</i> - chromen-4-on
1d	TAKK070	2-(3-Brom-2-hydroxy-5-methylphenyl)-3-methoxy-7,8-dimethoxy-4 <i>H</i> - chromen-4-on

9.4. Konkordanzliste

No.	Code	Name
1e	TAKK116	2-(3-Brom-2-fluorphenyl)-5-hydroxy-3,7,8-trimethoxy-4 <i>H</i> -chromen-4-on
1f	TAKK187	2-(3-Brom-2-(difluoromethoxy)phenyl)-5-hydroxy-3,7,8-trimethoxy-4H-
"		chromen-4-on
10	ΤΔΚΚΛΛΟ	2-(3-Chlor-2-hydroxyphenyl)-3-ethoxy-5-hydroxy-7,8-dimethoxy-4H-
.9	17 11 10000	chromen-4-on
1h	TAKK042	2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3-ethoxy-5-hydroxy-7,8-dimethoxy-4H-
		chromen-4-on
1i	TAKK044	2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3-isoproxy-5-hydroxy-7,8-dimethoxy-4 <i>H</i> -
		chromen-4-on
1i	TAKK100	2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-5-hydroxy-3-(2-hydroxyethoxy)-7,8-
.,		dimethoxy-4 <i>H</i> -chromen-4-on
1k	TAKK112	2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3-(2-(dimethylamino)ethoxy)-5-hydroxy-
		7,8-dimethoxy-4 <i>H</i> -chromen-4-on
1m	TAKK136	2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3-(difluormethoxy)-5-hydroxy-7,8-
		dimethoxy-4 <i>H</i> -chromen-4-on
1a	TAKK169	2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-5-hydroxy-3,7-dimethoxy-8-methyl-4 <i>H</i> -
		chromen-4-on
1r	TAKK123	2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-5-hydroxy-3-methoxy-4 <i>H</i> -chromen-4-on
2d	TAKK054	3-Brom-2-hydroxy-5-methyl-benzaldehyd
3a	TAKK002	3-Chlor-2-(methoxymethoxy)benzaldehyd
3b	TAKK014	3-Brom-2-(methoxymethoxy)benzaldehyd
3c	TAKK183	3-Methoxy-4-(methoxymethoxy)benzaldehyd
3d	TAKK056	3-Brom-2-(methoxymethoxy)-5-methylbenzaldehyd
3e	TAKK026	3,5-Dibrom-2-(methoxymethoxy)-benzaldehyd
3f	TAKK006	3-Brom-5-chlor-2-(methoxymethoxy)benzaldehyd
3g	TAKK028	3,5-Dichlor-2-(methoxymethoxy)-benzaldehyd
4a	TAKK111	2'-Hydroxy-4'-methoxyacetophenon
4b	TAKK046	1-(2-Hydroxy-4-methoxy-3-methylphenyl)ethan-1-on
5a	ΤΑΚΚΟ21	2-(3-Chlor-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-hydroxy-7,8-dimethoxy-4 <i>H</i> -
0u	17 (11021	chromen-4-on
5b	ΤΑΚΚ027	2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-hydroxy-7,8-dimethoxy-4H-
		chromen-4-on
50	ΤΔΚΚ228	3-Hydroxy-7,8-dimethoxy-2-(3-methoxy-4-(methoxymethoxy)phenyl)-
90	IANNZZŎ	4H-chromen-4-on

No.	Code	Name
5d	ΤΔΚΚΛ59	2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)-5-methylphenyl)-3-hydroxy-7,8-
54		dimethoxy-4 <i>H</i> -chromen-4-on
5e	TAKK106	2-(3-Brom-2-fluorphenyl)-3-hydroxy-7,8-dimethoxy-4 <i>H</i> -chromen-4-on
50	ΤΔΚΚ121	2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-hydroxy-7-methoxy-4H-
Jy		chromen-4-on
5h	ΤΔΚΚ122	2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-hydroxy-7-methoxy-8-methyl-
511		4 <i>H</i> -chromen-4-on
5i	TAKK110	2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-hydroxy-4H-chromen-4-on
62	ΤΔΚΚ511	2-(3-Chlor-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3,7,8-trimethoxy-4H-chromen-
Ua		4-on
6h	ΤΔΚΚ127	2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3,7,8-trimethoxy-4H-chromen-
0.0		4-on
60	TAKK235	3,7,8-Trimethoxy-2-(3-methoxy-4-(methoxymethoxy)phenyl)-4H-
	TANA200	chromen-4-on
ed	TAKKOG2	2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)-5-methylphenyl)-3-ethoxy-7,8-
ou	TANNUUJ	dimethoxy-4 <i>H</i> -chromen-4-on
6e	TAKK114	2-(3-Brom-2-fluorphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4 <i>H</i> -chromen-4-on
60	TAKKOOA	2-(3-Chlor-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-ethoxy-7,8-dimethoxy-4H-
٥g		chromen-4-on
6h		2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-ethoxy-7,8-dimethoxy-4H-
011	TANNUUT	chromen-4-on
61	ΤΔΚΚΟ32	2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-isopropoxy-7,8-dimethoxy-
	TAILINUUZ	4 <i>H</i> -chromen-4-on
61	TAKK020	2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-(2-hydroxyethoxy)-7,8-
IJ	TANN029	dimethoxy-4 <i>H</i> -chromen-4-on
6k	ΤΔΚΚΛΩΊ	2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-(2-(dimethylamino)ethoxy)-
UN		7,8-dimethoxy-4 <i>H</i> -chromen-4-on
61	ΤΔΚΚ076	3-(Benzyloxy)-2-(3-chlor-2-(methoxymethoxy)phenyl)-7,8-dimethoxy-
0.	17414070	4 <i>H</i> -chromen-4-on
6m	ΤΔΚΚ147	2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-(difluormethoxy)-7,8-
0111		dimethoxy-4 <i>H</i> -chromen-4-on
6n	ΤΔΚΚ125	2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3,7-dimethoxy-4H-chromen-4-
4~		on
60	TAKK157	2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3,7-dimethoxy-8-methyl-4H-
~~		chromen-4-on
6r	TAKK115	2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-methoxy-4 <i>H</i> -chromen-4-on

No.	Code	Name	
7a	TAKK186	2-(3-Chlor-2-hydroxyphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4H-chromen-4-on	
7b	TAKK130	2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4H-chromen-4-on	
7c	TAKK242	2-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4H-chromen-4-on	
7d	TAKK064	2-(3-Brom-2-hydroxy-5-methylphenyl)-3-methoxy-7,8-dimethoxy-4 <i>H</i> - chromen-4-on	
7f	TAKK146	2-(3-Brom-2-(difluormethoxy)phenyl)-3,7,8-trimethoxy-4 <i>H</i> -chromen-4- on	
7g	TAKK008	2-(3-Chlor-2-hydroxyphenyl)-3-ethoxy-7,8-dimethoxy-4 <i>H</i> -chromen-4-on	
7h	TAKK034	2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3-ethoxy-7,8-dimethoxy-4 <i>H</i> -chromen-4-on	
7i	TAKK035	2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3-ethoxy-7,8-dimethoxy-4 <i>H</i> -chromen-4-on	
7j	TAKK099	2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3-(2-hydroxyethoxy)-7,8-dimethoxy-4 <i>H</i> - chromen-4-on	
7k	TAKK105	2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3-(2-(dimethylamino)ethoxy)-7,8- dimethoxy-4 <i>H</i> -chromen-4-on	
71	TAKK080	3-(Benzyloxy)-2-(3-chlor-2-hydroxyphenyl)-7,8-dimethoxy-4 <i>H</i> -chromen- 4-on	
7m	TAKK133	2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3-(difluormethoxy)-7,8-dimethoxy-4 <i>H</i> -chromen-4-on	
7р	TAKK131	2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3,7-dimethoxy-4H-chromen-4-on	
7q	TAKK161	2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3,7-dimethoxy-8-methyl-4H-chromen-4-on	
7r	TAKK119	2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3-methoxy-4 <i>H</i> -chromen-4-on	
8	TAKK142	1,3-Dioxoisoindolin-2-yltosylat	
9a	TAKK156	2-(2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4-oxo-4 <i>H</i> -chromen-5- yl)isoindolin-1,3-dion	
9b	TAKK205	<i>N</i> -(2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4-oxo-4 <i>H</i> -chromen-5- yl)-4-methylbenzolsulfonamid	
9c	TAKK210	5-Amino-2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4 <i>H</i> -chromen-4- on	
9d	TAKK221	<i>N</i> -(2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4-oxo-4 <i>H</i> -chromen-5-yl)acetamid	
9e	TAKK223	<i>N</i> -(2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4-oxo-4 <i>H</i> -chromen-5-yl)-2,2,2-trifluoracetamid	
9f	TAKK214	Methyl-3-(2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4-oxo-4 <i>H</i> - chromen-5-yl)acrylat	
13	TAKK260	2-(((Diethoxyphosphoryl)(phenyl)methyl)thio)essigsäure	

No.	Code	Name	
15	TAKK246	<i>tert</i> -Butyl-(benzyloxy)carbamat	
15a	TAKK515	<i>tert</i> -Butyl ((<i>ter</i> t-butoxycarbonyl)oxy)carbamat	
16	TAKK247	tert-Butyl-(benzyloxy)(3-phenylpropyl)carbamat	
17	TAKK251	O-Benzyl-N-(3-phenylpropyl)hydroxylamin•HCl	
17a	TAKK516	N-(3-Phenylpropyl)hydroxylamin	
18	ΤΔΚΚ346	Diethyl (((2-((benzyloxy)(3-phenylpropyl)amino)-2-	
10	17 11 (10-10	oxoethyl)thio)(phenyl)methyl) phosphonat	
19	ΤΔΚΚ518	Diethyl (((2-(hydroxy(3-phenylpropyl)amino)-2-	
15	17 11 10 10	oxoethyl)thio)(phenyl)methyl)phosphonat	
20	ΤΑΚΚ420	(((2-(Hydroxy(3-phenylpropyl)amino)-2-	
20	17 (10120	oxoethyl)thio)(phenyl)methyl)phosphonsäure	
21d	TAKK400	3-(Hexyloxy)benzaldehyd	
21e	TAKK399	4-(Hexyloxy)benzaldehyd	
21f	TAKK452	3-((6-(1,3-Dioxoisoindolin-2-yl)hexyl)oxy)benzaldehyd	
21g	TAKK453	4-((6-(1,3-Dioxoisoindolin-2-yl)hexyl)oxy)benzaldehyd	
22a	TAKK320	Diethyl-hydroxy-phenyl-methylphosphonat	
22b	TAKK407	Diethyl ((3-(hexyloxy)phenyl)(hydroxy)methyl)phosphonat	
22c	TAKK406	Diethyl ((4-(hexyloxy)phenyl)(hydroxy)methyl)phosphonat	
22d	TAKK454	Diethyl ((3-((6-(1,3-dioxoisoindolin-2-	
220	17 11 (11)-1	yl)hexyl)oxy)phenyl)(hydroxy)methyl)phos-phonat	
220	TAKK455	Diethyl ((4-((6-(1,3-dioxoisoindolin-2-	
	17 4 4 1 1 0 0	yl)hexyl)oxy)phenyl)(hydroxy)methyl)phos-phonat	
22f	TAKK445	Diethyl (hydroxy(3-nitrophenyl)methyl)phosphonat	
22g	TAKK444	Diethyl (hydroxy(4-nitrophenyl)methyl)phosphonat	
22h	TAKK447	Diethyl ((3-aminophenyl)(hydroxy)methyl)phosphonat	
22i	TAKK446	Diethyl ((4-aminophenyl)(hydroxy)methyl)phosphonat	
22j	TAKK448	Diethyl ((3-hexanamidophenyl)(hydroxy)methyl)phosphonat	
22k	TAKK450	Diethyl ((4-hexanamidophenyl)(hydroxy)methyl)phosphonat	
221	TAKK330	<i>tert</i> -Butyl (4-((diethoxyphosphoryl)(hydroxy)methyl)phenyl)carbamat	
23a	TAKK328	(Diethoxyphosphoryl)(phenyl)methyltosylat	
23b	TAKK411	(Diethoxyphosphoryl)(3-hexyloxyphenyl)methyltosylat	
230	ΤΔΚΚ458	(Diethoxyphosphoryl)(3-((6-(1,3-dioxoisoindolin-2-	
200	17 11 11 11 100	yl)hexyl)oxy)phenyl)methyl tosylat	
23d	TAKK428	(Diethoxyphosphoryl)(3-nitrophenyl)methyltosylat	
23e	TAKK427	(Diethoxyphosphoryl)(4-nitrophenyl)methyltosylat	

No.	Code	Name
23f	TAKK451	(Diethoxyphosphoryl)(3-hexanamidophenyl)methyltosylat
24a	TAKK422	Diethyl (chlor(4-(hexyloxy)phenyl)methyl)phosphonat
24h		Diethyl (chlor(4-((6-(1,3-dioxoisoindolin-2-
240		yl)hexyl)oxy)phenyl)methyl)phospho-nat
24c	TAKK456	Diethyl (chlor(4-hexanamidophenyl)methyl)phosphonat
24d	TAKK387	tert-Butyl (4-(chlor(diethoxyphosphoryl)methyl)phenyl)carbamat
25a	TAKK424	Methyl 2-(((diethoxyphosphoryl)(3-(hexyloxy)phenyl)methyl)thio)acetat
25b	TAKK435	Methyl 2-(((diethoxyphosphoryl)(4-(hexyloxy)phenyl)methyl)thio)acetat
250	TAKKAGI	Methyl 2-(((diethoxyphosphoryl)(3-((6-(1,3-dioxoisoindolin-2-
250	1 ANN40 1	yl)hexyl)oxy)phen-yl)methyl)thio)acetat
25d	TAKKA65	Methyl 2-(((diethoxyphosphoryl)(4-((6-(1,3-dioxoisoindolin-2-
250	1403	yl)hexyl)oxy)phen-yl)methyl)thio)acetat
250	TAKKAGO	Methyl 2-(((diethoxyphosphoryl)(3-
236	1400	hexanamidophenyl)methyl)thio)acetat
25f	TAKKA67	Methyl 2-(((diethoxyphosphoryl)(4-
		hexanamidophenyl)methyl)thio)acetat
25 a	TAKK105	Methyl 2-(((4-((<i>tert</i> -
259	TAN1495	butoxycarbonyl)amino)phenyl)(diethoxyphosphoryl)methyl) thio)acetat
26a	TAKK429	2-(((Diethoxyphosphoryl)(3-(hexyloxy)phenyl)methyl)thio)essigsäure
26b	TAKK439	2-(((Diethoxyphosphoryl)(4-(hexyloxy)phenyl)methyl)thio)essigsäure
260	TAKK160	2-(((Diethoxyphosphoryl)(3-((6-(1,3-dioxoisoindolin-2-
		yl)hexyl)oxy)phenyl)methyl)thio)essigsäure
26d	ΤΔΚΚ173	2-(((Diethoxyphosphoryl)(4-((6-(1,3-dioxoisoindolin-2-
200		yl)hexyl)oxy)phenyl)methyl)thio)essigsäure
26e	TAKK460	2-(((Diethoxyphosphoryl)(3-hexanamidophenyl)methyl)thio)essigsäure
26f	TAKK471	2-(((Diethoxyphosphoryl)(4-hexanamidophenyl)methyl)thio)essigsäure
		2-(((4-((tert-
26g	TAKK496	Butoxycarbonyl)amino)phenyl)(diethoxyphosphoryl)methyl)thio)-
		essigsäure
27a	ΤΔΚΚΔ33	Diethyl ((3-(hexyloxy)phenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-
210	17 (111400	oxoethyl)thio)methyl) phosphonat
27h	τδκκλλ1	Diethyl ((4-(hexyloxy)phenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-
210	17 11 11 1 11 11 11	oxoethyl)thio)methyl) phosphonat
270	ΤΔ ΚΚ Λ79	Diethyl ((3-((6-(1,3-dioxoisoindolin-2-yl)hexyl)oxy)phenyl)((2-
210	171114/0	(hydroxy(methyl) amino)-2-oxoethyl)thio)methyl)phosphonat

No.	Code	Name
27d	τδκκάτο	Diethyl ((4-((6-(1,3-dioxoisoindolin-2-yl)hexyl)oxy)phenyl)((2-
	(hydroxy(methyl) amino)-2-oxoethyl)thio)methyl)phosphonat	
276	TAKKA63	Diethyl ((3-hexanamidophenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-
210	17 11 (14-00	oxoethyl)thio) methyl)phosphonat
27f	TAKK474	Diethyl ((4-hexanamidophenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-
		oxoethyl)thio) methyl)phosphonat
27a	TAKK503	<i>tert</i> -Butyl (4-((diethoxyphosphoryl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-
3		oxoethyl)thio)methyl)phenyl)carbamat
27h	TAKK520	Diethyl ((4-(hexyloxy)phenyl)((2-(hydroxy(3-phenylpropyl)amino)-2-
		oxoethyl) thio)methyl)phosphonat
28a	TAKK443	((3-(Hexyloxy)phenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-
		oxoethyl)thio)methyl)phos-phonsäure
28b	TAKK442	((4-(Hexyloxy)phenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-
		oxoethyl)thio)methyl)phos-phonsäure
28c	TAKK481	((3-((6-(1,3-Dioxoisoindolin-2-yl)hexyl)oxy)phenyl)((2-
		(hydroxy(methyl)amino)-2-oxo-ethyl)thio)methyl)phosphosäure
28d	TAKK490	((4-((6-(1,3-Dioxoisoindolin-2-yl)hexyl)oxy)phenyl)((2-
		(hydroxy(methyl)amino)-2-oxo-ethyl)thio)methyl)phosphosäure
28e	TAKK476	((3-Hexanamidophenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-
		oxoethyl)thio)methyl)phosphonsäure
28f	TAKK477	((4-Hexanamidophenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-
		oxoethyl)thio)methyl)phosphonsäure
31	TAKK519	2-Chlor-3,4-dimethoxybenzoesäure
32	TAKK489	2-Chlor-3,4-dihydroxybenzoesäure
34	TAKK336	L-Lysinmethylester•2 HCI
36	TAKK318	Benzyl-2,3-bis-benzyloxy-benzoat
37	TAKK316	2,3-Bis-benzyloxybenzoesäure
38	TAKK335	Methyl- <i>N</i> ² , <i>N</i> ⁶ -bis(2,3-bis(benzyloxy)benzoyl)-L-lysinat
39	TAKK345	N ² ,N ⁶ -bis(2,3-bis(benzyloxy)benzoyl)-L-lysin
40	TAKK494	N ² ,N ⁶ -Bis(2,3-dihydroxybenzoyl)-L-lysin
42	TAKK219	2-(Benzyloxy)benzoylchlorid
43	TAKK278	(S)-Benzyl-2-(2-(benzyloxy)benzamido)-2-hydroxyacetat
44	TAKK296	(S)-Benzyl 2-(2-(benzyloxy)phenyl)-4,5-dihydrooxazol-4-carboxylat
45	TAKK308	(S)-2-(2-hydroxyphenyl)-4,5-dihydrooxazol-4-carbonsäure
46	TAKK317	2,3-Bis(benzyloxy)benzoylchlorid

No.	Code	Name
47	TAKK337	Benzyl (2,3-bis(benzyloxy)benzoyl)-L-threoninat
48	TAKK344	Benzyl (4S,5R)-2-(2,3-bis(benzyloxy)phenyl)-5-methyl-4,5-
		dihydrooxazol-4-carboxylat
49	TAKK391	(4S,5R)-2-(2,3-dihydroxyphenyl)-5-methyl-4,5-dihydrooxazol-4-
		carbonsäure
51	TAKK363	<i>tert</i> -Butyl ((benzyloxy)carbonyl)-L-lysinat
52	TAKK303	<i>tert</i> -Butyl <i>N</i> ⁶ -(benzoyloxy)- <i>N</i> ² -((benzyloxy)carbonyl)-L-lysinat
53	ТАКК412	<i>tert</i> -Butyl <i>N</i> ⁶ -(benzoyloxy)- <i>N</i> ² -((benzyloxy)carbonyl)- <i>N</i> ⁶ -palmitoyl-L-
	17 0 0 0 1 1 2	lysinat
54	TAKK415	<i>tert</i> -Butyl <i>N</i> ⁶ -(benzoyloxy)- <i>N</i> ⁶ -palmitoyl-L-lysinat
55	TAKK419	<i>tert</i> -Butyl N^{6} -(benzoyloxy)- N^{2} -((S)-2-(2-hydroxyphenyl)-4,5-
		dihydrooxazol-4-car-bonyl)- <i>N</i> ⁶ -palmitoyl-L-lysinat
57	TAKK282	(<i>S</i>)-3-(((Benzyloxy)carbonyl)amino)-2-oxoazepan-1-yl benzoat
58	TAKK389	(S)-3-Amino-2-oxoazepan-1-yl benzoat
60	TAKK302	3-(((Benzyloxy)carbonyl)amino)- <i>N</i> -(<i>tert</i> -butoxycarbonyl)-L-alanin
61	TAKK243	(S,Z)-N-(5-(((Benzyloxy)carbonyl)amino)-5-carboxypentyl)-1-
0.1	17 11 11 2 10	phenylmethaniminoxid
65	TAKK252	<i>N</i> ² -((Benzyloxy)carbonyl)- <i>N</i> ⁶ -hydroxy-∟-lysin
66	TAKK253	Benzyl (<i>S</i>)-(1-((<i>tert</i> -butyldiphenylsilyl)oxy)-2-oxoazepan-3-yl)carbamat
	TAKK493	Diethyl ((3-((6-aminohexyl)oxy)phenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-
67a	TAKK505	oxoethyl) thio)methyl)phosphonat
	TAKK482	
67b	TAKK521	Diethyl ((4-((6-aminohexyl)oxy)phenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-
		oxoethyl) thio)methyl)phosphonat
68a	TAKK509	Diethyl ((3-((6-(2,3-dihydroxybenzamido)hexyl)oxy)phenyl)((2-
		(hydroxy(methyl) amino)-2-oxoethyl)thio)methyl)phosphonat
68b	TAKK499	Diethyl ((3-((6-(2-chloro-3,4-dihydroxybenzamido)hexyl)oxy)phenyl)((2-
		(hydroxy (methyl)amino)-2-oxoethyl)thio)methyl)phosphonat
680	TAKK522	Diethyl ((4-((6-aminohexyl)oxy)phenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-
		oxoethyl) thio)methyl)phosphonat

9.5. Allgemeine Arbeitsvorschriften

9.5.1. Darstellung der MOM-geschützten Aldehyde (AAV 1)

Die Darstellung der Methoxymethyl-geschützten Verbindungen **3a-g** wurde in Anlehnung an die Vorschrift von OHNO *et al.* durchgeführt.⁴⁹¹ Die entsprechenden 2-Hydroxybenzaldehyde (1.00 Äq.) wurden jeweils in einem ausgeheizten 100 mL Rundkolben vorgelegt und in trockenem Dichlormethan (1.5 mL/mmol) gelöst. Mit einem Eisbad wurde auf 0 °C abgekühlt und unter Rühren *N*,*N*-Diisopropylethylamin (2.00 Äq.) tropfenweise hinzugegeben. Anschließend wurde (Chlormethyl)methylether (1.20 Äq.) tropfenweise zugegeben und die Eiskühlung entfernt. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur 16 h lang gerührt, die Reaktion durch Zugabe von gesättigter wässriger Ammoniumchlorid-Lösung (2.00 mL/mmol) beendet und für 10 min weiter gerührt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase mit Dichlormethan dreimal im Verhältnis 1:1 extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung (2.00 mL/mmol) gewaschen, mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das gewonnene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit einem Eluentengemisch bestehend aus *n*-Hexan/Ethylacetat 10/1 v/v gereinigt.

9.5.2. Darstellung der Flavonole mittels Algar-Flynn-Oyamada-Reaktion (AAV 2)

Die Synthese der Flavonole 5a-i erfolgte gemäß einer Vorschrift von BERGER et al.³¹³ 3,4-Dimethoxy-2-hydroxyacetophenon (4) (1.00 Åq.) oder die Acetophenone 4a-c (1.00 Åq.) wurden in einem 500 mL oder 1000 mL Rundkolben vorgelegt, in Ethanol gelöst (3 mL/mmol) und der entsprechende MOM-geschützte Aldehyd **3a-g** (1.00 Äg.) zugegeben. Anschließend wurde 5 м Natronlauge (5.00 Äg.) hinzugegeben, der Reaktionsansatz auf 50 °C erwärmt und 24 h lang gerührt. Der Reaktionsansatz wurde mittels Eisbad auf 0 °C abgekühlt und mit Ethanol (0.3 mL/mmol)verdünnt. Es wurde tropfenweise 30 %ige wässrige Wasserstoffperoxid-Lösung (2.50 Äg.) zugegeben und bei 0 °C 30 min lang gerührt. Anschließend wurde der Ansatz auf Raumtemperatur erwärmt und 16 h lang bei dieser Temperatur gerührt. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in entmineralisiertem Eiswasser (5 mL/mmol) aufgenommen und mit 2 м Salzsäure auf einen pH-Wert von 7 eingestellt. Die wässrige Suspension wurde viermal mit jeweils (4 mL/mmol) Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen einmal mit (4 mL/mmol) einer gesättigten wässrigen Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Säulenchromatographie mit einem Eluentengemisch bestehend aus *n*-Hexan/Ethylacetat $(10/1 \rightarrow 10/2 \rightarrow 10/3 v/v)$ gereinigt.

9.5.3. Darstellung der 3-Alkylflavonoide (AAV 3)

Die Synthese der 3-Alkylflavonoide **6a-r** erfolgte gemäß einer Vorschrift von BERGER *et al.*³¹³ In einem ausgeheizten 250 mL oder 500 mL Rundkolben wurde das entsprechende Flavonol **5a-i** (1.00 Äq.) in *N*,*N*-Dimethylformamid (10 mL/mmol) gelöst und mit und Cäsiumcarbonat (2.25 Äq.) versetzt. Bei Raumtemperatur wurde Alkylhalogenid (1.50 Äq.) tropfenweise hinzugegeben und der Ansatz 1-2 h lang gerührt. Nach vollständigem Reaktionsumsatz wurde die Reaktion mit Eiswasser (5 mL/mmol) abgebrochen und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Ethylacetat (20 mL/mmol) aufgenommen und die organische Phase mit gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung (6 x 20 mL/mmol) gewaschen. Die organische Phase wurde mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Säulenchromatographie mit einem Eluentengemisch bestehend aus *n*-Hexan/Ethylacetat (10/1 \rightarrow 10/2 \rightarrow 10/3 *v*/*v*) gereinigt.

9.5.4. Acidolytisches Entfernen der MOM-Schutzgruppe (AAV 4)

Die Synthese der 2'Hydroxyflavonoide **7a-r** erfolgte gemäß einer Vorschrift von BERGER *et al.*³¹³ Das entsprechende MOM-geschützte Flavonoid **6a-r** (1.00 Äq.) wurde in Methanol (15 mL/mmol) gelöst und langsam mit 2 M Salzsäure (6.40 Äq.) versetzt. Der Reaktionsansatz wurde auf 50 °C erwärmt und bis zum vollständigen DC-Umsatz gerührt. Das Lösemittelvolumen wurde unter vermindertem Druck reduziert und die wässrige Suspension viermal mit Dichlormethan (10 mL/mmol) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden einmal mit einer gesättigten wässrigen Natriumchlorid-Lösung (40 mL/mmol) gewaschen, mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Säulenchromatographie mit einem Eluentengemisch bestehend aus *n*-Hexan/Ethylacetat (10/1 \rightarrow 10/2 \rightarrow 10/3 *v/v*) gereinigt.

9.5.5. Darstellung der 5-Hydroxyflavonoide mittels Ruthenium-katalysierter *ortho*-C(sp²)-H-Hydroxylierung (AAV 5)

Die Synthese der 5-Hydroxyflavonoide **1a-r** erfolgte gemäß einer Vorschrift von BERGER *et al.*³¹³ Das entsprechende Flavonoid **7a-r** (1.00 Äq.), Silbercarbonat (2.00 Äq.), *Selectfluor*[®] (1.10 Äq., 95.0 %), Dichlor(*p*-cymol)ruthenium(II)-Dimer (46.4 mg, 0.08 mmol, 0.05 Äq.) wurden in einem ausgeheizten 50 mL SCHLENK-Kolben unter Argon-Atmosphäre vorgelegt und mit Trifluoressigsäureanhydrid (109 Äq.) versetzt. Anschließend wurde Trifluoressigsäure (3.00 Äq.) zugetropft und die Reaktion auf einem vorgeheizten Ölbad bei 80 °C 24 h lang erhitzt. Die Reaktion wurde langsam auf Raumtemperatur abgekühlt und mit Dichlormethan

(30 mL/mmol) verdünnt, mittels Vakuumfiltration über *Celite*[®] filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Der ölige Rückstand wurde in Methanol (50 mL/mmol) aufgenommen und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Säulenchromatographie mit einem Eluentengemisch bestehend aus *n*-Hexan/Ethylacetat (10/1 \rightarrow 10/2 \rightarrow 10/3 *v*/*v*) gereinigt.

9.5.6. Darstellung der Alkoxybenzaldehyde (AAV 6)

Die Synthese der Alkoxyaldehyde **21d-g** erfolgte gemäß einer modifizierten Vorschrift von JEONG *et al.*⁴⁹² In einem 250 mL Rundkolben wurde das entsprechende Phenol **21b-c** (1.00 Äq.) in Acetonitril (2 mL/mmol) gelöst und mit wasserfreiem Kaliumcarbonat (2.00 Äq.) sowie dem Alkylhalogenid (1.00 Äq.) versetzt. Anschließend wurde die Reaktion bei 80 °C 24 h lang gerührt. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in Ethylacetat (2 mL/mmol) aufgenommen und die organische Phase mit gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung (2 x 100 mL) gewaschen. Die organische Phase wurden mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Säulenchromatographie mit einem Eluentengemisch bestehend aus Cyclohexan/Ethylacetat (20/1 v/v) gereinigt.

9.5.7. Darstellung der α -Hydroxyphosphonate mittels PUDOVIC-Reaktion (AAV 7)

Die Synthese der α -Hydroxyphosphonate **22a-g** erfolgte gemäß einer modifizierten Vorschrift von SARDARIAN *et al.*⁴²⁵ In einem 100 mL Rundkolben wurde der entsprechende Aldehyd **21a** oder **22d-i** (1.00 Äq.) und Diethylphosphonat (1.00 Äq.) vorgelegt und mit Magnesiumoxid (1.00 Äq.) versetzt. Der Reaktionskolben wurde für 30 min im Ultraschallbad behandelt, sodass der Ansatz fest wurde. Anschließend wurde der Feststoff in Dichlormethan (1 mL/mmol) suspendiert und erneut 15 min im Ultraschallbad behandelt. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, sodass wieder Feststoff erhalten wurde. Dies wurde drei- bis fünfmal wiederholt, bis mittels Dünnschichtchromatographie ein vollständiger Umsatz festgestellt werden konnte. Anschließend wurde der Feststoff in Ethylacetat (5 mL/mmol) aufgenommen und mit 1 M Salzsäure (2 x 5 mL/mmol) gewaschen. Die organische Phase wurde mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Säulenchromatographie mit einem Eluentengemisch bestehend aus Dichlormethan/Methanol (10/1 v/v) oder durch Umkristallisation (Gemische aus Cyclohexan/Methanol) gereinigt.

9.5.8. Tosylierung oder Chlorierung der α -Hydroxyphosphonate (AAV 8)

Die Synthese der α -Chlorphosphonat **24a-d** oder α -Tosylphosphonat **23a-f** erfolgte gemäß der einer modifizierten Vorschrift von KONG *et al.*⁴⁹³ In einem ausgeheizten 250 mL Rundkolben wurde das entsprechende α -Hydroxyphosphonat **22a-g** oder **22j-l** (1.00 Äq.) unter Stickstoffatmosphäre in trockenem Dichlormethan (4.5 mL/mmol) gelöst und im Eisbad auf 0°C abgekühlt. Anschließend wurde die Lösung mit Tosylchlorid (1.20 Äq.), Triethylamin (2.50 Äq.) und 4-(Dimethylamino)pyridin (0.10 Äq.) versetzt und bei Raumtemperatur 18 h lang gerührt. Dem Reaktionssatz wurde 1 M Salzsäure (4.5 mL/mmol α -Hydroxyphosphonat) zugegeben und die Phasen im Scheidetrichter separiert. Die organische Phase wurde anschließend mit gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung (3 x 5 mL/mmol) gewaschen, mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Säulenchromatographie mit einem Eluentengemisch bestehend aus Cyclohexan/Ethylacetat (10/1 \rightarrow 10/3 \rightarrow 10/5 v/v) gereinigt.

9.5.9. Nukleophile Substitution der α-Chlor- und α-Tosylphosphonate (AAV 9)

Die Synthese der Carbonsäuremethylester 25a-g erfolgte gemäß einer modifizierten Vorschrift von NORDQVIST et al.494 In einem 100 mL Rundkolben wurde das entsprechende a-Chlorphosphonat **24a-d** oder a-Tosylphosphonat **23a-f** (1.00 Äq.) in *N*,*N*-Dimethylformamid (6.6 mL/mmol) gelöst und mit Cäsiumcarbonat (2.00 Äg.) versetzt. Anschließend wurde Methylthioglycolat (2.00 Äq.) hinzugegeben und tropfenweise die Reaktion bei Raumtemperatur 16 h lang gerührt. Die Suspension wurde filtriert und mit Dichlormethan gewaschen. Das Lösemittel des Filtrates wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 30 mL Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wurde mit gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung (3 x 30 mL) gewaschen, mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Säulenchromatographie mit einem Eluentengemisch bestehend aus Cyclohexan/Ethylacetat $(10/1 \rightarrow 10/3 \rightarrow 10/5 v/v)$ gereinigt.

9.5.10. CDI-vermittelte Kupplungsreaktion (AAV 10)

Die Synthese der *N*-Methylhydroxamsäuren **27a-g** erfolgte gemäß einer modifizierten Vorschrift von SHIROKANE *et al.*⁴⁹⁵ In einem 10 mL Rundkolben wurde die entsprechende Carbonsäure **26a-g** (1.00 Äq.) in trockenem Tetrahydrofuran (1 mL/mmol) vorgelegt und mit 1,1'-Carbonyldiimidazol (1.50 Äq.) versetzt. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur 1 h lang gerührt, dann *N*-Methylhydroxylamin•HCI (1.10 Äq) zugegeben und bei Raumtemperatur weitere 16 h lang gerührt. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in Ethylacetat (20 mL) aufgenommen. Die organische Phase wurde mit 1 M

Salzsäure (2 x 20 mL) gewaschen, mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem ruck entfernt. Die Reinigung erfolgte mittels Flash-Säulenchromatographie mit einem Eluentengemisch bestehend aus Dichlormethan/Methanol 20/1 v/v + 0.1 % Ameisensäure.

9.5.11. TMSBr-Spaltung des Phosphonsäurediethylesters (AAV 11)

Die Synthese der Phosphonohydroxamsäuren **20** und **28a-f** erfolgte gemäß einer modifizierten Vorschrift von LIENAU *et al.*²⁷⁸ In einem ausgeheizten 10 mL Rundkolben wurde der entsprechende Phosphonsäurediethylester (1.00 Äq.) unter Stickstoffatmosphäre in trockenem Dichlormethan (3 mL/mmol) gelöst und im Eisbad auf 0 °C abgekühlt. Die Lösung wurde tropfenweise mit Trimethylsilylbromid (10.0 Äq.) versetzt und bei 0 °C 1 h lang gerührt. Anschließend wurde das Eisbad entfernt und bei Raumtemperatur weitere 15 h lang gerührt. Das Lösemittel wurde im Stickstoffstrom entfernt, der Rückstand in 3 mL Tetrahydrofuran aufgenommen und mit einem Tropfen Wasser versetzt. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur 1 h lang gerührt und das Lösemittel mittels Stickstoffstrom entfernt. Das Rohprodukt wurde über Nacht am Hochvakuum getrocknet.

Aufreinigungsmethode I: Der Rückstand wurde in wenig Dichlormethan gelöst und an eine kleine Menge Kieselgel adsorbiert. Die säulenchromatographische Isolierung erfolgte in einer 5 mL BRAUN-Spritze, die mit 300 mg Kieselgel gepackt wurde, unter Verwendung von Cyclohexan (100 %) \rightarrow Ethylacetat (100 %). Das Lösemittel wurde mittels Stickstoffstrom entfernt und das Produkt im Hochvakuum getrocknet.

Aufreinigungsmethode II: Der Rückstand wurde mit 5 mL *n*-Pentan versetzt und für 10 min im Ultraschallbad bei 20 °C behandelt. Der Überstand wurde abdekantiert und der Rückstand mittels Rotationsverdampfer ohne Erwärmen getrocknet. Dieses Prozedere wurde 5- bis 10mal wiederholt, bis das TMS-Signal im ¹H-NMR-Spektrum verschwunden war. Anschließend wurde der Rückstand in wenig entmineralisiertem Wasser aufgenommen und zügig lyophilisiert.

Aufreinigungsmethode III: Der Rückstand wurde in wenig Dichlormethan gelöst und an eine kleine Menge C₁₈-Kieselgel adsorbiert. Die säulenchromatographische Isolation erfolgte mittels C₁₈-Umkehrphasen-Flashchromatographie mit einem Eluentengemisch bestehend aus Wasser/Acetonitril (10/1 \rightarrow 3/1 *v*/*v*). Das Lösemittel wurde mittels Stickstoffstrom entfernt und das Produkt im Hochvakuum getrocknet.

9.6. Analytische Daten

9.6.1. Darstellung der Chlor- und Bromflavonin Analoga

9.6.1.1. Darstellung der MOM-geschützten Benzaldehyde 3a-g

3-Chlor-2-(methoxymethoxy)benzaldehyd (3a)



Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 1** unter Verwendung von 3-Chlor-2hydroxybenzaldehyd (**2a**) (5.00 g, 31.9 mmol, 1.00 Äq.), (Chlormethyl)methylether (3.06 mL, 38.3 mmol, 1.20 Äq.) und *N*,*N*-Diisopropylethylamin (11.1 mL, 63.9 mmol, 2.00 Äq.) in 50 mL trockenem Dichlormethan. 3-Chlor-2-(methoxymethoxy)benzaldehyd (**3a**) wurde als farbloser Feststoff (6.20 g, 30.9 mmol, 97 %) erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Publikation von CHRISTENSEN *et al.*⁴⁹⁶ überein und wurden bereits von unserer Arbeitsgruppe publiziert.³¹³

R _f	0.24 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 10/1 <i>v/v</i>).
Schmelzpunkt	43 °C (40-41 °C). ³¹³
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 3.53 (s, 3 H), 5.21 (s, 2 H), 7.36 (td, J = 7.9, 0.7 Hz,
	1 H), 7.73 (dd, $J = 7.8$, 1.7 Hz, 1 H), 7.87 (dd, $J = 7.9$,
	1.7 Hz, 1 H), 10.23 (d, <i>J</i> = 0.8 Hz, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 58.3, 100.5, 125.5, 126.9, 128.6, 131.6, 136.1, 156.2,
	189.6.
HPLC (Methode B, 254 nm)	t _R : 12.39 min, ≥ 99 % Reinheit.

3-Brom-2-(methoxymethoxy)benzaldehyd (3b)



Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 1** unter Verwendung von 3-Brom-2hydroxybenzaldehyd (**2b**) (5.10 g, 25.4 mmol, 1.00 Äq.), (Chlormethyl)methylether (2.43 mL, 30.4 mmol, 1.20 Äq.) und *N*,*N*-Diisopropylethylamin (8.84 mL, 50.7 mmol, 2.00 Äq.) in 38 mL trockenem Dichlormethan. 3-Brom-2-(methoxymethoxy)benzaldehyd (**3b**) wurde als farbloser Feststoff (5.99 g, 24.4 mmol, 96 %) erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Publikation von EL DINE *et al.*⁴⁹⁷ überein und wurden bereits von unserer Arbeitsgruppe publiziert.³¹³

R _f	0.36 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 10/1 <i>v/v</i>).
Schmelzpunkt	54 °C.
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 3.54 (s, 3 H), 5.19 (s, 2 H), 7.30 (td, <i>J</i> = 7.8, 0.8 Hz, 1H),
	7.77 (dd, <i>J</i> = 7.7, 1.7 Hz, 1 H), 8.01 (dd, <i>J</i> = 7.9, 1.7 Hz,
	1 H), 10.20 (d, <i>J</i> = 0.8 Hz, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 57.8, 100.8, 117.9, 126.4, 127.8, 131.2, 139.2, 156.34,
	189.7.
HPLC (Methode B, 254 nm)	t_R : 12.75 min, ≥ 99 % Reinheit.

3-Methoxy-4-(methoxymethoxy)benzaldehyd (3c)



Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 1** unter Verwendung von 4-Hydroxy-3methoxybenzaldehyd (**2c**) (3.80 g, 25.0 mmol, 1.00 Äq.), (Chlormethyl)methylether (4.55 mL, 56.8 mmol, 1.20 Äq.) und *N*,*N*-Diisopropylethylamin (2.40 mL, 30.0 mmol, 2.00 Äq.) in 38 mL trockenem Dichlormethan. 3-Methoxy-4-(methoxymethoxy)benzaldehyd (**3c**) wurde als farbloser Feststoff (4.89 g, 24.9 mmol, 99 %) erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Publikation von MABIC *et al.* überein.⁴⁹⁸

R _f	0.43 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 1/1 <i>v</i> / <i>v</i>).
Schmelzpunkt	40 °C (Lit. 39 °C). ⁴⁹⁸
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 3.40 (s, 3 H), 3.85 (s, 3 H), 5.30 (s, 2 H), 7.26 (d,
	J = 8.2 Hz, 1 H), 7.45 (d, J = 1.9 Hz, 1 H), 7.52 (dd,
	<i>J</i> = 8.2, 1.9 Hz, 1 H), 9.86 (s, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 55.6, 56.0, 94.4, 110.5, 115.0, 125.3, 130.7, 149.8,
	151.3, 191.5.
HPLC (Methode B, 254 nm)	t_R : 9.09 min, ≥ 99 % Reinheit.

3-Brom-2-hydroxy-5-methyl-benzaldehyd (2d)



Die Synthese erfolgte gemäß einer modifizierten Vorschrift von MCGARRIGLE *et al.*⁴⁹⁹ In einem 100 mL Rundkolben wurde 2-Hydroxy-5-methylbenzaldehyd (5.04 g, 37.0 mmol, 1.00 Äq.) bei 0 °C in 50 mL Essigsäure vorgelegt. Unter Rühren wurde tropfenweise Brom (2.09 mL, 40.7 mmol, 1.10 Äq.) zugegeben. Nach 1 h wurde der Lösung Eiswasser hinzugeben und das gebildete Präzipitat bei reduziertem Druck filtriert. Es wurde mit 100 mL Eiswasser gewaschen und der Rückstand unter vermindertem Druck getrocknet. 3-Brom-2-hydroxy-5-methylbenzaldehyd (**2d**) wurde als gelber Feststoff (6.88 g, 32.0 mmol, 87 %) erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Publikation von MCGARRIGLE *et al.* überein.⁴⁹⁹

R _f	0.64 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 95/5 <i>v</i> / <i>v</i>).
Schmelzpunkt	66 °C (Lit. 64°C). ⁴⁹⁹
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 2.29 (t, J = 0.7 Hz, 3 H), 7.57 (dd, J = 2.3, 0.8 Hz, 1 H),
	7.75 (dd, J = 2.2, 0.7 Hz, 1 H), 10.03 (s, 1 H), 11.01 (s,
	1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 19.4, 110.7, 122.5, 130.6, 131.7, 139.8, 154.5, 195.0.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 14.23 min, 96.1 % Reinheit.

3-Brom-2-(methoxymethoxy)-5-methylbenzaldehyd (3d)



Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 1** unter Verwendung von 3-Brom-2-hydroxy-5methylbenzaldehyd (**2d**) (6.50 g, 30.2 mmol, 1.00 Äq.), (Chlormethyl)methylether (2.90 mL, 36.3 mmol, 1.20 Äq.) und *N*,*N*-Diisopropylethylamin (10.5 mL, 60.5 mmol, 2.00 Äq.) in 45 mL trockenem Dichlormethan. 3-Brom-2-(methoxymethoxy)-5-methylbenzaldehyd (**3d**) wurde als farbloser Feststoff (7.50 g, 28.9 mmol, 96 %) erhalten. Diese Daten wurden bereits publiziert.³¹³

R _f	0.24 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 10/1 <i>v</i> / <i>v</i>).
Schmelzpunkt	47 °C.
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 2.34 (t, J = 0.7 Hz, 3 H), 3.52 (s, 3 H), 5.14 (s, 2 H), 7.56
	(dq, J = 2.2, 0.7 Hz, 1 H), 7.86 (dt, J = 2.3, 0.7 Hz, 1 H),
	10.17 (s, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 19.8, 57.8, 100.8, 117.5, 127.8, 130.6, 136.3, 139.5,
	189.8, 206.5.
HPLC (Methode B, 254 nm)	t _R : 14.45 min, ≥ 99 % Reinheit.
HRMS (ESI) m/z	ber. für C ₁₀ H ₁₂ BrO ₃ : 258.9964, gef. 258.9961.

3,5-Dibrom-2-(methoxymethoxy)-benzaldehyd (3e)



Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 1** unter Verwendung von 3,5-Dibrom-2-hydroxybenzaldehyd (**2e**) (10.0 g, 35.7 mmol, 1.00 Äq.), (Chlormethyl)methylether (3.43 mL, 42.9 mmol, 1.20 Äq.) und *N*,*N*-Diisopropylethylamin (12.4 mL, 71.4 mmol, 2.00 Äq.) und 71 mL trockenem Dichlormethan in einem 250 mL Rundkolben. 3,5-Dichlor-2-(methoxymethoxy)-benzaldehyd (**3e**) wurde als farbloser Feststoff (10.4 g, 32.1 mmol, 90 %) erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Publikation von EL DINE *et al.* überein.⁴⁹⁷

0.56 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 10/1 <i>v</i> / <i>v</i>).
81 °C (Lit. 79 °C). ⁴⁹⁷
δ 3.53 (s, 3 H), 5.19 (s, 2 H), 7.84 (d, J = 2.5 Hz, 1 H),
8.27 (d, <i>J</i> = 2.5 Hz, 1 H), 10.08 (d, <i>J</i> = 17.3 Hz, 1 H).
δ 57.9, 101.0, 117.6, 119.6, 130.3, 132.1, 140.5, 155.7,
188.6.
t _R : 15.44 min, ≥ 99 % Reinheit.
3-Brom-5-chlor-2-(methoxymethoxy)benzaldehyd (3f)



Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 1** unter Verwendung von 3-Brom-5-Chlor-2hydroxybenzaldehyd (**2f**) (6.12 g, 26.0 mmol, 1.00 Äq.), (Chlormethyl)methylether (2.37 mL, 31.2 mmol, 1.20 Äq.) und *N*,*N*-Diisopropylethylamin (9.06 mL, 52.0 mmol, 2.00 Äq.) in 52 mL trockenem Dichlormethan. 5-Brom-3-chlor-2-(methoxymethoxy)benzaldehyd (**3f**) wurde als farbloser Feststoff (6.88 g, 24.6 mmol, 95 %) erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Publikation von EL DINE *et al.* überein.⁴⁹⁷

R _f	0.54 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 10/1 <i>v/v</i>).
Schmelzpunkt	84 °C (Lit. 85 °C). ⁴⁹⁷
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 3.55 (s, 3 H), 5.20 (s, 2 H), 7.74 (d, J = 2.6 Hz, 1 H),
	8.18 (d, <i>J</i> = 2.7 Hz, 1 H), 10.13 (s, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 57.9, 101.1, 119.4, 127.3, 129.9, 131.7, 137.9, 155.3,
	188.7.
HPLC (Methode B, 254 nm)	t _R : 16.00 min, 98.3 % Reinheit.

3,5-Dichlor-2-(methoxymethoxy)-benzaldehyd (3g)



Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 1** unter Verwendung von 3,5-Dichlor-2-hydroxybenzaldehyd (**2g**) (10.0 g, 50.8 mmol, 1.00 Äq.), (Chlormethyl)methylether (4.87 mL, 60.9 mmol, 1.20 Äq.) und *N*,*N*-Diisopropylethylamin (17.7 mL, 102 mmol, 2.00 Äq.) und 102 mL trockenem Dichlormethan in einem 250 mL Rundkolben. 3,5-Dichlor-2-(methoxymethoxy)-benzaldehyd (**3g**) wurde als farbloser Feststoff (10.8 g, 45.9 mmol, 90 %) erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Publikation von EL DINE *et al.* überein.⁴⁹⁷

R _f	0.45 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 10/1 <i>v</i> / <i>v</i>).
Schmelzpunkt	88 °C (Lit. 90 - 92 °C). ⁵⁰⁰
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 3.54 (s, 3 H), 5.22 (s, 2 H), 7.70 (d, J = 2.6 Hz, 1 H),
	8.06 (d, <i>J</i> = 2.7 Hz, 1 H), 10.15 (s, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 57.8, 100.9, 126.7, 129.6, 131.8, 135.1, 135.1, 154.2,
	188.5.
HPLC (Methode B, 254 nm)	t_R : 14.73 min, ≥ 99 % Reinheit.

9.6.1.2. Darstellung der 3-Hydroxy-2-phenyl-4H-chromen-4-one 5a-i

2-(3-Chlor-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-hydroxy-7,8-dimethoxy-4H-chromen-4-on (5a)



[392.79]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 2** unter Verwendung von 3-Chlor-2-(methoxymethoxy)benzaldehyd (**3a**) (10.70 g, 58.7 mmol, 1.00 Äq.), 1-(2-Hydroxy-3,4dimethoxyphenyl)ethan-1-on (11.8 g, 58.7 mmol, 1.00 Äq.), 5 M Natronlauge (11.7 mL, 294 mmol, 5.00 Äq.) und 170 mL Ethanol in einem 1000 mL Rundkolben. Die Reaktion wurde bei 50 °C für 24 h erhitzt. Anschließend wurde auf 0 °C abgekühlt, mit 260 mL Ethanol verdünnt, 30 %ige wässrige H₂O₂-Lösung (16.6 mL, 147 mmol, 2.50 Äq.) hinzugetropft und die Reaktion langsam auf Raumtemperatur erwärmen lassen. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur 16 h lang gerührt. 2-(3-Chlor-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-hydroxy-7,8dimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**5a**) wurde als gelber Feststoff (8.02 g, 34.8 mmol, 35 %) erhalten. Diese Daten wurden bereits publiziert.³¹³

R _f	0.27 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 1/1 <i>v</i> / <i>v</i>).
Schmelzpunkt	167°C.
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 3.13 (s, 3 H), 3.82 (s, 3 H), 3.96 (s, 3 H), 4.97 (s, 2 H),
	7.31 - 7.26 (m, 1 H), 7.34 (d, $J = 7.9$ Hz, 1 H), 7.58 (dd,
	<i>J</i> = 7.8, 1.7 Hz, 1 H), 7.70 (dd, <i>J</i> = 8.0, 1.6 Hz, 1 H), 7.87
	(d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1 H), 9.13 (s, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 56.5, 56.6, 60.8, 99.0, 110.8, 116.8, 120.3, 125.3,
	127.4, 127.4, 130.3, 132.1, 136.0, 138.6, 145.0, 149.3,
	151.0, 155.9, 172.4.
HPLC (Methode B, 254 nm)	t _R : 13.79 min, ≥ 99 % Reinheit.
HRMS (ESI) <i>m/z</i>	ber. für C ₁₉ H ₁₈ ClO ₇ : 393.0736, gef.: 393.0740.

2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-hydroxy-7,8-dimethoxy-4H-chromen-4-on (5b)



Die Synthese erfolgte gemäß der AAV 2 unter Verwendung 3-Brom-2von (methoxymethoxy)benzaldehyd (3b) (10.60 g, 43.3 mmol, 1.00 Äq.), 1-(2-Hydroxy-3,4dimethoxyphenyl)ethan-1-on (7.90 g, 43.3 mmol, 1.00 Äq.), 5 M Natronlauge (43.3 mL, 217 mmol, 5.00 Äq.) und 130 mL Ethanol in einem 500 mL Rundkolben. Die Reaktion wurde bei 50 °C für 24 h erhitzt. Anschließend wurde auf 0 °C abgekühlt, mit 200 mL Ethanol verdünnt, 30 %ige wässrige H₂O₂-Lösung (12.3 mL, 108 mmol, 2.50 Äq.) hinzugetropft und die Reaktion langsam auf Raumtemperatur erwärmen lassen. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur 16 h lang gerührt. 2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-hydroxy-7,8dimethoxy-4H-chromen-4-on (5b) wurde als farbloser Feststoff (4.22 g, 9.65 mmol, 22 %) erhalten. Diese Daten wurden bereits publiziert.³¹³

R _f	0.22 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 1/1 <i>v</i> / <i>v</i>).
Schmelzpunkt	126 °C.
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 3.13 (s, 3 H), 3.83 (s, 3 H), 3.96 (s, 3 H), 4.95 (s, 2 H),
	7.26 (d, J = 7.8 Hz, 1 H), 7.34 – 7.28 (m, 1 H), 7.62 (dd,
	J = 7.7, 1.6 Hz, 1 H), 7.84 (dd, J = 7.8, 1.6 Hz, 1 H), 7.88
	(d, <i>J</i> = 9.2 Hz, 1 H), 9.14 (s, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 56.5, 56.7, 60.8, 99.1, 110.8, 116.8, 117.3, 120.3,
	125.7, 127.3, 131.0, 135.2, 136.0, 138.6, 145.1, 149.3,
	152.1, 155.9, 172.4.
HPLC (Methode B, 254 nm)	t _R : 13.14 min, ≥ 99 % Reinheit.
HRMS (ESI) m/z	ber. für C ₁₉ H ₁₈ BrO ₇ : 437.0230, gef.: 437.0231.

3-Hydroxy-7,8-dimethoxy-2-(3-methoxy-4-(methoxymethoxy)phenyl)-4*H*-chromen-4-on (5c)



[388.12]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 2** unter Verwendung von 3-Methoxy-4-(methoxymethoxy)benzaldehyd (**3c**) (4.80 g, 24.5 mmol, 1.00 Äq.), 2'-Hydroxyacetophenon .(4.90 g, 24.5 mmol, 1.00 Äq.), 5 M Natronlauge (24.5 mL, 122 mmol, 5.00 Äq.) und 75 mL Ethanol in einem 500 mL Rundkolben. Die Reaktion wurde bei 50 °C 24 h lang gerührt. Anschließend wurde auf 0 °C abgekühlt, mit 113 mL Ethanol verdünnt, 30 %ige wässrige H_2O_2 -Lösung (6.93 mL, 61.2 mmol, 2.50 Äq.) hinzugetropft und die Reaktion langsam auf Raumtemperatur erwärmen lassen. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur 16 h lang gerührt. 3-Hydroxy-7,8-dimethoxy-2-(3-methoxy-4-(methoxymethoxy)phenyl)-4*H*-chromen-4-on (**5c**) wurde als farbloser Feststoff (1.69 g, 4.35 mmol, 18 %) erhalten.

R _f	0.35 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 1/2 <i>v</i> / <i>v</i>).
Schmelzpunkt	212 °C.
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆):	δ 3.42 (s, 3 H), 3.86 (s, 3 H), 3.95 (s, 3 H), 3.96 (s, 3 H),
	5.26 (s, 2 H), 7.26 (dd, <i>J</i> = 8.9, 1.3 Hz, 2 H), 7.75 – 7.87
	(m, 3 H), 9.43 (bs, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 55.5, 55.9, 56.5, 61.0, 94.6, 110.6, 111.1, 116.0, 116.2,
	120.2, 120.8, 125.5, 136.0, 137.9, 144.6, 147.2, 148.8,
	149.3, 156.0, 172.4.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 12.92 min, ≥ 99 % Reinheit.

2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)-5-methylphenyl)-3-hydroxy-7,8-dimethoxy-4*H*chromen-4-on (5d)



Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 2** unter Verwendung von 3-Brom-2-(methoxymethoxy)-5-methylbenzaldehyd (**3d**) (7.20 g, 27.8 mmol, 1.00 Äq.), 1-(2-Hydroxy-3,4dimethoxyphenyl)ethan-1-on (5.56 g, 27.8 mmol, 1.00 Äq.), 5 M Natronlauge (27.8 mL, 139 mmol, 5.00 Äq.) und 84 mL Ethanol in einem 500 mL Rundkolben. Die Reaktion wurde bei 50 °C 24 h lang gerührt. Anschließend wurde auf 0 °C abgekühlt, mit 125 mL Ethanol verdünnt und 30 %ige wässrige H_2O_2 -Lösung (7.88 mL, 69.5 mmol, 2.50 Äq.) hinzugetropft und die Reaktion langsam auf Raumtemperatur erwärmen lassen. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur 16 h lang gerührt. 2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)-5-methylphenyl)-3hydroxy-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**5d**) wurde als gelber Feststoff (3.86 g, 8.56 mmol, 31 %) erhalten. Diese Daten wurden bereits publiziert.³¹³

R _f	0.21 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 3/2 <i>v</i> / <i>v</i>).
Schmelzpunkt	183 °C.
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 2.34 (t, J = 0.7 Hz, 3 H), 3.10 (s, 3 H), 3.82 (s, 3 H), 3.96
	(s, 3 H), 4.90 (s, 2 H), 7.29 (d, <i>J</i> = 9.1 Hz, 1 H), 7.40 (dd,
	J = 2.2, 0.8 Hz, 1 H), 7.68 (dd, J = 2.2, 0.8 Hz, 1 H), 7.87
	(d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1 H), 9.09 (s, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 19.8, 56.5, 56.6, 60.9, 99.1, 110.8, 116.8, 116.9, 120.3,
	126.8, 131.2, 135.3, 135.4, 136.0, 138.6, 145.2, 149.3,
	149.8, 155.9, 172.4.
HPLC (Methode B, 254 nm)	t _R : 14.32 min, 96.7 % Reinheit.
HRMS (ESI) m/z	ber. für C ₂₀ H ₂₀ BrO ₇ : 451.0387, gef.: 451.0393.

2-(3-Brom-2-fluorphenyl)-3-hydroxy-7,8-dimethoxy-4H-chromen-4-on (5e)



[393.99]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 2** unter Verwendung von 3-Brom-2-Fluorbenzaldehyd (5.07 g, 25.0 mmol, 1.00 Äq.), 1-(2-Hydroxy-3,4-dimethoxyphenyl)ethan-1-on (5.00 g, 25.0 mmol, 1.00 Äq.), 5 M Natronlauge (25.0 mL, 125 mmol, 5.00 Äq.) und 75 mL Ethanol in einem 500 mL Rundkolben. Die Reaktion wurde bei 50 °C 24 h lang gerührt. Anschließend wurde auf 0 °C abgekühlt, mit 113 mL Ethanol verdünnt, 30 %ige wässrige H₂O₂-Lösung (7.08 mL, 62.4 mmol, 2.50 Äq.) hinzugetropft und die Reaktion langsam auf Raumtemperatur erwärmen lassen. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur 16 h lang gerührt. 2-(3-Brom-2-fluorphenyl)-3-hydroxy-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**5e**) wurde als brauner Feststoff (1.47 g, 3.72 mmol, 15 %) mit einer Reinheit von 79 % erhalten. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung weiterverwendet. Diese Daten wurden bereits publiziert.³¹³

R _f	0.45 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat).
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 3.84 (s, 3 H), 3.96 (s, 3 H), 7.31 (dd, J = 9.2, 2.7 Hz,
	1 H), 7.36 (t, $J = 7.9$ Hz, 1 H), 7.78 (ddd, $J = 7.9$, 6.3,
	1.6 Hz, 1 H), 7.88 (d, J = 9.0 Hz, 1 H), 7.91 (ddd, J = 8.1,
	6.5, 1.6 Hz, 1 H), 9.49 (s, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 56.6, 60.9, 109.1 (d, ${}^{2}J_{C,F}$ = 20.9 Hz), 111.0, 116.8,
	120.6 (d, ${}^{2}J_{C,F}$ = 26.1 Hz), 125.9 (d, ${}^{3}J_{C,F}$ = 4.2 Hz), 130.7
	(d, ${}^{4}J_{C,F}$ = 2.0 Hz), 135.3, 136.1, 139.1, 141.7 (d,
	⁴ J _{C,F} = 1.6 Hz), 145.2, 149.4, 156.1, 157.0, 172.4.
¹⁹ F-NMR (282 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ -104.85 .
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 13.14 min, 79.0 % Reinheit.
HRMS (ESI) <i>m/z</i>	ber. für C ₁₇ H ₁₃ BrFO ₇ : 394.9925, gef.: 394.9927.

2'-Hydroxy-4'-methoxyacetophenon (4a)



Die Synthese erfolgte gemäß einer modifizierten Vorschrift von PROENCA *et al.*⁵⁰¹ In einem 100 mL Rundkolben wurde 2',4'-Dihydroxyacetophenon (4.58 g, 30.1 mmol, 1.00 Äq.) in 50 mL Aceton gelöst, mit wasserfreiem Kaliumcarbonat (4.16 g, 30.1 mmol, 1.00 Äq.) versetzt und Dimethylsulfat (2.85 mL 30.1 mmol, 1.00 Äq.) über 15 min tropfenweise zugegeben. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur 16 h lang gerührt, das Kaliumcarbonat abfiltriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in 50 mL Dichlormethan aufgenommen und mit 1 M Salzsäure (3 x 50 mL) sowie gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung (1 x 50 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (*n*-Hexan/Ethylacetat 3/1 *v/v*) gereinigt und 2'-Hydroxy-4'- methoxyacetophenon (**4a**) als farbloser Feststoff (4.77 g, 28.7 mmol, 95 %) erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Publikation von CHEN *et al.* überein.⁵⁰²

R _f	0.48 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 3/2 <i>v</i> / <i>v</i>).
Schmelzpunkt	47 °C (Lit. 47-48 °C). ⁵⁰²
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 2.55 (s, 3 H), 3.81 (s, 3 H), 6.46 (d, J = 2.5 Hz, 1 H),
	6.52 (dd, <i>J</i> = 8.9, 2.5 Hz, 1 H), 7.83 (d, <i>J</i> = 8.9 Hz, 1 H),
	12.64 (s, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 27.0, 56.1, 101.2, 107.7, 114.2, 133.7, 164.6, 166.2,
	203.6.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t_R : 11.45 min, ≥ 99 % Reinheit.

2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-hydroxy-7-methoxy-4H-chromen-4-on (5g)



[406.01]

Die Synthese erfolgte gemäß AAV 2 unter Verwendung Brom-2der von (methoxymethoxy)benzaldehyd (**3b**) (4.97 g, 20.3 mmol, 1.00 Äq.), 2'-Hydroxy-4'methoxyacetophenon (4a) (3.37 g, 20.3 mmol, 1.00 Äq.), 5 M Natronlauge (4.06 mL, 101 mmol, 5.00 Äq.) und 60 mL Ethanol in einem 250 mL Rundkolben. Die Reaktion wurde bei 50 °C 24 h lang gerührt. Anschließend wurde auf mittels Eisbad auf 0 °C abgekühlt, mit 90 mL Ethanol verdünnt, 30 % ige wässrige H₂O₂-Lösung (5.75 mL, 50.7 mmol, 2.50 Äg.) hinzugetropft und die Reaktion langsam auf Raumtemperatur erwärmen lassen. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur 16 h lang gerührt. 2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3hydroxy-7-methoxy-4H-chromen-4-on (5g) wurde als farbloser Feststoff (1.61 g, 3.95 mmol, 20 %) gewonnen

R _f	0.45 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 2/1 <i>v</i> / <i>v</i>).
Schmelzpunkt	153 °C.
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃)	δ 3.23 (s, 3 H), 3.90 (s, 3 H), 5.02 (s, 2 H), 6.92 (d,
	J = 2.3 Hz, 1 H), 7.01 (dd, J = 9.0, 2.4 Hz, 1 H), 7.16 (t,
	J = 7.9 Hz, 1 H), 7.59 (dd, J = 7.7, 1.6 Hz, 1 H), 7.73 (dd,
	<i>J</i> = 8.0, 1.6 Hz, 1 H), 8.16 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃)	δ 56.0, 57.7, 100.0, 100.1, 115.1, 115.4, 118.5, 125.6,
	126.9, 127.0, 130.6, 135.8, 138.6, 144.1, 152.9, 158.0,
	164.5, 172.7.
HPLC (Methode B, 254 nm)	t _R : 14.33 min, 95.2 % Reinheit.

1-(2-Hydroxy-4-methoxy-3-methylphenyl)ethan-1-on (4b)



The Synthese erfolgte gemäß einer Vorschrift von HECKRODT *et al.*⁵⁰³ In einem 100 mL wurde 1-(2,4-Dihydroxy-3-methylphenyl)ethan-1-on (5.00 g, 30.1 mmol, 1.00 Äq.) in 50 mL Aceton gelöst und wasserfreies Kaliumcarbonat (4.16 g, 30.1 mmol, 1.00 Äq.) hinzugegeben. Anschließend wurde Dimethylsulfat (2.85 mL, 30.1 mmol, 1.00 Äq.) über 15 min tropfenweise zugegeben und bei Raumtemperatur 16 h lang gerührt. Kaliumcarbonat wurde abfiltriert, das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 50 mL Wasser aufgenommen. Mit 1 M Salzsäure wurde auf einen pH-Wert von 6 eingestellt und die wässrige Phase mit Dichlormethan extrahiert (3 x 50mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (*n*-Hexan/Ethylacetat 3/1 v/v) gereinigt und 1-(2-Hydroxy-4-methoxy-3-methylphenyl)ethan-1-on (**4b**) als farbloser Feststoff (5.35 g, 29.7 mmol, 99 %) erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Publikation von HECKRODT *et al.* überein.

R _f	0.56 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 3/2 <i>v</i> / <i>v</i>).		
Schmelzpunkt	83 °C (Lit. 82 - 84 °C). ⁵⁰⁴		
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 1.99 (s, 3 H), 2.59 (s, 3 H), 3.89 (s, 3 H), 6.66 (d,		
	J = 9.0 Hz, 1 H), 7.83 (dd, J = 9.0, 0.7 Hz, 1 H), 12.83 (s,		
	1 H).		
¹³ C-NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 7.4, 26.3, 55.9, 102.5, 111.6, 113.6, 131.0, 160.8,		
	163.1, 203.9.		
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 14.27 min, ≥ 99 % Reinheit.		

2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-hydroxy-7-methoxy-8-methyl-4*H*-chromen-4on (5h)



[420.02]

Die Synthese erfolgte gemäß der AAV2 unter Verwendung Brom-2von (methoxymethoxy)benzaldehyd (3b) (5.85 g, 23.9 mmol, 1.00 Äq.), 1-(2-Hydroxy-4-methoxy-3-methylphenyl)ethan-1-on (4b) (4.30 g, 23.9 mmol, 1.00 Äq.), 5 м Natronlauge (23.9 mL, 294 mmol, 5.00 Äq.) und 72 mL Ethanol in einem 500 mL Rundkolben. Die Reaktion wurde bei 50 °C 24 h lang gerührt. Anschließend wurde der Ansatz mittels Eisbad auf 0 °C abgekühlt und mit 108 mL Ethanol verdünnt. Zum Ansatz wurde 30 %ige wässrige H₂O₂-Lösung (6.76 mL, 59.7 mmol, 2.50 Äq.) hinzugetropft und die Reaktion langsam auf Raumtemperatur erwärmen lassen. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur 16 h lang gerührt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (*n*-Hexan/Ethylacetat) konnte 2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-hydroxy-7-methoxy-8-methyl-4H-chromen-4-on (5h) nicht sauber isoliert werden und wurde ohne weitere Reinigung für die nächste Reaktion verwendet.

2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-hydroxy-4H-chromen-4-on (5i)



Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 2** unter Verwendung von 3-Brom-2-(methoxymethoxy)benzaldehyd (**3b**) (3.68 g, 15.0 mmol, 1.00 Äq.), 2'-Hydroxyacetophenon (2.04 g, 15.0 mmol, 1.00 Äq.), 5 M Natronlauge (3.0 mL, 75.0 mmol, 5.00 Äq.) und 45 mL Ethanol in einem 250 mL Rundkolben. Die Reaktion wurde bei 50 °C 24 h lang gerührt. Anschließend wurde der Ansatz mittels Eisbad auf 0 °C gekühlt, mit 68 mL Ethanol verdünnt, 30 %ige wässrige H₂O₂-Lösung (4.25 mL, 37.5 mmol, 2.50 Äq.) zugetropft und die Reaktion langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur 16 h lang gerührt. 2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-hydroxy-4*H*-chromen-4-on (**5i**) wurde als brauner Feststoff (1.28 g, 3.39 mmol, 23 %) erhalten.

R _f	0.28 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 4/1 <i>v</i> / <i>v</i>).
Schmelzpunkt	149 °C.
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 3.10 (s, 3 H), 4.94 (s, 2 H), 7.26 (t, J = 7.8 Hz, 1 H),
	7.41 - 7.54 (m, 2 H), 7.62 (dd, $J = 7.7$, 1.6 Hz, 1 H),
	$7.65 - 7.69 \ (m, 2 \ H), \ 7.75 - 7.81 \ (m, 1 \ H), \ 7.81 - 7.89 \ (m,$
	1 H), 8.15 (dd, <i>J</i> = 8.0, 1.5 Hz, 1 H), 9.26 (s, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 56.7, 99.2, 117.3, 118.4, 121.9, 124.7, 125.0, 125.7,
	127.2, 131.0, 133.8, 135.2, 139.3, 145.6, 152.1, 155.0,
	172.8.
HPLC (Methode C, 254 nm)	t _R : 16.00 min, 95.2 % Reinheit.

9.6.1.3. Darstellung der 3-Alkoxy-2-phenyl-4H-chromen-4-one 6a-r

2-(3-Chlor-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3,7,8-trimethoxy-4H-chromen-4-on (6a)



[406.08]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 3** unter Verwendung von 2-(3-Chlor-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-hydroxy-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**5a**) (1.96 g, 5.00 mmol, 1.00 Äq.), Cäsiumcarbonat (3.67 g, 11.3 mmol, 2.25 Äq.), lodmethan (467 μ L, 11.3 mmol, 1.50 Äq.) und 38 mL trockenem *N*,*N*-Dimethylformamid in einem 100 mL Rundkolben. 2-(3-Chlor-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-methoxy-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**6a**) wurde als gelbes Öl (1.61 g, 3.96 mmol, 79 %) erhalten. Diese Daten wurden bereits publiziert.³¹³

Anal	vtisc	he D	aten
/ 11/01	<i>y 1</i> 1001		aton

R _f	0.23 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 2/1 <i>v</i> / <i>v</i>).
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 3.10 (s, 3 H), 3.74 (s, 3 H), 3.81 (s, 3 H), 3.96 (s, 3 H),
	5.01 (s, 2 H), $7.25 - 7.41$ (m, 2 H), 7.59 (dd, $J = 7.7$,
	1.7 Hz, 1 H), 7.74 (dd, $J = 8.0$, 1.6 Hz, 1 H), 7.86 (d,
	<i>J</i> = 9.1 Hz, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	$\delta56.5,56.6,59.6,60.9,99.3,111.0,118.5,120.4,125.6,$
	$127.3,\ 127.4,\ 129.9,\ 132.6,\ 136.1,\ 140.5,\ 149.3,\ 151.1,$
	154.0, 156.3, 173.1.
HPLC (Methode C, 254 nm)	t _R : 16.04 min, 97.5 % Reinheit.
HRMS (ESI) m/z	ber. für C ₂₀ H ₂₀ ClO ₇ : 407.0892, gef.: 407.0891.

2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3,7,8-trimethoxy-4H-chromen-4-on (6b)



[450.03]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 3** unter Verwendung von 2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-hydroxy-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**5b**) (3.17 g, 6.52 mmol, 1.00 Äq.), Cäsiumcarbonat (4.78 g, 14.7 mmol, 2.25 Äq.), lodmethan (609 μ L, 9.78 mmol, 1.50 Äq.) und 87 mL trockenem *N*,*N*-Dimethylformamid in einem 250 mL Rundkolben. 2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-methoxy-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**6b**) wurde als gelbes Öl (1.65 g, 3.66 mmol, 85 %) erhalten. Diese Daten wurden bereits publiziert.³¹³

R _f	0.21 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 3/2 <i>v</i> / <i>v</i>).
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 3.09 (s, 3 H), 3.74 (s, 3 H), 3.81 (s, 3 H), 3.96 (s, 3 H),
	4.99 (s, 2 H), $7.23 - 7.35$ (m, 2 H), 7.62 (dd, $J = 7.7$,
	1.6 Hz, 1 H), 7.81 – 7.94 (m, 2 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 56.5, 56.7, 59.5, 60.9, 99.5, 111.0, 117.3, 118.6, 120.4,
	$126.0,\ 127.2,\ 130.6,\ 135.7,\ 136.1,\ 140.5,\ 149.3,\ 152.2,$
	154.1, 156.3, 173.1.
HPLC (Methode B, 254 nm)	t _R : 15.48 min, 95.7 % Reinheit.
HRMS (ESI) m/z	ber. für C ₂₀ H ₂₀ BrO ₇ : 451.0387, gef.: 451.0393.

3,7,8-Trimethoxy-2-(3-methoxy-4-(methoxymethoxy)phenyl)-4*H*-chromen-4-on (6c)



C₂₁H₂₂O₈ [402.13]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 3** unter Verwendung von 3-Hydroxy-7,8-dimethoxy-2-(3-methoxy-4-(methoxymethoxy)phenyl)-4*H*-chromen-4-on (**5c**) (1.60 g, 4.12 mmol, 1.00 Äq.), Cäsiumcarbonat (3.02 g, 9.27 mmol, 2.25 Äq.), lodmethan (385 μ L, 6.18 mmol, 1.50 Äq.) und 50 mL trockenem *N*,*N*-Dimethylformamid in einem 250 mL Rundkolben. 3,7,8-Trimethoxy-2-(3-methoxy-4-(methoxymethoxy)phenyl)-4*H*-chromen-4-on (**6c**) wurde als farbloser Feststoff (1.61 g, 3.98 mmol, 97 %) erhalten.

Analytische Daten	
R _f	0.20 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 2/1 <i>v</i> / <i>v</i>).
Schmelzpunkt	126 °C.
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 3.43 (s, 3 H), 3.83 (s, 3 H), 3.89 (s, 3 H), 3.94 (s, 3 H),
	3.97 (s, 3 H), 5.30 (s, 2 H), $7.25 - 7.34$ (m, 2 H),
	7.63 – 7.75 (m, 2 H), 7.82 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 55.5, 55.9, 56.5, 59.6, 61.1, 94.5, 110.8, 111.7, 115.9,
	118.2, 120.3, 121.4, 124.3, 136.1, 139.8, 148.0, 148.9,
	149.3, 154.1, 156.2, 173.4.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 12.84 min, 97.9 % Reinheit.

2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)-5-methylphenyl)-3-ethoxy-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-on (6d)



[464.05]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 3** unter Verwendung von 2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)-5-methylphenyl)-3-hydroxy-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**5d**) (3.75 g, 8.31 mmol, 1.00 Äq.), Cäsiumcarbonat (6.09 g, 18.7 mmol, 2.25 Äq.), Iodmethan (776 μ L, 12.5 mmol, 1.50 Äq.) und 83 mL trockenem *N*,*N*-Dimethylformamid in einem 250 mL Rundkolben. 2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)-5-methylphenyl)-3-ethoxy-7,8-dimethoxy-4*H*chromen-4-on (**6d**) wurde als gelb-braunes Öl (3.98 g, 8.13 mmol, 95 %) erhalten. Diese Daten wurden bereits publiziert.³¹³

R _f	0.24 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 3/2 <i>v</i> / <i>v</i>).
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	$\delta2.36$ (s, 3 H), 3.07 (s, 3 H), 3.74 (s, 3 H), 3.82 (s, 3 H),
	3.97 (s, 3 H), 4.96 (s, 2 H), 7.32 (d, $J = 9.2$ Hz, 1 H),
	7.45 – 7.38 (m, 1 H), 7.72 (dd, <i>J</i> = 2.2, 0.9 Hz, 1 H), 7.86
	(d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 19.8, 56.5, 56.7, 59.5, 60.9, 99.4, 111.0, 116.9, 118.6,
	$120.4,\ 126.8,\ 130.8,\ 135.7,\ 135.8,\ 136.1,\ 140.5,\ 149.3,$
	149.9, 154.3, 156.3, 173.1.
HPLC (Methode B, 254 nm)	t _R : 15.29 min, 97.2 % Reinheit.
HRMS (ESI) m/z	ber. für C ₂₁ H ₂₂ BrO ₇ : 465.0543, gef.: 465.0544.

2-(3-Brom-2-fluorphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4H-chromen-4-on (6e)



C₁₈H₁₄BrFO₅ [408.00]

Die Synthese erfolgte gemäß einer modifizierten Vorschrift von IINUMA et al. 321 In einem 100 mL Rundkolben wurde 2-(3-Brom-2-fluorphenyl)-3-hydroxy-7,8-dimethoxy-4H-chromen-4-on (5e) (1.59 g, 4.35 mmol, 1.00 Äq., 79 % Reinheit) in 50 mL trockenem Aceton gelöst und wasserfreies Kaliumcarbonat (602 mg, 4.35 mmol, 1.35 Äq.) unter Rühren zugegeben. Anschließend wurde Dimethylsulfat (0.412 mL, 4.35 mmol, 1.35 Äq.) über 10 Minuten tropfenweise zugegeben und bei Raumtemperatur 16 h lang gerührt. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 50 mL entmineralisiertem Wasser gelöst. Mit 2 M Salzsäure wurde unter Rühren auf einen pH-Wert von 6 eingestellt. Danach wurde die wässrige Phase mit Dichlormethan (4 x 50 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel Druck Rohprodukt unter vermindertem entfernt. Das wurde mittels Flash-Säulenchromatographie (*n*-Hexan/Ethylacetat $10/1 \rightarrow 10/2 \rightarrow 10/3 v/v$) gereinigt und 2-(3-Brom-2-fluorphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4H-chromen-4-on (6e) als farbloser Feststoff (620 mg, 1.52 mmol, 47 %) erhalten. Diese Daten wurden bereits publiziert.³¹³

R _f	0.16 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 7/3 <i>v</i> / <i>v</i>).
Schmelzpunkt	183 °C.
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 3.80 – 3.77 (m, 3 H), 3.83 (s, 3 H), 3.97 (s, 3 H), 7.34
	(d, J = 9.1 Hz, 1 H), 7.40 (td, J = 7.9, 0.9 Hz, 1 H), 7.78
	(ddd, <i>J</i> = 7.9, 6.4, 1.7 Hz, 1 H), 7.87 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1 H),
	7.97 (ddd, <i>J</i> = 8.2, 6.7, 1.6 Hz, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 56.6, 60.1, 61.0, 109.0 (d, $^{2}J_{C,F}$ = 21.0 Hz), 111.2, 118.5,
	120.1 (d, ${}^{2}J_{C,F}$ = 15.4 Hz), 120.4, 126.2 (d, ${}^{3}J_{C,F}$ = 4.4 Hz),
	130.7 (d, ${}^{4}J_{C,F}$ = 1.7 Hz), 136.1 (d, ${}^{3}J_{C,F}$ = 13.3 Hz), 141.0,
	149.4, 150.4 (d, ${}^{4}J_{C,F} = 1.0 \text{ Hz}$), 155.4 (d,
	¹ J _{C,F} = 250.9 Hz), 156.4, 173.1.
¹⁹ F-NMR (282 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ -106.22.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 14.99 min, ≥ 99 % Reinheit.
HRMS (ESI) m/z	ber. für C ₁₈ H ₁₅ BrFO ₅ : 409.0081, gef.: 409.0085.

2-(3-Chlor-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-ethoxy-7,8-dimethoxy-4H-chromen-4-on (6g)



[420.10]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 3** unter Verwendung von 2-(3-Chlor-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-hydroxy-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**5a**) (1.48 g, 3.77 mmol, 1.00 Äq.), Cäsiumcarbonat (2.76 g, 8.48 mmol, 2.25 Äq.), Iodethan (460 μ L, 5.65 mmol, 1.50 Äq.) und 38 mL trockenem *N*,*N*-Dimethylformamid in einem 100 mL Rundkolben. 2-(3-Chlor-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-ethoxy-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**6g**) wurde als gelbes Öl (1.11 g, 2.63 mmol, 70 %) erhalten.

R _f	0.33 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 2/1 <i>v</i> / <i>v</i>).
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 1.09 – 1.03 (m, 3 H), 3.10 (s, 3 H), 3.82 (s, 3 H), 3.96
	(s, 3 H), $4.05 - 4.01$ (m, 2 H), 5.01 (s, 2 H), $7.40 - 7.24$
	(m, 2 H), 7.59 (dt, J = 7.7, 1.2 Hz, 1 H), 7.76 – 7.69 (m,
	1 H), 7.93 – 7.82 (m, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 15.3, 56.5, 56.6, 60.9, 67.7, 99.3, 111.0, 118.6, 120.4,
	125.4, 127.35, 127.40, 130.0, 132.5, 136.1, 139.8, 149.3,
	151.1, 154.1, 156.2, 173.4.
HPLC (Methode B, 254 nm)	t _R : 13.02 min, 93.9 % Reinheit.

2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-ethoxy-7,8-dimethoxy-4H-chromen-4-on (6h)



[464.05]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 3** unter Verwendung von 2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-hydroxy-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**5b**) (2.00 g, 3.82 mmol, 1.00 Äq.), Cäsiumcarbonat (2.80 g, 8.59 mmol, 2.25 Äq.), Iodethan (627 μ L, 7.64 mmol, 2.00 Äq.) und 38 mL trockenem *N*,*N*-Dimethylformamid in einem 100 mL Rundkolben. 2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-ethoxy-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4on (**6h**) wurde als gelbes Öl (1.37 g, 2.95 mmol, 77 %) erhalten.

R _f	0.23 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 1/1 <i>v</i> / <i>v</i>).
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 1.06 (t, J = 7.0 Hz, 3 H), 3.09 (s, 3 H), 3.82 (s, 3 H), 3.96
	(s, 3 H), 4.99 (s, 2 H), $7.33-7.25$ (m, 2 H), 7.62 (dd,
	<i>J</i> = 7.7, 1.6 Hz, 1 H), 7.93 – 7.80 (m, 2 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 22.3, 56.6, 59.6, 60.9, 74.3, 99.2, 111.0, 118.5, 120.4,
	125.6, 127.4, 131.1, 135.6, 136.1, 138.7, 143.9, 149.2,
	152.1, 154.4, 156.2, 173.7.
HPLC (Methode B, 254 nm)	t _R : 14.97 min, 93.5 % Reinheit.

2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-isopropoxy-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-on (6i)



Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 3** unter Verwendung von 2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-hydroxy-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**5b**) (1.83 g, 3.83 mmol, 1.00 Äq.), Cäsiumcarbonat (3.74 g, 11.5 mmol, 3.00 Äq.), 2-Brompropan (1.08 mL, 11.5 mmol, 3.00 Äq.) und 39 mL trockenem *N*,*N*-Dimethylformamid in einem 100 mL Rundkolben Die Reaktion wurde bei 50 °C 16 h lang gerührt. 2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-ispropoxy-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**6**i) wurde als gelbes Öl (997 mg, 2.08 mmol, 54 %) erhalten.

R _f	0.40 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 1/1 <i>v</i> / <i>v</i>).
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 1.00 (d, J = 6.2 Hz, 6 H), 3.12 (s, 3 H), 3.83 (s, 3 H),
	3.97 (s, 3 H), 4.42 (p, J = 6.2 Hz, 1 H), 5.01 (s, 2 H), 7.28
	(t, J = 7.9 Hz, 1 H), 7.32 (d, J = 9.1 Hz, 1 H), 7.65 (dd,
	J = 7.7, 1.6 Hz, 1 H), 7.86 (d, J = 9.1 Hz, 1 H), 7.88 (dd,
	<i>J</i> = 7.6, 1.6 Hz, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 15.3, 56.5, 56.7, 60.9, 67.7, 99.4, 111.0, 117.2, 118.5,
	120.4, 125.8, 127.3, 130.7, 135.6, 136.1, 139.7, 149.3,
	152.1, 154.2, 156.2, 173.3.
HPLC (Methode B, 254 nm)	t _R : 15.88 min, 94.2 % Reinheit.

2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-(2-hydroxyethoxy)-7,8-dimethoxy-4*H*chromen-4-on (6j)



Die Synthese erfolgte gemäß einer modifizierten Vorschrift von ZHONG et al. 335 2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-hydroxy-7,8-dimethoxy-4H-chromen-4-on (1.45 g, (**5b**) 3.32 mmol, 1.00 Äq.) wurde im 100 mL Rundkolben 25 mL trockenem in N,N-Dimethylformamid vorgelegt, mit 2-Bromethanol (259 µL, 3.65 mmol, 1.10 Äq.) und Kaliumcarbonat (1.15 g, 8.29 mmol, 2.50 Äg.) versetzt und bei Raumtemperatur 21 h lang gerührt. Anschließend wurde mit 10 %iger Salzsäure auf einen pH-Wert von 7 neutralisiert. Die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat (3 x 50 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit Wasser (1 x 50 mL) sowie gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung (1 x 50 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte säulenchromatographisch (n-Hexan/Ethylacetat 1/1 v/v) und 2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-(2-hydroxyethoxy)-7,8-dimethoxy-4H-chromen-4-on (6j) wurde in Form eines braunes Öls (865 mg, 1.80 mmol, 54 %) erhalten.

R _f	0.31 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 1/1 <i>v</i> / <i>v</i>).
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 3.09 (s, 3 H), 3.46 (q, J = 5.4 Hz, 2 H), 3.82 (s, 3 H),
	3.96 (s, 3 H), 4.02 (t, <i>J</i> = 6.6 Hz, 2 H), 4.62 (t, <i>J</i> = 5.5 Hz,
	1 H), 4.99 (s, 2 H), 7.36 – 7.22 (m, 2 H), 7.65 (dd, <i>J</i> = 7.7,
	1.6 Hz, 1 H), 7.86 (d, J = 9.0 Hz, 1 H), 7.88 (dd, J = 8.0,
	1.6 Hz, 1 H).
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 12.21 min, 94.5 % Reinheit.

2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-(2-(dimethylamino)ethoxy)-7,8-dimethoxy-4*H*chromen-4-on (6k)



[507.09]

Die Synthese erfolgte einer modifizierten Vorschrift von XIONG et al.³³⁶ 2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-hydroxy-7,8-dimethoxy-4H-chromen-4-on (**5b**) (1.00 g, 2.29 mmol, 1.00 Äq.) wurde im 250 mL Rundkolben in 60 mL trockenem Tetrahydrofuran vorgelegt, mit 2-(Dimethylamino)-ethanol (256 µL, 2.52 mmol, 1.10 Äq.) und Triphenylphosphan (720 mg, 2.74 mmol, 1.20 Äq.) versetzt und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde Diisopropylazodicarboxylat (575 µL, 2.74 mmol, 1.10 Äq.) tropfenweise zugegeben, langsam auf Raumtemperatur erwärmt und bei dieser Temperatur 16 h lang gerührt. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 100 mL Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wurde mit gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung (4 x 100 mL) gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte mittels Flash-Säulenchromatographie (Dichlormethan Dichlormethan/Methanol 10/1 v/v). 2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-(2-(dimethylamino)ethoxy)-7,8-dimethoxy-4H-chromen-4-on (6k) wurde mit 87.5 % Reinheit als braunes Öl erhalten (910 mg, 1.79 mmol, 78 %) und ohne weitere Reinigung für die nächste Reaktion verwendet.

R _f	0.22 (Dichlormethan/Methanol 10/1 v/v).
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 2.09 (s, 6 H), 2.45 (t, J = 5.7 Hz, 2 H), 3.09 (s, 3 H), 3.82
	(s, 3 H), 3.96 (s, 3 H), 4.07 (t, <i>J</i> = 5.8 Hz, 2 H), 4.99 (s,
	2 H), 7.36 – 7.23 (m, 2 H), 7.64 (dd, <i>J</i> = 7.7, 1.6 Hz, 1 H),
	7.96 – 7.81 (m, 2 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 56.6, 56.7, 58.0, 60.9, 69.5, 99.5, 111.1, 117.3, 118.5,
	120.4, 125.9, 127.3, 130.8, 135.7, 136.1, 139.8, 149.3,
	152.2, 154.2, 156.3, 173.3.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 10.07 min, 87.5 % Reinheit.

3-(Benzyloxy)-2-(3-chlor-2-(methoxymethoxy)phenyl)-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-on (6l)



Die Synthese erfolgte gemäß einer Vorschrift von DZIUBA et al. 337 In einem zylindrischen 100 mL SCHLENK-Rohr 2-(3-Chlor-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-hydroxy-7,8wurde dimethoxy-4H-chromen-4-on (5a) (3.12 g, 7.00 mmol), 1.00 Äg.) in 30 mL Toluol gelöst. Anschließend wurde Benzylbromid (2.12 mL, 17.5 mmol, 2.50 Äq.), [18]-Krone-6 (187 mg, 0.70 mmol, 0.10 Äg.) und 25 %ige wässrige Kaliumhydroxid-Lösung (7.00 mL, 5.50 Äg.) zugegeben. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur 5 h lang stark gerührt. Die organische Phase wurde separiert und die wässrige Phase mit Dichlormethan (2 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung (1 x 30 mL) gewaschen, mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel vermindertem Druck entfernt. Rohprodukt wurde mittels unter Das Flash-Säulenchromatographie (*n*-Hexan/Ethylacetat $10/1 \rightarrow 10/2 \rightarrow 10/3 v/v$) gereinigt und 3-(Benzyloxy)-2-(3-chlor-2-(methoxymethoxy)phenyl)-7,8-dimethoxy-4H-chromen-4-on (6I) als gelbes Öl (3.41 g, 5.89 mmol, 84 %) erhalten

R _f	0.31 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 2/1 <i>v</i> / <i>v</i>).
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 3.10 (s, 3 H), 3.82 (s, 3 H), 3.97 (s, 3 H), 4.96 (s, 2 H),
	5.05 (s, 2 H), 7.12 – 7.17 (m, 2 H), 7.26 (tt, J = 3.5,
	2.9 Hz, 3 H), 7.32 (d, J = 5.5 Hz, 1 H), 7.35 (d, J = 6.8 Hz,
	1 H), 7.48 (dd, J = 7.7, 1.7 Hz, 1 H), 7.73 (dd, J = 8.0,
	1.6 Hz, 1 H), 7.90 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 20.7, 56.5, 56.6, 60.9, 73.2, 99.2, 111.1, 118.5, 120.4,
	125.4, 127.2, 127.3, 127.9, 128.0, 128.1, 130.0, 132.6,
	136.1, 136.9, 139.5, 149.3, 151.1, 154.4, 156.3, 173.3.
HPLC (Methode B, 254 nm)	t _R : 16.75 min, 96.3 % Reinheit.

2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-(difluormethoxy)-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-on (6m)



Die Synthese erfolgte gemäß einer Vorschrift von LI et al.332 In einem zylindrischen 20 mL SCHLENK-Rohr wurde 2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-hydroxy-7,8-dimethoxy-4Hchromen-4-on (5b) (656 mg, 1.44 mmol, 1.00 Äq.) bei 0 °C in 6 mL trockenem Dichlormethan gelöst. Dieser Lösung wurde 20 %ige wässrige Kaliumhydroxid-Lösung (2.40 mL, 8.61 mmol, 6.00 Äq.) unter starkem Rühren zugegeben. (Bromdifluormethyl)trimethylsilan (569 mL, 3.59 mmol, 2.50 Äq.) wurde in drei Portionen nach 0, 30 and 60 min bei 0 °C zugegeben und anschließend bei Raumtemperatur 16 h lang stark gerührt. Der Ansatz wurde mit 5 mL entmineralisiertem Wasser verdünnt und die wässrige Phase mit Dichlormethan (2 x 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel bei vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Säulenchromatographie (n-Hexan/Ethylacetat $10/1 \rightarrow 10/2 \rightarrow 10/3 v/v$) und durch n-Hexan/Ethylacetat Umkristallisation aus isoliert. 2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-(difluormethoxy)-7.8-dimethoxy-4H-chromen-4-on (6m) wurde als farbloser Feststoff (408 mg, 0.84 mmol, 58 %) erhalten.

0.44 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 2/1 <i>v</i> / <i>v</i>).
126 °C.
δ 3.07 (s, 3 H), 3.83 (s, 3 H), 3.98 (s, 3 H), 4.98 (s, 2 H),
7.04 (t, ${}^{1}J_{C,F}$ = 73.8 Hz, 1 H), 7.32 (t, J = 7.9 Hz, 1 H),
7.39 (d, <i>J</i> = 9.1 Hz, 1 H), 7.64 (dd, <i>J</i> = 7.7, 1.6 Hz, 1 H),
7.90 (d, <i>J</i> = 9.2 Hz), 7.93 (dd, <i>J</i> = 7.9, 1.6 Hz, 1 H).
δ 56.6, 56.6, 60.9, 99.5, 111.7, 116.5 (t, $^{1}\!J_{\rm C,F}$ = 253.3 Hz),
117.3, 117.9, 120.4, 125.8, 125.9, 130.6, 133.8, (t,
${}^{3}J_{\rm C,F}$ = 4.1 Hz), 136.2, 136.3, 149.3, 152.2, 155.6, 156.8,
171.5.
t _R : 15.36 min, 95.8 % Reinheit.

2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3,7-dimethoxy-4H-chromen-4-on (6p)



[420.02]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 3** unter Verwendung von 2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-hydroxy-7-methoxy-4*H*-chromen-4-on (**5g**) (1.05 g, 2.29 mmol, 1.00 Äq.), Cäsiumcarbonat (1.68 g, 5.16 mmol, 2.25 Äq.), Iodmethan (214 μ L, 3.44 mmol, 1.50 Äq.) und 23 mL trockenem *N*,*N*-Dimethylformamid in einem 250 mL Rundkolben. 2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3,7-dimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**6p**) wurde als gelber Feststoff (924 mg, 2.19 mmol, 11 % über 2 Schritte) erhalten.

R _f	0.24 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 4/1 <i>v</i> / <i>v</i>).
Schmelzpunkt	76 °C.
¹ H-NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 3.12 (s, 3 H), 3.75 (s, 3 H), 3.89 (s, 3 H), 4.99 (s, 2 H),
	7.09 (dd, <i>J</i> = 8.9, 2.4 Hz, 1 H), 7.19 (d, <i>J</i> = 2.4 Hz, 1 H),
	7.28 (t, J = 7.8 Hz, 1 H), 7.60 (dd, J = 7.6, 1.6 Hz, 1 H),
	7.87 (dd, <i>J</i> = 8.0, 1.6 Hz, 1 H), 8.03 (d, <i>J</i> = 8.9 Hz, 1 H).
¹³ C-NMR (126 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 56.0, 56.7, 59.5, 99.3, 100.4, 114.7, 117.1, 117.6,
	125.7, 126.3, 127.1, 130.5, 135.5, 140.8, 152.0, 153.9,
	156.8, 163.8, 172.8.
HPLC (Methode B, 254 nm)	t _R : 15.01 min, ≥ 99 % Reinheit.

2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3,7-dimethoxy-8-methyl-4H-chromen-4-on (6q)



 $C_{20}H_{19}BrO_6$

[434.04]

Die Synthese erfolgte gemäß der AAV 3 mit geringfügigen Modifikationen. In einem 100 mL Rundkolben wurde 2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-hydroxy-7-methoxy-8-methyl-2.32 mmol, 1.00 Äq.) 4*H*-chromen-4-on (**5h**) (1.22 g, in 30 mL trockenem N,N-Dimethylformamid gelöst und Cäsiumcarbonat (1.70 g, 5.21 mmol, 2.25 Äq.) unter Rühren zugegeben. Anschließend wurde lodmethan (216 µL, 3.48 mmol, 1.50 Äg.) tropfenweise zugegeben und die Reaktion bei Raumtemperatur 16 h lang gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit 30 mL entmineralisiertem Eiswasser verdünnt und die wässrige Phase mit Ethylacetat (3 x 70 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung (1 x 70 mL) gewaschen, mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach Reining mittels Flash-Säulenchromatographie (*n*-Hexan/Ethylacetat $10/1 \rightarrow 10/2 \rightarrow 10/3 v/v$) 2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3,7-dimethoxy-8-methyl-4H-chromen-4-on konnte (6q) nicht sauber isoliert werden und wurde ohne weitere Reinigung für die nächste Reaktion verwendet.

2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-methoxy-4H-chromen-4-on (6r)



Die Synthese erfolgte gemäß einer modifizierten Vorschrift von ZHONG *et al.*³³⁵ In einem 100 mL Rundkolben wurde 2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-hydroxy-4*H*-chromen-4on (**5i**) (1.23 g, 3.26 mmol, 1.00 Äq.) in 50 mL Aceton gelöst und mit Kaliumcarbonat (451 mg, 3.26 mmol, 1.00 Äq.) versetzt. Anschließend wurde Dimethylsulfat (309 µL. 3.26 mmol, 1.00 Äq.) über einen Zeitraum von 15 min tropfenweise zugegeben und die Reaktion bei Raumtemperatur 16 h lang gerührt. Der Ansatz wurde filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in 20 mL Dichlormethan aufgenommen und mit 1 M Salzsäure (3 x 20 mL) sowie gesättigter wässrige Natriumchlorid-Lösung (1 x 20 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Säulenchromatographie (*n*-Hexan/Ethylacetat 10/1 \rightarrow 10/2 \rightarrow 10/3 *v*/*v*) isoliert und 2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-methoxy-4*H*-chromen-4-on (**6r**) als farbloser Feststoff (959 mg, 2.45 mmol, 75 %) erhalten.

R _f	0.59 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 2/1 <i>v</i> / <i>v</i>).
Schmelzpunkt	175 °C.
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 3.06 (s, 3 H), 3.76 (s, 3 H), 4.99 (s, 2 H), 7.29 (t,
	J = 7.9 Hz, 1 H), $7.46 - 7.58$ (m, 1 H), $7.58 - 7.73$ (m,
	2 H), 7.77 – 7.93 (m, 2 H), 8.15 (dd, <i>J</i> = 8.0, 1.7 Hz, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 57.2, 60.0, 100.0, 117.8, 118.9, 124.3, 125.6, 125.7,
	126.4, 127.6, 131.1, 134.7, 136.2, 141.5, 152.6, 155.1,
	155.5, 174.1.
HPLC (Methode B, 254 nm)	t _R : 14.46 min, 93.1 % Reinheit.

9.6.1.4. Darstellung der 2-(Hydroxyphenyl)-3-methoxy-4H-chromen-4-one 7a-r

2-(3-Chlor-2-hydroxyphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4*H*-chromen-4-on (7a)



 $C_{18}H_{15}CIO_6$

[362.06]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 4** unter Verwendung von 2-(3-Chlor-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-methoxy-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**6a**) (1.5 g, 3.69 mmol, 1.00 Äq.), 5 M Salzsäure (4.72 mL, 23.6 mmol, 6.40 Äq.) und 55 mL Methanol in einem 100 mL Rundkolben. Die Reaktion wurde bei 50 °C 16 h lang gerührt. 2-(3-Chlor-2hydroxyphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**7a**) wurde als gelber Feststoff (1.30 g, 3.58 mmol, 97 %) erhalten. Diese Daten wurden bereits publiziert.³¹³

R _f	0.35 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 3/1 <i>v</i> / <i>v</i>).
Schmelzpunkt	80 °C.
¹ H-NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 3.72 (s, 3 H), 3.81 (s, 3 H), 3.96 (s, 3 H), 7.01 (t,
	J = 7.8 Hz, 1 H), 7.31 (d, $J = 9.1$ Hz, 1 H), 7.42 (dd,
	<i>J</i> = 7.7, 1.6 Hz, 1 H), 7.57 (dd, <i>J</i> = 8.0, 1.6 Hz, 1 H), 7.86
	(d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1 H), 10.02 (s, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 56.5, 59.8, 60.9, 110.8, 118.8, 120.1, 120.2, 120.4,
	121.5, 129.5, 131.9, 136.2, 140.8, 149.6, 150.9, 154.4,
	156.1, 173.4.
HPLC (Methode C, 254 nm)	t _R : 16.04 min, 97.5 % Reinheit.
HRMS (ESI) m/z	ber. für C ₁₈ H ₁₆ ClO ₆ : 363.0630, gef.: 363.0632.

2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4H-chromen-4-on (7b)



C₁₈H₁₅BrO₆ [406.01]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 4** unter Verwendung von 2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-methoxy-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**6b**) (1.63 g, 3.61 mmol, 1.00 Äq.), 2 M Salzsäure (11.6 mL, 23.1 mmol, 6.40 Äq.) und 45 mL Methanol in einem 100 mL Rundkolben. Die Reaktion wurde bei 50 °C 16 h lang gerührt. 2-(3-Brom-2hydroxy-phenyl)-3-methoxy-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**7b**) wurde als gelber Feststoff (1.01 g, 2.48 mmol, 69 %) erhalten. Diese Daten wurden bereits publiziert.³¹³

Analytische Daten	
R _f	0.41 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 1/1 <i>v</i> / <i>v</i>).
Schmelzpunkt	178 °C.
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 3.71 (s, 3 H), 3.80 (s, 3 H), 3.96 (s, 3 H), 6.94 (t,
	J = 7.8 Hz, 1 H), 7.30 (d, $J = 9.1$ Hz, 1 H), 7.44 (dd,
	<i>J</i> = 7.7, 1.6 Hz, 1 H), 7.72 (dd, <i>J</i> = 8.0, 1.6 Hz, 1 H), 7.85
	(d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1 H), 9.98 (s, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 56.5, 59.8, 60.9, 110.7, 111.5, 118.9, 120.1, 120.2,
	120.6, 130.2, 135.0, 136.2, 140.9, 149.6, 151.7, 154.3,
	156.1, 173.5.
HPLC (Methode C, 254 nm)	t _R : 15.41 min, ≥ 99 % Reinheit.
HRMS (ESI) m/z	ber. für C ₁₈ H ₁₆ BrO ₆ : 407.0125, gef.: 407.0129.

2-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4*H*-chromen-4-on (7c)



C₁₉H₁₈O₇ [358.11]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 4** unter Verwendung von 3,7,8-Trimethoxy-2-(3methoxy-4-(methoxymethoxy)phenyl)-4*H*-chromen-4-on (**6c**) (1.60 g, 3.98 mmol, 1.00 Äq.), 2 M Salzsäure (12.7 mL, 25.4 mmol, 6.40 Äq.) und 50 mL Methanol in einem 100 mL Rundkolben. Die Reaktion wurde bei 50 °C 4 h lang gerührt. 2-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**7c**) wurde als farbloser Feststoff (1.31 mg, 3.63 mmol, 91 %) erhalten.

R _f	0.30 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 1/2 <i>v</i> / <i>v</i>).
Schmelzpunkt	189 °C.
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 3.81 (s, 3 H), 3.86 (s, 3 H), 3.93 (s, 3 H), 3.95 (s, 3 H),
	6.99 (d, J = 8.4 Hz, 1 H), 7.26 (d, J = 9.1 Hz, 1 H), 7.62
	(dd, <i>J</i> = 8.4, 2.1 Hz, 1 H), 7.68 (d, <i>J</i> = 2.1 Hz, 1 H), 7.79
	(d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1 H), 9.88 (s, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 55.5, 56.5, 59.4, 61.1, 110.7, 111.7, 115.7, 118.2,
	120.2, 121.4, 122.0, 136.1, 139.4, 147.4, 148.8, 149.5,
	154.5, 156.1, 173.3.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 10.67 min, ≥ 99 % Reinheit.

2-(3-Brom-2-hydroxy-5-methylphenyl)-3-methoxy-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-on (7d)



[420.02]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV4** unter Verwendung von 2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)-5-methylphenyl)-3-methoxy-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**6d**) (3.70 g, 7.95 mmol, 1.00 Äq.), 2 M Salzsäure (39.8 mL, 79.5 mmol, 10.0 Äq.) und 120 mL Methanol in einem 250 mL Rundkolben. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur 16 h lang gerührt. 2-(3-Brom-2-hydroxy-5-methylphenyl)-3-methoxy-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**7d**) wurde als farbloser Feststoff (2.49 g, 5.91 mmol, 74 %) erhalten. Diese Daten wurden bereits publiziert.³¹³

R _f	0.33 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 1/1 <i>v</i> / <i>v</i>).
Schmelzpunkt	175 °C.
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 2.27 (d, $J = 0.8$ Hz, 3 H), 3.29 (s, 1 H), 3.70 (s, 3 H),
	3.00 (S, 311), 3.33 (S, 311), 7.22 (dd, 3 – 2.2, 0.0112, 111),
	7.30 (d, $J = 9.1$ Hz, 1 H), 7.55 (dd, $J = 2.1$, 0.8 Hz, 1 H),
	7.84 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1 H), 9.69 (s, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 19.9, 57.0, 60.2, 61.4, 111.2, 111.7, 119.4, 120.3,
	120.5, 130.3, 130.6, 135.6, 136.7, 141.3, 149.8, 150.0,
	154.9, 156.5, 173.8.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 13.98 min, ≥ 99 % Reinheit.
HRMS (ESI) m/z	ber. für: C ₁₉ H ₁₈ BrO ₆ : 421.0281, gef.: 421.0284.

2-(3-Brom-2-(difluormethoxy)phenyl)-3,7,8-trimethoxy-4H-chromen-4-on (7f)



[456.00]

Die Synthese erfolgte gemäß einer Vorschrift von LI *et al.*³³² 2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**7b**) (407 mg, 1.00 mmol, 1.00 Äq.) wurde in einem zylindrischen 20 mL SCHLENK-Rohr bei 0 °C in 4 mL trockenem Dichlormethan gelöst. Dieser Lösung wurde unter starkem Rühren 20 %ige wässrige Kaliumhydroxid-Lösung (1.40 mL, 6.00 mmol, 6.00 Äq.) zugegeben. (Bromdifluormethyl)trimethylsilan (518 mg, 2.50 mmol, 2.50 Äq.) wurde in drei Portionen nach 0, 30 and 60 min bei 0°C zugegeben und anschließend bei Raumtemperatur für 16 h lang stark gerührt. Der Ansatz wurde mit 5 mL entmineralisiertem Wasser verdünnt und die wässrige Phase mit Dichlormethan (2 x 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel bei vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Säulenchromatographie (*n*-Hexan/Ethylacetat 10/1 \rightarrow 10/2 \rightarrow 10/3 *v*/*v*) und durch Umkristallisation aus *n*-Hexan/Ethylacetat isoliert. 2-(3-Brom-2-(difluormethoxy)phenyl)-3,7,8trimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**7f**) wurde als farbloser Feststoff (360 mg, 0.78 mmol, 78 %) erhalten. Diese Daten wurden bereits publiziert.³¹³

R _f	0.22 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 1/1 <i>v</i> / <i>v</i>).
Schmelzpunkt	117 °C.
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 3.86 (s, 3 H), 3.94 (s, 3 H), 4.00 (s, 3 H), 6.51 (d,
	J = 74.0 Hz, 1 H), 7.07 (d, $J = 9.1$ Hz, 1 H), 7.30 (t,
	J = 7.9 Hz, 1 H), 7.58 (dd, J = 7.7, 1.6 Hz, 1 H), 7.80 (dd,
	<i>J</i> = 8.1, 1.6 Hz, 1 H), 8.01 (d, <i>J</i> = 9.1 Hz, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 56.7, 60.6, 61.9, 110.3, 116.7 (t, ${}^{1}J_{C,F}$ = 264.8 Hz),
	118.2, 119.6, 121.3, 127.9, 128.4, 131.1, 136.0, 137.0,
	141.5, 146.2 (t, ${}^{3}J_{C,F}$ = 3.3 Hz), 150.1, 153.1, 156.7,
	174.5.
¹⁹ F-NMR (282 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ -80.48.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 14.16 min, 97.8 % Reinheit.
HRMS (ESI) m/z	ber. für C ₁₉ H ₁₆ BrF ₂ O ₆ : 457.0093, gef.: 457.0100.

2-(3-Chlor-2-hydroxyphenyl)-3-ethoxy-7,8-dimethoxy-4H-chromen-4-on (7g)



 $C_{19}H_{17}CIO_6$

[376.07]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 4** unter Verwendung von 2-(3-Chlor-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-ethoxy-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**6g**) (1.11 g, 2.63 mmol, 1.00 Äq.), 2 M Salzsäure (8.70 mL, 17.4 mmol, 6.40 Äq.) und 40 mL Methanol in einem 100 mL Rundkolben. Die Reaktion wurde bei 50 °C 16 h lang gerührt. 2-(3-Chlor-2hydroxyphenyl)-3-ethoxy-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**7g**) wurde als gelber Feststoff (435 mg, 1.15 mmol, 42 %) erhalten.

R _f	0.27 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 2/1 <i>v</i> / <i>v</i>).
Schmelzpunkt	132 °C.
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 1.05 (t, J = 7.0 Hz, 3 H), 3.82 (s, 3 H), 3.96 (s, 3 H),
	3.93-4.08 (m, 3 H), 7.00 (t, $J = 7.8$ Hz, 1 H), 7.31 (d,
	<i>J</i> = 9.1 Hz, 1 H), 7.41 (dd, <i>J</i> = 7.7, 1.7 Hz, 1 H), 7.53-7.64
	(m, 1 H), 7.85 (d, <i>J</i> = 9.1 Hz, 1 H), 9.97 (s, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 15.2, 56.6, 61.0, 67.7, 110.8, 118.8, 120.0, 120.2,
	120.5, 121.4, 129.7, 131.9, 136.2, 139.9, 149.6, 150.9,
	154.7, 156.1, 173.7.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 15.71 min, 95.4 % Reinheit.

2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3-ethoxy-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-on (7h)



[420.02]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 4** unter Verwendung von 2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-ethoxy-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**6**h) (1.72 g, 2.72 mmol, 1.00 Äq.), 2 M Salzsäure (8.70 mL, 17.4 mmol, 6.40 Äq.) und 40 mL Methanol in einem 100 mL Rundkolben. Die Reaktion wurde bei 50 °C 16 h lang gerührt. 2-(3-Brom-2hydroxy-phenyl)-3-ethoxy-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**7**h) wurde als gelber Feststoff (750 mg, 1.78 mmol, 66 %) erhalten.

R _f	0.27 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 1/1 <i>v</i> / <i>v</i>).
Schmelzpunkt	146 °C.
¹ H-NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 1.05 (t, J = 7.0 Hz, 3 H), 3.82 (s, 3 H), 3.96 (s, 3 H), 4.01
	(q, $J = 7.1$ Hz, 2 H), 6.94 (t, $J = 7.8$ Hz, 1 H), 7.30 (d,
	J = 9.1 Hz, 1 H), 7.44 (dd, J = 7.6, 1.6 Hz, 1 H), 7.72 (dd,
	J = 8.0, 1.6 Hz, 1 H), 7.85 (d, $J = 9.0$ Hz, 1 H), 9.94 (s,
	1 H).
¹³ C-NMR (150 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	$\delta15.7,39.6,39.6,39.7,39.9,40.0,40.1,40.3,40.4,40.5,$
	57.0, 61.4, 68.2, 111.2, 111.9, 119.4, 120.7, 120.7, 121.0,
	$130.8,\ 135.5,\ 136.7,\ 140.4,\ 150.1,\ 152.2,\ 155.1,\ 156.5,$
	174.2.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 14.11 min, ≥ 99 % Reinheit.

2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3-ethoxy-7,8-dimethoxy-4H-chromen-4-on (7i)



[434.04]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV4** unter Verwendung von 2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-isopropoxy-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**6**i) (0.90 g, 1.88 mmol, 1.00 Äq.), 2 M Salzsäure (6.01 mL, 12 mmol, 6.40 Äq.) und 30 mL Methanol in einem 100 mL Rundkolben. Die Reaktion wurde bei 50 °C 16 h lang gerührt. 2-(3-Brom-2hydroxyphenyl)-3-isopropoxy-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**7**i) wurde als gelber Feststoff (194 mg, 0.50 mmol, 63 %) erhalten.

R _f	0.35 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 2/1 <i>v</i> / <i>v</i>).
Schmelzpunkt	131 °C.
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	$\delta0.99$ (d, J = 6.2 Hz, 6 H), 3.82 (s, 3 H), 3.95 (s, 3 H),
	4.37 (hept, J = 6.2 Hz, 1 H), 6.92 (t, J = 7.8 Hz, 1 H), 7.29
	(d, $J = 9.1$ Hz, 1 H), 7.43 (dd, $J = 7.7$, 1.6 Hz, 1H), 7.70
	(dd, $J = 7.9$, 1.6 Hz, 1 H), 7.84 (d, $J = 9.1$ Hz, 1 H), 9.86
	(s, 1 H),
¹³ C-NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 22.2, 56.5, 60.9, 74.2, 110.7, 111.2, 118.8, 120.2,
	$120.3,\ 130.7,\ 134.9,\ 136.2,\ 138.9,\ 149.6,\ 151.7,\ 154.9,$
	156.0, 173.9.
HPLC (Methode B, 254 nm)	t _R : 15.38 min, 95.4 % Reinheit.

2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3-(2-hydroxyethoxy)-7,8-dimethoxy-4H-chromen-4-on (7j)



[436.02]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV4** unter Verwendung von 2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-(2-hydroxyethoxy)-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**6j**) (0.86 g, 1.79 mmol, 1.00 Äq.), 2 M Salzsäure (5.36 mL, 10.7 mmol, 6.00 Äq.) und 27 mL Methanol in einem 100 mL Rundkolben. Die Reaktion wurde bei 50 °C 3 h lang gerührt. 2-(3-Brom-2hydroxy-phenyl)-3-(2-hydroxyethoxy)-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**7j**) wurde als gelber Feststoff (631 mg, 1.44 mmol, 81 %) erhalten.

R _f	0.38 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 1/2 <i>v</i> / <i>v</i>).
Schmelzpunkt	167 °C.
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 3.46 (t, J = 5.5 Hz, 2 H), 3.81 (s, 3 H), 4.03 – 3.92 (m,
	5 H), 6.93 (t, $J = 7.8$ Hz, 1 H), 7.30 (d, $J = 9.1$ Hz, 1 H),
	7.47 (dd, <i>J</i> = 7.7, 1.6 Hz, 1 H), 7.71 (dd, <i>J</i> = 8.0, 1.6 Hz,
	1 H), 7.85 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1 H), 9.95 (s, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 56.6, 60.1, 61.0, 73.8, 110.8, 111.6, 118.8, 120.2,
	120.3, 120.6, 130.4, 135.1, 136.2, 140.2, 149.7, 151.7,
	154.5, 156.2, 173.9.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 11.20 min, 95.5 % Reinheit.
2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3-(2-(dimethylamino)ethoxy)-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-on (7k)



[463.06]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 4** unter Verwendung von 2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-(2-(dimethylamino)ethoxy)-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**6**k) (890 mg, 1.75 mmol, 1.00 Äq.), 6 M Salzsäure (1.87 mL, 11.2 mmol, 6.40 Äq.) und 15 mL Methanol in einem 50 mL Rundkolben. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur 16 h lang gerührt. Das Lösemittel wurde bei vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 20 mL gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung aufgenommen. Die wässrige Phase wurde mit Dichlormethan (4 x 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. 2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3-(2-(dimethylamino)ethoxy)-7,8-dimethoxy-4*H*chromen-4-on (**7k**) wurde als gelber Feststoff (524 mg, 0.92 mmol, 40 % über 2 Schritte) erhalten.

R _f	0.07 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 1/1 <i>v</i> / <i>v</i>).
Schmelzpunkt	184 °C.
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 2.74 (d, J = 4.9 Hz, 6 H), 3.34 – 3.26 (m, 2 H), 3.81 (s,
	3 H), 3.96 (s, 3 H), 4.25 (t, J = 4.8 Hz, 2 H), 6.96 (t,
	J = 7.8 Hz, 1 H), 7.34 (d, $J = 9.2$ Hz, 1 H), 7.50 (dd,
	J = 7.7, 1.6 Hz, 1 H), 7.75 (dd, J = 8.0, 1.6 Hz, 1 H), 7.87
	(d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1 H), 10.28 (s, 1 H).
¹³ C-NMR (126 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 42.3, 48.5, 55.9, 56.6, 60.9, 66.2, 111.1, 111.8, 118.6,
	119.9, 120.1, 120.8, 130.1, 135.3, 136.3, 139.3, 149.6,
	151.6, 155.0, 156.3, 173.5.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 9.10 min, 94.6 % Reinheit.

3-(Benzyloxy)-2-(3-chloro-2-hydroxyphenyl)-7,8-dimethoxy-4H-chromen-4-on (7I)



C₂₄H₁₉ClO₆

[438.09]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 4** unter Verwendung von 3-(Benzyloxy)-2-(3-chlor-2-(methoxymethoxy)phenyl)-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**6**I) (3.20 g, 6.63 mmol, 1.00 Äq.), 2 M Salzsäure (33.1 mL, 66.3 mmol, 10.00 Äq.) und 100 mL Methanol in einem 250 mL Rundkolben. Die Reaktion wurde 50 °C 16 h lang gerührt. Das Rohprodukt wurde aus einem Gemisch bestehend aus *n*-Hexan/Ethylacetat umkristallisiert und 3-(Benzyloxy)-2-(3chloro-2-hydroxyphenyl)-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**7**I) als gelber Feststoff (2.43 g, 5.45 mmol, 82 %) erhalten.

R _f	0.29 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 2/1 <i>v</i> / <i>v</i>).
Schmelzpunkt	146 °C.
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 3.82 (s, 3 H), 3.97 (s, 3 H), 5.02 (s, 2 H), 6.96 (t,
	J = 7.8 Hz, 1 H), $7.12 - 7.19$ (m, 2 H), $7.23 - 7.29$ (m,
	3 H), 7.29 – 7.36 (m, 2 H), 7.57 (dd, <i>J</i> = 8.0, 1.6 Hz, 1 H),
	7.90 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1 H), 10.01 (s, 1 H).
¹³ C-NMR (126 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 57.0, 61.4, 73.9, 111.4, 119.3, 120.3, 120.6, 120.8,
	$121.9,\ 128.2,\ 128.3,\ 128.4,\ 129.9,\ 132.2,\ 136.8,\ 137.3,$
	140.2, 150.0, 151.3, 155.3, 156.6, 174.0.
HPLC (Methode B, 254 nm)	t _R : 15.54 min, ≥ 99 % Reinheit.

2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3-(difluormethoxy)-7,8-dimethoxy-4H-chromen-4-on (7m)



[441.99]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 4** unter Verwendung von 2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-(difluoromethoxy)-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**6m**) (380 mg, 0.78 mmol, 1.00 Äq.), 2 M Salzsäure (2.5 mL, 4.99 mmol, 6.40 Äq.) und 12 mL Methanol in einem 50 mL Rundkolben. Die Reaktion wurde bei 50 °C 4 h lang gerührt. 2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3-(difluormethoxy)-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**7m**) wurde als farbloser Feststoff (345 mg, 0.78 mmol, 99 %) erhalten.

R _f	0.30 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 2/1 <i>v</i> / <i>v</i>).
Schmelzpunkt	159 °C.
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 3.82 (s, 3 H), 3.98 (s, 3 H), 6.95 (t, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1 H), 7.01
	(t, $J = 74.3$ Hz, 1 H), 7.37 (d, $J = 9.2$ Hz, 1 H), 7.44 (dd,
	<i>J</i> = 7.7, 1.6 Hz, 1 H), 7.75 (dd, <i>J</i> = 8.0, 1.6 Hz, 1 H), 7.89
	(d, <i>J</i> = 9.1 Hz, 1 H), 10.16 (s, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 56.7, 61.1, 111.4, 111.6, 116.6 (t, ${}^{1}J_{\rm C,F}$ = 258.9 Hz),
	118,3, 118.7, 120.4, 120.6, 130.4, 134.1 (t,
	${}^{3}J_{C,F}$ = 3.8 Hz), 135.7, 136.3, 149.8, 151.8, 156.1, 156.8,
	172.0.
¹⁹ F-NMR (282 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ -80.94.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 13.65 min, 95.9 % Reinheit.

2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3,7-dimethoxy-4H-chromen-4-on (7p)



[375.99]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 4** unter Verwendung von 2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-methoxy-4*H*-chromen-4-on (**6p**) (0.90 g, 2.14 mmol, 1.00 Äq.), 2 M Salzsäure (6.84 mL, 13.7 mmol, 6.40 Äq.) und 17 mL Methanol in einem 50 mL Rundkolben. Die Reaktion wurde bei 50 °C 4 h lang gerührt. 2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3,7dimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**7p**) wurde als farbloser Feststoff (652 mg, 1.73 mmol, 81 %) erhalten.

R _f	0.44 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 2/1 <i>v</i> / <i>v</i>).
Schmelzpunkt	194 °C.
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃)	δ 3.91 (s, 3 H), 3.92 (s, 3 H), 6.89 (d, J = 2.3 Hz, 1 H),
	6.91-7.04 (m, 2 H), 7.65 (dd, J = 8.0, 1.6 Hz, 1 H), 7.73
	(dd, $J = 7.8$, 1.6 Hz, 1 H), 8.15 (s, 1 H), 8.15 (d,
	<i>J</i> = 8.9 Hz, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃)	δ 56.1, 62.2, 100.2, 113.8, 115.0, 118.0, 120.1, 121.6,
	127.4, 129.3, 136.2, 139.9, 151.8, 153.8, 157.7, 164.6,
	173.4.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 13.64 min, ≥ 99 % Reinheit.

```
2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3,7-dimethoxy-8-methyl-4H-chromen-4-on (7q)
```



[390.01]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 4** unter Verwendung von 2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3,7-dimethoxy-8-methyl-4*H*-chromen-4-on (**6q**) (1.01 g, 2.32 mmol, 1.00 Äq.), 2 M Salzsäure (7.41 mL, 14.8 mmol, 6.40 Äq.) und 16 mL Methanol in einem 50 mL Rundkolben. Die Reaktion wurde bei 50 °C 3 h lang gerührt. 2-(3-Brom-2hydroxyphenyl)-3,7-dimethoxy-8-methyl-4*H*-chromen-4-on (**7q**) wurde als gelber Feststoff (211 mg, 0.54 mmol, 3 % über 3 Schritte) erhalten.

R _f	0.38 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 2/1 <i>v</i> / <i>v</i>).
Schmelzpunkt	189 °C.
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃)	δ 2.33 (s, 3 H), 3.93 (s, 3 H), 3.98 (s, 3 H), 6.99 (t,
	J = 8.0 Hz, 1 H), 7.03 (d, $J = 7.9$ Hz, 1 H), 7.70 (dd,
	<i>J</i> = 8.0, 1.6 Hz, 1 H), 7.75 (dd, <i>J</i> = 7.8, 1.6 Hz, 1 H), 8.13
	(dd, <i>J</i> = 8.9, 0.7 Hz, 1 H), 8.31 (s, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃)	$\delta \ 8.3, \ 56.2, \ 62.1, \ 108.8, \ 113.8, \ 114.1, \ 117.9, \ 120.4,$
	121.6, 124.4, 129.1, 136.1, 139.2, 151.8, 153.8, 154.9,
	161.7, 173.8.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 14.87 min, 95.7 % Reinheit.





[345.98]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 4** unter Verwendung von 2-(3-Brom-2-(methoxymethoxy)phenyl)-3-methoxy-4*H*-chromen-4-on (**6r**) (0.90 g, 2.30 mmol, 1.00 Äq.), 2 M Salzsäure (6.90 mL, 13.8 mmol, 6.00 Äq.) und 17 mL Methanol in einem 50 mL Rundkolben. Die Reaktion wurde bei 50 °C 3 h lang gerührt. 2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3methoxy-4*H*-chromen-4-on (**7r**) wurde als farbloser Feststoff (733 mg, 2.11 mmol, 92 %) erhalten.

R _f	0.28 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 4/1 <i>v</i> / <i>v</i>).
Schmelzpunkt	222 °C.
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃)	δ 3.94 (s, 3 H), 6.99 (t, J = 7.9 Hz, 1 H), 7.44 (ddd, J = 8.1,
	7.1, 1.1 Hz, 1 H), 7.52 (ddd, $J = 8.5$, 1.0, 0.5 Hz, 1 H),
	7.62 - 7.77 (m, 3 H), 8.09 (s, 1 H), 8.28 (ddd, <i>J</i> = 8.0, 1.7,
	0.5 Hz, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃)	δ 62.0, 113.6, 118.2, 119.9, 121.6, 124.1, 125.1, 125.9,
	129.3, 134.0, 136.2, 139.9, 151.7, 154.3, 155.8, 173.9.
HPLC (Methode C, 254 nm)	t _R : 15.74 min, 97.9 % Reinheit.

9.6.1.5. Darstellung der 5-Hydroxy-2-phenyl-4H-chromen-4-one 1a-r

2-(3-Chlor-2-hydroxyphenyl)-5-hydroxy-3,7,8-trimethoxy-4H-chromen-4-on (1a)



C₁₈H₁₅CIO₇

[378.05]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 5** unter Verwendung von 2-(3-Chlor-2-hydroxyphenyl)-3-ethoxy-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**7a**) (550 mg, 1.52 mmol, 1.00 Äq.), Silbercarbonat (836 mg, 3.03 mmol, 2.00 Äq.), *Selectfluor*[®] (622 mg, 1.67 mmol, 1.10 Äq., 95.0 %), Dichlor(*p*-cymol)ruthenium(II)-Dimer (46.4 mg, 0.08 mmol, 0.05 Äq.), Trifluoressigsäureanhydrid (23.0 mL, 165 mmol, 109 Äq.) und Trifluoressigsäure (348 μ L, 4.55 mmol, 3.00 Äq.). 2-(3-Chlor-2-hydroxyphenyl)-5-hydroxy-3,7,8-trimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**1a**) wurde als gelber Feststoff (221 mg, 0.58 mmol, 38 %) erhalten. Diese Daten wurden bereits publiziert.³¹³

Analytische Daten

R _f	0.34 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 3/2 <i>v</i> / <i>v</i>).
Schmelzpunkt	214 °C.
¹ H-NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 3.71 (s, 3 H), 3.72 (s, 3 H), 3.93 (s, 3 H), 6.65 (s, 1 H),
	7.01 (t, J = 7.8 Hz, 1 H), 7.42 (dd, J = 7.7, 1.7 Hz, 1 H),
	7.59 (dd, $J = 8.0$, 1.7 Hz, 1 H), 10.09 (s, 1 H), 12.43 (s,
	1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 56.6, 60.1, 60.9, 95.8, 105.2, 119.8, 120.2, 121.6,
	$128.3,\ 129.5,\ 132.2,\ 139.4,\ 148.7,\ 150.9,\ 155.6,\ 156.5,$
	158.2, 178.6.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 14.30 min, ≥ 99 % Reinheit.
HRMS (ESI) <i>m</i> /z	ber. für C ₁₈ H ₁₆ ClO ₇ : 379.0585, gef.: 379.0582.

2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-5-hydroxy-3,7,8-trimethoxy-4*H*-chromen-4-on (1b)



[422.00]

Die Synthese erfolgte gemäß der AAV 5 unter Verwendung von 2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3-methoxy-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-on 1.00 Äq.), (**7b**) (1.02 mg, 2.50 mmol, Silbercarbonat (1.38 g, 1.19 mmol, 2.00 Äq.), Selectfluor® (1.03 g, 0.65 mmol, 1.10 Äq., Dichlor(*p*-cymol)ruthenium(II)-Dimer 95.0 %), (77.1 mg, 0.13 mmol, 0.05 Äq.), Trifluoressigsäureanhydrid (38.0 mL, 273 mmol, 109 Äq.) und Trifluoressigsäure (575 µL, 7.51 mmol, 3.00 Äq.). 2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)- 5-hydroxy-3,7,8-trimethoxy-4H-chromen-4-on (1b) wurde als gelber Feststoff (124 mg, 0.29 mmol, 12 %) erhalten. Diese Daten wurden bereits publiziert.³¹³

Analytische Datei	n
-------------------	---

R _f	0.24 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 7/3 <i>v</i> / <i>v</i>).
Schmelzpunkt	210 °C.
¹ H-NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 3.70 (s, 3 H), 3.71 (s, 3 H), 3.92 (s, 3 H), 6.64 (s, 1 H), 6.95 (t, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1 H), 7.44 (dd, <i>J</i> = 7.6, 1.6 Hz, 1 H), 7.73 (dd, <i>J</i> = 8.0, 1.6 Hz, 1 H), 10.04 (s, 1 H), 12.42 (s, 1 H)
¹³ C-NMR (151 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 56.6, 60.1, 60.9, 95.8, 105.2, 11.6, 119.5, 120.7, 128.4, 130.2, 135.4, 139.5, 148.8, 151.7, 155.6, 156.5, 158.2, 178.7.
HPLC (Methode A, 254 nm) HRMS (ESI) <i>m/z</i>	t _R : 14.76 min, ≥ 99 % Reinheit. ber. für C ₁₈ H ₁₆ BrO ₇ : 423.0079, gef.: 423.0076.

5-Hydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4*H*-chromen-4-on (1c)



C₁₉H₁₈O₈ [374.10]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 5** unter Verwendung von 2-(4-Hydroxy-3methoxyphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**7c**) (358 mg, 1.00 mmol, 1.00 Äq.), Silbercarbonat (551 mg, 2.00 mmol, 2.00 Äq.), *Selectfluor*[®] (410 mg, 1.10 mmol, 1.10 Äq., 95.0 %), Dichlor(*p*-cymol)ruthenium(II)-Dimer (15.2 mg, 0.05 mmol, 0.05 Äq.), Trifluoressigsäureanhydrid (15.2 mL, 109 mmol, 109 Äq.) und Trifluoressigsäure (230 μ L, 3.00 mmol, 3.00 Äq.). 5-Hydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4*H*chromen-4-on (**1c**) wurde als gelber Feststoff (60 mg, 0.16 mmol, 16 %) erhalten.

R _f	0.61 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 1/1 <i>v</i> / <i>v</i>).
Schmelzpunkt	206 °C.
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 3.81 (s, 3 H), 3.86 (s, 3 H), 3.93 (s, 3 H), 3.95 (s, 3 H),
	6.99 (d, J = 8.4 Hz, 1 H), 7.26 (d, J = 9.1 Hz, 1 H), 7.62
	(dd, J = 8.4, 2.1 Hz, 1 H), 7.68 (d, J = 2.1 Hz, 1 H), 7.79
	(d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1 H), 9.88 (s, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃)	δ 56.1, 56.5, 60.3, 61.7, 76.7, 77.2, 77.6, 95.6, 105.5,
	110.9, 114.9, 122.8, 123.0, 128.9, 138.8, 146.5, 148.6,
	155.9, 157.5, 158.5, 179.1.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t_R : 12.80 min, ≥ 99 % Reinheit.
HRMS (ESI) m/z	ber. für C ₁₉ H ₁₉ O ₈ : 375.1074, gef.: 375.1077.

2-(3-Brom-2-hydroxy-5-methylphenyl)-3-methoxy-7,8-dimethoxy-4H-chromen-4-on (1d)



[436.02]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 5** unter Verwendung von 2-(3-Brom-2-hydroxy-5methylphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**7d**) (1.00 g, 2.37 mmol, 1.00 Äq.), Silbercarbonat (1.31 g, 4.75 mmol, 2.00 Äq.), *Selectfluor*[®] (974 mg, 2.61 mmol, 1.10 Äq., 95.0 %), Dichlor(*p*-cymol)ruthenium(II)-Dimer (73.0 mg, 0.12 mmol, 0.05 Äq.), Trifluoressigsäureanhydrid (35.3 mL, 254 mmol, 107 Äq.) und Trifluoressigsäure (545 μ L, 7.12 mmol, 3.00 Äq.). 2-(3-Brom-2-hydroxy-5-phenyl)-3-methoxy-5-hydroxy-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**1d**) wurde als gelber Feststoff (120 mg, 0.27 mmol, 12 %) erhalten. Diese Daten wurden bereits publiziert.³¹³

R _f	0.40 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 3/2 <i>v</i> / <i>v</i>).
Schmelzpunkt	252 °C.
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 2.27 (s, 3 H), 3.69 (s, 3 H), 3.71 (s, 3 H), 3.92 (s, 3 H),
	6.63 (s, 1 H), 7.23 (dd, <i>J</i> = 2.2, 0.8 Hz, 1 H), 7.60-7.53 (m,
	1H), 9.76 (s, 1 H), 12.43 (s, 1 H).
¹³ C-NMR (126 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 19.9, 57.0, 60.5. 61.3, 96.2, 105.7, 11.8, 119.7, 128.9,
	130.3, 130.6, 136.0, 139.9, 149.2, 149.9, 156.1, 156.9,
	158.6, 179.1.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 13.48 min, ≥ 99 % Reinheit.
HRMS (ESI) m/z	ber. für C ₁₉ H ₁₈ BrO ₆ 437.0158, gef.: 437.0234.

2-(3-Brom-2-fluorphenyl)-5-hydroxy-3,7,8-trimethoxy-4H-chromen-4-on (1e)



C₁₈H₁₄BrFO₆ [424.00]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 5** unter Verwendung von 2-(3-Brom-2-fluorphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**6e**) (600 mg, 1.47 mmol, 1.00 Äq.), Silbercarbonat (809 mg, 2.93 mmol, 2.00 Äq.), *Selectfluor*[®] (601 mg, 1.61 mmol, 1.10 Äq., 95.0 %), Dichlor(*p*-cymol)ruthenium(II)-Dimer (45.2 mg, 0.07 mmol, 0.05 Äq.), Trifluoressigsäureanhydrid (22.2 ml, 160 mmol, 109 Äq.) und Trifluoressigsäure (337 μ L, 4.40 mmol, 3.00 Äq.). 2-(3-Brom-2-fluorphenyl)-5-hydroxy-3,7,8-trimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**1e**) wurde als gelber Feststoff (50 mg, 0.09 mmol, 6 %) erhalten. Diese Daten wurden bereits publiziert.³¹³

R _f	0.45 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 3/2 <i>v</i> / <i>v</i>).
Schmelzpunkt	217 °C.
¹ H-NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 3.72 (s, 3 H), 3.79 (s, 3 H), 3.93 (s, 3 H), 6.66 (s, 1 H),
	7.40 (t, J = 7.9 Hz, 1 H), 7.77 (ddd, J = 7.9, 6.3, 1.7 Hz,
	1 H), 7.98 (ddd, <i>J</i> = 8.2, 6.7, 1.7 Hz, 1 H), 12.25 (s, 1 H).
¹³ C-NMR (126 MHz, Aceton- <i>d</i> ₆)	δ 57.3, 61.3, 61.8, 97.1, 106.8, 110.5 (d, $^{2}J_{C,F}$ = 21.0 Hz),
	121.6 (d, ${}^{2}J_{C,F}$ = 15.6 Hz), 127.0 (d, ${}^{3}J_{C,F}$ = 4.6 Hz), 130.4
	(d, ${}^{3}J_{C,F}$ = 5.1 Hz), 131.8 (d, ${}^{4}J_{C,F}$ = 1.4 Hz), 137.3, 141.3,
	150.3, 153.0 (d, ${}^{2}J_{C,F} = 8.2 \text{ Hz}$), 157.4 (d,
	¹ <i>J</i> _{C,F} = 252.1 Hz), 158.7, 160.4, 180.1.
¹⁹ F-NMR (565 MHz, Aceton- <i>d</i> ₆)	<i>δ</i> -106.22.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 16.76 min, ≥ 99 % Reinheit.
HRMS (ESI) m/z	ber. für C ₁₈ H ₁₅ BrFO ₆ : 425.0031, gef.: 425.0030.

2-(3-Brom-2-(difluoromethoxy)phenyl)-5-hydroxy-3,7,8-trimethoxy-4*H*-chromen-4-on (1f)



[472.00]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 5** unter Verwendung von 2-(3-Brom-2-(difluoromethoxy)phenyl)-3,7,8-trimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**7f**) (273 mg, 0.60 mmol, 1.00 Äq.), Silbercarbonat (329 mg, 1.19 mmol, 2.00 Äq.), *Selectfluor*[®] (245 mg, 0.66 mmol, 1.10 Äq., 95.0 %), Dichlor(*p*-cymol)ruthenium(II)-Dimer (18.0 mg, 0.03 mmol, 0.05 Äq.), Trifluoressigsäureanhydrid (9.10 ml, 65.1 mmol, 109 Äq.) und Trifluoressigsäure (137 μ L, 1.78 mmol, 3.00 Äq.). 2-(3-Brom-2-(difluoromethoxy)phenyl)-5-hydroxy-3,7,8-trimethoxy-4*H*chromen-4-on (**1f**) wurde als gelber Feststoff (30 mg, 0.11 mmol, 11 %) erhalten. Diese Daten wurden bereits publiziert.³¹³

R _f	0.27 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 3/2 <i>v</i> / <i>v</i>).
Schmelzpunkt	162 °C.
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 3.70 (s, 3 H), 3.74 (s, 3 H), 3.93 (s, 3 H), 6.66 (s, 1 H),
	7.06 (t, J = 72.3 Hz, 1 H), 7.50 (t, J = 7.9 Hz, 1 H), 7.76
	(dd, J = 7.7, 1.6 Hz, 1 H), 8.02 (dd, J = 8.1, 1.6 Hz, 1 H),
	12.28 (s, 1 H).
¹³ C-NMR (125 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 56.6, 60.1, 60.9, 96.2, 105.0, 117.0 (t, ${}^{1}J_{C,F}$ = 262.3 Hz),
	117.7, 127.0, 128.4, 128.6, 130.9, 136.3, 139.2, 145.3 (t,
	³ J _{C,F} = 3.7 Hz), 148.4, 153.6, 156.6, 158.6.
¹⁹ F-NMR (282 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ-80.65.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 16.19 min, ≥ 99 % Reinheit.
HRMS (ESI) m/z	ber. für C ₁₉ H ₁₆ BrF ₂ O ₇ : 473.0042, gef.: 473.0044.

2-(3-Chlor-2-hydroxyphenyl)-3-ethoxy-5-hydroxy-7,8-dimethoxy-4H-chromen-4-on (1g)



[392.07]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 5** unter Verwendung von 2-(3-Chlor-2-hydroxyphenyl)-3-ethoxy-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**7g**) (222 mg, 0.59 mmol, 1.00 Äq.), Silbercarbonat (325 mg, 1.18 mmol, 2.00 Äq.), *Selectfluor*[®] (242 mg, 0.65 mmol, 1.10 Äq., 95.0 %), Dichlor(*p*-cymol)ruthenium(II)-Dimer (18.0 mg, 0.03 mmol, 0.05 Äq.), Trifluoressigsäureanhydrid (8.93 mL, 64.4 mmol, 109 Äq.) und Trifluoressigsäure (135 μ L, 1.77 mmol, 3.00 Äq.). 2-(3-Chlor-2-hydroxyphenyl)-3-ethoxy-5-hydroxy-7,8-dimethoxy-4*H*chromen-4-on (**1g**) wurde als gelber Feststoff (35 mg, 0.09 mmol, 15 %) erhalten.

R _f	0.36 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 1/1 <i>v</i> / <i>v</i>).
Schmelzpunkt	144 °C.
¹ H-NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 1.05 (t, J = 7.1 Hz, 3 H), 3.70 (s, 3 H), 3.92 (s, 3 H), 3.99
	(q, J = 7.0 Hz, 2 H), 6.63 (s, 1 H), 7.00 (t, J = 7.9 Hz, 1 H),
	7.40 (dd, J = 7.7, 1.6 Hz, 1 H), 7.58 (dd, J = 8.0, 1.6 Hz,
	1 H), 10.04 (s, 1 H), 12.45 (s, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 15.2, 56.6, 61.0, 68.2, 95.8, 105.2, 119.9, 120.1, 121.5,
	128.4, 129.6, 132.2, 138.5, 148.8, 150.9, 155.9, 156.6,
	158.2, 178.9.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 15.16 min, ≥ 99 % Reinheit.
HRMS (ESI) m/z	ber. für C ₁₉ H ₁₇ ClO ₇ : 393.0663, gef. 393.0736.

2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3-ethoxy-5-hydroxy-7,8-dimethoxy-4H-chromen-4-on (1h)



[436.02]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 5** unter Verwendung von 2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3-ethoxy-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**7h**) (250 mg, 0.94 mmol, 1.00 Äq.), Silbercarbonat (327 mg, 1.19 mmol, 2.00 Äq.), *Selectfluor*[®] (243 mg, 0.65 mmol, 1.10 Äq., 95.0 %), Dichlor(*p*-cymol)ruthenium(II)-Dimer (18.2 mg, 0.03 mmol, 0.05 Äq.), Trifluoressigsäureanhydrid (8.84 mL, 64.4 mmol, 107 Äq.) und Trifluoressigsäure (136 μ L, 1.78 mmol, 3.00 Äq.). 2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3-ethoxy-5-hydroxy-7,8-dimethoxy-4*H*chromen-4-on (**1h**) wurde als gelber Feststoff (26 mg, 0.06 mmol, 10 %) erhalten.

R _f	0.25 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 1/1 <i>v</i> / <i>v</i>).
Schmelzpunkt	158 °C.
¹ H-NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 1.05 (t, J = 7.0 Hz, 3 H), 3.70 (s, 3 H), 3.92 (s, 3 H), 3.99
	(q, J = 7.0 Hz, 2 H), 6.63 (s, 1 H), 6.94 (t, J = 7.8 Hz, 1 H),
	7.44 (dd, J = 7.7, 1.6 Hz, 1 H), 7.73 (dd, J = 7.9, 1.6 Hz,
	1 H), 10.00 (s, 1 H), 12.46 (s, 1 H).
¹³ C-NMR (151 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 15.7, 57.1, 61.4, 68.7, 96.2, 105.7, 112.0, 120.1, 121.1,
	128.9, 130.8, 135.8, 139.1, 149.3, 152.2, 156.3, 157.0,
	158.7, 179.4.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 15.63 min, ≥ 99 % Reinheit.
HRMS (ESI) m/z	ber. für C ₁₉ H ₁₈ BrO ₇ : 437.0230 gef. 437.0234.

2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3-isoproxy-5-hydroxy-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-on (1i)



 $C_{20}H_{19}BrO_7$

[450.03]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 5** unter Verwendung von 2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3-isoproxy-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**7i**) (435 mg, 1.00 mmol, 1.00 Äq.), Silbercarbonat (551 mg, 2.00 mmol, 2.00 Äq.), *Selectfluor*[®] (410 mg, 1.10 mmol, 1.10 Äq., 95.0 %), Dichlor(*p*-cymol)ruthenium(II)-Dimer (31.0 mg, 0.05 mmol, 0.05 Äq.), Trifluoressigsäureanhydrid (14.9 mL, 107 mmol, 107 Äq.) und Trifluoressigsäure (230 μ L, 3.00 mmol, 3.00 Äq.). 2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3-isoproxy-5-hydroxy-7,8-dimethoxy-4*H*chromen-4-on (**1i**) wurde als gelber Feststoff (11 mg, 0.02 mmol, 4 %) erhalten.

R _f	0.27 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 1/1 <i>v</i> / <i>v</i>).
Schmelzpunkt	131 °C.
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃)	δ 1.21 (d, J = 6.2 Hz, 3 H), 3.85 (s, 1 H), 3.95 (s, 1 H),
	4.56 - 4.70 (m, 1 H), 6.45 (dd, $J = 2.6$, 1.2 Hz, 1 H),
	$6.93 \text{ - } 7.05 \text{ (m, 1 H)}, \ 7.68 \text{ - } 7.80 \text{ (m, 2 H)}, \ 8.53 \text{ (s, 1 H)},$
	12.22 (s, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃)	δ 22.1, 56.6, 61.8, 79.0, 96.0, 105.3, 114.1, 120.6, 121.8,
	129.1, 129.2, 135.4, 136.6, 149.2, 152.0, 155.6, 157.6,
	159.1, 178.4.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 17.34 min, 98.2 % Reinheit.
HRMS (ESI) <i>m</i> /z	ber. für C ₂₀ H ₂₀ BrO ₇ : 451.0387 gef. 451.0390.

2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-5-hydroxy-3-(2-hydroxyethoxy)-7,8-dimethoxy-4*H*chromen-4-on (1j)



[452.01]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 5** unter Verwendung von 2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3-(hydroxyethoxy)-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**7**j) (550 mg, 1.26 mmol, 1.00 Äq.), Silbercarbonat (551 mg, 2.00 mmol, 2.00 Äq.), *Selectfluor*[®] (516 mg, 1.38 mmol, 1.10 Äq., 95.0 %), Dichlor(*p*-cymol)ruthenium(II)-Dimer (38.5 mg, 0.06 mmol, 0.05 Äq.), Trifluoressigsäureanhydrid (18.7 mL, 135 mmol, 107 Äq.) und Trifluoressigsäure (289 μ L, 3.77 mmol, 3.00 Äq.). 2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-5-hydroxy-3-(2-hydroxyethoxy)-7,8dimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**1**j) wurde als gelber Feststoff (126 mg, 0.28 mmol, 22 %) erhalten.

Analytische Daten

R _f	0.36 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 1/1 <i>v</i> / <i>v</i>).
Schmelzpunkt	144 °C.
¹ H-NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 3.32 (s, 3 H), 3.46 (t, J = 5.5 Hz, 2 H), 3.70 (s, 3 H), 3.92
	(s, 3 H), 3.99 (t, <i>J</i> = 5.5 Hz, 2 H), 5.76 (s, 1 H), 6.63 (s,
	1 H), 6.91 (t, J = 7.8 Hz, 1 H), 7.46 (dd, J = 7.6, 1.7 Hz,
	1 H), 7.72 (dd, <i>J</i> = 7.9, 1.6 Hz, 1 H), 9.92 (bs, 1 H), 12.43
	(s, 1 H).
¹³ C-NMR (151 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 56.6, 60.0, 61.0, 74.0, 95.8, 105.2, 111.6, 119.6, 120.7,
	128.4, 130.4, 135.3, 138.8, 148.8, 151.7, 155.6, 156.5,
	158.2, 178.9.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 12.27 min, 97.3 % Reinheit.
HRMS (ESI) m/z	ber. für C ₁₉ H ₇ BrO ₈ : 453.0107 gef. 453.0180.

2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3-(2-(dimethylamino)ethoxy)-5-hydroxy-7,8-dimethoxy-4*H*chromen-4-on (1k)



 $C_{21}H_{22}BrNO_7$

[479.06]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 5** unter Verwendung von 2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3-(2-(dimethylamino)ethoxy)-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**7k**) (412 mg, 0.84 mmol, 1.00 Äq.), Silbercarbonat (463 mg, 1.68 mmol, 2.00 Äq.), *Selectfluor*[®] (344 mg, 0.92 mmol, 1.10 Äq., 95.0 %), Dichlor(*p*-cymol)ruthenium(II)-Dimer (27.9 mg, 0.04 mmol, 0.05 Äq.), Trifluoressigsäureanhydrid (12.7 mL, 91.5 mmol, 109 Äq.) und Trifluoressigsäure (193 µL, 2.52 mmol, 3.00 Äq.). Die Reaktion wurde 60 °C 48 h lang gerührt. Nach Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem Eluentengemisch bestehend aus *n*-Hexan/Ethylacetat + 1 % Triethylamin (10/1 \rightarrow 3/1 \rightarrow 2/1 v/v) und C₁₈-Kieselgel mit einem Eluentengemisch bestehend aus Wasser/Acetonitril (10/1 \rightarrow 10/2 v/v) wurde 2-(3-Brom-2hydroxyphenyl)-3-(2-(dimethylamino)ethoxy)-5-hydroxy-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**1k**) als gelber Feststoff (67 mg, 0.11 mmol, 13 %) erhalten.

R _f	0.05 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 1/1 <i>v</i> / <i>v</i>).
Schmelzpunkt	103 °C.
¹ H-NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 2.52 (t, 2 H), 2.78 (d, J = 4.2 Hz, 6 H), 3.71 (s, 3 H), 3.93
	(s, 3 H), 4.21 (t, $J = 4.9$ Hz, 2 H), 6.68 (s, 1 H), 6.98 (t,
	J = 7.8 Hz, 1 H), 7.49 (dd, J = 7.7, 1.6 Hz, 1 H), 7.77 (dd,
	<i>J</i> = 8.0, 1.6 Hz, 1 H), 10.18 (s, 1 H), 12.23 (s, 1 H).
¹³ C-NMR (151 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	Aufgrund von Substanzverlust nicht verfügbar.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 9.82 min, 97.4 % Reinheit.
HRMS (ESI) m/z	ber. für C ₂₁ H ₂₃ BrNO ₇ : 480.0580, gef. 480.0660.

2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3-(difluormethoxy)-5-hydroxy-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-on (1m)



C₁₈H₁₃BrF₂O₇ [457.98]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 5** unter Verwendung von 2-(3-Bromo-2-hydroxyphenyl)-3-(difluormethoxy)-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**7m**) (443 mg, 1.00 mmol, 1.00 Äq.), Silbercarbonat (551 mg, 2.00 mmol, 2.00 Äq.), Selectfluor[®] (410 mg, 1.10 mmol, 1.10 Äq., 95.0 %). Dichlor(*p*-cymol)ruthenium(II)-Dimer (31.0 mg, 0.05 mmol, 0.05 Äq.), Trifluoressigsäureanhydrid (15.2 mL, 109 mmol, 109 Äq.) und Trifluoressigsäure (230 μ L, 3.00 mmol, 3.00 Äq.). 2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3-(difluormethoxy)-5-hydroxy-7,8-dimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**1m**) wurde als gelber Feststoff (70 mg, 0.15 mmol, 15 %) erhalten.

R _f	0.24 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 4/1 <i>v</i> / <i>v</i>).
Schmelzpunkt	192 °C.
¹ H-NMR (600 MHz, CDCl ₃)	δ 3.71 (s, 3 H), 3.94 (s, 3 H), 6.71 (s, 1 H), 6.96 (t,
	J = 7.8 Hz, 1 H), 6.98 (t, $J = 72.0$ Hz, 1 H), 7.43 (dd,
	<i>J</i> = 7.7, 1.6 Hz, 1 H), 7.76 (dd, <i>J</i> = 8.0, 1.6 Hz, 1 H), 10.20
	(s, 1 H), 11.97 (s, 1 H).
¹³ C-NMR (151 MHz, CDCl ₃)	δ 56.7, 62.0, 77.0, 77.2, 77.4, 96.4, 105.4, 111.8, 115.7
	(t, ${}^{1}J_{C,F}$ = 263.4 Hz), 117.5, 121.7, 129.2, 130.8, 132.3 (t,
	³ J _{C,F} = 3.7 Hz), 135.4, 149.0, 150.8, 157.1, 157.6, 159.3,
	177.1.
¹⁹ F-NMR (565 MHz, CDCl ₃)	δ -83.12.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 14.57 min, ≥ 99 % Reinheit.
HRMS (ESI) m/z	ber. für C ₁₈ H ₁₃ BrF ₂ O ₇ : 458.9885, gef.: 458.9889.

2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-5-hydroxy-3,7-dimethoxy-8-methyl-4H-chromen-4-on (1q)



C₁₈H₁₅BrO₆ [406.01]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 5** unter Verwendung von 2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3,7-dimethoxy-8-methyl-4*H*-chromen-4-on (**7q**) (194 mg, 0.50 mmol, 1.00 Äq.), Silbercarbonat (273 mg, 0.99 mmol, 2.00 Äq.), *Selectfluor*[®] (203 mg, 0.55 mmol, 1.10 Äq., 95.0 %), Dichlor(*p*-cymol)ruthenium(II)-Dimer (15.2 mg, 0.03 mmol, 0.05 Äq.), Trifluoressigsäureanhydrid (7.51 ml, 54.1 mmol, 109 Äq.) und Trifluoressigsäure (114 μ L, 1.49 mmol, 3.00 Äq.). 2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-5-hydroxy-3,7-dimethoxy-8-methyl-4*H*chromen-4-on (**1q**) wurde als gelber Feststoff (15 mg, 0.04 mmol, 7 %) erhalten.

R _f	0.39 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 2/1 <i>v</i> / <i>v</i>).
Schmelzpunkt	226 °C.
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃)	δ 2.19 (s, 3 H), 3.88-3.96 (m, 6 H), 6.43 (s, 1 H), 6.99 (t,
	J = 7.8 Hz, 1 H), 7.70 (dd, J = 17.9, 8.0 Hz, 2 H), 8.12 (s,
	1 H), 12.34 (s, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃)	δ 7.7, 56.3, 62.4, 95.1, 104.3, 105.5, 113.9, 119.9, 121.8,
	129.3, 136.4, 137.7, 151.9, 154.2, 154.6, 160.4, 163.7,
	178.1.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 16.52 min, ≥ 99 % Reinheit.
HRMS (ESI) m/z	ber. für C ₁₈ H ₁₆ BrO ₆ : 407.0125, gef.: 407.0123.

2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-5-hydroxy-3-methoxy-4H-chromen-4-on (1r)



[361.98]

Die Synthese erfolgte gemäß der AAV 5 unter Verwendung von 2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3-methoxy-4H-chromen-4-on (7r) (600 mg, 1.73 mmol, 1.00 Äq.), Silbercarbonat (953 mg, 3.46 mmol, 2.00 Äq.), Selectfluor® (709 mg, 1.90 mmol, 1.10 Äq., 95.0 %), Dichlor(*p*-cymol)ruthenium(II)-Dimer 0.05 Äq.), (52.8 mg, 0.08 mmol, Trifluoressigsäureanhydrid (26.2 ml, 188 mmol, 109 Äq.) und Trifluoressigsäure (397 µL, 5.18 mmol, 3.00 Äq.). 2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-5-hydroxy-3-methoxy-4H-chromen-4-on (1r) wurde als gelber Feststoff (40 mg, 0.11 mmol, 6 %) erhalten.

R _f	0.72 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 2/1 <i>v</i> / <i>v</i>).
Schmelzpunkt	168 °C.
¹ H-NMR (600 MHz, CDCl ₃)	δ 3.92 (s, 3 H), 6.82 (dt, J = 8.2, 0.9 Hz, 1 H), 6.95 (dd,
	J = 8.5, 0.9 Hz, 1 H), 6.99 (t, $J = 7.9 Hz, 1 H), 7.55$ (t,
	J = 8.3 Hz, 1 H), 7.62 (dd, $J = 7.9$, 1.4 Hz, 1 H),
	7.72 - 7.76 (m, 1 H), 12.18 (s, 1 H).
¹³ C-NMR (125 MHz, CDCI ₃)	δ 62.1, 107.3, 111.1, 111.2, 113.5, 119.4, 121.7, 129.5,
	135.8, 136.4, 138.5, 151.7, 155.4, 156.0, 160.8, 178.8.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 14.83 min, 97.3 % Reinheit.
HRMS (ESI) m/z	ber. für C ₁₆ H ₁₁ BrO ₅ : 362.9863, gef.: 362.9867.

9.6.1.6. Darstellung der 5-substituierten 2-Phenyl-4H-chromen-4-one 9a-9f

1,3-Dioxoisoindolin-2-yltosylat (8)



C₁₅H₁₁NO₅S [317.04]

In einem ausgeheizten 250 mL SCHLENK-Kolben wurden unter Stickstoffatmosphäre *N*-Hydroxyphthalimid (3.26 g, 20.0 mmol, 1.00 Äq.) und *N*,*N*-Diisopropylethylamin (6.97 mL, 40.0 mmol, 2.00 Äq.) in 90 mL 1,4-Dioxan gelöst und unter Stickstoffgegenstrom portionsweise *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (4.19 g, 22.0 mmol, 1.10 Äq.) zugegeben. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur 1 h lang gerührt und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (*n*-Hexan/Ethylacetat 2/1 v/v) isoliert und 1,3-Dioxoisoindolin-2-yltosylat (**9**) als farbloser Feststoff (1.94 g, 6.10 mmol, 61 %) erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Publikation von TERENT'EV *et al.* überein.⁵⁰⁵

R _f	0.56 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 1/1 <i>v</i> / <i>v</i>).
Schmelzpunkt	161 °C (Lit. 161-162 °C). ⁵⁰⁵
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 2.46 (s, 3 H), 7.48 – 7.57 (m, 2 H), 7.87 – 7.97 (m, 6 H).
¹³ C-NMR (151 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 21.3, 124.1, 128.3, 129.3, 129.9, 130.4, 135.5, 147.2,
	161.5.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 13.94 min, ≥ 99 % Reinheit.

2-(2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4-oxo-4*H*-chromen-5-yl)isoindolin-1,3dion (9a)



Die Synthese erfolgte gemäß einer modifizierten Vorschrift von RAGHUVANSHI et al. 356 In einem ausgeheizten sekurierten 25 mL SCHLENK-Kolben wurden unter Stickstoffatmosphäre 2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4H-chromen-4-on (**7b**) (204 mg, 0.50 mmol, 1.00 Äq.), 1,3-Dioxoisoindolin-2-yltosylat (9) (190 mg, 0.60 mmol, 1.20 Äq.), Dichlor(p-cymol)ruthenium(II)-Dimer (30.6 mg, 0.05 mmol, 0.10 Äq.), Kupfer(II)acetat•H₂O (99.8 mg, 0.50 mmol, 1.00 Äq.) und Silberhexafluoroantimonat (51.5 mg, 0.15 mmol, 0.30 Äq.) in 2.0 mL trockenem 1,4-Dioxan suspendiert und bei 100 °C 24 h lang gerührt. Nach Abkühlen des Ansatzes wurde mit 20 mL Dichlormethan verdünnt und über wenig Kieselgel filtriert. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (*n*-Hexan/Ethylacetat 6/4 v/v) gereinigt. 2-(2-(3-Brom-2hydroxyphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4-oxo-4H-chromen-5-yl)isoindolin-1,3-dion (9a) wurde als gelber Feststoff (6 mg, 0.01 mmol, 2 %) erhalten.

R _f	0.70 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 2/1 <i>v</i> / <i>v</i>).
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃)	δ 3.75 (s, 3 H), 4.00 (s, 3 H), 4.02 (s, 3 H), 6.99 (s, 1 H),
	7.00 (t, J = 7.9 Hz, 1 H), 7.71 (dd, J = 8.0, 1.6 Hz, 1 H),
	7.74 (dd, <i>J</i> = 7.9, 1.6 Hz, 1 H), 7.81 (dd, <i>J</i> = 5.5, 3.1 Hz,
	2 H), 7.99 (dd, <i>J</i> = 5.5, 3.1 Hz, 2 H), 8.07 (s, 1 H).
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 14.26 min, ≥ 99 % Reinheit.

N-(2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4-oxo-4*H*-chromen-5-yl)-4methylbenzolsulfonamid (9b)



[575.02]

Die Synthese erfolgte gemäß einer modifizierten Vorschrift von CHOI et al.³⁵⁷ In einem ausgeheizten sekurierten 20 mL SCHLENK-Kolben wurden unter Stickstoffatmosphäre 2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4*H*-chromen-4-on 0.50 mmol, (**7b**) (204 mg, 1.20 Äq.), 1.00 Äq.), *p*-Toluolsulfonsäureazid (118 mg, 0.60 mmol, Bis(acetato- κO][(1,2,3,4,5,6-n)-1-methyl-4-(1-methylethyl)benzol]ruthenium (17.5 mg, 0.05 mmol, 0.10 Äq.) und Silberhexafluoroantimonat (34.4 mg, 0.1 mmol, 0.20 Äq.) in 3.5 mL trockenem 2,2,2-Trifluorethanol suspendiert und bei 80 °C 16 h lang gerührt. Nach Abkühlen des Ansatzes wurde mit 20 mL Ethylacetat verdünnt und über wenig Kieselgel filtriert. Das Lösemittel wurde vermindertem Druck entfernt und Rohprodukt unter das säulenchromatographisch (n-Hexan/Ethylacetat 2/1 v/v) gereinigt. N-(2-(3-Brom-2hydroxyphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4-oxo-4H-chromen-5-yl)-4-methylbenzolsulfonamid (**9b**) wurde als gelber Feststoff (110 mg, 0.19 mmol, 38 %) erhalten.

R _f	0.42 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 2/1 <i>v</i> / <i>v</i>).
Schmelzpunkt	215 °C.
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	$\delta2.40$ (s, 3 H), 3.85 (s, 3 H), 3.89 (s, 3 H), 3.99 (s, 3 H),
	7.00 (t, <i>J</i> = 7.9 Hz, 1 H), 7.27 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz, 2 H), 7.32 (s,
	1 H), 7.67 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz, 1 H), 7.76 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz, 1 H),
	7.83 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 2 H), 8.00 (s, 1 H), 12.12 (s, 1 H).
¹³ C-NMR (100 MHz, CDCl ₃)	δ 21.7, 56.7, 61.8, 62.2, 98.3, 106.5, 113.7, 119.3, 121.9,
	127.5, 129.4, 129.9, 132.0, 136.53, 136.55, 136.6, 138.7,
	144.3, 150.3, 151.9, 154.0, 157.5, 176.6.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 16.57 min, ≥ 99 % Reinheit.
HRMS (ESI) m/z	ber. für C ₂₅ H ₂₂ BrNO ₈ S: 576.0322, gef.: 576.0320.

5-Amino-2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4H-chromen-4-on (9c)



C₁₈H₁₆BrNO₆ [421.02]

Die Synthese erfolgte gemäß einer modifizierten Vorschrift von BHANUCHANDRA *et al.*⁵⁰⁶ In einem 50 mL Rundkolben wurde 22 mL konzentrierte Schwefelsäure vorgelegt und mit einem Eisbad auf 0 °C abgekühlt. *N*-(2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4-oxo-4*H*-chromen-5-yl)-4-methylbenzolsulfonamid (**9b**) (150 mg, 0.26 mmol, 1.00 Äq.) wurde hinzugegeben und die resultierende Suspension 20 min lang gerührt. Anschließend wurde die Lösung vorsichtig mit 50 mL gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung verdünnt und zusammen mit 100 mL Ethylacetat in einen Scheidetrichter überführt. Es wurde weitere gesättigte wässrige Natriumhydrogencarbonat-Lösung zugegeben, bis sich ein pH-Wert von 7 eingestellt hatte. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase mit Ethylacetat (2 x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde abfiltriert und mit 20 mL *n*-Hexan gewaschen. 5-Amino-2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**9c**) wurde als gelber Feststoff (95 mg, 0.23 mmol, 87 %) erhalten.

R _f	0.21 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 2/1 <i>v</i> / <i>v</i>).
Schmelzpunkt	86 °C.
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl₃)	δ 3.80 (s, 3 H), 3.87 (s, 3 H), 3.90 (s, 3 H), 6.02 (s, 1 H),
	6.42 (s, 2 H), 6.98 (t, J = 7.9 Hz, 1 H), 7.69 - 7.77 (m,
	2 H), 8.39 (s, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃)	δ 56.0, 61.6, 62.1, 93.0, 104.0, 113.5, 119.8, 121.5,
	127.0, 129.1, 136.0, 138.5, 147.0, 150.6, 151.7, 152.3,
	158.1, 176.0.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 12.88 min, 98.1 % Reinheit.
HRMS (ESI) <i>m/z</i>	ber. für C ₁₈ H ₁₇ BrNO ₆ : 422.0234, gef.: 422.0234.

N-(2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4-oxo-4H-chromen-5-yl)acetamid (9d)



 $C_{20}H_{18}BrNO_7$

[463.03]

In einem ausgeheizten sekurierten 20 mL SCHLENK-Kolben wurde 5-Amino-2-(3-Brom-2hydroxyphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**9c**) (38.8 mg, 0.09 mmol, 1.00 Äq.) in 1.0 mL trockenem Dichlormethan gelöst, Acetylchlorid (66.8 μ L, 0.92 mmol, 10.0 Äq.) tropfenweise zugegeben und der Ansatz bei Raumtemperatur 16 h lang gerührt. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 2 mL Tetrahydrofuran und 1 mL entmineralisiertem Wasser aufgenommen. Der Suspension wurde Lithiumhydroxid (22.0 mg, 0.92 mmol, 10.0 Äq.) zugegeben und bei Raumtemperatur 3 h lang gerührt. Anschließend wurde mit 10 mL entmineralisiertem Wasser verdünnt und mit 1 M wässriger Kaliumhydrogensulfat-Lösung auf einen pH-Wert von 2 eingestellt. Die wässrige Phase wurde mit Diethylether (3 x 15 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung (1 x 20 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. *N*-(2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4-oxo-4*H*chromen-5-yl)acetamid (**9d**) wurde als gelber Feststoff (30 mg, 0.06 mmol, 70 %) erhalten.

R _f	0.54 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 1/1 <i>v</i> / <i>v</i>).
Schmelzpunkt	240 °C.
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃)	$\delta2.31$ (s, 3 H), 3.90 (s, 3 H), 3.91 (s, 3 H), 4.03 (s, 4 H),
	7.03 (t, <i>J</i> = 7.9 Hz, 1 H), 7.76 (ddd, <i>J</i> = 11.3, 7.9, 1.6 Hz,
	2 H), 8.20 (bs, 1 H), 8.54 (s, 1 H), 12.45 (s, 1 H).
¹³ C-NMR (126 MHz, CDCI ₃)	δ 25.6, 56.5, 61.6, 62.1, 99.7, 106.0, 113.6, 119.2, 121.7,
	129.3, 131.5, 136.4, 137.5, 138.8, 150.1, 151.7, 153.6,
	157.7, 169.9, 176.6.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 13.29 min, ≥ 99 % Reinheit.
HRMS (ESI) m/z	ber. für C ₂₀ H ₁₉ BrNO ₇ : 464.0339, gef.: 464.0339.

N-(2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4-oxo-4*H*-chromen-5-yl)-2,2,2-trifluoracetamid (9e)



Die Synthese erfolgte gemäß einer Vorschrift von NACSA et al. 507 In einem ausgeheizten sekurierten SCHLENK-Kolben wurde 5-Amino-2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4H-chromen-4-on (9c) (40.5 mg, 0.10 mmol, 1.00 Äq.) in 1.0 mL trockenem Tetrahydrofuran gelöst und mittels Eisbad auf 0 °C abgekühlt. Trifluoressigsäureanhydrid (267 µL, 1.92 mmol, 20.0 Äq.) wurde tropfenweise über 30 Minuten zugegeben und das Eisbad entfernt. Der Ansatz wurde 2 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 5 mL Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wurde mit gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung (3 x 5 mL) und gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung (1 x 5 mL) gewaschen, mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Hochvakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 2.5 mL Ethylacetat aufgenommen und mit 2 mL gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung für 4 h kräftig gerührt. Die organische Phase wurde abgetrennt und mit entmineralisiertem Wasser (2 x 5 mL) und gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung (2 x 5 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Hochvakuum entfernt. N-(2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4-oxo-4H-chromen-5-yl)-2,2,2-trifluoracetamid (9e) wurde als gelber Feststoff (36 mg, 0.07 mmol, 72 %) erhalten.

R _f	0.33 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 4/1 <i>v</i> / <i>v</i>).
Schmelzpunkt	212 °C.
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃)	δ 3.91 (s, 3 H), 3.92 (s, 3 H), 4.04 (s, 3 H), 7.02 (t,
	J = 7.9 Hz, 1 H), 7.70 (dd, J = 8.0, 1.6 Hz, 1 H), 7.77 (dd,
	<i>J</i> = 7.9, 1.6 Hz, 1 H), 7.94 (s, 1 H), 8.43 (s, 1 H), 13.73 (s,
	1 H).
¹³ C-NMR (126 MHz, CDCl ₃)	δ 56.7, 61.7, 62.2, 101.2, 106.8, 113.6, 115.6 (q,
	$^{1}J_{C,F}$ = 288.3 Hz), 118.9, 121.8, 129.4, 133.4, 134.5,

	136.5,	139.0,	150.1,	151.7,	154.4,	155.9	(q,
	${}^{2}J_{C,F} = 38$	8.1 Hz), 1	157.4, 176	5.8.			
¹⁹ F-NMR (376 MHz, CDCl ₃)	δ - 76.19).					
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 16.70) min, ≥ 9	9 % Reir	heit.			
HRMS (ESI) <i>m</i> /z	ber. für	C ₂₀ H₁BrF	3NO7: 51	8.0057, g	ef.: 518.0	056.	

Methyl-3-(2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4-oxo-4*H*-chromen-5-yl)acrylat (9f)



Die Synthese erfolgte gemäß einer modifizierten Vorschrift von CHOI et al.³⁵⁷ In einem ausgeheizten sekurierten 20 mL SCHLENK-Kolben wurden unter Stickstoffatmosphäre 2-(3-Brom-2-hydroxyphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4*H*-chromen-4-on (**7b**) (40.7 mg, 0.10 mmol. 1.00 Äq.), Bis(acetato-κO)[(1,2,3,4,5,6-η)-1-methyl-4-(1-methylethyl)benzol]ruthenium (3.45 mg, 0.01 mmol, 0.10 Äq.), Silberhexafluorantimonat (6.87 mg, 0.02 mmol, 0.20 Äq.) und Kupfer(II)acetat (37.1 mg, 0.20 mmol, 2.00 Äq.) in 0.7 mL trockenem 2,2,2-Trifluorethanol suspendiert. Methylacrylat (27.3 µL, 0.30 mmol, 3.00 Äq.) wurde tropfenweise hinzugegeben und der Ansatz anschließend bei 80 °C 24 h lang gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (n-Hexan/Ethylacetat 4/1 v/v) gereinigt. Methyl-3-(2-(3-Brom-2hydroxyphenyl)-3,7,8-trimethoxy-4-oxo-4H-chromen-5-yl)acrylat (9f) wurde als gelber Feststoff (33 mg, 0.07 mmol, 67 %) erhalten.

R _f	0.65 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 1/1 <i>v</i> / <i>v</i>).
Schmelzpunkt	217 °C.
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃)	δ 4.02 (s, 3 H), 4.08 (s, 3 H), 4.14 (s, 3 H), 4.20 (s, 3 H),
	6.44 (d, J = 15.9 Hz, 1 H), 7.17 (t, J = 7.9 Hz, 1 H), 7.43
	(s, 1 H), 7.91 (ddd, <i>J</i> = 7.9, 6.2, 1.6 Hz, 2 H), 8.43 (s, 1 H),
	9.18 (d, <i>J</i> = 15.9 Hz, 1 H).
¹³ C-NMR (151 MHz, CDCl ₃)	δ 51.9, 56.6, 61.7, 64.8, 109.4, 113.7, 116.3, 119.5,
	121.1, 121.7, 129.2, 132.4, 136.3, 138.1, 139.9, 144.4,
	150.9, 151.8, 153.0, 155.6, 166.8, 174.6.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 14.95 min, 95.3 % Reinheit.
HRMS (ESI) <i>m/z</i>	ber. für C ₂₂ H ₂₀ BrNO ₈ : 491.0336, gef.: 491.0335.

9.6.2. Darstellung von (((2-(Hydroxy(3-phenylpropyl)amino)-2-oxoethyl)thio)-(phenyl)methyl)phosphonsäure (20)

2-(((Diethoxyphosphoryl)(phenyl)methyl)thio)essigsäure (13)



[318.07]

In einem 100 mL Rundkolben wurde Diethylbenzylphosphonat (5.71 mg, 25.0 mmol, 1.00 Äg.) in 50 mL trockenem Tetrahydrofuran unter Stickstoffatmosphäre gelöst und auf -78 °C abgekühlt. Die Lösung wurde tropfenweise mit 1.6 M n-Butyllithium-Lösung in n-Hexan (17.2 mL, 27.5 mmol, 1.10 Äq.) versetzt und bei -78 °C 5 min lang gerührt. Anschließend wurde unter Stickstoffgegenstrom gepulverter elementarer Schwefel S₈ (802 mg, 3.13 mmol, 0.125 Äq.) zugegeben. Die Suspension wurde über einen Zeitraum von 2 h auf 0 °C erwärmt. 25.0 mmol, 1.00 Äq.) Wasserfreies Kaliumcarbonat (3.46 g, wurde zugegeben, Trimethylsilylbromoacetat (6.70 mL, 39.9 mmol, 1.60 Äq.) zugetropft und bei 0 °C 15 min lang gerührt. Die Reaktion wurde mit 50 mL Wasser und 5 mL gesättigter wässriger Natriumcarbonat-Lösung versetzt und die organische Phase separiert. Die wässrige Phase wurde mit Dichlormethan (2 x 50 mL) gewaschen. Anschließend wurde die wässrige Phase mit 1 M Salzsäure auf einen pH-Wert von 2 eingestellt und mit Dichlormethan (3 x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. 2-(((Diethoxyphosphoryl)(phenyl) methyl)thio)essigsäure (13) wurde als farbloses Öl (4.57 g. 14.4 mmol, 57 %) erhalten.

R _f	0.43 (Dichlormethan/Methanol 20/1 v/v + 0.1 % Ameisen-
	säure).
¹ H-NMR (300 MHz, CD₃OD)	δ 1.13 (td, J = 7.0, 0.7 Hz, 3 H), 1.32 (td, J = 7.1, 0.6 Hz,
	3 H), 3.08 (d, J = 15.2 Hz, 1 H), 3.32 (dd, J = 15.2,
	2.8 Hz, 1 H), 3.77 – 4.28 (m, 4 H), 4.53 (d, J = 20.5 Hz,
	1H), 7.26 – 7.52 (m, 5 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CD ₃ OD)	δ 16.5 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 5.9 Hz), 16.7 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 6.0 Hz), 33.8 (d,
	$^{3}J_{C,P}$ = 7.3 Hz), 46.0 (d, $^{1}J_{C,P}$ = 146.3 Hz), 64.8 (d,
	$^{2}J_{C,P}$ = 7.3 Hz), 64.9 (d, $^{3}J_{C,P}$ = 6.7 Hz), 129.3 (d,

	$J^* = 2.7$ Hz), 129.6 (d, $J^1 = 2.1$ Hz), 130.8 (d, $J^* = 6.4$ Hz),
	135.8 (d, ³ J _{C,P} = 5.1 Hz), 173.0.
³¹ P-NMR (121 MHz, CD ₃ OD)	δ22.11.
HPLC (Methode A, 220 nm)	t _R : 9.15 min, 95.8 % Reinheit.

¹ Die Kohlenstoffkerne und somit auch die Kopplungskonstanten konnten trotz Durchführung von HSQC, HMBC, COSY und NOESY-Experimenten nicht zugeordnet werden.

tert-Butyl-(benzyloxy)carbamat (15)



[223.12]

Die Synthese erfolgte gemäß einer Vorschrift von PFLIEGER *et al.*⁵⁰⁸ In einem 100 mL Rundkolben wurde O-Benzylhydroxylamin (5.85, 47.5 mmol, 1.00 Äq.) in 50 mL Ethanol gelöst und Triethylamin (7.29 mL, 52.3 mmol, 1.10 Äq.) tropfenweise hinzugegeben. Di-*tert*-Butyldicarbonat (11.4 g, 52.3 mmol, 1.10 Äq.) wurde portionsweise hinzugefügt und die Reaktion bei Raumtemperatur 16 h lang gerührt. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, das Rohprodukt mittels Flash-Säulenchromatographie (*n*-Hexan/Ethylacetat 10/1 *v*/*v*) gereinigt und *tert*-Butyl-(benzyloxy)carbamat (**15**) als farbloser Feststoff (10.0 g, 44.8 mmol, 94 %) erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Publikation von PFLIEGER *et al.* überein.⁵⁰⁸

R _f	0.32 (Cyclohexan/Ethylacetat 10/1 v/v).
Schmelzpunkt	46 °C (Lit. 45-47°C) ⁵⁰⁹
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃)	δ 1.48 (s, 9 H), 4.86 (s, 2 H), 7.07 (s, 1 H), 7.30 – 7.46 (m,
	5 H).
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 12.28 min, 99.0 % Reinheit.

tert-Butyl-(benzyloxy)(3-phenylpropyl)carbamat (16)



Die Synthese erfolgte gemäß einer Vorschrift von ABDULLAZIZ *et al.*²³⁴ In einem 100 mL Rundkolben wurde *tert*-Butyl-(benzyloxy)carbamat (**15**) (6.60 g, 29.6 mmol, 1.00 Äq.) unter Stickstoffatmosphäre in 40 mL wasserfreiem Tetrahydrofuran gelöst, mittels Eisbad auf 0 °C gekühlt und mit Natriumhydrid (60 % Dispersion in Mineralöl, 1.18 g, 29.6 mmol, 1.00 Äq.) versetzt. Nachdem die Gasbildung beendet war, wurde 1-Brom-3-Phenylpropan (4.49 mL, 29.6 mmol, 1.00 Äq.) tropfenweise zugegeben und bei Raumtemperatur 16 h lang gerührt. Die organische Phase wurde mit Wasser (3 x 50 mL) gewaschen, mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Säulenchromatographie (*n*-Hexan/Ethylacetat 20/1 *v/v*) gereinigt und *tert*-Butyl-(benzyloxy)(3-phenylpropyl)carbamat (**16**) als farbloses Öl (8.31 g, 24.3 mmol, 82 %) erhalten.

58 (Cyclohexan/Ethylacetat 10/1 <i>v/v</i>).
1.53 (s, 9 H), 1.97 (tt, <i>J</i> = 9.3, 6.8 Hz, 2 H), 2.60 – 2.72
, 2 H), 3.43 – 3.52 (m, 2 H), 4.86 (s, 2 H), 7.16 – 7.48
, 10 H).
20.99 min, ≥ 99 % Reinheit.

O-Benzyl-N-(3-phenylpropyl)hydroxylamin•HCl (17)



 $C_{16}H_{20}CINO$

[277.13]

Die Synthese erfolgte gemäß einer Vorschrift von ABDULLAZIZ *et al.*²³⁴ In einem 250 mL Rundkolben wurde *tert*-Butyl-(benzyloxy)(3-phenylpropyl)carbamat (**16**) (8.37 g, 24.5 mmol, 1.00 Äq.) in 50 mL Diethylether gelöst und 4 M Salzsäure in Dioxan (73.5 mL, 245 mmol, 10.0 Äq.) zugegeben. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur 16 h lang gerührt. Das Präzipitat wurde abfiltriert und im Hochvakuum getrocknet. *O*-Benzyl-*N*-(3-phenylpropyl)hydroxylamin•HCI (**17**) wurde als farbloser Feststoff (5.80 g, 24.0 mmol, 99 %) erhalten.

R _f	0.46 (Cyclohexan/Ethylacetat 1/1 v/v + 0.1 % Et ₃ N).
Schmelzpunkt	130°C.
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 1.89 – 2.05 (m, 2 H), 2.69 (t, J = 7.7 Hz, 2 H),
	$3.15-3.26~(m,\;2\;H),\;5.14~(s,\;2\;H),\;7.15-7.26~(m,\;3\;H),$
	7.26-7.37 (m, 2 H), $7.37-7.48$ (m, 5 H), 12.27 (s, 2 H).
HPLC (Methode A, 220 nm)	t _R : 10.19 min, ≥ 99 % Reinheit.

tert-Butyl ((tert-butoxycarbonyl)oxy)carbamat (15a)



[233.13]

Die Synthese erfolgte gemäß einer Vorschrift von STASZAK und DOECKE.⁵¹⁰ In einem 500 mL Rundkolben wurden Di-*tert*-butyldicarbonat (7.95 g, 34.6 mmol, 2.00 Äq.) und Triethylamin (5.00 mL, 36.3 mmol, 2.10 Äq.) in 120 mL Cyclohexan/Methyl-*tert*-butylether (5:1 *v/v*) gelöst und mittels Eisbad auf 0 °C gekühlt. Hydroxylamin•HCI (1.20 g, 17.3 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 120 mL entmineralisiertem Wasser gelöst und auf 0 °C abkühlt. Zu dieser Lösung wurde die Di-*tert*-butyldicarbonat-Lösung über 45 Minuten zugetropft und bei 0 °C weitere 6 h lang stark gerührt. Die organische Phase wurde abgetrennt und mit gesättigter wässriger Ammoniumchlorid-Lösung (2 x 50 mL) und gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung (1 x 50 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde in 30 mL kaltem Petrolether im Ultraschallbad für 10 min suspendiert, der Feststoff abfiltriert und im Hochvakuum getrocknet. *tert*-Butyl ((*tert*-butoxycarbonyl)oxy)carbamat (**15a**) wurde als farbloser Feststoff (3.19 g, 13.7 mmol, 79 %) erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Publikation von STASZAK und DOECKE überein.⁵¹⁰

R _f	0.40 (Cyclohexan/Ethylacetat 1/1 v/v).
Schmelzpunkt	67 °C (Lit. 67-68 °C). ⁵¹⁰
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 1.41 (s, 9 H), 1.45 (s, 9 H), 10.68 (bs, 1 H).

N-(3-Phenylpropyl)hydroxylamin (17a)



Die Synthese erfolgte gemäß einer modifizierten Vorschrift von ABDULLAZIZ *et al.*²³⁴ In einem 50 mL Rundkolben wurde *tert*-Butyl ((*tert*-butoxycarbonyl)oxy)carbamat (**15a**) (3.20 g, 13.7 mmol, 1.00 Äq.) in 10 mL trockenem *N*,*N*-Dimethylformamid unter Stickstoffatmosphäre gelöst, im Eisbad auf 0 °C abgekühlt und mit Natriumhydrid (548 mg, 13.7 mmol, 1.00 Äq.) versetzt. Der Ansatz wurde bei 0 °C 15 min lang gerührt. Anschließend wurde 1-Brom-Phenylpropan (2.08 mL, 13.7 mmol, 1.00 Äq.) tropfenweise hinzugegeben und 16 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 10 mL Tetrahydrofuran aufgenommen. Die Lösung wurde im Eisbad auf 0 °C gekühlt und tropfenweise mit 4 M Salzsäure in 1,4-Dioxan (17.1 mL, 68.5 mmol, 5.00 Äq) versetzt. Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Säulenchromatographie (Cyclohexan \rightarrow Cyclohexan/Ethylacetat 1/1 *v*/*v*) isoliert und *N*-(3-Phenylpropyl)hydroxylamin (**17a**) als farbloser Feststoff (1.30 g, 8.60 mmol, 63 %) erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Publikation von SHIINO *et al.* überein.⁵¹¹

0.31 (Cyclohexan/Ethylacetat 1/1 v/v).
38-39 °C (Lit. 42-43 °C). ⁵¹¹
δ 1.91 (dtd, J = 9.2, 7.6, 6.4 Hz, 2 H), 2.70 (dd, J = 8.5,
$6.9 \text{ Hz}, \ 2 \text{ H}), \ 2.94 - 3.05 \ (m, \ 2 \text{ H}), \ 5.60 \ (s, \ 2 \text{ H}),$
7.15 – 7.37 (m, 5 H).
δ 28.7, 33.4, 53.4, 126.0, 128.5, 128.5, 141.9.

Diethyl (((2-((benzyloxy)(3-phenylpropyl)amino)-2-oxoethyl)thio)(phenyl)methyl)phos phonat (18)



 $C_{29}H_{36}NO_5PS$

[541.21]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 10** unter Verwendung von 2-(((Diethoxyphosphoryl) (phenyl)methyl)thio)essigsäure (**13**) (315 mg, 0.99 mmol, 1.00 Äq.), *O*-Benzyl-*N*-(3-phenyl propyl)hydroxylamin•HCl (300 mg, 1.09 mmol, 1.10 Äq.) und 1,1'-Carbonyldiimidazol (241 mg, 1.48 mmol, 1.50 Äq.) in 4 mL Tetrahydrofuran. Diethyl (((2-((benzyloxy)(3-phenylpropyl) amino)-2-oxoethyl)thio)(phenyl)methyl)phosphonat (**18**) wurde als farbloses Öl (450 mg, 0.83 mmol, 84 %) erhalten.

R _f	0.29 (Cyclohexan/Ethylacetat 1/1 v/v).
¹ H-NMR (300 MHz, CD ₃ OD)	δ 1.11 (t, J = 7.1 Hz, 3 H), 1.27 (t, J = 7.1 Hz, 3 H), 1.92
	(p, $J = 7.3$ Hz, 2 H), $2.55 - 2.66$ (m, 2 H), 3.16 (d,
	J = 14.5 Hz, 1 H), 3.45 (dd, J = 14.5, 2.6 Hz, 1 H), 3.69
	(s, 2 H), $3.72 - 4.04$ (m, 2 H), $4.04 - 4.20$ (m, 2 H), 4.53
	(d, J = 20.7 Hz, 1 H), 4.74 – 4.86 (m, 2 H), 7.12 – 7.50
	(m, 15 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CD ₃ OD)	δ 16.5 (d, ${}^3\!J_{\rm C,P}$ = 5.7 Hz), 16.7 (d, ${}^3\!J_{\rm C,P}$ = 5.7 Hz), 29.5,
	32.8, 33.9 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 2.8 Hz), 45.8, 46. (d,
	$^{1}J_{C,P}$ = 147.1 Hz), 64.8 (d, $^{2}J_{C,P}$ = 7.1 Hz), 64.9 (d,
	$^{2}J_{\mathrm{C,P}}$ = 7.0 Hz), 77.3, 127.0, 129.2, 129.43, 129.44, 129.5,
	129.6, 129.8, 130.1, 130.7 (d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 3.6 Hz), 130.8,
	142.7, 172.1.
³¹ P-NMR (121 MHz, CD ₃ OD)	δ22.14.
HPLC (Methode A, 220 nm)	t _R : 16.84 min, 95.5 % Reinheit.
Diethyl (((2-(hydroxy(3-phenylpropyl)amino)-2-oxoethyl)thio)(phenyl)methyl)phosphonat (19)



 $C_{22}H_{30}NO_5PS$

[451.16]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 10** unter Verwendung von 2-(((Diethoxyphosphoryl)(phenyl)methyl)thio)essigsäure (**13**) (796 mg, 2.50 mmol, 1.00 Äq.), *N*-(3-Phenylpropyl)hydroxylamin (378 mg, 2.50 mmol, 1.00 Äq.) und 1,1'-Carbonyldiimidazol (608 mg, 3.75 mmol, 1.50 Äq.) in 5 mL Tetrahydrofuran. Diethyl (((2-(hydroxy(3-phenylpropyl)amino)-2-oxoethyl)thio)(phenyl)methyl)phosphonat (**19**) wurde als farbloses Öl (550 mg, 1.22 mmol, 49 %) erhalten.

R _f	0.51 (Dichlormethan/Methanol 20/1 <i>v</i> / <i>v</i>).
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃)	δ 1.17 (t, J = 7.1 Hz, 3 H), 1.22 (t, J = 7.1 Hz, 3 H), 1.99
	(q, J = 7.5 Hz, 2 H), 2.66 (t, J = 7.9 Hz, 2 H), 3.31 (d,
	<i>J</i> = 14.0 Hz, 1 H), 3.69 (hept, <i>J</i> = 6.9 Hz, 2 H), 3.80 (dd,
	J = 14.0, 2.1 Hz, 1 H), 3.93 – 4.05 (m, 2 H), 4.06 – 4.13
	(m, 2 H), 4.26 (d, J = 17.9 Hz, 1 H) 7.17 (t, J = 7.2 Hz,
	1 H), 7.19 – 7.22 (m, 2 H), 7.25 – 7.28 (m, 3 H), 7.32 (t,
	J = 7.4 Hz, 2 H), 7.40 (dd, J = 7.2, 1.8 Hz, 2 H), 9.40 (s,
	1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃)	δ 16.4 (t, ${}^{3}J_{C,P}$ = 4.5 Hz), 28.5, 32.3 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 2.4 Hz),
	33.1, 44.3, 46.2, 47.9, 63.8 (d, $^2J_{\text{C},\text{P}}$ = 7.9 Hz), 64.5 (d,
	$^{2}J_{C,P}$ = 8.2 Hz), 126.0, 128.2, 128.5, 128.5, 128.7 (d,
	$J^2 = 1.8$ Hz), 129.4 (d, $J^* = 6.8$ Hz), 134.8 (d,
	² J _{C,P} = 4.2 Hz), 141.8, 169.7.
³¹ P-NMR (121 MHz, CDCl ₃)	δ 21.74 .
HPLC (Methode A, 220 nm)	t _R : 12.87 min, 96.8 % Reinheit.

² Die Kohlenstoffkerne und somit auch die Kopplungskonstanten konnten trotz Durchführung von HSQC, HMBC, COSY und NOESY-Experimenten nicht zugeordnet werden.

(((2-(Hydroxy(3-phenylpropyl)amino)-2-oxoethyl)thio)(phenyl)methyl)phosphonsäure (20)



 $C_{18}H_{22}NO_5PS$

[395.10]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 11** aus Diethyl (((2-(hydroxy(3-phenylpropyl)amino)-2oxoethyl)thio)(phenyl)methyl)phosphonat (**19**) (160 mg, 0.35 mmol, 1.00 Äq.) und Trimethylsilylbromid (482 µL, 3.54 mmol, 10.0 Äq.) in 3 mL trockenem Dichlormethan. Das Rohprodukt wurde mit der **Aufreinigungsmethode I** gereinigt und (((2-(Hydroxy(3phenylpropyl)amino)-2-oxoethyl)thio)(phenyl)methyl)phosphonsäure (**20**) als farbloser Feststoff (60 mg, 0.15 mmol, 43 %) erhalten.

Schmelzpunkt	138 °C.
¹ H NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 1.75 – 1.82 (m, 2 H), 2.53 (dd, J = 8.7, 6.8 Hz, 2 H),
	3.28 (s, 1 H), 3.43 – 3.55 (m, 3 H), 4.21 – 4.29 (m, 1 H),
	7.14 – 7.24 (m, 4 H), 7.28 (dt, <i>J</i> = 12.0, 7.5 Hz, 4 H), 7.39
	(dt, <i>J</i> = 8.1, 1.6 Hz, 2 H), 9.86 (s, 1 H).
¹³ C-NMR (151 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 26.3, 32.2, 32.3 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 6.6 Hz), 45.8 (d,
	${}^{1}\!J_{\rm C,P}$ = 139.2 Hz), 47.0, 125.7, 126.8, 127.9, 128.3, 128.3,
	129.3 (d, $J^*_{C,P}$ = 6.0 Hz), 137.5 (d, $J^3_{C,P}$ = 3.9 Hz), 141.6,
	168.9.
³¹ P-NMR (243 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ17.34.
HPLC (Methode A, 220 nm)	t _R : 9.69 min, ≥ 99 % Reinheit.
HRMS (ESI) m/z	ber. für C ₁₈ H ₂₃ NO ₅ PS: 396.1029, gef.: 396.1030.

³ Die Kohlenstoffkerne und somit auch die Kopplungskonstanten konnten trotz Durchführung von HSQC, HMBC, COSY und NOESY-Experimenten nicht zugeordnet werden.

9.6.3. Darstellung der α -(Alkoxyphenyl)- β -thia-isosteren Fosmidomycin Analoga

9.6.3.1. Darstellung der Alkoxybenzaldehyde 21d-g

3-(Hexyloxy)benzaldehyd (21d)



 $C_{13}H_{18}O_2$

[206.13]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 6** unter Verwendung von 3-Hydroxybenzaldehyd (6.23 g, 51.0 mmol, 1.00 Äq.), 1-Bromhexan (7.16 mL, 51.0 mmol, 1.00 Äq.) und Kaliumcarbonat (14.1 g, 102 mmol, 2.00 Äq.) in 104 mL Acetonitril. 3-(Hexyloxy)benzaldehyd (**21d**) wurde als farbloses Öl (9.10 g, 44.1 mmol, 87 %) erhalten.

R _f	0.58 (Cyclohexan/Ethylacetat 10/1 v/v).
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	$\delta0.83-0.98$ (m, 3 H), 1.29 – 1.37 (m, 4 H), 1.36 – 1.52
	(m, 2 H), 1.71 – 1.86 (m, 2 H), 3.99 (t, <i>J</i> = 6.6 Hz, 2 H),
	7.11-7.19(m,1H),7.35-7.38(m,1H),7.40-7.45(m,
	2 H), 9.95 (s, 1 H).
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 18.14 min, ≥ 99 % Reinheit.

4-(Hexyloxy)benzaldehyd (21e)



Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 6** unter Verwendung von 4-Hydroxybenzaldehyd (6.23 g, 51.0 mmol, 1.00 Äq.), 1-Bromhexan (7.16 mL, 51.0 mmol, 1.00 Äq.) und Kaliumcarbonat (14.1 g, 102 mmol, 2.00 Äq.) in 104 mL Acetonitril. 4-(Hexyloxy)benzaldehyd (**21e**) wurde als farbloses Öl (10.3 g, 49.9 mmol, 98 %) erhalten.

R _f	0.46 (Cyclohexan/Ethylacetat 10/1 v/v).
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃)	δ 0.83 (td, J = 6.1, 2.8 Hz, 3 H), 1.27 (dq, J = 7.0, 3.4 Hz,
	4 H), $1.34 - 1.47$ (m, 2 H), $1.66 - 1.81$ (m, 2 H), 3.96 (t,
	J = 6.6 Hz, 2 H), $6.86 - 6.96$ (m, 2 H), $7.69 - 7.81$ (m,
	2 H), 9.80 (s, 1 H).
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 17.50 min, 98.0 % Reinheit.





 $C_{21}H_{21}NO_4$

[351.15]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 6** unter Verwendung von 3-Hydroxybenzaldehyd (9.77 g, 80.0 mmol, 1.00 Äq.), *N*-(6-Bromhexyl)phthalimid (24.8 g, 80.0 mmol, 1.00 Äq.) und Kaliumcarbonat (22.1 g, 160 mmol, 2.00 Äq.) in 160 mL Acetonitril. 3-((6-(1,3-Dioxoisoindolin-2-yl)hexyl)oxy)benzaldehyd (**21f**) wurde als farbloser Feststoff (23.8 g, 67.6 mmol, 84 %) erhalten.

R _f	0.33 (Cyclohexan/Ethylacetat 5/1 v/v).
Schmelzpunkt	75 °C.
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃)	δ 1.36 – 1.90 (m, 7 H), 3.72 (t, J = 7.2 Hz, 2 H), 4.02 (t,
	J = 6.4 Hz, 2 H), 7.11 – 7.23 (m, 1 H), 7.34 – 7.40 (m,
	1 H), 7.42 – 7.48 (m, 2 H), 7.72 (dd, <i>J</i> = 5,5, 3.0 Hz, 2 H),
	7.86 (dd, <i>J</i> = 5,4, 3.1 Hz, 2 H), 9.98 (s, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃)	$25.6,\ 26.6,\ 28.5,\ 29.0,\ 37.9,\ 68.1,\ 112.9,\ 121.9,\ 123.19,$
	123.2n, 130.0, 132.2, 133.9, 137.8, 159.6, 168.5, 192.2.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 15.90 min, ≥ 99 % Reinheit.





 $C_{21}H_{21}NO_4$

[351.15]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 6** unter Verwendung von 4-Hydroxybenzaldehyd (2.68 g, 21.9 mmol, 1.00 Äq.), *N*-(6-Bromhexyl)phthalimid (6.80 g, 21.9 mmol, 1.00 Äq.) und Kaliumcarbonat (6.06 g, 43.8 mmol, 2.00 Äq.) in 120 mL Acetonitril. 4-((6-(1,3-Dioxoisoindolin-2-yl)hexyl)oxy)benzaldehyd (**21g**) wurde als farbloser Feststoff (6.93 g, 19.7 mmol, 90 %) erhalten.

R _f	0.25 (Cyclohexan/Ethylacetat 5/1 v/v).
Schmelzpunkt	85 °C.
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃)	δ 1.38 – 1.61 (m, 4 H), 1.73 (q, J = 7.3 Hz, 2 H), 1.82 (dt,
	J = 8.1, 6.4 Hz, 2 H), 3.72 (t, $J = 7.2$ Hz, 2 H), 4.05 (t,
	J = 6.4 Hz, 2 H), $6.97 - 7.01$ (m, 2 H), 7.73 (dd, $J = 5.5$,
	3.1 Hz, 2 H), 7.79 – 7.90 (m, 4 H), 9.89 (s, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃)	25.6, 26.5, 28.5, 28.9, 37.9, 68.2, 114.7, 123.2, 129.8,
	132.0, 132.1, 133.9, 164.2, 168.5, 190.8.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 15.65 min, 98.0 % Reinheit.

9.6.3.2. Darstellung der Diethyl (hydroxy(phenyl)methyl)phosphonate 22a-e

Diethyl (hydroxy(phenyl)methyl)phosphonat (22a)



Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 7** unter Verwendung von Benzaldehyd (2.65 g, 25.0 mmol, 1.00 Äq.), Diethylphosphonat (3.45 g, 25.0 mmol, 1.00 Äq.) und Magnesiumoxid (1.01 g, 25.0 mmol, 1.00 Äq.). Das Rohprodukt wurde aus Cyclohexan/Ethanol umkristallisiert. Diethyl (hydroxy(phenyl)methyl)phosphonat (**22a**) wurde als farbloser Feststoff (6.07 g, 24.9 mmol, 99 %) erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Publikation von SARDARIAN *et al.* überein.⁴²⁵

R _f	0.45 (Dichlormethan/Methanol 20/1 v/v).
Schmelzpunkt	76 °C (Lit. 75-77 °C). ⁴²⁵
¹ H-NMR (300 MHz, CD ₃ OD)	δ 1.25 (dt, J = 10.4, 7.1 Hz, 6 H), 4.05 – 3.88 (m, 1 H),
	4.16 - 3.99 (m, 3 H), 5.00 (d, J = 13.1 Hz, 1 H),
	7.25 – 7.42 (m, 3 H), 7.49 (dt, <i>J</i> = 8.1, 2.1 Hz, 2 H).
HPLC (Methode A, 220 nm)	t_R : 7.90 min, ≥ 99 % Reinheit.





[344.18]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 7** unter Verwendung von 3-(Hexyloxy)benzaldehyd (**21d**) (9.52 g, 46.2 mmol, 1.00 Äq.), Diethylphosphonat (5.95 mL, 46.2 mmol, 1.00 Äq.) und Magnesiumoxid (1.86 g, 46.2 mmol, 1.00 Äq.). Diethyl ((3-(hexyloxy)phenyl)(hydroxy)methyl) phosphonat (**22b**) wurde als farbloser Feststoff (11.1 g, 32.2 mmol, 70 %) erhalten.

R _f	0.51 (Dichlormethan/Methanol 20/1 v/v).
Schmelzpunkt	56 °C.
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃)	δ 0.85 – 0.98 (m, 3 H), 1.23 (t, J = 7.1 Hz, 3 H), 1.28 (t,
	J = 7.1 Hz, 3 H), 1.31 – 1.39 (m, 4 H), 1.39 – 1.52 (m,
	2 H), 1.69 – 1.85 (m, 2 H), 3.96 (t, J = 6.6 Hz, 2 H),
	3.99 – 4.16 (m, 4 H), 4.47 (dd, <i>J</i> = 8.9, 5.6 Hz, 1 H), 4.99
	(dd, $J = 11.1$, 5.3 Hz, 1 H), 6.78 – 6.89 (m, 1 H),
	6.96 – 7.03 (m, 1 H), 7.03 - 7.08 (m, 1 H), 7.20 – 7.28 (m,
	1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃)	δ 14.0, 16.3 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 2.5 Hz), 16.4 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 2.7 Hz),
	22.6, 25.7, 29.2, 31.6, 63.1 (d, $^2\!J_{\text{C},\text{P}}$ = 7.3 Hz), 63.4 (d,
	${}^{3}J_{C,P}$ = 7.1 Hz), 70.8 (d, ${}^{1}J_{C,P}$ = 158.8 Hz), 113.0 (d,
	${}^{3}J_{C,P} = 5.7 \text{ Hz}$, 114.5 (d, ${}^{5}J_{C,P} = 3.1 \text{ Hz}$), 119.3 (d,
	${}^{3}J_{C,P} = 5.9 \text{ Hz}$, 129.1 (d, ${}^{4}J_{C,P} = 2.5 \text{ Hz}$), 138.1 (d,
	${}^{2}J_{C,P}$ = 1.9 Hz), 159.1 (d, ${}^{4}J_{C,P}$ = 2.6 Hz).
³¹ P-NMR (121 MHz, CDCl ₃)	δ21.40.
HPLC (Methode A, 220 nm)	t _R : 14.26 min, 98.1 % Reinheit.





[344.18]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 7** unter Verwendung von 4-(Hexyloxy)benzaldehyd (**21e**) (10.3 g, 49.9 mmol, 1.00 Äq.), Diethylphosphonat (6.43 mL, 49.9 mmol, 1.00 Äq.) und Magnesiumoxid (2.01 g, 49.9 mmol, 1.00 Äq.). Diethyl ((4-(hexyloxy)phenyl)(hydroxy)methyl) phosphonat (**22c**) wurde als farbloses Öl (16.4 g, 47.5 mmol, 95 %) erhalten.

R _f	0.49 (Dichlormethan/Methanol 20/1 <i>v/v</i>).
¹ H-NMR (300 MHz, CD ₃ OD)	δ 0.92 (td, J = 3.3, 6.0 Hz, 3 H), 1.23 (t, J = 7.1 Hz, 3 H),
	1.29 (t, <i>J</i> = 7.1 Hz, 3 H), 1.31 – 1.37 (m, 4 H), 1.38 – 1.55
	(m, 2H), 1.79 (dq, J = 6.6, 8.2 Hz, 2 H), 3.96 (t,
	J = 6.6 Hz, 2 H, 3.87 - 4.17 (m, 4 H), 4.95 (d,
	J = 10.0 Hz, 1 H), 6.84 – 6.95 (m, 2 H), 7.35 – 7.47 (m,
	2 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃)	δ 14.0, 16.4 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 3.0 Hz), 16.4 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 3.0 Hz),
	22.6, 25.7, 29.2, 31.6, 63.0 (d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 7.4 Hz), 63.2 (d,
	$^{2}J_{C,P}$ = 7.0 Hz), 68.0, 70.4 (d, $^{1}J_{C,P}$ = 161.0 Hz), 114.3 (d,
	${}^{4}J_{C,P}$ = 2.3 Hz), 128.3 (d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 2.0 Hz), 128.4 (d,
	${}^{3}J_{C,P}$ = 6.1 Hz), 159.1 (d, ${}^{5}J_{C,P}$ = 2.8 Hz).
³¹ P-NMR (121 MHz, CDCl ₃)	δ21.70.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 14.34 min, 96.0 % Reinheit.
EI + MS (70 eV, <i>m/z</i> (%))	344 ([$C_{17}H_{29}O_5P$] ⁺ , 14), 207 ([$C_{13}H_{19}O_2$] ⁺ , 100), 205 (35),
	138 ([C ₄ H ₁₀ O ₃ P]+, 34), 123 (77), 122 ([C ₇ H ₆ O ₂]+, 11), 121
	(70), 111 (28), 99 (10), 95 (18), 83 (13), 82 (11), 65 (10).

Diethyl)phenyl)(hydroxy)methyl)phosphonat (22d)



C₂₅H₃₂NO₇P

[489.19]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 7** unter Verwendung von 3-((6-(1,3-Dioxoisoindolin-2yl)hexyl)oxy)benzaldehyd (**21e**) (23.80 g, 67.6 mmol, 1.00 Äq.), Diethylphosphonat (9.33 g, 67.6 mmol, 1.00 Äq.) und Magnesiumoxid (2.72 g, 67.6 mmol, 1.00 Äq.). Diethyl ((3-((6-(1,3dioxoisoindolin-2-yl)hexyl)oxy)phenyl)droxy)methyl)phosphonat (**22d**) wurde als farbloser Feststoff (33.1 g, 67.6 mmol, 99 %) erhalten.

R _f	0.46 (Dichlormethan/Methanol 20/1 v/v).
Schmelzpunkt	113 °C.
¹ H-NMR (300 MHz, CD ₃ OD)	δ 1.24 (t, J = 7.1 Hz, 4 H), 1.28 (t, J = 7.0 Hz, 2 H),
	$1.32-1.61 \ (m,\ 4\ H),\ 1.62-1.84 \ (m,\ 4\ H),\ 3.67 \ (t,$
	J = 7.1 Hz, 2 H), $3.88 - 4.16$ (m, 6 H), 4.85 (s, 1 H), 4.97
	(d, $J = 13.0$ Hz, 1 H), $6.78 - 6.88$ (m, 1 H), 7.02 (dd,
	J = 7,3, 2.3 Hz, 1 H), 7.06 (q, $J = 2.2$ Hz, 1 H), 7.22 (dt,
	1 H), 7.72 – 7.90 (m, 4 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CD ₃ OD)	δ 16.8 (t, ${}^{3}J_{\rm C,P}$ = 5.3 Hz), 26.8, 27.7, 29.5, 30.2, 38.7, 64.3
	(d, $^2J_{\text{C},\text{P}}$ = 7.2 Hz), 64.6 (d, $^2J_{\text{C},\text{P}}$ = 7.5 Hz), 68.9, 71.4 (d,
	$^{1}J_{C,P}$ = 165.2 Hz), 114.6 (d, $^{3}J_{C,P}$ = 6.0 Hz), 115.5 (d,
	${}^{5}\!J_{\rm C,P}$ = 3.1 Hz), 120.8 (d, ${}^{3}\!J_{\rm C,P}$ = 6.2 Hz), 124.1, 130.2 (d,
	$^{4}J_{C,P}$ = 2.5 Hz), 133.4, 135.3, 140.1 (d, $^{2}J_{C,P}$ = 1.4 Hz),
	160.5 (d, ⁴ J _{C,P} = 2.5 Hz), 169.9.
³¹ P-NMR (121 MHz, CD ₃ OD)	δ 22.06 .
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 13.20 min, 97.2 % Reinheit.

Diethyl ((4-((6-(1,3-dioxoisoindolin-2-yl)hexyl)oxy)phenyl)(hydroxy)methyl)phosphonat (22e)



[489.19]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 7** unter Verwendung von 4-((6-(1,3-Dioxoisoindolin-2yl)hexyl)oxy)benzaldehyd (**21g**) (6.78 g, 19.6 mmol, 1.00 Äq.), Diethylphosphonat (2.70 g, 19.6 mmol, 1.00 Äq.) und Magnesiumoxid (788 mg, 19.6 mmol, 1.00 Äq.). Das Rohprodukt wurde aus Cyclohexan/Ethanol umkristallisiert. Diethyl ((4-((6-(1,3-dioxoisoindolin-2yl)hexyl)oxy)phenyl)(hydroxy)methyl)phosphonat (**22e**) wurde als farbloser Feststoff (8.65 g, 17.7 mmol, 90 %) erhalten.

R _f	0.40 (Dichlormethan/Methanol 20/1 v/v).
Schmelzpunkt	89 °C.
¹ H-NMR (300 MHz, CD ₃ OD)	δ 1.22 (t, J = 7.1 Hz, 3 H), 1.28 (t, J = 7.1 Hz, 3 H),
	$1.31-1.58 \ (m,\ 4\ H),\ 1.62-1.83 \ (m,\ 4\ H),\ 3.67 \ (t,$
	<i>J</i> = 7.1 Hz, 2 H), 3.88 – 4.19 (m, 6 H), 4.85 (s, 1 H), 4.92
	(d, $J = 12.0$ Hz, 1 H), $6.83 - 6.93$ (m, 2 H), $7.32 - 7.43$
	(m, 2 H), 7.72 – 7.89 (m, 4 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CD ₃ OD)	δ 16.7 (d, $^3\!J_{\rm C,P}$ = 5.8 Hz), 26.7, 27.6, 29.4, 30.2, 38.7, 64.2
	(d, $^2J_{\text{C},\text{P}}$ = 7.4 Hz), 64.5 (d, $^2J_{\text{C},\text{P}}$ = 7.3 Hz), 68.9, 71.0 (d,
	$^2J_{\text{C},\text{P}}$ = 167.3 Hz) 115.2 (d, $^4J_{\text{C},\text{P}}$ = 2.3 Hz) 124.1, 129.9 (d,
	${}^{3}J_{C,P}$ = 6.2 Hz), 130.3 (d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 1.6 Hz), 133.3, 135.3,
	160.6 (d, ⁵ J _{C,P} = 2.9 Hz), 169.8.
³¹ P-NMR (121 MHz, CD ₃ OD)	δ 22.43.
HPLC (Methode A, 220 nm)	t _R : 12.97 min, 95.8 % Reinheit.

9.6.3.3. Darstellung der (Diethoxyphosphoryl)(phenyl)methyltosylate 23a-c

(Diethoxyphosphoryl)(phenyl)methyltosylat (23a)



 $C_{18}H_{23}O_6PS$

[398.10]

Die Synthese erfolgte gemäß **AAV 8** Verwendung Diethyl der unter von (hydroxy(phenyl)methyl)phosphonat 30.0 mmol, 1.00 Äq.), (22a) (7.33 g, p-Toluolsulfonsäurechlorid (6.86 g, 36.0 mmol, 1.20 Äq.), 4-(Dimethylamino)pyridin (367 mg, 3.00 mmol, 0.10 Äq.) und Triethylamin (10.5 mL, 75.0 mmol, 2.50 Äq.) in 135 mL Dichlormethan. (Diethoxyphosphoryl)(phenyl)methyltosylat (23a) wurde als farbloser Feststoff (8.30 g, 20.8 mmol, 69 %) erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Publikation von KONG et al. überein.493

0.41 (Cyclohexan/Ethylacetat 1/1 v/v).
64 °C (63-65 °C). ⁴⁹³
δ 1.18 (td, J = 7.1, 0.7 Hz, 3 H), 1.29 (td, J = 7.1, 0.7 Hz,
3 H), 2.36 (s, $3 H$), $3.79 - 4.25$ (m, $4 H$), 5.67 (d,
J = 15.7 Hz, 1 H), $7.09 - 7.37$ (m, 7 H), $7.53 - 7.63$ (m,
2 H).
t _R : 13.71 min, 97.1 % Reinheit.

(Diethoxyphosphoryl)(3-hexyloxyphenyl)methyltosylat (23b)



C₂₄H₃₅O₇PS [498.18]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 8** unter Verwendung von Diethyl ((3-(hexyloxy)phenyl) (hydroxy)methyl)phosphonat (**22b**) (5.29 g, 15.4 mmol, 1.00 Äq.), *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (3.51 g, 18.4 mmol, 1.20 Äq.), 4-(Dimethylamino)pyridin (188 mg, 0.10 mmol, 0.10 Äq.) und Triethylamin (5.35 mL, 38.4 mmol, 2.50 Äq.) in 69 mL Dichlormethan. (Diethoxyphosphoryl)(3-hexyloxyphenyl)methyltosylat (**23b**) wurde als farbloses Öl (5.23 g, 9.95 mmol, 72 %) erhalten.

R _f	0.36 (Cyclohexan/Ethylacetat 1/1 v/v).
¹ H-NMR (300 MHz, CD ₃ OD)	δ 0.87 – 0.98 (m, 3 H), 1.19 (td, J = 7.1, 0.6 Hz, 3 H),
	1.21 - 1.54 (m, 9 H), $1.66 - 1.81$ (m, 2 H), 2.36 (s, 3 H),
	$3.70 - 4.26 \ (m, 6 \ H), 6.71 - 6.91 \ (m, 3 \ H), 7.05 - 7.18 \ (m, 3 \ H), 7.05 \ (m, 3 \ H), 7.05 - 7.18 \ (m, 3 \ H), 7.05 - 7.18 \ (m, 3 \ H), 7.05 \ (m$
	3 H), 7.52 – 7.62 (m, 2 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃)	δ 14.0, 16.2 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 5.8 Hz), 16.4 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 5.8 Hz),
	21.5, 22.6, 25.7, 29.2, 31.6, 63.6 (d, $^2\!J_{\rm C,P}$ = 6.7 Hz), 64.2
	(d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 7.1 Hz), 67.9, 77.5 (d, ${}^{1}J_{C,P}$ = 170.3 Hz), 113.6
	(d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 5.8 Hz), 115.8 (d, ${}^{5}J_{C,P}$ = 2.7 Hz), 120.4 (d,
	${}^{3}J_{C,P}$ = 6.2 Hz), 128.0, 129.2 (d, ${}^{4}J_{C,P}$ = 2.0 Hz), 129.3,
	132.8 (d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 1.8 Hz), 133.8, 144.7, 158.9 (d,
	${}^{4}J_{C,P} = 2.2 \text{ Hz}$).
³¹ P-NMR (121 MHz, CDCl ₃)	δ 14.59.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 19.19 min, 95.6 % Reinheit.

(Diethoxyphosphoryl)(3-((6-(1,3-dioxoisoindolin-2-yl)hexyl)oxy)phenyl)methyl tosylat (23c)



 $C_{32}H_{38}NO_9PS$

[643.20]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 8** unter Verwendung von Diethyl ((3-((6-(1,3-dioxoisoindolin-2-yl)hexyl)oxy)phenyl)(hydroxy)methyl)phosphonat (**22e**) (9.00 g, 18.4 mmol, 1.00 Äq.), *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (7.01 g, 36.8 mmol, 2.00 Äq.), 4-(Dimethylamino)pyridin (225 mg, 1.84 mmol, 0.10 Äq.) und Triethylamin (6.41 mL, 46.0 mmol, 2.50 Äq.) in 83 mL Dichlormethan. (Diethoxyphosphoryl)(3-((6-(1,3-dioxoisoindolin-2-yl)hexyl)oxy)phenyl)methyl-tosylat (**23c**) wurde als farbloses Öl (11.4 g, 17.7 mmol, 96 %) erhalten.

R _f	0.31 (Cyclohexan/Ethylacetat 1/1 <i>v</i> / <i>v</i>).
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl₃)	δ 1.17 (t, J = 7.1 Hz, 3 H), 1.28 (t, J = 7.0 Hz, 3 H),
	1.33 – 1.55 (m, 5 H), 1.72 (p, J = 6.7 Hz, 5 H), 2.34 (s,
	3 H), 3.70 (t, J = 7.2 Hz, 2 H), 3.74 – 4.19 (m, 5 H), 5.61
	(d, $J = 15.6$ Hz, 1 H), 6.73 (dt, $J = 6.8$, 1.4 Hz, 2 H),
	$6.80 - 6.90 \ (m, 1 \ H), 7.01 - 7.16 \ (m, 3 \ H), 7.52 - 7.59 \ (m, 3 \ H)$
	2 H), 7.71 (dd, J = 5.4, 3.1 Hz, 2 H), 7.84 (dd, J = 5.5,
	3.1 Hz, 2 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃)	δ 16.2 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 5.8 Hz), 16.4 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 5.4 Hz), 25.7,
	26.6, 28.5, 29.0, 37.9, 63.9 (d, $^2J_{\text{C},\text{P}}$ = 6.7 Hz), 64.4 (d,
	$^{2}J_{C,P}$ = 7.1 Hz), 67.7, 77.2 (d, $^{1}J_{C,P}$ = 170.6 Hz), 119.0 (d,
	${}^{3}J_{C,P}$ = 5.7 Hz), 120.2, 123.1 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 6.1 Hz), 123.2,
	128.0, 128.8, 129.5, 132.1, 133.4, 134.0, 138.8 (d,
	$^{2}J_{C,P}$ = 2.2 Hz), 145.0, 158.8 (d, $^{4}J_{C,P}$ = 2.2 Hz), 168.5.
³¹ P-NMR (121 MHz, CD ₃ OD)	δ 10.38.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 16.63 min, 98.6 % Reinheit.

9.6.3.4. Darstellung der Diethyl (chlor(phenyl)methyl)phosphonate 24a-b



Diethyl (chlor(4-(hexyloxy)phenyl)methyl)phosphonat (24a)

[362.14]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 8** unter Verwendung von Diethyl ((4-(hexyloxy)phenyl)(hydroxy)methyl)phosphonat (**23c**) (3.80 g, 11.0 mmol, 1.00 Äq.), *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (2.52 g, 13.2 mmol, 1.20 Äq.), 4-(Dimethylamino)pyridin (315 mg, 1.10 mmol, 0.10 Äq.) und Triethylamin (3.84 mL, 27.6 mmol, 2.50 Äq.) in 50 mL Dichlormethan. Diethyl (chlor(4-(hexyloxy)phenyl)methyl)phosphonat (**24a**) wurde als farbloses Öl (1.74 g, 4.80 mmol, 44 %) erhalten.

R _f	0.38 (Cyclohexan/Ethylacetat 2/1 v/v).
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃)	δ 0.82 – 0.98 (m, 3 H), 1.16 (td, J = 7.1, 0.7 Hz, 3 H),
	1.24 – 1.39 (m, 6 H), 1.43 (dtd, <i>J</i> = 8.9, 6.8, 4.8 Hz, 2 H),
	1.75 (dq, <i>J</i> = 8.2, 6.6 Hz, 2 H), 3.72 – 4.10 (m, 4 H), 4.18
	(dq, $J = 8.3$, 7.1 Hz, 2 H), 4.84 (d, $J = 13.7$ Hz, 1 H),
	6.80 – 6.91 (m, 2 H), 7.37 – 7.49 (m, 2 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃)	δ 14.0, 116.3 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 5.8 Hz), 16.4 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 5.8 Hz),
	22.6, 25.7, 29.1, 31.5, 53.4 (d, $^{1}J_{\rm C,P}$ = 162.5 Hz), 63.8 (d,
	$^2J_{\text{C},\text{P}}$ = 7.0 Hz), 64.0 (d, $^2J_{\text{C},\text{P}}$ = 7.2 Hz), 68.1, 114.5 (d,
	$^{4}J_{C,P}$ = 1.7 Hz), 125.8 (d, $^{2}J_{C,P}$ = 3.5 Hz), 130.3 (d,
	${}^{3}J_{C,P}$ = 6.4 Hz), 159.7 (d, ${}^{5}J_{C,P}$ = 2.3 Hz).
³¹ P-NMR (121 MHz, CDCl ₃)	<i>δ</i> 17.46.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 18.54 min, ≥ 99 % Reinheit.
EI + MS (70 eV, <i>m/z</i> (%))	$362 \ ([C_{17}H_{28}CIO_4P]^{\scriptscriptstyle +}, \ 19), \ 327 \ ([C_{17}H_{28}O_4P]^{\scriptscriptstyle +}, \ 15), \ 227$
	(34), 226 ([$C_{11}H_{15}O_3P$] ⁺ , 13), 225 ([$C_{13}H_{18}CIO$] ⁺ , 100), 143
	(32), 141 (96), 107 (17), 91 (12).

Diethyl (chlor(4-((6-(1,3-dioxoisoindolin-2-yl)hexyl)oxy)phenyl)methyl)phosphonat (24b)



[507.16]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 8** unter Verwendung von Diethyl ((4-((6-(1,3-dioxoisoindolin-2-yl)hexyl)oxy)phenyl)(hydroxy)methyl)phosphonat (**22e**) (7.50 g, 15.3 mmol, 1.00 Äq.), *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (5.84 g, 30.6 mmol, 2.00 Äq.), 4-(Dimethylamino)pyridin (187 mg, 1.53 mmol, 0.10 Äq.) und Triethylamin (5.34 mL, 38.3 mmol, 2.50 Äq.) in 69 mL Dichlormethan. Diethyl (chlor(4-((6-(1,3-dioxoisoindolin-2-yl)hexyl)oxy)phenyl)methyl)phosphonat (**24b**) wurde als farbloses Öl (4.88 g, 9.61 mmol, 63 %) erhalten.

R _f	0.43 (Cyclohexan/Ethylacetat 1/2 v/v).
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃)	δ 1.17 (td, J = 7.1, 0.7 Hz, 3 H), 1.32 (td, J = 7.0. 0.6 Hz,
	3 H), 1.36 – 1.56 (m, 4 H), 1.62 – 1.84 (m, 4 H), 3.68 (t,
	J = 7.2 Hz, 2 H), 3.93 (t, J = 6.5 Hz, 2 H), 3.78 – 4.08 (m,
	2 H), 4.18 (dq, <i>J</i> = 8.4, 6.7 Hz, 2 H), 4.84 (d, <i>J</i> = 13.7 Hz,
	1 H), $6.79 - 6.90$ (m, 2 H), $7.36 - 7.48$ (m, 2 H),
	7.63 – 7.76 (m, 2 H), 7.76 – 7.89 (m, 2 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃)	δ 16.3 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 5.3 Hz), 16.4 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 5.1 Hz), 25.6,
	26.6, 28.5, 29.0, 37.9, 53.5 (d, ${}^{1}J_{C,P}$ = 163.4 Hz), 63.9 (d,
	${}^{2}J_{C,P}$ = 6.9 Hz), 64.0 (d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 7.2 Hz), 67.8, 114.5,
	123.2, 125.9 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 3.5 Hz), 130.3 (d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 6.4 Hz),
	132.1, 133.9, 159.6 (d, ⁵ J _{C,P} = 2.2 Hz), 168.5.
³¹ P-NMR (121 MHz, CDCl ₃)	δ17.46.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 15.84 min, 97.2 % Reinheit.
EI + MS (70 eV, <i>m/z</i> (%))	507 ($[C_{25}H_{31}CINO_6P]^+$, 31), 370 ($[C_{21}H_{21}CINO_3]^+$, 23), 230
	$([C_{14}H_{16}NO_2]^+, 40), 160 (100), 143 (24), 142 (68), 133$
	(11), 130 (12), 107 (14).

9.6.3.5. Darstellung der Methyl 2-(((diethoxyphosphoryl)(phenyl)methyl)thio)acetate 25a-d

Methyl 2-(((diethoxyphosphoryl)(3-(hexyloxy)phenyl)methyl)thio)acetat (25a)



C₂₀H₃₃O₆PS [432.17]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 9** unter Verwendung von (Diethoxyphosphoryl)(3hexyloxyphenyl)methyl tosylat (**23b**) (1.50 g, 3.01 mmol, 1.00 Äq.), Cäsiumcarbonat (1.97 g, 6.02 mmol, 2.00 Äq.) und Methylthioglycolat (538 μ L, 6.02 mmol, 2.00 Äq.) in 20 mL *N*,*N*-Dimethylformamid. Methyl 2-(((diethoxyphosphoryl)(3-(hexyloxy)phenyl)methyl)thio)acetat (**25a**) wurde als farbloses Öl (720 mg, 1.66 mmol, 55 %) erhalten.

R _f	0.52 (Cyclohexan/Ethylacetat 1/1 <i>v/v</i>).
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃)	δ 0.85 – 0.92 (m, 3 H), 1.16 (td, J = 7.1, 0.7 Hz, 3 H), 1.30
	(td, $J = 7.1$, 0.6 Hz, 3 H), 1.32 (q, $J = 6.4$ Hz, 4 H),
	1.39 - 1.49 (m, 2 H), $1.69 - 1.81$ (m, 2 H), 3.10 (d,
	J = 15.1 Hz, 1 H), 3.35 (dd, J = 15.1, 2.6 Hz, 1 H), 3.66
	(s, 3 H), 3.94 (t, J = 6.6 Hz, 2 H), 3.79 – 4.23 (m, 4 H),
	4.36 (d, J = 19.7 Hz, 1 H), 6.77 – 6.86 (m, 1 H),
	6.95 – 7.07 (m, 2 H), 7.15 – 7.25 (m, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃)	δ 14.1, 16.3 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 5.8 Hz), 16.5 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 5.8 Hz),
	22.7, 25.8, 29.3, 31.7, 32.9 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 7.4 Hz), 45.6 (d,
	$^{1}J_{C,P}$ = 148.2 Hz), 52.5, 63.3 (d, $^{2}J_{C,P}$ = 7.2 Hz), 63.7 (d,
	$^{2}J_{C,P}$ = 6.8 Hz), 68.1, 114.7, 115.4 (d, $^{5}J_{C,P}$ = 6.1 Hz),
	121.9 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 6.7 Hz), 129.6 (d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 1.9 Hz), 135.7
	(d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 4.9 Hz), 159.4 (d, ${}^{4}J_{C,P}$ = 1.9 Hz), 170.5.
³¹ P-NMR (121 MHz, CDCl ₃)	δ21.22.
HPLC (Methode C, 254 nm)	t _R : 18.51 min, 96.1 % Reinheit.





[432.17]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 9** unter Verwendung von (Diethoxyphosphoryl)(4hexyloxyphenyl)methyltosylat (**24a**) (1.53 g, 3.07 mmol, 1.00 Äq.), Cäsiumcarbonat (2.00 g, 6.14 mmol, 2.00 Äq.) und Methylthioglycolat (549 μ L, 6.14 mmol, 2.00 Äq.) in 20 mL *N*,*N*-Dimethylformamid. Methyl 2-(((diethoxyphosphoryl)(3-(hexyloxy)phenyl)methyl)thio)acetat (**25b**) wurde als farbloses Öl (690 mg, 1.65 mmol, 54 %) erhalten.

R _f	0.41 (Cyclohexan/Ethylacetat 1/2 v/v).
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃)	δ 0.84 – 0.95 (m, 3 H), 1.17 (t, J = 7.1 Hz, 3 H),
	1.26-1.37 (m, 6 H), $1.38-1.52$ (m, 2 H), 1.76 (dq,
	J = 8.2, 6.6 Hz, 2 H), 3.07 (d, J = 15.1 Hz, 1 H), 3.34 (dd,
	J = 15.1, 2.6 Hz, 1 H), 3.67 (s, 3 H), 3.71 - 4.22 (m, 6 H),
	4.29-4.42(m,1~H), 6.78-6.90(m,2~H), 7.31-7.43(m,
	2 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃)	δ 14.0, 16.3 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 6.0 Hz), 16.4 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 5.7 Hz),
	22.6, 25.7, 29.2, 31.6, 32.7 (d, $^3\!J_{C,P}$ = 6.9 Hz), 44.8 (d,
	${}^{1}J_{C,P}$ = 148.7 Hz), 52.3, 63.1 (d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 7.2 Hz), 63.5 (d,
	$^{2}J_{C,P}$ = 6.8 Hz), 114.6 (d, $^{4}J_{C,P}$ = 2.0 Hz), 125.7 (d,
	$^{2}J_{C,P}$ = 5.1 Hz), 130.7 (d, $^{3}J_{C,P}$ = 6.5 Hz), 159.0 (d,
	⁵ J _{C,P} = 2.4 Hz), 170.4.
³¹ P-NMR (121 MHz, CDCl ₃)	δ21.59.
HPLC (Methode A, 220 nm)	t _R : 16.77 min, ≥ 99 % Reinheit.

Methyl 2-(((diethoxyphosphoryl)(3-((6-(1,3-dioxoisoindolin-2-yl)hexyl)oxy)phenyl)methyl)thio)acetat (25c)



[577.19]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 9** unter Verwendung von (Diethoxyphosphoryl)(3-((6-(1,3-dioxoisoindolin-2-yl)hexyl)oxy)phenyl)methyltosylat (**23c**) (11.2 g, 17.4 mmol, 1.00 Äq.), Cäsiumcarbonat (11.4 g, 34.8 mmol, 2.00 Äq.) und Methylthioglycolat (3.11 mL, 34.8 mmol, 2.00 Äq.) in 116 mL *N*,*N*-Dimethylformamid. Methyl 2-(((diethoxyphosphoryl)(3-((6-(1,3-dioxoisoindolin-2-yl)hexyl)oxy)phenyl)methyl)thio)acetat (**25c**) wurde als farbloses Öl (5.47 g, 9.47 mmol, 75 %) erhalten.

R _f	0.26 (Cyclohexan/Ethylacetat 1/2 v/v).
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃)	δ 1.17 (t, J = 7.0 Hz, 3 H), 1.31 (t, J = 7.0 Hz, 3 H),
	1.19 - 1.59 (m, 3 H), $1.63 - 1.85$ (m, 5 H), 3.10 (d,
	J = 15.1 Hz, 1 H), 3.35 (dd, J = 15.1, 2.4 Hz, 1 H), 3.64-
	3.74 (m, 5 H), 3.79 – 4.22 (m, 6 H), 4.37 (d, <i>J</i> = 20.2 Hz,
	1 H), 6.76 – 6.83 (m, 1 H), 6.97 – 7.06 (m, 2 H), 7.21 (t,
	J = 8.1 Hz, 1 H), 7.71 (dd, J = 5.4, 3.1 Hz, 2 H), 7.84 (dd,
	<i>J</i> = 5.4, 3.1 Hz, 2 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃)	δ 16.3 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 5.3 Hz), 16.4 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ =5.8 Hz), 25.7,
	26.6, 28.5, 29.1, 32.8 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ =7.4 Hz), 37.9, 45.5 (d,
	$^{1}J_{C,P}$ = 145.3 Hz), 52.4, 63.2 (d, $^{2}J_{C,P}$ = 7.2 Hz), 63.6 (d,
	$^{2}J_{C,P}$ = 7.0 Hz), 67.8, 114.5, 115.3 (d, $^{3}J_{C,P}$ = 6.1 Hz),
	121.8 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 6.3 Hz), 123.2, 129.5 (d, ${}^{4}J_{C,P}$ = 1.3 Hz),
	132.1, 133.9, 135.6 (d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 4.7 Hz), 159.2 (d,
	⁴ J _{C,P} = 1.5 Hz), 168.4, 170.4.
³¹ P-NMR (121 MHz, CDCl ₃)	δ21.21.
HPLC (Methode C, 254 nm)	t _R : 17.47 min, 95.8 % Reinheit.

Methyl 2-(((diethoxyphosphoryl)(4-((6-(1,3-dioxoisoindolin-2-yl)hexyl)oxy)phenyl)methyl)thio)acetat (25d)



[577.19]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 9** unter Verwendung von Diethyl (chlor(4-((6-(1,3-dioxoisoindolin-2-yl)hexyl)oxy)phenyl)methyl)phosphonat (**24b**) (4.62 g, 9.10 mmol, 1.00 Äq.), Cäsiumcarbonat (5.95 g, 18.2 mmol, 2.00 Äq.) und Methylthioglycolat (1.63 mL, 9.10 mmol, 2.00 Äq.) in 60 mL *N*,*N*-Dimethylformamid. Methyl 2-(((diethoxyphosphoryl)(4-((6-(1,3-dioxoisoindolin-2-yl)hexyl)oxy)phenyl)methyl)thio)acetat (**25d**) wurde als farbloses Öl (1.54 g, 92.7 mmol, 29 %) erhalten.

```
Analytische Daten
```

R _f	0.21 (Cyclohexan/Ethylacetat 1/2 v/v).
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃)	δ 1.13 – 1.48 (m, 8 H), 1.45 – 1.61 (m, 2 H), 1.75 (tt,
	<i>J</i> = 14.8, 6.9 Hz, 5 H), 3.09 (d, <i>J</i> = 15.1 Hz, 1 H), 3.36 (dd,
	J = 15.1, 2.6 Hz, 1 H), 3.69 (s, 3 H), 3.73 (d, $J = 7.2$ Hz,
	2 H), 3.83-4.24 (m, 6 H), 4.32-4.45 (m, 1 H),
	6.80-6.91(m,2~H), 7.33-7.43(m,2~H), 7.67-7.80(m,
	2 H), 7.86 (dd, <i>J</i> = 5.5, 3.0 Hz, 2 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃)	δ 16.3, 25.7, 26.6, 28.5, 29.1, 32.6, 37.9, 45.8, 52.4, 63.5
	(d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 2.1 Hz), 63.5 (d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 2.5 Hz), 67.8, 114.6 (d,
	${}^{3}J_{\rm C,P}$ = 1.9 Hz), 123.2, 125.7 (d, ${}^{3}J_{\rm C,P}$ = 5.2 Hz), 130.7 (d,
	${}^{4}J_{C,P}$ = 6.4 Hz), 132.2, 133.9, 158.9 (d, ${}^{5}J_{C,P}$ = 2.4 Hz),
	168.5, 170.4.
³¹ P-NMR (121 MHz, CDCl ₃)	δ 21.56 .
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 14.97 min, 96.9 % Reinheit.

9.6.3.6. Darstellung der 2-(((Diethoxyphosphoryl)(phenyl)methyl)thio)essigsäuren 26a-d

2-(((Diethoxyphosphoryl)(3-(hexyloxy)phenyl)methyl)thio)essigsäure (26a)



C₁₉H₃₁O₆PS

[418.16]

Rundkolben wurde In einem 10 mL Methyl 2-(((diethoxyphosphoryl)(3-(hexyloxy)phenyl)methyl)thio)acetat (25a) (670 mg, 1.55 mmol, 1.00 Äq.) in 3 mL Methanol gelöst und mit 5 M Natronlauge (538 µL, 2.69 mmol, 2.00 Äq.) versetzt. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur 30 min lang gerührt und anschließend mit 10 mL 1 M Salzsäure versetzt. Die wässrige Phase wurde mit Dichlormethan (3 x 15 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. 2-(((Diethoxyphosphoryl)(3-(hexyloxy)phenyl)methyl)thio)essigsäure (26a) wurde als farbloses Öl (612 mg, 1.22 mmol, 91 %) erhalten.

R _f	0.30 (Dichlormethan/Methanol $20/1 v/v + 0.1\%$
	Ameisensäure).
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃)	δ 0.87 – 0.98 (m, 3 H), 1.29 (t, J = 7.0 Hz, 6 H),
	$1.32 - 1.40 \ (m, 5 \ H), 1.40 - 1.55 \ (m, 2 \ H), 1.71 - 1.87 \ (m$
	2 H), 3.16 (d, $J = 15.2$ Hz, 1 H), 3.46 (dd, $J = 15.2$,
	2.6 Hz, 1 H), 3.97 (t, $J = 6.6$ Hz, 2 H), $4.01 - 4.27$ (m,
	4 H), 4.48 (d, J = 18.9 Hz, 1 H), 6.86 (ddt, J = 8.3, 2.5,
	1.3 Hz, 1 H), 7.03 (dq, J = 4.2, 1.7 Hz, 2 H), 7.19 – 7.31
	(m, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃)	δ 14.0, 16.3 (t, ${}^{3}J_{C,P}$ = 5.8 Hz), 22.6, 25.7, 29.2, 31.6, 33.3
	(d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 6.0 Hz), 63.8 (d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 6.9 Hz), 64.2 (d,
	$^{2}J_{C,P}$ = 7.2 Hz), 68.1, 114.6, 115.4 (d, $^{5}J_{C,P}$ = 6.4 Hz),
	121.7 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 6.5 Hz), 129.6 (d, ${}^{4}J_{C,P}$ = 1.7 Hz), 135.2
	(d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 4.7 Hz), 159.3 (d, ${}^{4}J_{C,P}$ = 1.7 Hz), 172.2.
³¹ P-NMR (121 MHz, CDCl ₃)	δ22.14.
HPLC (Methode A, 220 nm)	t _R : 14.45 min, ≥ 99 % Reinheit.

2-(((Diethoxyphosphoryl)(4-(hexyloxy)phenyl)methyl)thio)essigsäure (26b)



In einem 10 mL Rundkolben wurde Methyl 2-(((diethoxyphosphoryl)(4-(hexyloxy)phenyl)methyl)thio)acetat (**25b**) (670 mg, 1.55 mmol, 1.00 Äq.) in 3 mL Methanol gelöst und mit 5 M Natronlauge (620 µL, 3.10 mmol, 2.00 Äq.) versetzt. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur 30 min lang gerührt und anschließend mit 10 mL 1 M Salzsäure versetzt. Die wässrige Phase wurde mit Dichlormethan (3 x 15 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. 2-(((Diethoxyphosphoryl)(4-(hexyloxy)phenyl)methyl)thio)essigsäure (**26b**) wurde als farbloses Öl (610 mg, 1.46 mmol, 94%) erhalten.

R _f	0.22 (Dichlormethan/Methanol 20/1 v/v + 0.1 % Ameisen-
	säure).
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃)	δ 0.91 (td, J = 6.0, 3.2 Hz, 3 H), 1.26 (td, J = 7.0, 1.8 Hz,
	6 H), 1.30 – 1.53 (m, 6 H), 1.77 (dq, <i>J</i> = 8.3, 6.6 Hz, 2 H),
	3.11 (d, J = 15.1 Hz, 1 H), 3.42 (dd, J = 15.1, 2.6 Hz,
	1 H), 3.94 (t, <i>J</i> = 6.6 Hz, 2 H), 3.98 – 4.23 (m, 4 H), 4.46
	(d, J = 18.8 Hz, 1 H), 6.78 – 6.91 (m, 2 H), 7.30 – 7.42
	(m, 2 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃)	δ 14.0, 16.3 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 5.5 Hz), 22.6, 25.7, 29.2, 31.6, 33.1
	(d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 4.9 Hz), 44.5 (d, ${}^{1}J_{C,P}$ = 147.7 Hz), 63.7, 68.1,
	114.7, 125.2 (d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 5.0 Hz), 130.6 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 6.7 Hz),
	159.1 (d, ⁵ J _{C,P} = 2.3 Hz), 172.3.
³¹ P-NMR (121 MHz, CDCl ₃)	δ22.52.
HPLC (Methode C, 254 nm)	t _R : 14.29 min, 97.5 % Reinheit.

2-(((Diethoxyphosphoryl)(3-((6-(1,3-dioxoisoindolin-2-yl)hexyl)oxy)phenyl)methyl)thio)essigsäure (26c)



[563.17]

In einem 250 mL Rundkolben wurde Methyl 2-(((diethoxyphosphoryl)(3-((6-(1,3-dioxoisoindolin-2-yl)hexyl)oxy)phenyl)methyl)thio) acetat (**25c**) (2.20 g, 3.81 mmol, 1.00 Äq.) in 50 mL Eisessig gelöst und mit 1 M Salzsäure (12.2 mL, 12.2 mmol, 3.20 Äq.) versetzt. Die Reaktion wurde bei 60 °C 5 h lang gerührt. Der Ansatz wurde mit 50 mL entmineralisiertem Wasser verdünnt und mit Dichlormethan (3 x 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 1 M Salzsäure (1 x150 mL) gewaschen, die organische Phase mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. 2-(((Diethoxyphosphoryl)(3-((6-(1,3-dioxoisoindolin-2-yl)hexyl)oxy)phenyl)methyl)thio)essigsäure (**26c**) wurde als farbloses Öl (1.80 g, 3.19 mmol, 84 %) erhalten.

R _f	0.19 (Dichlormethan/Methanol 20/1 v/v + 0.1 % Ameisen-
	säure).
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃)	δ 1.26 (t, J = 7.0 Hz, 6 H), 1.44 (td, J = 14.8, 8.1 Hz, 4 H),
	1.63 - 1.84 (m, 4 H), 3.15 (d, $J = 15.1$ Hz, 1 H),
	3.40 - 3.52 (m, 1 H), 3.69 (t, $J = 7.2$ Hz, 2 H), 3.93 (t,
	J = 6.4 Hz, 2 H), $4.00 - 4.23$ (m, 4 H), $4.35 - 4.48$ (m,
	1 H), 6.81 (d, <i>J</i> = 8.3 Hz, 1 H), 6.93 – 7.05 (m, 2 H), 7.22
	(t, J = 7.9 Hz, 1 H), 7.71 (dd, J = 5.5, 3.1 Hz, 2 H), 7.84
	(dd, <i>J</i> = 5.4, 3.1 Hz, 2 H).
¹³ C-NMR (151 MHz, CDCl ₃)	δ 16.3 (d, ${}^3\!J_{\rm C,P}$ = 5.9 Hz), 25.7, 26.6, 28.5, 29.1, 33.3 (d,
	${}^{3}J_{C,P}$ = 5.3 Hz), 37.9, 45.3 (d, ${}^{1}J_{C,P}$ = 146.3 Hz), 63.8 (d,
	$^2J_{\text{C},\text{P}}$ = 7.2 Hz), 64.2 (d, $^2J_{\text{C},\text{P}}$ = 7.1 Hz), 67.8, 114.6 (d,
	${}^{3}J_{C,P}$ = 2.3 Hz), 115.4 (d, ${}^{5}J_{C,P}$ = 6.8 Hz), 121.7 (d,
	${}^{3}J_{C,P}$ = 6.5 Hz), 123.2, 129.6, 132.1, 133.9, 135.2 (d,
	² J _{C,P} = 4.4 Hz), 159.2, 168.5, 171.8.
³¹ P-NMR (121 MHz, CDCl ₃)	δ22.17.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 15.84 min, 97.2 % Reinheit.

2-(((Diethoxyphosphoryl)(4-((6-(1,3-dioxoisoindolin-2-yl)hexyl)oxy)phenyl)methyl)thio)essigsäure (26d)



C₂₇H₃₄NO₈PS [563.17]

In einem 100 mL Rundkolben Methyl 2-(((diethoxyphosphoryl)(4-((6-(1,3wurde dioxoisoindolin-2-yl)hexyl)oxy)phenyl)methyl)thio)acetat (25d) (1.50 g, 2.60 mmol, 1.00 Äq.) in 35 mL Eisessig gelöst und mit 1 M Salzsäure (8.33 mL, 8.33 mmol, 3.21 Äq.) versetzt. Die Reaktion wurde bei 60 °C 5 h lang gerührt. Der Ansatz wurde mit 50 mL entmineralisiertem Wasser verdünnt und mit Dichlormethan (3 x 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 1 M Salzsäure (1 x100 mL) gewaschen, mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und Lösemittel vermindertem das unter Druck entfernt. 2-(((Diethoxyphosphoryl)(4-((6-(1,3-dioxoisoindolin-2-yl)hexyl)oxy)phenyl)methyl)thio)essigsäure (26d) wurde als farbloses Öl (1.08 g, 1.91 mmol, 74 %) erhalten.

R _f	0.27 (Dichlormethan/Methanol 20/1 v/v + 0.1 % Ameisensäure).
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl₃)	δ 1.23 – 1.31 (m, 3 H), 1.29 – 1.34 (m, 3 H), 1.38 – 1.61 (m, 4 H), 1.66 – 1.87 (m, 4 H), 3.16 (d, <i>J</i> = 15.0 Hz, 1 H), 3.46 (dd, <i>J</i> = 15.0, 2.2 Hz, 1 H), 3.72 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 2 H), 3.95 (t, <i>J</i> = 6.4 Hz, 2 H), 4.07 – 4.21 (m, 4 H), 4.38 (d, <i>J</i> = 18.3 Hz 1 H), 6.87 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 2 H), 7.36 (dd, <i>J</i> = 8.7, 1.9 Hz, 2 H), 7.73 (dd, <i>J</i> = 5.4, 3.1 Hz, 2 H), 7.86 (dd, <i>J</i> = 5.5, 3.0 Hz, 2 H), 8.05 (s, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃)	δ 16.36 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 1.8 Hz), 16.43 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 2.2 Hz), 25.8, 26.7, 28.6, 29.2, 33.1 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 5.9 Hz), 38.0, 44.6 (d, ${}^{1}J_{C,P}$ = 148.2 Hz), 63.9 (d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 7.2 Hz), 64.3 (d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 7.2 Hz), 67.9, 114.8, 123.3, 125.2 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 5.0 Hz), 130.8 (d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 6.8 Hz), 132.2, 134.0, 159.2 (d, ${}^{5}J_{C,P}$ = 2.4 Hz), 163.9, 168.7.
³¹ P-NMR (121 MHz, CDCl ₃) HPLC (Methode A, 254 nm)	δ22.34. t _R : 13.46 min, 96.4 % Reinheit.

9.6.3.7. Darstellung der Diethyl (((2-(Hydroxy(methyl)amino)-2oxoethyl)thio)(phenyl)methyl) phosphonate 27a-d

Diethyl ((3-(hexyloxy)phenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)thio)methyl)phosphonat (27a)



C₂₀H₃₄NO₆PS [447.18]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 10** unter Verwendung von 2-(((Diethoxyphosphoryl)(3-(hexyloxy)phenyl)methyl)thio)essigsäure (**26a**) (477 mg, 1.14 mmol, 1.00 Äq.), *N*-Methylhydroxylamin•HCl (143 mg, 1.71 mmol, 1.50 Äq.) und 1,1'-Carbonyldiimidazol (277 mg, 1.71 mmol, 1.50 Äq.) in 3 mL Tetrahydrofuran. Diethyl ((3-(hexyloxy)phenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)thio)methyl)phosphonat (**27a**) wurde als farbloses Öl (240 mg, 0.54 mmol, 47 %) erhalten.

Analytische Daten	
R _f	0.18 (Dichlormethan/Methanol 20/1 v/v + 0.1 % Ameisen-
	saue).
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃)	δ0.82 – 0.95 (m, 3 H), 1.11 – 1.37 (m, 10 H), 1.32 – 1.51
	(m, 2 H), 1.75 (p, <i>J</i> = 6.7 Hz, 2 H), 3.23 (s, 3 H), 3.27 (d,
	<i>J</i> = 14.4 Hz, 1 H), 3.73 (dd, <i>J</i> = 14.4, 2.3 Hz, 1 H), 3.92 (t,
	<i>J</i> = 6.6 Hz, 2 H), 4.06 (m, 4 H), 4.29 – 4.39 (m, 1 H), 6.80
	(dt, J = 8.7, 2.0 Hz, 1 H), 6.98 (dq, J = 6.9, 2.1 Hz, 2 H),
	7.19 (t, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1 H), 9.48 (bs, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CD ₃ OD)	δ 14.4, 16.6 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 7.2 Hz), 16.7 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 6.4 Hz),
	23.7, 26.9, 30.3, 32.8, 36.4, 45.9 (d, ${}^{1}J_{C,P}$ = 148.1 Hz),
	64.8 (d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 7.2 Hz), 65.0 (d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 6.9 Hz), 69.1,
	115.5 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 2.9 Hz), 116.7 (d, ${}^{5}J_{C,P}$ = 6.2 Hz), 123.0
	(d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 6.7 Hz), 130.5 (d, ${}^{4}J_{C,P}$ = 2.1 Hz), 137.5 (d,
	$^{2}J_{C,P}$ = 4.8 Hz), 160.7 (d, $^{4}J_{C,P}$ = 2.1 Hz), 171.5.
³¹ P-NMR (121 MHz, CD ₃ OD)	δ 22.33.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 13.87 min, ≥ 99 % Reinheit.

Diethyl ((4-(hexyloxy)phenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)thio)methyl)phosphonat (27b)



Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 10** unter Verwendung von 2-(((Diethoxyphosphoryl)(4-(hexyloxy)phenyl)methyl)thio)essigsäure (**26b**) (590 mg, 1.41 mmol, 1.00 Äq.), *N*-Methylhydroxylamin•HCI (130 mg, 1.55 mmol, 1.10 Äq.) und 1,1'-Carbonyldiimidazol (343 mg, 2.11 mmol, 1.50 Äq.) in 3 mL Tetrahydrofuran. Diethyl ((4-(hexyloxy)phenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)thio)methyl)phosphonat (**27b**) wurde als farbloses Öl (489 mg, 1.09 mmol, 78 %) erhalten.

R _f	0.19 (Dichlormethan/Methanol 20/1 v/v + 0.1 % Ameisen-
	säure).
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃)	δ 0.81 – 0.95 (m, 3 H), 1.08 – 1.53 (m, 13 H), 1.76 (dq,
	J = 8.2, 6.5 Hz, 2 H), 3.27 (m, 4 H), 3.77 (d, J = 14.3 Hz,
	1 H), 3.93 (t, $J = 6.6$ Hz, 2 H), 4.06 (ddt, $J = 16.3$, 14.5,
	5.2 Hz, 2 H), 4.24 (dd, $J = 16.7$, 4.6 Hz, 1 H), 6.84 (d,
	<i>J</i> = 8.5 Hz, 2 H), 7.28 – 7.37 (m, 2 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃)	$\delta14.0,16.3,22.6,25.7,29.2,31.6,31.7,36.1,45.5,63.7,$
	68.0, 114.6, 126.2, 130.3 (d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 5.5 Hz), 158.9, 169.9.
³¹ P-NMR (121 MHz, CDCl ₃)	δ22.10.
HPLC (Methode A, 220 nm)	t _R : 14.31 min, ≥ 99 % Reinheit.
MS (ESI) m/z	ber. für C ₂₀ H ₃₄ NO ₆ PS: 448.18, gef.: 488.18.

Diethyl ((3-((6-(1,3-dioxoisoindolin-2-yl)hexyl)oxy)phenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2oxoethyl)thio)methyl)phosphonat (27c)



[592.20]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 10** unter Verwendung von Methyl 2-(((diethoxyphosphoryl)(3-((6-(1,3-dioxoisoindolin-2-yl)hexyl)oxy)phenyl)methyl)thio)acetat (**26c**) (2.60 g, 4.61 mmol, 1.00 Äq.), *N*-Methylhydroxylamin•HCl (578 mg, 6.92 mmol, 1.50 Äq.) und 1,1'-Carbonyldiimidazol (1.12 g, 6.92 mmol, 1.50 Äq.) in 46 mL Tetrahydrofuran. Diethyl ((3-((6-(1,3-dioxoisoindolin-2-yl)hexyl)oxy)phenyl)((2-(hydroxy(methyl)-amino)-2-oxo ethyl)thio)methyl)phosphonat (**27c**) wurde als farbloses Öl (2.56 g, 4.32 mmol, 94 %) erhalten.

R _f	0.25 (Dichlormethan/Methanol 20/1 v/v + 0.1 % Ameisen-
	säure).
¹ H-NMR (300 MHz, CD ₃ OD)	δ 1.16 (td, J = 7.1, 0.7 Hz, 3 H), 1.34 (td, J = 7.0, 0.6 Hz,
	3 H), 1.41 – 1.63 (m, 2 H), 1.66 – 1.91 (m, 4 H),
	2.90 – 3.01 (m, 2 H), 3.19 (s, 3 H), 3.27 (s, 1 H), 3.63 (dd,
	J = 14.5, 2.5 Hz, 1 H), 3.80 – 4.05 (m, 2 H), 4.11 – 4.26
	(m, 2 H), 4.57 (d, $J = 20.5$ Hz, 1 H) 6.88 (dq, $J = 8.2$,
	1.4 Hz, 1 H), 7.04 (d, J = 7.7 Hz, 1 H), 7.09 (q, J = 2.1 Hz,
	1 H), 7.20 – 7.32 (m, 1 H), 8.39 (s, 2 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CD ₃ OD)	δ 16.5 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 6.1 Hz), 16.7 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 4.7 Hz), 26.7,
	27.6, 29.4, 30.1, 32.5 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 7.4 Hz), 36.4, 38.7, 45.8
	(d, ${}^{1}J_{C,P}$ = 146.0 Hz), 64.8 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 7.2 Hz), 64.9 (d,
	${}^{3}J_{C,P}$ = 7.3 Hz), 68.9, 115.5 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 2.4 Hz), 116.7 (d,
	${}^{5}J_{C,P}$ = 5.7 Hz), 122.9 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 6.8 Hz), 124.0, 130.5,
	133.3, 135.3, 137.5 (d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 4.5 Hz), 160.6 (d,
	⁴ <i>J</i> _{C,P} = 2.1 Hz), 169.8, 171.4.
³¹ P-NMR (121 MHz, CDCl ₃)	δ22.31.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 13.15 min, ≥ 99 % Reinheit.

Diethyl ((4-((6-(1,3-dioxoisoindolin-2-yl)hexyl)oxy)phenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2oxoethyl)thio)methyl)phosphonat (27d)



[592.20]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 10** unter Verwendung von Methyl 2-(((diethoxyphosphoryl) (4-((6-(1,3-dioxoisoindolin-2-yl)hexyl)oxy)phenyl)methyl)thio) acetat (**26d**) (2.25 g, 3.99 mmol, 1.00 Äq.), *N*-Methylhydroxylamin•HCl (500 mg, 5.99 mmol, 1.50 Äq.) und 1,1'-Carbonyldiimidazol (971 mg, 5.99 mmol, 1.50 Äq.) in 25 mL Tetrahydrofuran. Diethyl ((4-((6-(1,3-dioxoisoindolin-2-yl)hexyl)oxy)phenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)thio)meth-yl)phosphonat (**27d**) wurde als farbloses Öl (2.10 g, 3.54 mmol, 89 %) erhalten.

Analytische Daten

 R_{f} 0.28 (Dichlormethan/Methanol 20/1 v/v + 0.1 % Ameisensäure). ¹**H-NMR** (600 MHz, CD₃OD) δ 1.14 (t, J = 7.1 Hz, 3 H), 1.31 (t, J = 7.1 Hz, 3 H), 1.37 - 1.45 (m, 2 H), 1.53 (dtd, J = 9.3, 7.3, 5.7 Hz, 2 H), 1.67 – 1.74 (m, 2 H), 1.74 – 1.81 (m, 2 H), 3.17 (s, 3 H), 3.24 (d, J = 14.5 Hz, 1 H), 3.59 (dd, J = 14.5, 2.6 Hz, 1 H), 3.68 (t, J = 7.1 Hz, 2 H), 3.85 (ddq, J = 10.2, 8.4, 7.1 Hz, 1 H), 3.91 – 4.02 (m, 3 H), 4.08 – 4.20 (m, 2 H), 4.48 – 4.55 (m, 1 H), 6.84 – 6.90 (m, 2 H), 7.33 – 7.39 (m, 2 H), 7.80 (td, J = 5.2, 2.0 Hz, 2 H), 7.84 (td, J = 5.2, 2.1 Hz, 2 H). ¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD) δ 16.6 (d, ${}^{3}J_{CP}$ = 5.8 Hz), 16.7 (d, ${}^{3}J_{CP}$ = 5.7 Hz), 26.8, 27.6, 29.4, 30.1, 32.3 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 7.4 Hz), 36.4, 38.7, 43.3 (d, ${}^{1}J_{C,P}$ = 133.2 Hz), 64.7 (d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 7.2 Hz), 64.9 (d, $^{2}J_{CP} = 7.4$ Hz), 69.0, 115.5, 124.1, 127.5 (d, $^{2}J_{C,P} = 5.7$ Hz), 131.9 (d, $^{3}J_{C,P} = 6.4$ Hz), 133.4, 135.4, 160.5 (d, ${}^{5}J_{C,P}$ = 2.6 Hz), 169.9, 171.6. ³¹**P-NMR** (121 MHz, CDCl₃) δ 22.10. HPLC (Methode A, 254 nm) t_R: 13.22 min, 97.0 % Reinheit.

9.6.3.8. Darstellung der (((2-(Hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)thio)(phenyl)methyl) phosphonsäuren 28a-d

((3-(Hexyloxy)phenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)thio)methyl)phosphonsäure (28a)



C₁₆H₂₆NO₆PS [391.12]

Die Synthese erfolgte gemäß der der **AAV 11** aus Diethyl ((3-(hexyloxy)phenyl)((2-(hydroxy(meth-yl)amino)-2-oxoethyl)thio)methyl)phosphonat (**27a**) (100 mg, 0.22 mmol, 1.00 Äq.) und Trimethylsilylbromid (295 μ L, 2.23 mmol, 10.0 Äq.) in 3.0 mL trockenem Dichlormethan. Das Rohprodukt wurde mit der **Aufreinigungsmethode II** gereinigt und ((3-(Hexyloxy)phenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)thio)methyl)phosphonsäure (**28a**) als farbloses Öl (67 mg, 0.13 mmol, 83 %) erhalten.

¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 0.87 (td, J = 5.7, 2.5 Hz, 3 H), 1.24 – 1.45 (m, 6 H),
	1.63 – 1.76 (m, 2 H), 3.06 (s, 3 H), 3.21 (d, <i>J</i> = 14.7 Hz,
	1 H), 3.49 (d, <i>J</i> = 14.8 Hz, 1 H), 3.91 (t, <i>J</i> = 6.5 Hz, 2 H),
	4.21 (d, J = 19.1 Hz, 1 H), 6.71 – 6.85 (m, 1 H),
	6.87 – 7.00 (m, 2 H), 7.19 (t, <i>J</i> = 7.9 Hz, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 14.4, 22.5, 25.7, 29.2, 31.5, 32.5 (d, $^3J_{\text{C},\text{P}}$ =6.7 Hz), 36.3,
	46.3 (d, ${}^{1}J_{C,P}$ = 139.1 Hz), 67.7, 113.1, 116.1 (d,
	${}^{5}J_{C,P}$ = 5.8 Hz), 122.1 (d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 6.1 Hz), 129.3, 139.4,
	158.8 (d, ² J _{C,P} = 7.1 Hz), 169.5.
³¹ P-NMR (121 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 17.34.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 10.68 min, 96.0 % Reinheit.
HRMS (ESI) m/z	ber. für C ₁₆ H ₂₇ N ₂ O ₆ PS: 392.1291, gef.: 392.1288.

((4-(Hexyloxy)phenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)thio)methyl)phosphonsäure (28b)



Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 11** aus Diethyl ((4-(hexyloxy)phenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)thio)methyl)phosphonat (**27b**) (90 mg, 0.20 mmol, 1.00 Äq.) und Trimethylsilylbromid (265 μ L, 2.01 mmol, 10.0 Äq.) in 3 mL trockenem Dichlormethan. Das Rohprodukt wurde mit der **Aufreinigungsmethode II** gereinigt und ((4-(Hexyloxy)phenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)thio)methyl)phosphonsäure (**28b**) als farbloses Öl (65 mg, 0.17 mmol, 83 %) erhalten.

δ 0.82 – 0.93 (m, 3 H), 1.30 (dq, J = 7.4, 3.5 Hz, 4 H),
1.35 – 1.47 (m, 2 H), 1.68 (dt, <i>J</i> = 8.1, 6.4 Hz, 2 H), 3.06
(s, 3 H), 3.19 (d, <i>J</i> = 14.7 Hz, 1 H), 3.48 (d, <i>J</i> = 14.9 Hz,
1 H), 3.93 (t, <i>J</i> = 6.5 Hz, 2 H), 4.19 (d, 1 H), 6.81 – 6.88
(m, 2 H), 7.25 – 7.31 (m, 2 H).
δ 13.9, 22.1, 25.2, 28.7, 31.0, 31.8 (d, $^3\!J_{\rm C,P}{=}6.1$ Hz),
35.8, 45.1 (d, ${}^{1}J_{C,P}$ = 140.9 Hz), 67.4, 113.9, 128.9, 130.4
(d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 6.1 Hz), 157.7 (d, ${}^{5}J_{C,P}$ = 2.2 Hz), 169.1, 171.1.
δ17.34.
t _R : 10.83 min, 95.4 % Reinheit.
ber. für C ₁₆ H ₂₇ N ₂ O ₆ PS: 392.1291, gef.: 392.1287.

((3-((6-(1,3-Dioxoisoindolin-2-yl)hexyl)oxy)phenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)thio)methyl)phosphosäure (28c)



 $C_{24}H_{29}N_2O_8PS$

[536.14]

Die Synthese erfolgte gemäß der AAV 11 aus Diethyl ((3-((6-(1,3-dioxoisoindolin-2yl)hexyl)oxy)phenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)thio)methyl)phosphonat (27c) (89 mg, 0.15 mmol, 1.00 Äq.) und Trimethylsilylbromid (204 µL, 1.50 mmol, 10.0 Äq.) in 3 mL trockenem Dichlormethan hergestellt. Das Rohprodukt wurde mit der ((3-((6-(1,3-Dioxoisoindolin-2-Aufreinigungsmethode II gereinigt und yl)hexyl)oxy)phenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl) thio)methyl)phosphosäure (28c) als farbloses Öl (69 mg, 0.13 mmol, 84 %) erhalten.

¹ H-NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	1.29 – 1.49 (m, 4 H), 1.55 – 1.74 (m, 4 H), 3.06 (s, 3 H),
	3.23 (d, <i>J</i> = 14.7 Hz, 1 H), 3.49 (d, <i>J</i> = 14.5 Hz, 1 H), 3.58
	(t, $J = 7.1$ Hz, 2 H), 3.90 (t, $J = 6.4$ Hz, 2 H), 4.21 (d,
	J = 19.2 Hz, 1 H), 6.74 - 6.81 (m, 1 H), 6.90 - 6.98 (m,
	2 H), 7.18 (t, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1 H), 7.80 – 7.91 (m, 4 H).
¹³ C-NMR (151 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	25.7, 26.5, 28.4, 29.1, 32.5 (d, ³ J _{C,P} = 6.9 Hz), 36.3, 37.8,
	46.2 (d, ${}^{1}J_{C,P}$ = 139.1 Hz), 67.7, 113.1, 116.1 (d,
	${}^{5}J_{C,P}$ = 5.9 Hz), 122.1 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 6.0 Hz), 123.5, 129.4,
	132.1, 134.8, 139.3 (d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 3.1 Hz), 158.8, 168.4,
	169.5.
³¹ P-NMR (121 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ17.19.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 10.74 min, 97.0 % Reinheit.
HRMS (ESI) m/z	ber. für C ₂₄ H ₃₀ N ₂ O ₈ PS: 537.1455, gef.: 537.1453.

((4-((6-(1,3-Dioxoisoindolin-2-yl)hexyl)oxy)phenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2oxoethyl)thio)methyl)phosphosäure (28d)



Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 11** aus Diethyl ((4-((6-(1,3-dioxoisoindolin-2yl)hexyl)oxy)phenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)thio)methyl)phosphonat (**27d**) (72 mg, 0.12 mmol, 1.00 Äq.) und Trimethylsilylbromid (160 μ L, 1.21 mmol, 10.0 Äq.) in 3 mL trockenem Dichlormethan. Das Rohprodukt wurde mit der **Aufreinigungsmethode II** gereinigt und ((4-((6-(1,3-Dioxoisoindolin-2-yl)hexyl)oxy)phenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl) thio)methyl)phosphosäure (**28d**) wurde als farbloser Feststoff (50 mg, 0.32 mmol, 78 %) erhalten.

¹ H-NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 1.31 – 1.37 (m, 2H), 1.37 – 1.47 (m, 2H), 1.61 (p,
	J = 7.3 Hz, 2H), 1.68 (p, J = 6.6 Hz, 2H), 3.06 (s, 3H),
	3.19 (d, <i>J</i> = 14.6 Hz, 1H), 3.48 (d, <i>J</i> = 14.6 Hz, 1H), 3.58
	(t, J = 7.1 Hz, 2H), 3.91 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 4.19 (d,
	J = 18.7 Hz, 1H), 6.79 – 6.86 (m, 2H), 7.24 – 7.30 (m,
	2H), 7.83 (dt, J = 5.0, 3.5 Hz, 2H), 7.85 – 7.89 (m, 2H),
	9.98 (s, 1H).
¹³ C-NMR (151 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 25.6, 26.5, 28.3, 29.0, 32.2 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 6.1 Hz), 36.3,
	37.6, 37.8, 45.6 (d, ¹ J _{C,P} = 140.8 Hz), 67.8, 114.4, 123.5,
	129.4 (d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 4.5 Hz), 130.9 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 6.1 Hz), 132.1,
	134.9, 158.1, 168.4, 169.6.
³¹ P-NMR (121 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ17.46.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 9.94 min, 97.9 % Reinheit.
HRMS (ESI) m/z	ber. für C ₂₄ H ₃₀ N ₂ O ₈ PS: 537.1455, gef.: 537.1454.

- 9.6.4. Darstellung der α -(Amidophenyl)- β -thia-isosteren Fosmidomycin Analoga
- 9.6.4.1. Darstellung der Diethyl (hydroxy(phenyl)methyl)phosphonate 22f-I

Diethyl (hydroxy(3-nitrophenyl)methyl)phosphonat (22f)



Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 7** unter Verwendung von 3-Nitrobenzaldehyd (7.56 g, 50.0 mmol, 1.00 Äq.), Diethylphosphonat (6.44 mL, 50.0 mmol, 1.00 Äq.) und Magnesiumoxid (2.02 g, 50.0 mmol, 1.00 Äq.). Das Rohprodukt wurde aus Cyclohexan/Ethanol umkristallisiert und Diethyl (hydroxy(3-nitrophenyl)methyl)phosphonat (**22f**) als farbloser Feststoff (13.9 g, 48.5 mmol, 97 %) erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Publikation von SARDARIAN *et al.* überein.⁴²⁵

0.49 (Dichlormethan/Methanol 20/1 v/v).
80 °C (Lit. 81-82 °C).425
δ 1.28 (tdd, J = 7.1, 1.2, 0.6 Hz, 6 H), 4.00 – 4.24 (m,
4 H), 5.21 (d, <i>J</i> = 14.0 Hz, 1 H), 7.56 – 7.69 (m, 1 H), 7.88
(dddt, $J = 7.7$, 2.5, 1.7, 0.9 Hz, 1 H), 8.19 (dtd, $J = 8.2$,
2.2, 1.0 Hz, 1 H), 8.35 – 8.43 (m, 1 H).
t _R : 8.65 min, 96.1 % Reinheit.

Diethyl (hydroxy(4-nitrophenyl)methyl)phosphonat (22g)



Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 7** unter Verwendung von 4-Nitrobenzaldehyd (3.78 g, 25.0 mmol, 1.00 Äq.), Diethylphosphonat (3.22 mL, 25.0 mmol, 1.00 Äq.) und Magnesiumoxid (1.01 g, 25.0 mmol, 1.00 Äq.). Das Rohprodukt wurde aus Cyclohexan/Ethanol umkristallisiert und Diethyl (hydroxy(4-nitrophenyl)methyl)phosphonat (**22g**) als oranger Feststoff (7.05 g, 24,4 mmol, 98 %) erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Publikation von SARDARIAN *et al.* überein.⁴²⁵

R _f	0.46 (Dichlormethan/Methanol 20/1 v/v).
Schmelzpunkt	88 °C (Lit. 87-88 °C). ⁴²⁵
¹ H-NMR (300 MHz, CD ₃ OD)	δ 1.28 (dt, J = 7.1, 2.0 Hz, 6 H), 4.01 – 4.23 (m, 4 H), 5.20
	(d, J = 15.1 Hz, 1 H,), 7.67 - 7.79 (m, 2 H), 8.18 - 8.29
	(m, 2 H).
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 8.58 min, ≥ 99 % Reinheit.

Diethyl ((3-aminophenyl)(hydroxy)methyl)phosphonat (22h)



In einem 500 mL Rundkolben wurde Diethyl (hydroxy(3-nitrophenyl)methyl)phosphonat (**22f**) (10.7 g, 37.0 mmol, 1.00 Äq) in 185 mL Methanol unter Stickstoffatmosphäre gelöst. Zu dieser Lösung wurde Palladium auf Aktivkohle (3.94 mg, 3.70 mmol, 10 mol%) gegeben und unter Wasserstoffatmosphäre (Ballon) bei Raumtemperatur 24 h lang gerührt. Die Suspension wurde über Kieselgel filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Diethyl ((3-aminophenyl)(hydroxy)methyl)phosphonat (**22h**) wurde als gelber Feststoff (9.62 g, 37.1 mmol, 99 %) erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Publikation von NÉMETH *et al.* überein.⁵¹²

R _f	0.56 (Dichlormethan/Methanol 9/1 v/v + 1 % Triethyl-
	amin).
Schmelzpunkt	160 °C.
¹ H-NMR (300 MHz, CD ₃ OD)	δ 1.25 (t, J = 6.1 Hz, 3 H), 1.29 (t, J = 6.1 Hz, 3 H), 3.37
	(s, 1 H), $3.90 - 4.20$ (m, 4 H), 4.91 (d, 1 H), 6.69 (dtd,
	J = 8.0, 2.2, 1.0 Hz, 1 H), $6.77 - 6.85$ (m, 1 H), 6.88 (q,
	<i>J</i> = 2.1 Hz, 1 H), 7.10 (td, <i>J</i> = 7.8, 0.9 Hz, 1 H).
HPLC (Methode C, 220 nm)	t_R : 3.64 min, 96.0 % Reinheit.
¹ H-NMR (300 MHz, CD₃OD) HPLC (Methode C, 220 nm)	δ 1.25 (t, $J = 6.1$ Hz, 3 H), 1.29 (t, $J = 6.1$ Hz, 3 H), 3 (s, 1 H), 3.90 – 4.20 (m, 4 H), 4.91 (d, 1 H), 6.69 (J = 8.0, 2.2, 1.0 Hz, 1 H), 6.77 – 6.85 (m, 1 H), 6.88 J = 2.1 Hz, 1 H), 7.10 (td, $J = 7.8, 0.9$ Hz, 1 H). t _R : 3.64 min, 96.0 % Reinheit.

Diethyl ((4-aminophenyl)(hydroxy)methyl)phosphonat (22i)



[259.10]

In einem 250 mL Rundkolben wurde Diethyl (hydroxy(4-nitrophenyl)methyl)phosphonat (**22g**) (7.00 g, 24.2 mmol, 1.00 Äq) in 120 mL Methanol unter Stickstoffatmosphäre gelöst. Zu dieser Lösung wurde Palladium auf Aktivkohle (2.58 mg, 2.42 mmol, 10 mol%) zugegeben und unter Wasserstoffatmosphäre (Ballon) bei Raumtemperatur 24 h lang gerührt. Die Suspension wurde über Kieselgel filtriert, das Filtrat eingeengt und im Vakuum vollständig getrocknet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Dichlormethan/Methanol 20/1 v/v + 1 % Triethylamin) isoliert und Diethyl ((4-aminophenyl)(hydroxy)methyl)phosphonat (**22i**) als farbloser Feststoff (6.14 g, 23.7 mmol, 98 %) erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Publikation von NÉMETH *et al.* überein.⁵¹²

Analytische Daten

0.52 (Dichlormethan/Methanol 9/1 v/v + 1 % Et ₃ N).
156 °C (Lit. 157-158 °C). ⁵¹²
δ 1.22 (t, J = 7.1 Hz, 3 H), 1.28 (t, J = 7.1 Hz, 3 H),
3.85 - 4.16 (m, 4 H), 4.86 (d, $J = 11.8$ Hz, 1 H),
6.75 – 6.85 (m, 2 H), 7.22 – 7.34 (m, 2 H).
t_R : 3.72 min, ≥ 99 % Reinheit.

472
Diethyl ((3-hexanamidophenyl)(hydroxy)methyl)phosphonat (22j)



[357.17]

Die Synthese erfolgte gemäß einer modifizierten Vorschrift von CHANTHAMATH *et al.*⁵¹³ In einem 500 mL Rundkolben wurde Diethyl ((3-aminophenyl)(hydroxy)methyl)phosphonat (**22h**) (9.39 g, 36.2 mmol, 1.00 Äq.) in 180 mL Aceton gelöst und mit wasserfreiem Kaliumcarbonat (5.01 g, 36.2 mmol, 1.00 Äq.) versetzt. Die Suspension wurde unter Eisbadkühlung bei 0 °C 10 min lang gerührt. Anschließend wurde Capronsäurechlorid (5.39 mL, 38 mmol, 1.05 Äq.) zugetropft. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur 1 h lang gerührt und filtriert. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels Flash-Säulenchromatographie (Dichlormethan \rightarrow Dichlormethan/Methanol 20/1 *v/v*) isoliert. Diethyl ((3-hexanamidophenyl)(hydroxy)methyl)-phosphonat (**22j**) wurde als gelbes Öl (6.60 g, 18.5 mmol, 51 %) erhalten.

R _f	0.30 (Dichlormethan/Methanol 20/1 v/v).
¹ H-NMR (300 MHz, CD ₃ OD)	δ0.90 − 1.01 (m, 3 H), 1.28 (dt, J = 8.2, 7.1 Hz, 6 H), 1.40
	(dp, J = 7.2, 4.3 Hz, 4 H), 1.72 (p, J = 7.3 Hz, 2 H), 2.38
	(t, J = 7.5 Hz, 2 H), 3.93 – 4.19 (m, 4 H), 5.00 (d,
	J = 13.1 Hz, 1 H), 7.19 – 7.27 (m, 1 H), 7.32 (t,
	J = 7.8 Hz, 1 H), 7.57 (dq, J = 8.3, 1.8 Hz, 1 H), 7.70 (q,
	<i>J</i> = 2.1 Hz, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CD ₃ OD)	δ 14.3, 16.7 (t, ${}^{3}J_{C,P}$ = 5.0 Hz), 23.5, 26.7, 32.6, 38.0, 64.4
	(d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 7.2 Hz), 64.7 (d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 7.5 Hz), 71.4 (d,
	$^{1}J_{C,P}$ = 165.7 Hz), 120.3 (d, $^{3}J_{C,P}$ = 5.7 Hz), 120.9 (d,
	${}^{5}J_{C,P}$ = 3.1 Hz), 124.2 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 5.8 Hz), 129.5 (d,
	${}^{4}J_{C,P}$ = 2.6 Hz), 139.5 (d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 1.4 Hz), 139.9 (d,
	$^{4}J_{C,P}$ = 2.4 Hz), 174.7.
³¹ P-NMR (122 MHz, CD ₃ OD)	δ 21.86 .
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 9.96 min, ≥ 99 % Reinheit.





 $C_{17}H_{28}NO_5P$

[357.17]

Die Synthese erfolgte gemäß einer modifizierten Vorschrift von CHANTHAMATH *et al.*⁵¹³ In einem 250 mL Rundkolben wurde Diethyl ((4-aminophenyl)(hydroxy)methyl)phosphonat (**22i**) (3.00 g, 11.6 mmol, 1.00 Äq.) in 56 mL Aceton gelöst und mit Kaliumcarbonat (1.60 g, 11.6 mmol, 1.00 Äq.) versetzt. Die Suspension wurde unter Eisbadkühlung bei 0 °C 10 min lang gerührt. Anschließend wurde Capronsäurechlorid (1.72 mL, 12.2 mmol, 1.05 Äq.) zugetropft. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur 1 h lang gerührt und filtriert. Das Lösemittel des Filtrates wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels Flash-Säulenchromatographie (Dichlormethan \rightarrow Dichlormethan/Methanol 20/1 *v/v*) isoliert. Diethyl ((4-hexanamidophenyl)(hydroxy)methyl)-phosphonat (**22k**) wurde als gelber Feststoff (2.25 g, 6.30 mmol, 54 %) erhalten.

R _f	0.30 (Dichlormethan/Methanol 20/1 v/v).
Schmelzpunkt	129 °C.
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃)	δ 0.83 – 0.95 (m, 3 H), 1.20 (t, J = 7.1 Hz, 3 H), 1.27 (t,
	J = 7.1 Hz, 3 H), 1.34 (h, J = 3.5 Hz, 4 H), 1.70 (p,
	<i>J</i> = 6.2 Hz, 2 H), 2.36 (t, <i>J</i> = 7.6 Hz, 2 H), 3.82 – 4.16 (m,
	4 H), 4.93 (d, <i>J</i> = 11.6 Hz, 1 H), 7.33 (dd, <i>J</i> = 8.7, 2.2 Hz,
	2 H), 7.45 (d, <i>J</i> = 8.3 Hz, 2 H), 8.13 (s, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃)	δ 14.1, 16.5 (t, ${}^{3}J_{C,P}$ = 6.1 Hz), 22.6, 25.4, 31.6, 37.7,
	63.30 (d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 7.2 Hz), 63.4 (d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 7.7 Hz), 70.6 (d,
	$^{1}J_{C,P}$ = 161.2 Hz), 119.9 (d, $^{4}J_{C,P}$ = 2.3 Hz), 127.9 (d,
	$^{2}J_{C,P}$ = 6.0 Hz), 131.9 (d, $^{3}J_{C,P}$ = 1.7 Hz), 138.4 (d,
	⁵ J _{C,P} = 3.2 Hz), 172.2.
³¹ P-NMR (121 MHz, CDCl ₃)	δ21.20.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 9.79 min, ≥ 99 % Reinheit.

tert-Butyl (4-((diethoxyphosphoryl)(hydroxy)methyl)phenyl)carbamat (22l)



 $C_{16}H_{26}NO_6P$

[359.15]

In einem 100 mL Rundkolben wurde Diethyl ((4-aminophenyl)(hydroxy)methyl)phosphonat (**22i**) (3.50 g, 13.5 mmol, 1.00 Äq) in 20 mL Dichlormethan gelöst und *N,N*-Diisopropylamin (2.60 mL, 14.9 mmol, 1.10 Äq) hinzugefügt. Di-*tert*-butyldicarbonat (3.09 g, 14.2 mmol, 1.05 Äq) wurde in 20 mL Dichlormethan gelöst und tropfenweise zum Reaktionsansatz gegeben. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur 16 h lang gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung (3 x 40 mL) gewaschen, die organische Phase mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde aus Cyclohexan/Ethanol umkristallisiert und *tert*-Butyl (4-((diethoxy-phosphoryl)(hydroxy)methyl)phenyl)carbamat (**22i**) als farbloser Feststoff (2.58 g, 7.18 mmol, 53 %) erhalten.

R _f	0.13 (Cyclohexan/Ethylacetat 1/2 v/v).
Schmelzpunkt	177 °C.
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl₃)	δ 1.24 (t, J = 7.1 Hz, 3 H), 1.29 (t, J = 7.1 Hz, 3 H), 1.54 (s, 9 H), 3.37 (dd, J = 10.2, 5.1 Hz, 1 H), 3.89 – 4.16 (m, 4 H), 4.97 (dd, J = 10.4, 5.1 Hz, 1 H), 6.63 (s, 1 H), 7.34 – 7.47 (m, 4 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CD₃OD)	δ 16.7 (t, ${}^{3}J_{C,P}$ = 5.1 Hz), 28.7, 64.3 (d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 7.4 Hz), 64.5 (d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 7.4 Hz), 71.1 (d, ${}^{1}J_{C,P}$ = 166.4 Hz), 80.9, 119.3, 129.1 (d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 6.2 Hz), 132.5 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 1.6 Hz), 140.7 (d, ${}^{5}J_{C,P}$ = 3.1 Hz), 155.2.
³¹ P-NMR (122 MHz, CD ₃ OD)	δ22.23.
HPLC (Methode A, 220 nm)	t _R : 10.26 min, 95.0 % Reinheit.

Darstellung der (Diethoxyphosphoryl)(phenyl)methyltosylate 23d-f (Diethoxyphosphoryl)(3-nitrophenyl)methyltosylat (23d)



C₁₈H₂₂NO₈PS [443.08]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 8** unter Verwendung von Diethyl (hydroxy(4nitrophenyl)methyl)phosphonat (**22f**) (3.00 g, 10.4 mmol, 1.00 Äq.), *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (5.93 g, 31.1 mmol, 1.20 Äq.), 4-(Dimethylamino)pyridin (127 mg, 1.04 mmol, 0.10 Äq.) und Triethylamin (3.61 mL, 25.9 mmol, 2.50 Äq.) in 50 mL Dichlormethan. (Diethoxyphosphoryl)(4-nitrophenyl)methyltosylat (**23d**) wurde als farbloses Öl (4.14 g, 9.34 mmol, 90 %) erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen des Patents von ARSTAD und SKATTEBOL überein.⁵¹⁴

R _f	0.46 (Cyclohexan/Ethylacetat 1/1 v/v).
Schmelzpunkt	93 °C (Lit. 90-92 °C). ⁵¹⁴
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃)	δ 1.18 – 1.33 (m, 6 H), 2.34 (s, 3 H), 3.81 – 4.26 (m, 4 H),
	5.72 (d, $J = 16.3$ Hz, 1 H), 7.11 – 7.20 (m, 2 H), 7.44 (t,
	J = 8.0 Hz, 1 H), $7.56 - 7.64$ (m, 2 H), $7.64 - 7.74$ (m,
	1 H), 7.99 – 8.06 (m, 1 H), 8.06 – 8.15 (m, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃)	δ 16.4 (d, ${}^{3}\!J_{\rm C,P}$ = 5.5 Hz), 16.5 (d, ${}^{3}\!J_{\rm C,P}$ = 5.9 Hz), 21.7,
	64.1 (d, $^2J_{\rm C,P}$ = 6.8 Hz), 64.7 (d, $^2J_{\rm C,P}$ = 7.0 Hz), 76.10 (d,
	$^2J_{\rm C,P}$ = 191.2 Hz), 123.0 (d, $^3J_{\rm C,P}$ = 5.6 Hz), 123.8 (d,
	${}^{5}J_{C,P}$ = 2.8 Hz), 128.1, 129.5 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 2.1 Hz), 129.8,
	133.4, 134.0 (d, ${}^{4}J_{C,P}$ = 5.3 Hz), 134.5 (d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 1.8 Hz),
	145.6, 148.1 (d, ⁴ J _{C,P} = 2.0 Hz).
³¹ P-NMR (121 MHz, CDCl ₃)	δ13.19.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 13.64 min, ≥ 99 % Reinheit.





J18H22INU8P3

[443.08]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 8** unter Verwendung von Diethyl (hydroxy(4nitrophenyl)methyl)phosphonat (**22g**) (3.00 g, 10.4 mmol, 1.00 Äq.), *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (5.93 g, 31.1 mmol, 1.20 Äq.), 4-(Dimethylamino)pyridin (127 mg, 1.04 mmol, 0.10 Äq.) und Triethylamin (3.61 mL, 25.9 mmol, 2.50 Äq.) in 50 mL Dichlormethan. (Diethoxyphosphoryl)(4-nitrophenyl)methyltosylat (**23e**) wurde als farbloses Öl (4.14 g, 9.34 mmol, 90 %) erhalten.

0.46 (Cyclohexan/Ethylacetat 1/1 <i>v</i> / <i>v</i>).
δ 1.17 – 1.31 (m, 6 H), 2.38 (s, 3 H), 3.89 – 4.24 (m, 4 H),
5.74 (d, $J = 16.8$ Hz, 1 H), 7.15 – 7.25 (m, 2 H),
$7.43 - 7.54 \ (m, 2 \ H), \ 7.59 - 7.68 \ (m, 2 \ H), \ 8.05 - 8.14 \ (m,$
2 H).
$\delta16.5$ (d, ${}^3\!J_{\rm C,P}$ = 5.8 Hz), 16.7 (d, ${}^3\!J_{\rm C,P}$ = 5.9 Hz), 21.5,
65.6 (d, $^2J_{C,P}$ = 6.6 Hz), 66.0 (d, $^2J_{C,P}$ = 7.2 Hz), 76.9 (d,
${}^{1}J_{C,P}$ = 171.2 Hz), 124.3 (d, ${}^{4}J_{C,P}$ = 2.3 Hz), 129.3, 130.3
(d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 5.4 Hz), 131.0, 134.4, 140.6 (d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 2.3 Hz),
147.2, 149.4 (d, ${}^{5}J_{C,P}$ = 3.1 Hz).
δ13.27.
t _R : 13.51 min, ≥ 99 % Reinheit.





[511.18]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 8** unter Verwendung von Diethyl ((3hexanamidophenyl)(hydroxy)methyl)phosphonat (**22j**) (5.12 g, 13.8 mmol, 1.00 Äq.), *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (5.26 g, 27.6 mmol, 2.00 Äq.), 4-(Dimethylamino)pyridin (168 mg, 1.30 mmol, 0.10 Äq.) und Triethylamin (4.80 mL, 34.5 mmol, 2.50 Äq.) in 62 mL Dichlormethan. (Diethoxyphosphoryl)(3-hexanamidophenyl)methyltosylat (**24f**) wurde als farbloser Feststoff (5.23 g, 9.95 mmol, 72 %) erhalten.

R _f	0.37 (Cyclohexan/Ethylacetat 1/2 v/v).
Schmelzpunkt	108 °C.
¹ H-NMR (300 MHz, CD ₃ OD)	δ 0.93 (td, J = 5.6, 2.8 Hz, 3 H), 1.17 (t, J = 7.1 Hz, 3 H),
	1.29 (t, J = 7.1 Hz, 3 H), 1.35 (p, J = 3.8 Hz, 4 H), 1.69
	(dd, <i>J</i> = 17.0, 9.8 Hz, 3 H), 2.31 (t, <i>J</i> = 7.6 Hz, 2 H), 2.35
	(s, 3 H), 3.78 – 4.23 (m, 4 H), 5.61 (d, <i>J</i> = 15.6 Hz, 1 H),
	7.00 (d, J = 7.8 Hz, 1 H), 7.08 – 7.22 (m, 4 H), 7.22 (q,
	<i>J</i> = 2.0 Hz, 1 H), 7.54 – 7.63 (m, 2 H), 7.71 (d, <i>J</i> = 8.3 Hz,
	1 H).
¹³ C-NMR (151 MHz, CDCl ₃)	δ 14.3, 16.5 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 5.6 Hz), 16.7 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 5.5 Hz),
	21.5, 23.5, 26.6, 32.6, 38.0, 65.4 (d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 7.1 Hz), 65.7
	(d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 7.2 Hz), 78.3 (d, ${}^{1}J_{C,P}$ = 172.0 Hz), 120.6 (d,
	${}^{3}J_{C,P}$ = 5.8 Hz), 121.4 (d, ${}^{5}J_{C,P}$ = 2.7 Hz), 124.8 (d,
	${}^{3}J_{C,P}$ = 6.0 Hz), 129.2, 129.7 (d, ${}^{4}J_{C,P}$ = 2.1 Hz), 130.7,
	133.4 (d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 2.1 Hz), 134.8, 140.2 (d, ${}^{4}J_{C,P}$ = 2.2 Hz),
	146.6, 174.6.
³¹ P-NMR (121 MHz, CDCl ₃)	δ 14.34.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 14.49 min, ≥ 99 % Reinheit.

9.6.4.2. Darstellung der Diethyl (chlor(phenyl)methyl)phosphonate 24c-d



Diethyl (chlor(4-hexanamidophenyl)methyl)phosphonat (24c)

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 8** unter Verwendung von Diethyl ((4hexanamidophenyl)(hydroxy)methyl)phosphonat (**22k**) (1.20 g, 3.36 mmol, 1.00 Äq.), *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (768 mg, 4.03 mmol, 1.20 Äq.), 4-(Dimethylamino)pyridin (41 mg, 0.37 mmol, 0.10 Äq.) und Triethylamin (1.17 mL, 8.39 mmol, 2.50 Äq.) in 57 mL Dichlormethan. Diethyl (chlor(4-hexanamidophenyl)methyl)phosphonat (**24c**) wurde als farbloses Öl (1.15 g, 3.06 mmol, 91 %) erhalten.

R _f	0.29 (Cyclohexan/Ethylacetat 1/2 v/v).
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃)	δ 0.86 – 0.98 (m, 3 H), 1.21 (t, J = 7.1 Hz, 3 H),
	1.29 – 1.44 (m, 7 H), 1.75 (p, J = 7.4 Hz, 1 H), 2.40 (t,
	J = 7.8 Hz, 2 H), $3.80 - 4.16$ (m, 2 H), 4.24 (dq, $J = 7.1$,
	8.1 Hz, 2 H), 4.89 (d, <i>J</i> = 13.9 Hz, 1 H), 7.46 (dd, <i>J</i> = 2.0,
	8.7 Hz, 2 H), 7.56 (d, J = 8.4 Hz, 2 H), 7.91 (s, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃)	δ 14.0, 16.3 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 5.8 Hz), 16.4 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 5.8 Hz),
	22.6, 25.7, 29.1, 31.5, 53.4 (d, $^1\!J_{\rm C,P}$ = 162.5 Hz), 63.8 (d,
	$^2J_{\text{C},\text{P}}$ = 7.0 Hz), 64.0 (d, $^2J_{\text{C},\text{P}}$ = 7.2 Hz), 68.1, 114.5 (d,
	$^{4}J_{C,P}$ = 1.7 Hz), 125.8 (d, $^{2}J_{C,P}$ = 3.5 Hz), 130.3 (d,
	${}^{3}J_{C,P}$ = 6.4 Hz), 159.7 (d, ${}^{5}J_{C,P}$ = 2.3 Hz).
³¹ P-NMR (121 MHz, CDCl ₃)	<i>δ</i> 17.46.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 12.78 min, 98.5 % Reinheit.

tert-Butyl (4-(chlor(diethoxyphosphoryl)methyl)phenyl)carbamat (24d)



 $C_{16}H_{25}CINO_5P$

[377.12]

Die Synthese erfolgte gemäß der AAV 8 unter Verwendung von *tert*-Butyl (4-((diethoxyphosphoryl)(hydroxy)methyl)phenyl)carbamat (**22I**) (2.46 g, 6.85 mmol, 4-Nitrobenzolsulfonylchlorid 1.20 Äq.), 1.00 Äq.), (1.82 g, 8.21 mmol, 4-(Dimethylamino)pyridin (84 mg, 0.69 mmol, 0.10 Äq.) und Triethylamin (2.39 mL, 17.1 mmol, 2.50 Äq.) in 30 mL Dichlormethan. Diethyl (chlor(4-((6-(1,3-dioxoisoindolin-2yl)hexyl)oxy)phenyl)methyl)phos-phonat (24d) wurde als gelber Feststoff (1.68 g, 4.45 mmol, 65 %) erhalten.

```
Analytische Daten
```

R _f	0.31 (Cyclohexan/Ethylacetat 1/1 v/v).
Schmelzpunkt	117 °C.
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃)	δ 1.19 (td, J = 7.0, 0.7 Hz, 3 H), 1.33 (td, J = 7.0, 0,6 Hz,
	3 H), 1.52 (s, 9 H), 3.89 (ddq, <i>J</i> = 10.2, 8.5, 7.0 Hz, 1 H),
	3.97 – 4.14 (m, 1 H), 4.19 (dq, <i>J</i> = 8.2, 6.9 Hz, 2 H), 4.85
	(d, $J = 13.9$ Hz, 1 H), 6.58 (s, 1 H), 7.37 (d, $J = 8.7$ Hz,
	2 H), 7.45 (dd, <i>J</i> = 8.7, 1.9 Hz, 2 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CD ₃ OD)	δ 16.7 (t, ${}^{3}J_{\rm C,P}$ = 5.8 Hz), 27.3, 64.6 (d, ${}^{2}J_{\rm C,P}$ = 7.1 Hz),
	64.9 (d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 7.2 Hz), 74.4, 80.2 (d, ${}^{1}J_{C,P}$ = 169.1 Hz),
	124.3 (d, ${}^{4}J_{C,P}$ = 2.7 Hz), 131.0 (d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 5.7 Hz), 132.1
	(d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 3.6 Hz), 137.5 (d, ${}^{5}J_{C,P}$ = 1.9 Hz), 156.8.
³¹ P-NMR (121 MHz, CD ₃ OD)	δ 18.66.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 13.40 min, 95.3 % Reinheit.

9.6.4.3. Darstellung der Methyl 2-(((diethoxyphosphoryl)(phenyl)methyl)thio)acetate 25e-g

Methyl 2-(((diethoxyphosphoryl)(3-hexanamidophenyl)methyl)thio)acetat (25e)



[445.17]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 9** unter Verwendung von (Diethoxyphosphoryl)(3hexanamidophenyl)methyltosylat (**23d**) (4.16 g, 8.16 mmol, 1.00 Äq.), Cäsiumcarbonat (5.32 g, 16.3 mmol, 2.00 Äq.) und Methylthioglycolat (1.45 mL, 16.3 mmol, 2.00 Äq.) in 53 mL N,N-Dimethylformamid. Methyl 2-(((diethoxyphosphoryl)(4-hexanamidophenyl)methyl)thio)acetat (**25e**) wurde als farbloses Öl (1.15 g, 2.58 mmol, 88 %) erhalten.

R _f	0.40 (Cyclohexan/Ethylacetat 1/2 v/v).
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃)	δ 0.87 (td, J = 6.0, 3.2 Hz, 3 H), 1.08 – 1.21 (m, 3 H),
	1.17 – 1.38 (m, 7 H), 1.67 (h, J = 7.5 Hz, 2 H),
	2.25 – 2.36 (m, 2 H), 3.08 (d, <i>J</i> = 15.2 Hz, 1 H), 3.30 (dd,
	<i>J</i> = 15.2, 2.7 Hz, 1 H), 3.64 (s, 3 H), 3.74 – 4.23 (m, 4 H),
	4.38 (d, J = 20.7 Hz, 1 H), 7.08 – 7.17 (m, 1 H),
	$7.18-7.29 \ (m, \ 1 \ H), \ 7.48-7.57 \ (m, \ 1 \ H), \ 7.73 \ (d,$
	<i>J</i> = 8.1 Hz, 1 H), 7.98 (s, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃)	δ 14.3, 16.6 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 5.9 Hz), 16.7 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 5.7 Hz),
	23.5, 26.6, 32.6, 33.7 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 7.7 Hz), 38.0, 46.4 (d,
	$^{1}J_{C,P}$ = 146.1 Hz), 52.9, 64.9 (d, $^{2}J_{C,P}$ = 7.4 Hz), 65.1 (d,
	$^{2}J_{C,P}$ = 7.2 Hz), 120.9 (d, $^{5}J_{C,P}$ = 2.5 Hz), 122.3 (d,
	${}^{3}J_{C,P}$ = 6.6 Hz), 126.3 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 6.3 Hz), 130.0 (d,
	${}^{4}J_{C,P}$ = 2.1 Hz), 136.4 (d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 5.0 Hz), 140.4 (d,
	⁴ <i>J</i> _{C,P} = 2.1 Hz), 171.9, 174.8.
³¹ P-NMR (121 MHz, CDCl ₃)	δ21.54.
HPLC (Methode C, 254 nm)	t _R : 15.32 min, 96.7 % Reinheit.





[445.17]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 9** unter Verwendung von Diethyl (chlor(4-hexanamidophenyl)methyl)phosphonat (**24c**) (1.10 g, 2.93 mmol, 1.0 Äq.), Cäsiumcarbonat (1.91 g, 5.85 mmol, 2.00 Äq.) und Methylthioglycolat (523 μ L, 5.85 mmol, 2.00 Äq.) in 20 mL *N*,*N*-Dimethylformamid. Methyl 2-(((diethoxyphosphoryl)(4-hexanamidophenyl)methyl)thio)acetat (**25f**) wurde als farbloses Öl (1.15 g, 2.58 mmol, 88 %) erhalten.

0.38 (Cyclohexan/Ethylacetat 1/2 v/v).
δ 0.85 – 0.96 (m, 3 H), 1.17 (td, J = 7.1, 0.6 Hz, 3 H),
1.22 – 1.43 (m, 8 H), 1.73 (t, J = 7.5 Hz, 2 H), 2.37 (t,
J = 7.6 Hz, 2 H), 3.05 (d, $J = 15.2$ Hz, 1 H), 3.30 (dd,
<i>J</i> = 15.2, 2.7 Hz, 1 H), 3.67 (s, 3 H), 3.70 – 4.23 (m, 4 H),
4.40 (d, <i>J</i> = 20.3 Hz, 1 H), 7.39 (dd, <i>J</i> = 8.6, 2.0 Hz, 2 H),
7.50 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 2 H), 7.83 (s, 1 H).
δ 14.1, 16.4 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 5.5 Hz), 16.5 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 5.8 Hz),
22.6, 25.4, 31.6, 32.6 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 7.7 Hz), 37.7, 45.0 (d,
$^{1}J_{C,P}$ = 148.4 Hz), 52.6, 63.6 (d, $^{2}J_{C,P}$ = 7.1 Hz), 63.7 (d,
$^{2}J_{C,P}$ = 7.1 Hz), 120.0 (d, $^{4}J_{C,P}$ = 1.5 Hz), 128.7 (d,
${}^{2}J_{C,P}$ = 5.6 Hz), 130.2 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 6.4 Hz), 138.7 (d,
⁵ J _{C,P} = 2.8 Hz), 170.5, 172.2.
<i>δ</i> 21.84.
t _R : 12.25 min, 97.0 % Reinheit.

Methyl 2-(((4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)phenyl)(diethoxyphosphoryl)methyl)thio)acetat (25g)



Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 9** unter Verwendung von Diethyl (chlor(4- (hexyloxy)phenyl)methyl)phosphonat (**24d**) (1.16 g, 3.07 mmol, 1.00 Äq.), Cäsiumcarbonat (2.01 g, 6.14 mmol, 2.00 Äq.) und Methylthioglycolat (549 μ L, 6.14 mmol, 2.00 Äq.) in 20 mL *N*,*N*-Dimethylformamid. Methyl 2-(((4-((tert-butoxycarbonyl)amino)phenyl)(diethoxyphosphoryl)methyl)thio)acetat (**25g**) wurde als farbloses Öl (1.34 g, 3.00 mmol, 98 %) erhalten.

R _f	0.18 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 1/1 <i>v</i> / <i>v</i>).
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃)	δ 1.17 (td, J = 7.0, 0.6 Hz, 3 H), 1.31 (td, J = 7.1, 0.6 Hz,
	3 H), 1.52 (s, 9 H), 3.07 (d, $J = 15.1$ Hz, 1 H), 3.33 (dd,
	J = 15.1, 2.7 Hz, 1 H), 3.67 (s, 3 H), 3.78 – 3.99 (m, 1 H),
	3.96-4.12~(m,1~H),4.06-4.23~(m,2~H),4.33-4.44~(m,
	1 H), 6.82 (s, 1 H), 7.31 – 7.44 (m, 4 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃)	δ 16.5, 28.4, 32.7 (d, $^3J_{\rm C,P}$ = 7.4 Hz), 46.0, 52.5, 63.3 (d,
	$^2J_{\text{C},\text{P}}$ = 7.1 Hz), 63.7 (d, $^2J_{\text{C},\text{P}}$ = 6.9 Hz), 80.8, 118.5, 128.5
	(d, $^2J_{\text{C},\text{P}}$ = 5.2 Hz), 130.4 (d, $^3J_{\text{C},\text{P}}$ = 6.3 Hz), 138.5 (d,
	⁵ J _{C,P} = 2.5 Hz), 152.8, 170.5.
³¹ P-NMR (121 MHz, CDCl ₃)	δ21.27.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 12.48 min, ≥ 99 % Reinheit.

9.6.4.4. Darstellung der 2-(((Diethoxyphosphoryl)(phenyl)methyl)thio)essigsäuren 26e-g

2-(((Diethoxyphosphoryl)(3-hexanamidophenyl)methyl)thio)essigsäure (26e)



[431.15]

Die Synthese erfolgte gemäß einer modifizierten Vorschrift von GRISWOLD und JOHNSON.⁵¹⁵In einem 25 mL Rundkolben wurde Methyl 2-(((diethoxyphosphoryl)(3-hexanamidophenyl) methyl)thio)acetat (25e) (1.10 g, 2.27 mmol, 1.00 Äg.) in 2 mL Methanol gelöst. Lithiumhydroxid•H₂O (104 mg, 2.27 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 3 mL einer Mischung aus Tetrahydrofuran/Wasser (2/1 v/v) gelöst und dem Reaktionsansatz tropfenweise zugegeben. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur 30 min lang gerührt und anschließend mit 10 mL 1 M Salzsäure versetzt. Die wässrige Phase wurde mit Dichlormethan (3 x 15 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. 2-(((Diethoxyphosphoryl)(3hexanamidophenyl)methyl)thio)essigsäure (26e) wurde als farbloses Öl (751 mg, 1.74 mmol, 71 %) erhalten.

R _f	0.17 (Dichlormethan/Methanol 20/1 v/v + 0.1 %
	Ameisensäure).
¹ H-NMR (300 MHz, CD ₃ OD)	δ 0.87 – 0.99 (m, 3 H), 1.11 – 1.20 (m, 3 H), 1.32 (t,
	J = 7.1 Hz, 3 H), 1.37 (dt, J = 6.4, 2.8 Hz, 4 H), 1.69 (dd,
	J = 8.6, 6.0 Hz, 2 H), 2.35 (q, J = 7.2 Hz, 2 H), 3.12 (d,
	J = 15.2 Hz, 1 H), 3.34 (dd, J = 15.2, 2.8 Hz, 1 H),
	3.82 - 3.99 (m, 1 H), $3.95 - 4.09$ (m, 1 H), $4.05 - 4.26$ (m,
	2 H), 4.46 – 4.57 (m, 1 H), 7.19 (dq, <i>J</i> = 7.7, 1.6 Hz, 1 H),
	7.29 (t, J = 7.9 Hz, 1 H), 7.60 (dq, J = 8.2, 1.7 Hz, 1 H),
	7.70 (q, <i>J</i> = 2.0 Hz, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CD ₃ OD)	δ 14.4, 16.6 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 5.8 Hz), 16.8 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 5.9 Hz),
	23.5, 26.6, 32.6, 33.9 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 7.5 Hz), 38.0, 46.1 (d,
	$^{1}J_{C,P}$ = 146.0 Hz), 64.9 (d, $^{2}J_{C,P}$ = 7.4 Hz), 65.1 (d,
	$^{2}J_{C,P}$ = 7.3 Hz), 121.0 (d, $^{5}J_{C,P}$ = 2.7 Hz), 122.2 (d,
	$^{3}J_{C,P} = 6.3 \text{ Hz}$, 126.3 (d, $^{3}J_{C,P} = 6.4 \text{ Hz}$), 130.0 (d,

 $\label{eq:c_p} \begin{array}{ll} {}^4J_{\text{C},\text{P}} = 2.2 \text{ Hz}), & 136.5 \quad (\text{d}, \ {}^2J_{\text{C},\text{P}} = 5.1 \text{ Hz}), & 140.4 \quad (\text{d}, \\ {}^4J_{\text{C},\text{P}} = 2.1 \text{ Hz}), & 173.1, & 174.8. \end{array}$

2-(((Diethoxyphosphoryl)(4-hexanamidophenyl)methyl)thio)essigsäure (26f)



 $C_{19}H_{30}NO_6PS$

[431.15]

Die Synthese erfolgte gemäß einer modifizierten Vorschrift von GRISWOLD und JOHNSON.⁵¹⁵ In 25 mL Rundkolben Methyl 2-(((diethoxyphosphoryl)(4einem wurde hexanamidophenyl)methyl)thio)acetat (25f) (998 mg, 2.24 mmol, 1.00 Äq.) in 2 mL Methanol gelöst. Lithiumhydroxid•H₂O (94 mg, 2.24 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 3 mL einer Mischung aus Tetrahydrofuran/Wasser (2/1 v/v) gelöst und dem Reaktionsansatz tropfenweise zugegeben. Der Ansatz wurde für bei Raumtemperatur 30 min lang gerührt und anschließend mit 10 mL 1 M Salzsäure versetzt. Die wässrige Phase wurde mit Dichlormethan (3 x 15 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. 2-(((Diethoxyphosphoryl)(4hexanamidophenyl)methyl)thio)-essigsäure (26f) wurde als farbloses Öl (760 mg, 1.76 mmol, 79 %) erhalten.

R _f	0.11 (Dichlormethan/Methanol 20/1 v/v + 0.1 % Ameisen-
	säure).
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃)	δ 0.86 – 0.96 (m, 2 H), 1.28 (td, J = 7.1, 4.1 Hz, 6 H),
	1.32 – 1.40 (m, 2 H), 1.72 (t, J = 7.5 Hz, 2 H), 2.36 (t,
	J = 7.6 Hz, 2 H), 3.13 (d, $J = 15.1$ Hz, 1 H), 3.42 (dd,
	J = 15.0, 2.2 Hz, 1 H), 4.01 – 4.22 (m, 4 H), 4.35 – 4.47
	(m, 1 H), 7.38 (dd, J = 8.6, 2.0 Hz, 2 H), 7.52 (d,
	<i>J</i> = 8.2 Hz, 3 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CD ₃ OD)	δ 14.3, 16.5 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 5.9 Hz), 16.7 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 5.8 Hz),
	23.5, 26.6, 32.6, 33.8 (d, $^3J_{\rm C,P}$ = 7.6 Hz), 38.0, 45.6 (d,
	$^{3}J_{C,P}$ = 147.1 Hz), 64.8 (d, $^{2}J_{C,P}$ = 7.2 Hz), 65.0 (d,
	$^{2}J_{C,P}$ = 7.1 Hz), 121.0 (d, $^{4}J_{C,P}$ = 2.1 Hz), 130.9 (d,
	$^{2}J_{C,P} = 5.4 \text{ Hz}$, 131.2 (d, $^{3}J_{C,P} = 6.5 \text{ Hz}$), 140.0 (d,
	⁵ J _{C,P} = 2.8 Hz), 173.1, 174.8.
³¹ P-NMR (243 MHz, CD ₃ OD)	δ22.06.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 10.62 min, ≥ 99 % Reinheit.

2-(((4-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)phenyl)(diethoxyphosphoryl)methyl)thio)essigsäure (26g)



Die Synthese erfolgte gemäß einer modifizierten Vorschrift von GRISWOLD und JOHNSON.⁵¹⁵ In einem 25 mL Rundkolben wurde Methyl 2-(((diethoxyphosphoryl)(3hexanamidophenyl)methyl)thio)acetat (25g) (1.30 g, 2.91 mmol, 1.00 Äq.) in 5 mL Methanol gelöst. Lithiumhydroxid•H₂O (122 mg, 2.91 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 5 mL einer Mischung aus Tetrahydrofuran/Wasser (2/1 v/v) gelöst und dem Reaktionsansatz tropfenweise zugegeben. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur 30 min lang gerührt und anschließend mit 10 mL 1 M Salzsäure versetzt. Die wässrige Phase wurde mit Dichlormethan (3 x 15 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. 2-(((Diethoxyphosphoryl)(3hexanamidophenyl)methyl)thio)-essigsäure (26g) wurde als farbloses Öl (1.21 mg, 2.79 mmol, 96 %) erhalten.

R _f	0.51 (Dichlormethan/Methanol 9/1 v/v + 0.1 % Ameisen-
	säure).
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃)	δ 1.16 (td, J = 7.0, 0.6 Hz, 3 H), 1.34 (td, J = 7.1, 0.6 Hz,
	3 H), 1.53 (s, 9 H), 3.07 (d, J = 14.6 Hz, 1 H), 3.22 (dd,
	J = 14.6, 2.5 Hz, 1 H), 3.79 – 4.09 (m, 2 H), 4.10 – 4.26
	(m, 2 H), 4.53 (d, J = 20.3 Hz, 1 H), 7.40 (d, J = 0.8 Hz,
	4 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CD ₃ OD)	δ 16.5 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 5.9 Hz), 16.7 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 5.9 Hz), 28.7,
	36.7 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 7.3 Hz), 45.4 (d, ${}^{1}J_{C,P}$ = 146.6 Hz), 64.7 (d,
	${}^{2}J_{C,P}$ = 4.4 Hz), 64.8 (d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 4.3 Hz), 80.9, 119.5, 129.9
	(d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 5.2 Hz), 131.2 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 6.6 Hz), 140.4, 155.1,
	175.8.
³¹ P-NMR (121 MHz, CD ₃ OD)	δ22.39.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 10.74 min, ≥ 99 % Reinheit.

9.6.4.5. Darstellung der (((2-(Hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)thio)(phenyl)methyl) phosphonate 27e-g

Diethyl ((3-hexanamidophenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)thio)methyl)phosphonat (27e)



C₂₀H₃₃N₂O₆PS [460.18]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 10** unter Verwendung von 2-(((Diethoxyphosphoryl)(3-hexanamidophenyl)methyl)thio)essigsäure (**26e**) (1.40 mg, 3.24 mmol, 1.00 Äq.), *N*-Methylhydroxylamin•HCI (298 mg, 3.57 mmol, 1.10 Äq.) und 1,1'-Carbonyldiimidazol (789 mg, 4.87 mmol, 1.50 Äq.) in 10 mL Tetrahydrofuran. Diethyl ((3-hexanamidophenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)thio)methyl)phosphonat (**27e**) wurde als farbloses Öl (480 mg, 1.04 mmol, 32 %) erhalten.

Anal	vtisc	he	Daten	
Anai	yusu		Daten	

R _f	0.37 (Dichlormethan/Methanol 20/1 v/v).
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃)	δ 0.86 – 0.96 (m, 3 H), 1.13 – 1.39 (m, 10 H), 1.71 (t,
	J = 7.5 Hz, 2 H), 2.36 (t, J = 7.6 Hz, 2 H), 3.17 (s, 3 H),
	3.44 (d, $J = 14.5$ Hz, 1 H), 3.60 (d, $J = 14.3$ Hz, 1 H),
	3.97 - 4.18 (m, 4 H), 4.27 (d, J = 19.9 Hz, 1 H),
	7.10 – 7.33 (m, 2 H), 7.39 – 7.55 (m, 2 H), 8.05 (s, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃)	δ 14.0, 16.3 (t, $^3\!J_{\rm C,P}$ = 6.7 Hz), 22.4, 25.2, 31.5, 32.2 (d,
	${}^{3}J_{C,P}$ = 8.2 Hz), 36.1, 37.3, 45.2 (d, ${}^{1}J_{C,P}$ = 143.1 Hz), 63.8
	(d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 7.3 Hz), 63.9 (d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 7.3 Hz), 120.1, 121.2
	(d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 6.9 Hz), 125.2, 129.1, 135.2 (d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 4.5 Hz),
	138.3 (d, ⁴ J _{C,P} = 1.7 Hz), 169.4, 172.8.
³¹ P-NMR (121 MHz, CDCl ₃)	δ21.23.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 10.42 min, 95.7 % Reinheit.

Diethyl ((4-hexanamidophenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)thio)methyl)phosphonat (27f)



Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 10** unter Verwendung von 2-(((Diethoxyphosphoryl)(4hexanamidophenyl)methyl)thio)essigsäure (**26f**) (750 mg, 1.74 mmol, 1.00 Äq.), *N*-Methylhydroxylamin•HCI (160 mg, 1.91 mmol, 1.10 Äq.) und 1,1'-Carbonyldiimidazol (423 mg, 2.61 mmol, 1.50 Äq.) in 5 mL Tetrahydrofuran. Diethyl ((4-hexanamidophenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)thio)methyl)phosphonat (**27f**) wurde als farbloses Öl (350 mg, 0.76 mmol, 44 %) erhalten.

R _f	0.28 (Dichlormethan/Methanol 20/1 <i>v/v</i>).
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃)	δ 0.87 – 0.93 (m, 3 H), 1.20 – 1.37 (m, 1 0H), 1.63 – 1.78
	(m, 2 H), 2.35 (t, <i>J</i> = 7.6 Hz, 2 H), 3.25 (s, 3 H), 3.30 (d,
	J = 14.4 Hz, 1 H), 3.69 (d, J = 14.3 Hz, 1 H), 4.04 (dd,
	J = 14.0, 7.0 Hz, 4 H), 4.21 - 4.34 (m, 1 H), 7.32 (d,
	J = 8.2 Hz, 2 H), 7.47 (d, J = 8.3 Hz, 2 H), 7.90 (s, 1 H).
¹³ C-NMR (151 MHz, CD ₃ OD)	δ 14.3, 16.5 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 5.9 Hz), 16.7 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 5.9 Hz),
	23.5, 26.6, 32.4 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 7.4 Hz), 32.6, 36.4, 38.0, 45.4
	(d, ${}^{1}J_{C,P}$ = 146.9 Hz), 64.8 (d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 7.4 Hz), 64.9 (d,
	$^{2}J_{C,P}$ = 7.2 Hz), 121.0 (d, $^{4}J_{C,P}$ = 2.1 Hz), 131.2 (d,
	${}^{3}J_{C,P}$ = 6.5 Hz), 131.4 (d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 5.1 Hz), 139.9, 171.4,
	174.8.
³¹ P-NMR (243 MHz, CD ₃ OD)	δ 22.30.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 10.88 min, 98.1 % Reinheit.

tert-Butyl (4-((diethoxyphosphoryl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)thio)methyl)phenyl)carbamat (27g)



Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 10** unter Verwendung von 2-(((4-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)phenyl)(diethoxyphosphoryl)methyl)thio)essigsäure (**26g**) 12.60 g, 3.96 mmol, 1.00 Äq.), *N*-Methylhydroxylamin•HCl (462 mg, 5.54 mmol, 1.50 Äq.) und 1,1'-Carbonyldiimidazol (898 g, 5.54 mmol, 1.50 Äq.) in 25 mL Tetrahydrofuran. *tert*-Butyl (4-((diethoxyphosphoryl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)thio)methyl)phenyl)carbamat (**27g**) wurde als farbloses Öl (480 mg, 1.04 mmol, 28 %) erhalten.

R _f	0.63 (Dichlormethan/Methanol 9/1 <i>v/v</i>).
¹ H-NMR (300 MHz, CD₃OD)	δ 1.17 (td, J = 7.0, 0.7 Hz, 3 H), 1.33 (td, J = 7.1, 0.6 Hz,
	3 H), 1.53 (s, 9 H), 3.19 (s, 3 H), 3.27 (d, J = 12.4 Hz,
	1 H), 3.61 (dd, J = 14.4, 2.6 Hz, 1 H), 3.82 – 4.05 (m,
	2 H), 4.16 (dqd, <i>J</i> = 7.8, 7.1, 2.0 Hz, 2 H), 4.51 – 4.60 (m,
	1 H), 7.35 – 7.45 (m, 4 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃)	δ 16.4 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 6.0 Hz), 16.5 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 6.1 Hz), 28.5,
	31.9 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 3.9 Hz), 36.2, 44.7 (d, ${}^{1}J_{C,P}$ = 148.0 Hz),
	63.9 (d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 7.2 Hz), 64.5 (d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 7.1 Hz), 80.9,
	118.7, 130.0 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 6.8 Hz), 138.4, 152.8, 155.4,
	169.9.
³¹ P-NMR (122 MHz, CD ₃ OD)	δ22.48.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 10.38 min, 96.7 % Reinheit.
MS (ESI) m/z	ber. für C ₁₉ H ₃₂ N ₂ O ₇ PS: 463.16, gef.: 463.17.

Darstellung der (((2-(Hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)thio)(phenyl)methyl) phosphonsäuren 28e-f

((3-Hexanamidophenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)thio)methyl)phosphonsäure (28e)



C₁₆H₂₅N₂O₆PS [404.12]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 11** unter Verwendung von Diethyl ((3hexanamidophenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)thio)methyl)phosphonat (**27e**) (428 mg, 0.93 mmol, 1.00 Äq.) und Trimethylsilylbromid (1.26 mL, 4.64 mmol, 10.0 Äq.) in 9.5 mL trockenem Dichlormethan. Das Rohprodukt wurde mit der **Aufreinigungsmethode III** gereinigt und ((3-Hexanamidophenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)thio)methyl) phosphonsäure (**28e**) als farbloses Öl (110 mg, 0.27 mmol, 29 %) erhalten.

¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃)	δ 0.90 – 0.99 (m, 3 H), 1.30 – 1.48 (m, 4 H), 1.70 (q,
	J = 7.2 Hz, 2 H), 2.38 (t, J = 7.5 Hz, 2 H), 3.08 (d,
	J = 14.1 Hz, 1 H), 3.19 (s, 2 H), 3.52 – 3.76 (m, 1 H),
	$4.23 - 4.48 \ (m, 1 \ H), 7.20 - 7.33 \ (m, 2 \ H), 7.52 - 7.67 \ (m,$
	2 H), 8.09 (s, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCI ₃)	δ 14.0, 16.3 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 6.0 Hz), 16.4 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 5.7 Hz),
	22.6, 25.7, 29.2, 31.6, 32.7 (d, $^3J_{\rm C,P}$ = 6.9 Hz), 44.8 (d,
	$^{1}J_{C,P}$ = 148.7 Hz), 52.3, 63.1 (d, $^{2}J_{C,P}$ = 7.2 Hz), 63.5 (d,
	$^{2}J_{C,P}$ = 6.8 Hz), 114.6 (d, $^{4}J_{C,P}$ = 2.0 Hz), 125.7 (d,
	$^{2}J_{C,P}$ = 5.1 Hz), 130.7 (d, $^{3}J_{C,P}$ = 6.5 Hz), 159.0 (d,
	⁵ J _{C,P} = 2.4 Hz), 170.4.
³¹ P-NMR (121 MHz, CDCI ₃)	δ21.59.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 7.23 min, 96.1 % Reinheit. ⁴
HRMS (ESI) <i>m</i> /z	ber. für C ₁₆ H ₂₆ N ₂ O ₆ PS: 405.1244, gef.: 405.1238.

⁴ Die angegebene HPLC-Reinheit entspricht nicht der tatsächlichen Reinheit der Verbindung, da die Methode nicht geeignet ist, um die *N*-Methylhydroxamsäure **28e** neben der hydrolysierten Carbonsäure **28e**⁴ zu quantifizieren.

((4-Hexanamidophenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)thio)methyl)phosphonsäure (28f)



[404.12]

Die Synthese erfolgte gemäß der **AAV 11** aus Diethyl ((4-hexanamidophenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)thio)methyl)phosphonat (**27f**) (350 mg, 0.76 mmol, 1.00 Äq.) und Trimethylsilylbromid (1.00 mL, 7.60 mmol, 10.0 Äq.) in 7.5 mL trockenem Dichlormethan. Das Rohprodukt wurde mit der **Aufreinigungsmethode III** gereinigt und ((4-Hexanamidophenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)thio)methyl)phosphonsäure (**28f**) als farbloses Öl (35 mg, 0.09 mmol, 11 %) erhalten.

¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃)	δ 0.86 – 0.99 (m, 3 H), 1.37 (h, J = 3.3 Hz, 4 H), 1.70 (t,
	J = 7.4 Hz, 2 H), 2.36 (t, J = 7.5 Hz, 2 H), 2.90 (s, 0.3 H),
	2.98 – 3.12 (m, 0.5 H), 3.17 (s, 2 H), 3.27 (s, 0.5 H),
	3.52 - 3.72 (m, 1 H), $4.22 - 4.42$ (m, 1 H), 7.44 (d,
	J = 8.2 Hz, 2 H), 7.51 (dd, J = 8.6, 2.0 Hz, 2 H), 8.07 (s,
	1 H).
¹³ C-NMR	Nicht vorhanden. ⁵
³¹ P-NMR (75 MHz, CD ₃ OD)	δ 18.32 .
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 7.22 min, 97.2 % Reinheit. ⁶
HRMS (ESI) m/z	ber. für C ₁₆ H ₂₆ N ₂ O ₆ PS: 405.1244, gef.: 405.1238.

⁵ Aufgrund schneller Zersetzung im Lösemittel konnte das ¹³C-NMR-Spektrum nicht sauber aufgenommen werden.

⁶ Die angegebene HPLC-Reinheit entspricht nicht der tatsächlichen Reinheit der Verbindung, da die Methode nicht geeignet ist, um die *N*-Methylhydroxamsäure **28f** neben der hydrolysierten Carbonsäure **28f**⁴ zu quantifizieren.

9.6.5. Darstellung von Siderophoren und Siderophorfragmenten

9.6.5.1. Darstellung von 2-Chlor-3,4-dihydroxybenzoesäure (32)

2-Chlor-3,4-dimethoxybenzoesäure (31)



Die Synthese erfolgte gemäß einer Vorschrift von AOKI et al.²²⁸ In einem 250 mL Rundkolben wurde 2-Chlorovertraldehyde (2.00 g, 10.0 mmol, 1.00 Äq.) in 30 mL1,4-Dioxan gelöst und bei 0 °C mit einer 1 M wässrigen Amidosulfonsäure-Lösung (22.0 mL, 22.0 mmol, 2.20 Äq.) und 1 M wässriger Natriumchlorit-Lösung (22.0 mL, 22.0 mmol, 2.20 Äq.) versetzt. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur 30 min lang gerührt. Nach vollständigem Reaktionsumsatz wurde die Reaktion mit 2.2 M wässrige Natriumhydrogensulfit-Lösung (20.0 mL, 44.0 mmol, 4.40 Äq.) abgebrochen. Die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat (3 x 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser (1 x 300 mL) und gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung (1 x 100 mL) gewaschen, mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, Lösemittel unter vermindertem filtriert und das Druck entfernt. 2-Chlor-3,4dimethoxybenzoesäure (31) wurde als farbloser Feststoff (1.80 g, 8.31 mmol, 83 %) erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Publikation von AOKI et al. überein.²²⁸

R _f	0.42 (Dichlormethan/Methanol 10/1 v/v).
Schmelzpunkt	201 °C (Lit. 202-203 °C). ⁵¹⁶
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 3.74 (s, 3 H), 3.88 (s, 3 H), 7.11 (d, J = 8.8 Hz, 1 H),
	7.62 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1 H), 13.01 (s, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 56.3, 60.1, 110.9, 123.4, 127.2, 145.3, 156.0, 166.1.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 8.56 min, 97.4 % Reinheit.

2-Chlor-3,4-dihydroxybenzoesäure (32)



Die Synthese erfolgte gemäß einer modifizierten Patentvorschrift von NISHITANI *et al.*²⁸⁶ 2-Chlor-3,4-dimethoxybenzoesäure (1.73 g, 7.99 mmol, 1.00 Äq.) wurde in einem ausgeheizten sekurierten 250 mL SCHLENK-Kolben vorgelegt und unter Stickstoffatmosphäre in 10 mL trockenem Dichlormethan gelöst. Der Reaktionsansatz wurde mittels Eisbad auf 0 °C gekühlt und unter Rühren 1.6 M Bortribromid in *n*-Hexan-Lösung (12.5 mL, 20.0 mmol, 2.50 Äq.) zugetropft. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur 2 h lang gerührt, anschließend mit 15 mL entmineralisiertem Wasser versetzt und bei Raumtemperatur 24 h gerührt. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels C₁₈-Umkehrphasen-Flashcchromatographie (Wasser/Acetonitril 10/1 v/v) isoliert. 2-Chlor-3,4-dihydroxybenzoesäure (**32**) wurde als beiger Feststoff (950 mg, 5.04 mmol, 63 %) erhalten.

R _f	0.25 (Dichlormethan/Methanol 10/1 v/v).
Schmelzpunkt	217 °C (Lit. 216-217 °C). ⁵¹⁷
¹ H-NMR (300 MHz, CD ₃ CN)	δ 6.86 (d, J = 8.6 Hz, 1 H), 7.04 (s, 1 H), 7.43 (d,
	<i>J</i> = 8.5 Hz, 1 H), 7.65 (s, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CD ₃ CN)	δ 113.8, 122.1, 124.7, 127.5, 142.8, 149.8, 166.5.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 4.09 min, ≥ 99 % Reinheit.

9.6.5.2. Darstellung von N², N⁶-Bis(2,3-dihydroxybenzoyl)-L-lysin (40)

L-Lysin-methylester•2 HCI (34)



[233.13]

Die Synthese erfolgte gemäß einer Vorschrift von FEHLER *et al.*⁵¹⁸ In einem 100 mL Rundkolben wurde 33 mL Methanol vorgelegt und mittels Eisbad auf 0 °C abgekühlt. Thionylchlorid (4.93 mL, 67.3 mmol 2.00 Äq.) wurde über 15 Minuten tropfenweise zugegeben und nach vollständiger Zugabe 10 min lang gerührt. L-Lysin•HCI (6.15 g, 33.7 mmol, 1.00 Äq.) wurde bei 0 °C portionsweise zugegeben und danach 1 h lang refluxiert. Das Lösemittel wurde mittels Rotationsverdampfer bei einer Wasserbadtemperatur von 60 °C entfernt. L-Lysin•methylester•2 HCI (**34**) wurde als farbloser Feststoff (6.50 g, 33.4 mmol, 99 %) erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Publikation von FEHLER *et al.* überein.⁵¹⁸

Schmelzpunkt	211 °C (Lit. 204 °C). ⁵¹⁹
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 1.26 – 1.64 (m, 3 H), 1.75 – 1.89 (m, 2 H), 2.74 (d,
	J = 7.0 Hz, 2 H), 3.75 (s, 3 H), 3.97 (t, J = 6.3 Hz, 1 H),
	8.14 (s, 3 H), 8.70 (s, 3 H).

Benzyl-2,3-bis-benzyloxy-benzoat (36)



Die Synthese erfolgte gemäß einer modifizierten Vorschrift von ALLRED *et al.*⁵²⁰ In einem 500 mL Rundkolben wurde 2,3-Dihydroxybenzoesäure (7.94 g, 50.0 mmol, 1.00 Äq.) in 250 mL Aceton gelöst und mit Kaliumcarbonat (41.5 g, 300 mmol, 6.00 Äq.), Kaliumiodid (8.30 g, 50.0 mmol, 1.00 Äq.) und Benzylbromid (17.8 mL, 150 mmol, 3.00 Äq.) versetzt. Der Ansatz wurde bei 60 °C 24 h lang gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Salze mittels BÜCHNER-Trichter abfiltriert und das Lösemittel des Filtrates unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde aus *n*-Hexan/Ethylacetat umkristallisiert und Benzyl 2,3-bis(benzyloxy)benzoat (**36**) als farbloser Feststoff (18.7 g, 44.0 mmol, 88 %) erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Veröffentlichung von ALLRED *et al.* überein.⁵²⁰

R _f	0.49 (Cyclohexan/Ethylacetat 9/1 v/v).
Schmelzpunkt	55 °C (Lit. 40 °C). ⁵²¹
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl₃)	δ 5.13 (s, 2 H), 5.17 (s, 2 H), 5.37 (s, 2 H), 7.06 – 7.15 (m, 1 H), 7.19 (dd, J = 8.2, 1.9 Hz, 1 H), 7.29 – 7.53 (m, 16 H)
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 19.75 min, ≥ 99 % Reinheit.

2,3-Bis-benzyloxybenzoesäure (37)



Die Synthese erfolgte gemäß einer modifizierten Vorschrift von ALLRED *et al.*⁵²⁰ In einem 500 mL Rundkolben wurde Benzyl 2,3-bis(benzyloxy)benzoat (**36**) (18.7 g, 44.0 mmol, 1.00 Äq.) in 180 mL Methanol gelöst und mit 5 M Natronlauge (35.0 mL, 176 mmol, 4.00 Äq.) versetzt. Der Ansatz wurde 3 h lang refluxiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde Methanol am Rotationsverdampfer entfernt. Die verbleibende wässrige Lösung wurde mit 10 %iger Salzsäure auf einen pH-Wert von 3 eingestellt und mit Ethylacetat (3 x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde aus *n*-Hexan/Ethylacetat umkristallisiert und 2,3-Bis(benzyloxy)benzoesäure (**37**) als farbloser Feststoff (12.4 g, 37.2 mmol, 85 %) erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Veröffentlichung von ALLRED *et al.* überein.⁵²⁰

0.36 (Cyclohexan/Ethylacetat 2/1 v/v + 0.1 % Ameisen-
säure)
125 °C (Lit. 124-125 °C). ⁵²²
δ 5.02 (s, 2 H), 5.14 (s, 2 H), 6.96 – 7.08 (m, 2 H), 7.14
(dd, <i>J</i> = 7.3, 2.5 Hz, 1 H), 7.23 – 7.52 (m, 9 H).
t _R : 14.74 min, ≥ 99 % Reinheit.

Methyl-N², N⁶-bis(2,3-bis(benzyloxy)benzoyl)-L-lysinat (38)



[792.34]

Die Synthese erfolgte gemäß einer modifizierten Vorschrift von MIYANAGA et al. 288 In einem 250 mL Rundkolben wurde 2,3-Bis-benzyloxy-benzoesäure (37) (2.00 g, 5.98 mmol, 1.00 Äg.) in 70 mL N,N-Dimethylformamid gelöst, N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (1.23 g, 5.98 mmol, 1.00 Äq.) sowie Ethyl(hydroxyimino)cyanoacetat (0.85 g, 5.89 mmol, 1.00 Äq.) bei 0 °C hinzufügt und 10 min lang bei dieser Temperatur gerührt. Anschließend wurde N,N-Diisopropylethylamin (1.05 mL, 5.89 mmol, 1.00 Äg.) und L-Lysinmethylester•2 HCl (34) (697 mg, 2.99 mmol, 0.50 Äq.) hinzugegeben, das Eiswasserbad entfernt und bei Raumtemperatur 16 h lang gerührt. Es wurden 50 mL Ethylacetat zugegeben und 30 min lang bei 0 °C gerührt. Der Überstand wurde abdekantiert und mit 1 M Salzsäure (2 x 50 mL), gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung (2 × 50 mL) and 5 % iger wässriger Lithiumchlorid-Lösung (2 x 50 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel entfernt. Das Rohprodukt wurde in Acetonitril (25 mL) gelöst und bei -20 °C für 24 h in den Tiefkühlschrank gestellt. Das Präzipitat Filtration abgetrennt Lösemittel wurde mittels und das des Filtrates mittels wurde Rotationsverdampfer entfernt. Rohprodukt säulenchromatographisch Das (*n*-Hexan/Ethylacetat 1/1 v/v) isoliert und Methyl- N^2 , N^6 -bis(2,3-bis(benzyloxy)benzoyl)-Llysinat (38) als farbloses Öl (1.72 g, 2.17 mmol, 37 %) erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Publikation von MIYANAGA et al. überein.²⁸⁸

R _f	0.40 (Cyclohexan/Ethylacetat 1/1 v/v).
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl₃)	δ 1.09 – 1.33 (m, 4 H), 1.41 (dq, J = 14.5, 7.5 Hz, 1 H),
	1.68 (dd, <i>J</i> = 13.7, 7.9 Hz, 1 H), 3.15 (q, <i>J</i> = 6.9 Hz, 2 H),
	3.71 (s, 3 H), 4.62 (td, <i>J</i> = 7.6, 5.5 Hz, 1 H), 5.07 (s, 2 H),
	5.12 (d, J = 10.4 Hz, 1 H), 5.17 (s, 4 H), 5.20 (d,
	J = 10.3 Hz, 1 H), 7.11 – 7.21 (m, 5 H), 7.22 – 7.55 (m,
	19 H), 7.68 – 7.81 (m, 2 H), 7.87 (t, <i>J</i> = 5.5 Hz, 1 H), 8.47
	(d, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1 H).
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 20.43 min, ≥ 99 % Reinheit.

*N*²,*N*⁶-bis(2,3-bis(benzyloxy)benzoyl)-L-lysin (39)



[778.33]

Die Synthese erfolgte gemäß einer modifizierten Vorschrift von MIYANAGA et al. 288 In einem 250 mL Rundkolben wurde Methyl-N², N⁶-bis(2,3-bis(benzyloxy)benzoyl)-L-lysinat (**38**) (1.70 g, 2.14 mmol, 1.00 Äq.) in 75 mL Methanol und 25 mL entmineralisiertem Wasser gelöst, mit 1 M Lithiumhydroxid-Lösung (19.3 mL, 19.3 mmol, 9.00 Äq.) wässrige versetzt und Raumtemperatur 30 min lang gerührt. Die wässrige Lösung wurde mit 5 M Salzsäure vorsichtig auf einen pH-Wert von 2 eingestellt und mit Ethylacetat (3 x 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. N^2 , N^6 -bis(2,3-bis(benzyloxy)benzoyl)-L-lysin (**39**) als farbloser Feststoff (1.34 g, 1.72 mmol, 85 %) erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Publikation von MIYANAGA et al. überein.288

R _f	0.46 (Dichlormethan/Methanol 20/1 v/v + 0.1 % Ameisen-
	säure).
Schmelzpunkt	53 °C.
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃)	δ 1.13 – 1.48 (m, 6 H), 1.63 – 1.81 (m, 1 H), 3.15 (q,
	J = 6.5 Hz, 2 H), 4.52 (td, $J = 7.4$, 5.6 Hz, 1 H), 5.07 (s,
	2 H), 5.08-5.25 (m, 6 H), 7.09-7.23 (m, 4 H),
	7.27-7.53 (m, 20 H), $7.67-7.80$ (m, 2 H), 7.94 (t,
	<i>J</i> = 5.6 Hz, 1 H), 8.56 (d, <i>J</i> = 6.9 Hz, 1 H).
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 18.61 min, 97.9 % Reinheit.

N², N⁶-Bis(2,3-dihydroxybenzoyl)-L-lysin (40)



[418.14]

Die Synthese erfolgte gemäß einer Vorschrift von MIYANAGA *et al.*²⁸⁸ In einem 100 mL Rundkolben wurde N^2 , N^6 -bis(2,3-bis(benzyloxy)benzoyl)-L-lysin (**39**) (1.18 g, 1.51 mmol, 1.00 Äq.) unter Stickstoffatmosphäre in 50 mL Methanol gelöst und Palladium auf Aktivkohle (161 mg, 0.15 mmol, 10 mol%) zugegeben. Die Suspension wurde bei Raumtemperatur 8 h lang unter Wasserstoffatmosphäre (Ballon) gerührt. Anschließend wurde der Katalysator durch Filtration über *Celite*[®] und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde zunächst mittels C₁₈-Umkehrphasen-Flashchromatographie (Wasser/Acetonitril 10/1 v/v) gereinigt, anschließend in 50 mL Ethylacetat aufgenommen und mit gesättigter wässriger Ethylendiamintetraessigsäure-Lösung (5 x 50 mL) gewaschen bis die organische Phase farblos war. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und N^2 , N^6 -Bis(2,3dihydroxybenzoyl)-L-lysin (**40**) als farbloses Öl (512 mg, 0.65mmol, 33 %) erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Publikation von MIYANAGA *et al.* überein.²⁸⁸

R _f	0.26 (Dichlormethan/Methanol 9/1 v/v + 1 % Ameisen-
	säure).
¹ H NMR (300 MHz, CD ₃ OD)	δ 1.47 – 1.63 (m, 2 H), 1.63 – 1.79 (m, 2 H), 1.84 – 2.13
	(m, 2 H), 3.41 (t, $J = 6.9$ Hz, 2 H), 4.65 (dd, $J = 8.8$,
	5.1 Hz, 1 H), 6.70 (t, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1 H), 6.74 (t, <i>J</i> = 8.0 Hz,
	1 H), 6.94 (ddd, $J = 9.2$, 7.9, 1.5 Hz, 2 H), 7.19 (dd,
	J = 8.1, 1.5 Hz, 1 H), 7.34 (dd, J = 8.1, 1.5 Hz, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CD ₃ OD)	$\delta 32.2, \ 40.2, \ 53.9, \ 116.8, \ 117.0, \ 118.7, \ 119.5, \ 119.6,$
	119.6, 119.8, 147.1, 147.2, 149.8, 150.2, 171.1, 171.6,
	175.6.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 7.93 min, 94.8 % Reinheit.

9.6.5.3. Darstellung von (*S*)-2-(2-hydroxyphenyl)-4,5-dihydrooxazol-4-carbonsäure (45)

2-(Benzyloxy)benzoylchlorid (42)



Die Synthese erfolgte gemäß einer modifizierten Vorschrift von MILLER *et al.*³⁰⁰ In einem 500 mL Rundkolben wurde 2-Benzyloxybenzoesäure (7.00 g, 30.7 mmol, 1.00 Äq.) in 136 mL trockenem Dichlormethan sowie 70 mL trockenem Toluol gelöst und im Eisbad auf 0 °C abgekühlt. Es wurden drei Tropfen wasserfreies *N*,*N*-Dimethylformamid und tropfenweise Oxalylchlorid (20.2 mL, 239 mmol, 7.80 Äq.) zugegeben. Nach erfolgter Zugabe wurde die Reaktion bei 0 °C 30 min lang gerührt. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und 2-(Benzyloxy)benzoylchlorid (**42**) ohne weitere Reinigung für die nächste Reaktion verwendet.

(S)-Benzyl-2-(2-(benzyloxy)benzamido)-2-hydroxyacetat (43)



[405.16]

Die Synthese erfolgte gemäß einer modifizierten Vorschrift von MORASKI et al. 523 In einem 250 mL Rundkolben wurde 2-(Benzyloxy)benzoylchlorid (42) (8.14 g, 33.0 mmol, 1.10 Äg.) in 140 mL Dichlormethan gelöst und mit einem Eisbad auf 0 °C abgekühlt. Anschließend wurden L-Serinbenzylester•HCl (6.89 g, 30.0 mmol, 1.00 Äq.) und N,N-Diisopropylethylamin (10.5 mL, 75.0 mmol, 2.50 Äq.) hinzugefügt, das Eisbad nach 10 min entfernt und der Ansatz bei Raumtemperatur 16 h lang gerührt. Anschließend wurde die organische Phase mit gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung (2 × 150 mL), 1 M wässrige Zitronensäure-Lösung (2 × 150 mL) und gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung (1 × 150 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert Lösemittel und das unter vermindertem Druck entfernt. (S)-Benzyl 2-(2-(benzyloxy)benzamido)-2-hydroxyacetat (43) wurde als farbloser Feststoff (12.4 g, 30.7 mmol, 93 %) erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen dem Patent von MILLER et al. überein.300

R _f	0.30 (Cyclohexan/Ethylacetat 2/1 v/v).
Schmelzpunkt	117 °C (116-117 °C). ³⁰⁰
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl₃)	δ 3.92 (dd, J = 3.9, 1.7 Hz, 2 H), 4.89 (m, 1 H),
	5.08 – 5.28 (m, 4 H), 7.08 (dd, J = 15.7, 7.0 Hz, 2 H),
	7.28 – 7.51 (m, 10 H), 8.20 (dd, <i>J</i> = 7.8, 1.9 Hz, 1 H), 8.79
	(d, <i>J</i> = 7.1 Hz, 1 H).
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 13.90 min, ≥ 99 % Reinheit.

(S)-Benzyl 2-(2-(benzyloxy)phenyl)-4,5-dihydrooxazol-4-carboxylat (44)



[387.15]

Die Synthese erfolgte gemäß einer modifizierten Vorschrift von MILLER *et al.*³⁰⁰ In einem 250 mL Rundkolben wurde (*S*)-Benzyl-2-(2-(benzyloxy)benzamido)-2-hydroxyacetat (**43**) (6.19 g, 15.3 mmol, 1.00 Äq.) in 110 mL trockenem Tetrahydrofuran gelöst und BURGESS-Reagenz (4.00 g, 16.8 mmol, 1.10 Äq.) unter Stickstoffatmosphäre hinzugegeben. Anschließend wurde der Ansatz 30 min lang refluxiert, die Reaktionslösung langsam auf Raumtemperatur abgekühlt und bei -20 °C im Tiefkühlschrank 24 h lang stehen gelassen. Das gebildete Präzipitat wurde abfiltriert und mit 200 mL Ethylacetat gewaschen. Das Lösemittel des Filtrates wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 100 mL Ethylacetat gelöst. Die organische Phase wurde mit gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung (2 × 200 mL) gewaschen, mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch (Cyclohexan/Ethylacetat 4/1 v/v) isoliert und (*S*)-Benzyl 2-(2-(benzyloxy)phenyl)-4,5-dihydrooxazol-4-carboxylat (**44**) als farbloser Feststoff (3.81 g, 9.83 mmol, 64 %) erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen des Patents von MILLER *et al.* überein.³⁰⁰

R _f	0.58 (Cyclohexan/Ethylacetat 2/1 v/v).
Schmelzpunkt	68 °C (69-71 °C). ³⁰⁰
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃)	δ 4.53 – 4.74 (m, 2 H), 5.03 (dd, J = 10.6, 8.0 Hz, 1 H),
	5.21 (s, 2 H), 5.23 – 5.36 (m, 2 H), 6.97 – 7.07 (m, 2 H),
	7.25-7.48 (m, 9 H), $7.49-7.56$ (m, 2 H), 7.84 (dd,
	<i>J</i> = 8.0, 1.8 Hz, 1 H).
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 12.19 min, 89.1 % Reinheit.

(S)-2-(2-hydroxyphenyl)-4,5-dihydrooxazol-4-carbonsäure (45)



Die Synthese erfolgte gemäß einer Vorschrift von WU *et al.*³⁰¹ In einem 250 mL Rundkolben wurde (*S*)-Benzyl 2-(2-(benzyloxy)phenyl)-4,5-dihydrooxazol-4-carboxylat (**44**) (3.90 g, 10.1 mmol, 1.00 Äq.) in 140 mL Methanol gelöst und Palladium auf Aktivkohle (536 mg, 0.50 mmol, 5 mol%) unter Stickstoffatmosphäre zugegeben. Die Suspension wurde bei Raumtemperatur 8 h lang unter Wasserstoffatmosphäre (Ballon) gerührt. Anschließend wurde der Katalysator durch Filtration über *Celite*[®] abgetrennt und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch (Dichlormethan/Methanol 10/1 *v/v*) isoliert und (*S*)-2-(2-Hydroxyphenyl)-4,5-dihydrooxazol-4-carbonsäure (**45**) als farbloser Feststoff (1.53 g, 7.38 mmol, 73 %) gewonnen. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Veröffentlichung von WU *et al.* überein.³⁰¹

R _f	0.21 (Cyclohexan/Ethylacetat 1/1 v/v + 1 % Ameisen-
	säure).
Schmelzpunkt	158 °C (156-158 °C). ³⁰¹
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl₃)	δ 4.53 – 4.74 (m, 2 H), 5.03 (dd, J = 10.6, 8.0 Hz, 1 H),
	5.21 (s, 2 H), 5.25 (d, J = 11.4 Hz, 1 H), 5.31 (d,
	J = 12.3 Hz, 1 H), 6.97 – 7.07 (m, 2 H), 7.25 – 7.48 (m,
	9 H), 7.49 – 7.56 (m, 2 H), 7.84 (dd, <i>J</i> = 8.0, 1.8 Hz, 1 H).
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 5.86 min, ≥ 99 % Reinheit.
EI + MS (70 eV, <i>m/z</i> (%))	208 ($[C_{10}H_9NO_4]^+$, 13), 207 ($[C_{10}H_9NO_4]^+$, 100), 162
	$([C_9H_8NO_2]^+, 69), 134 (27), 121 (21), 120 (12), 107 (41),$
	92 (30), 65 (17), 64 (17), 63 (19).

9.6.5.4. Darstellung von (4*S*,5*R*)-2-(2,3-dihydroxyphenyl)-5-methyl-4,5dihydrooxazol-4-carbonsäure (49)

2,3-Bis(benzyloxy)benzoylchlorid (46)

OBn ÓBn C₂₁H₁₇ClO₃ [352.09]

Die Synthese erfolgte gemäß einer modifizierten Vorschrift von MILLER *et al.*³⁰⁰ In einem 250 mL Rundkolben wurde 2,3-Bis(benzyloxy)benzoesäure (**37**) (6.06 g, 18.1 mmol, 1.00 Äq.) in 80 mL trockenem Dichlormethan sowie 40 mL trockenem Toluol gelöst und mittels eines Eisbades auf 0 °C abgekühlt. Es wurden drei Tropfen wasserfreies *N*,*N*-Dimethylformamid und tropfenweise Oxalylchlorid (12.0 mL, 141 mmol, 7.80 Äq.) zugegeben. Nach erfolgter Zugabe wurde die Reaktion bei 0 °C 30 min lang gerührt. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und 2,3-Bis(benzyloxy)benzoylchlorid (**46**) ohne weitere Reinigung weiterverwendet.

Benzyl (2,3-bis(benzyloxy)benzoyl)-L-threoninat (47)



 $C_{32}H_{31}NO_6$

[525.22]

Die Synthese erfolgte gemäß einer modifizierten Vorschrift von MORASKI *et al.*⁵²³ In einem 250 mL Rundkolben wurde 2,3-Bis(benzyloxy)benzoylchlorid (**46**) (6.04 g, 17.1 mmol, 1.11 Äq.) in 80 mL Dichlormethan gelöst und mit einem Eisbad auf 0 °C abgekühlt. Anschließend wurden L-Threoninbenzylester•HCI (374 mg, 15.4 mmol, 1.00 Äq.) und *N,N*-Diisopropylethylamin (6.00 mL, 42.8 mmol, 2.50 Äq.) hinzugefügt, das Eisbad nach 10 min entfernt und bei Raumtemperatur 16 h lang gerührt. Anschließend wurde die organische Phase mit gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung (2 × 80 mL), 1 M wässriger Zitronensäure-Lösung (2 × 80 mL) und gesättigter wässriger Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Benzyl (2,3-bis(benzyloxy)benzoyl)-L-threoninat (**47**) wurde als farbloses Öl (7.03 g, 13.4 mmol, 78 %) erhalten.

R _f	0.47 (Cyclohexan/Ethylacetat 2/1 v/v)
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃)	δ 1.17 (d, J = 6.4 Hz, 3 H), 1.79 (d, J = 5.5 Hz, 1 H),
	4.26 – 4.41 (m, 1 H), 4.81 (dd, <i>J</i> = 8.5, 2.8 Hz, 1 H), 5.10
	(d, <i>J</i> = 10.4 Hz, 1 H), 5.17 (s, 2 H), 5.18 – 5.27 (m, 3 H),
	7.08 – 7.52 (m, 16 H), 7.77 (dd, <i>J</i> = 6.0, 3.6 Hz, 1 H), 8.80
	(d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃)	δ 20.1, 58.1, 67.2, 68.1, 71.4, 73.1, 76.1, 117.4, 123.4,
	124.4, 126.7, 127.9, 128.36, 128.38, 128.4, 128.4, 128.6,
	128.7, 129.0, 135.4, 136.3, 136.4, 147.1, 151.8, 165.9,
	170.7.
HPLC (Methode A, 220 nm)	t _R : 16.83 min, ≥ 99 % Reinheit.

Benzyl (*4S*,*5R*)-2-(2,3-bis(benzyloxy)phenyl)-5-methyl-4,5-dihydrooxazol-4-carboxylat (48)



[507.21]

Die Synthese erfolgte gemäß der einer modifizierten Vorschrift von MILLER et al. 300 In einem 250 mL Rundkolben wurde Benzyl (2,3-bis(benzyloxy)benzoyl)-L-threoninat (47) (6.03 g, 11.5 mmol, 1.00 Äq.) in 85 mL trockenem Tetrahydrofuran gelöst und BURGESS-Reagenz (3.01 g, 12.6 mmol, 1.10 Äq.) unter Stickstoffatmosphäre hinzugegeben. Anschließend wurde der Ansatz 30 min lang refluxiert, auf Raumtemperatur abgekühlt und bei -20 °C im Tiefkühlschrank 24 h lang stehen gelassen. Das gebildete Präzipitat wurde abfiltriert und mit 200 mL Ethylacetat gewaschen. Das Lösemittel des Filtrates wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 100 mL Ethylacetat gelöst. Die organische Phase wurde mit gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung (2 × 200 mL) gewaschen, mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch (Cyclohexan/Ethylacetat 10/1 v/v) isoliert und Benzyl (4S,5R)-2-(2,3-bis(benzyloxy)phenyl)-5-methyl-4,5-dihydrooxazol-4-carboxylat (48) als farbloses Öl (4.80 g, 9.46 mmol, 82 %) erhalten. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung für die nächste Reaktion verwendet.

(4S,5R)-2-(2,3-dihydroxyphenyl)-5-methyl-4,5-dihydrooxazol-4-carbonsäure (49)



Die Synthese erfolgte gemäß einer Vorschrift von WU *et al.*³⁰¹ In einem 250 mL Rundkolben wurde (4S,5R)-2-(2,3-bis(benzyloxy)phenyl)-5-methyl-4,5-dihydrooxazol-4-carboxylat (**48**) (4.60 g, 9.06 mmol, 1.00 Äq.) in 100 mL Methanol gelöst und Palladium auf Aktivkohle (964 mg, 0.10 mmol, 10 mol%) unter Stickstoffatmosphäre zugegeben. Die Suspension wurde beim Raumtemperatur 1 h lang unter Wasserstoffatmosphäre (Ballon) gerührt. Anschließend wurde der Katalysator durch Filtration über *Celite*[®] und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch (Dichlormethan/Methanol) isoliert und (4S,5R)-2-(2,3-dihydroxyphenyl)-5-methyl-4,5-dihydrooxazol-4-carbonsäure (**49**) als gelber Feststoff (1.95 g, 8.22 mmol, 91 %) gewonnen. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Veröffentlichung von TAKEUCHI *et al.* überein.⁵²⁴

R _f	0.26 (Dichlormethan/Methanol 9/1 v/v + 1 % Ameisen-
	säure).
Schmelzpunkt	Zersetzung 117-124 °C (116-124°C). ⁵²⁴
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃)	δ 1.46 (d, J = 6.4 Hz, 3 H), 5.02 (d, J = 10.1 Hz, 1 H), 5.16
	(dq, J = 10.0, 6.4 Hz, 1 H), 6.75 (d, J = 7.9 Hz, 1 H), 6.96
	(dd, <i>J</i> = 7.9, 1.6 Hz, 1 H), 7.16 (dd, <i>J</i> = 7.9, 1.6 Hz, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃)	δ 15.8, 69.5, 77.2, 110.0, 117.8, 118.7, 119.5, 145.8,
	148.5, 166.7, 170.5.
HPLC (Methode A, 254 nm)	Partielle Hydrolyse auf der Säule.
HPLC (Methode B, 254 nm)	Mehrere Peaks aufgrund von Dissoziation.
9.6.5.5. Darstellung von *tert*-Butyl *N*⁶-(benzoyloxy)-*N*²-((*S*)-2-(2-hydroxyphenyl)-4,5dihydrooxazol-4-carbonyl)-*N*⁶-palmitoyl-L-lysinat (55)

tert-Butyl ((benzyloxy)carbonyl)-L-lysinat (51)



 $C_{18}H_{28}N_2O_4\\$

[336.20]

Die Synthese erfolgte gemäß einer modifizierten Vorschrift von WU *et al.*³⁰¹ In einem 1000 mL Rundkolben wurde N_{α} -(Carbobenzyloxy)-L-lysin (**50**) (14.3 g, 50.0 mmol, 1.00 Äq.) in 375 mL *tert*-Butylacetat gelöst, Perchlorsäure (4.53 mL, 75.0 mmol, 1.50 Äq.) tropfenweise zugegeben und bei Raumtemperatur 20 h lang gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 mL 1 M Salzsäure beendet und die wässrige Phase mit gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung auf einen pH-Wert von 8 eingestellt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase mit Ethylacetat (2 × 100 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung (1 × 500 mL) gewaschen, mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Hochvakuum entfernt. *tert*-Butyl ((benzyloxy)carbonyl)-L-lysinat wurde als farbloses Öl (**51**) erhalten und ohne weitere Reinigung weiterverwendet.

tert-Butyl *N*⁶-(benzoyloxy)-*N*²-((benzyloxy)carbonyl)-L-lysinat (52)



[456.23]

Die Synthese erfolgte gemäß der einer modifizierten Vorschrift von W∪ et al.301 In einem 1000 mL Rundkolben wurde Dibenzoylperoxid (25 % Wassergehalt, 18.9 g, 58.5 mmol, 1.17 Äq.) in 200 mL Dichlormethan gelöst, mit 200 mL Natriumhydrogencarbonat/Natriumhydroxid-Puffer mit einem pH-Wert von 10.5 versetzt und stark gerührt. tert-Butyl ((benzyloxy)carbonyl)-L-lysinat (51) wurde in 100 mL Dichlormethan gelöst, bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 4 h zur Dibenzoylperoxid-Lösung zugetropft und weitere 4 h lang gerührt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase mit Dichlormethan (2 × 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung (3 x 300 mL) gewaschen, mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch (Cyclohexan/Ethylacetat 1/1 v/v) isoliert und tert-Butyl N⁶-(benzoyloxy)-N²-((benzyloxy)carbonyl)-L-lysinat (52) als farbloses Öl (15.9 g, 34.8 mmol, 70 % über 2 Schritte) erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Veröffentlichung von WU et al. überein.³⁰¹

R _f	0.21 (Cyclohexan/Ethylacetat 1/1 v/v).
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃)	δ 1.45 (s, 9 H), 1.58 (s, 1 H), 1.66 (h, J = 6.2 Hz, 3 H),
	1.86 (s, 1 H), 3.12 (t, <i>J</i> = 7.1 Hz, 2 H), 4.27 (q, <i>J</i> = 6.9 Hz,
	1 H), 5.10 (s, 2 H), 5.30 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 1 H), 7.28 – 7.38
	(m, 4 H), $7.40 - 7.51$ (m, 2 H), $7.53 - 7.64$ (m, 1 H), 7.87
	(s, 1 H), 7.97 – 8.07 (m, 2 H).
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 16.22 min, 98.0 % Reinheit.
MS (ESI) m/z	ber. für C ₂₅ H ₃₂ N ₂ O ₈ : 457.23, gef.: 457.23.

tert-Butyl *N*⁶-(benzoyloxy)-*N*²-((benzyloxy)carbonyl)-*N*⁶-palmitoyl-L-lysinat (53)



 $C_{41}H_{62}N_2O_7$

[694.46]

Die Synthese erfolgte gemäß einer Vorschrift von WU *et al.*³⁰¹ In einem 100 mL Rundkolben wurde *tert*-Butyl *N*⁶-(benzoyloxy)-*N*²-((benzyloxy)carbonyl)-L-lysinat (**52**) (2.28 g, 5.00 mmol, 1.00 Äq.) in 25 mL Aceton gelöst und mittels Eisbad auf 0 °C abgekühlt. Die Lösung wurde mitt Kaliumcarbonat (691 mg, 5.00 mmol, 1.00 Äq.) versetzt, Palmitinsäurechlorid (4.56 mL, 5.00 mmol, 1.00 Äq.) tropfenweise zugegeben und bei Raumtemperatur 1 h lang gerührt. Kaliumcarbonat wurde mittels Filtration abgetrennt und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Cyclohexan/Ethylacetat 4/1 *v/v*) gereinigt und *tert*-Butyl *N*⁶-(benzoyloxy)-*N*²-((benzyloxy)carbonyl)-*N*⁶-palmitoyl-L-lysinat (**53**) als farbloses Öl (2.80 g, 4.03 mmol, 81 %) erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Veröffentlichung von WU *et al.* überein.³⁰¹

R _f	0.63 (Cyclohexan/Ethylacetat 1/1 <i>v</i> / <i>v</i>).
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃)	δ 0.90 (d, J = 6.4 Hz, 3 H), 1.21 – 1.32 (m, 24 H), 1.43 (m,
	2 H), 1.47 (s, 9 H), 1.56 – 1.90 (m, 6 H), 2.29 (t,
	J = 7.5 Hz, 2 H), 3.82 (t, $J = 7.1$ Hz, 2 H), 4.26 (dd,
	J = 16.2, 7.4 Hz, 1 H), 5.11 (s, 2 H), 5.35 (d, J = 8.1 Hz,
	1 H), 7.29 – 7.39 (m, 5 H), 7.54 (t, J = 7.7 Hz, 2 H),
	7.65 – 7.74 (m, 1 H), 8.06 – 8.16 (m, 2 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃)	δ 14.1, 22.2, 22.7, 24.4, 26.9, 28.0, 29.2, 29.4, 29.5, 29.6,
	29.7, 29.7, 31.9, 32.4, 54.2, 66.8, 76.6, 77.0, 77.5, 82.1,
	126.9, 128.1, 128.1, 128.5, 128.9, 130.0, 134.4, 136.4,
	155.9, 164.5, 171.4.
HPLC (Methode A, 220 nm)	t _R : 27.72 min, ≥ 99 % Reinheit.
HRMS (ESI) m/z	ber. für C ₄₁ H ₆₃ N ₂ O ₇ : 695.4630, gef.: 695.4632.

tert-Butyl *N*⁶-(benzoyloxy)-*N*⁶-palmitoyl-L-lysinat (54)



C₃₃H₅₆N₂O₅ [560.42]

Die Synthese erfolgte gemäß einer modifizierten Vorschrift von WU *et al.*³⁰¹ In einem 10 mL Rundkolben wurde *tert*-Butyl *N*⁶-(benzoyloxy)-*N*²-((benzyloxy)carbonyl)-*N*⁶-palmitoyl-L-lysinat (**53**) (695 mg, 1.00 mmol, 1.00 Äq.) unter Stickstoffatmosphäre in 4 mL Methanol gelöst und mit Eisessig (86 µL, 1.50 mmol, 1.50 Äq.) versetzt. Der Lösung wurde Palladium auf Aktivkohle (964 mg, 0.10 mmol, 10 mol%) zugegeben und die resultierende Suspension bei Raumtemperatur 5 h lang unter Wasserstoffatmosphäre (Ballon) gerührt. Anschließend wurde der Katalysator durch Filtration über wenig *Celite®* entfernt und das Lösemittel unter vermindertem Druck evaporiert. Der Rückstand wurde in 10 mL Ethylacetat aufgenommen und mit gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung (1 x 2 mL) sowie gesättigter wässriger Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. *tert*-Butyl *N*⁶-(benzoyloxy)-*N*⁶-palmitoyl-L-lysinat (**54**) wurde als farbloser Feststoff (200 mg, 0.36 mmol, 36 %) erhalten. Aufgrund ihrer Instabilität wurde Verbindung wurde die Identität nur massenspektrometrisch charakterisiert und ohne weitere Analytik für den nächsten Reaktionsschritt verwendet.

Analytische Daten HRMS (ESI) m/z

ber. für $C_{33}H_{57}N_2O_5$: 561.4262, gef.: 561.4235.

tert-Butyl N^6 -(benzoyloxy)- N^2 -((S)-2-(2-hydroxyphenyl)-4,5-dihydrooxazol-4-carbonyl)- N^6 -palmitoyl-L-lysinat (55)



C₄₃H₆₃N₃O₈ [749.46]

Die Synthese erfolgte gemäß einer Vorschrift von WU *et al.*³⁰¹ In einem 25 mL Rundkolben wurden *tert*-Butyl *N*⁶-(benzoyloxy)-*N*⁶-palmitoyl-L-lysinat (**54**) (901 mg, 1.61 mmol, 1.00 Äq.) und (*S*)-2-(2-hydroxyphenyl)-4,5-dihydrooxazol-4-carbonsäure (**45**) (333 mg, 1.61 mmol, 1.00 Äq.) und EDC-4CI (462 mg, 2.41 mmol, 1.50 Äq.) versetzt. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur 4 h lang gerührt und die Reaktion durch Zugabe von 20 mL Eiswasser beendet. Die organische Phase wurde separiert, mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Cyclohexan/Ethylacetat 10/1 *v/v*) gereinigt und *tert*-Butyl *N*⁶-(benzoyloxy)-*N*²-((*S*)-2-(2-hydroxyphenyl)-4,5-dihydrooxazol-4-carbonyl)-*N*⁶-palmitoyl-L-lysinat (**55**) als farbloses Öl (200 mg, 0.27 mmol, 17 %) erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Veröffentlichung von WU *et al.* überein.³⁰¹

R _f	0.32 (Cyclohexan/Ethylacetat 10/1 v/v).
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃)	δ 0.82 – 0.92 (m, 3 H), 1.17 – 1.34 (m, 24 H), 1.36 (s,
	2 H), 1.42 (s, 2 H), 1.46 (s, 9 H), 1.53 – 1.93 (m, 3 H),
	2.21 (q, J = 7.3 Hz, 2 H), 3.75 (t, J = 7.1 Hz, 2 H), 4.45
	(td, <i>J</i> = 7.5, 5.5 Hz, 1 H), 4.54 – 4.72 (m, 2 H), 4.94 (dd,
	J = 10.5, 8.5 Hz, 1 H, $6.82 - 6.93 (m, 2 H)$, $7.00 (dd,$
	J = 8.4, 1.1 Hz, 1 H), 7.39 (ddd, J = 8.8, 7.2, 1.7 Hz, 1 H),
	7.50 (dd, $J = 8.4$, 7.1 Hz, 2 H), 7.60 – 7.71 (m, 2 H),
	8.00 – 8.11 (m, 2H), 11.38 (s, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃)	δ 14.3, 22.6, 22.8, 24.5, 26.8, 28.1, 29.4, 29.5, 29.6, 29.7,
	29.8, 32.1, 32.3, 42.3, 52.7, 68.3, 69.8, 76.7, 77.2, 77.4,
	77.6, 82.6, 110.1, 117.1, 119.2, 127.0, 128.7, 129.0,
	130.1, 134.4, 134.5, 160.0, 164.6, 168.0, 170.4, 170.9.

HPLC (Methode A, 254 nm)

t_R: 26.89 min, 94.2 % Reinheit.

9.6.5.6. Darstellung der geschützten (S)-3-amino-1-hydroxyazepan-2-one

(S)-3-(((Benzyloxy)carbonyl)amino)-2-oxoazepan-1-yl benzoat (57)

 $C_{21}H_{22}N_2O_5$

[382.15]

Die Synthese erfolgte gemäß einer modifizierten Vorschrift von W∪ et al.³⁰¹ In einem 100 mL Rundkolben wurde *tert*-Butyl N⁶-(benzoyloxy)-N²-((benzyloxy)carbonyl)-L-lysinat (**52**) (5.02 g, 11.0 mmol, 1.00 Äg.) in 33 mL Dichlormethan gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Die Lösung wurde mit Trifluoressigsäure (16.4 mL, 214 mmol, 19.5 Äg.) versetzt und bei Raumtemperatur 4 h lang gerührt. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in 40 mL Ethylacetat aufgenommen und mit gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung auf einen pH-Wert von 6 eingestellt. Die organische Phase wurde separiert, mit gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung (2 x 30 mL) gewaschen, mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und N^6 -(Benzoyloxy)- N^2 -((benzyloxy)carbonyl)-L-lysin (**56**) wurde als farbloses Öl gewonnen und ohne weitere Reinigung im nächsten Schritt verwendet. Das Intermediat 56 wurde in 100 mL Dichlormethan gelöst (Lösung 1). In einem 250 mL Rundkolben wurden EDC•HCI (5.67 g, 29.6 mmol, 2.69 Äq.), 4-(Dimethylamino)pyridin (3.61 g, 29.6 mmol, 2.69 Äq.) und 4-(Dimethylamino)pyridin•HCl (4.70 g, 29.6 mmol, 2.69 Äg.) in 250 mL Dichlormethan gelöst (Lösung 2) und auf 40 °C erwärmt. Über einen Zeitraum von 8 h wurde die Lösung 1 der 40 °Cwarmen Lösung 2 getropft. Anschließend wurde der Reaktionsansatz bei Raumtemperatur weitere 16 h lang gerührt. Der Ansatz wurde mit 1 M Salzsäure (1 x 100 mL) und gesättigter Natriumchlorid-Lösung (2 x 300 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Cyclohexan/Ethylacetat 3/1 v/v) gereinigt und (S)-3-(((Benzyloxy)carbonyl)amino)-2-oxoazepan-1-yl benzoat (57) wurde als farbloses Öl (3.20 g, 8.37 mmol, 76 %) erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Veröffentlichung von WU et al. überein.³⁰¹

R _f	0.47 (Cyclohexan/Ethylacetat 2/1 v/v).
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 1.61 – 1.97 (m, 4 H), 2.05 – 2.22 (m, 2 H), 3.64 – 3.76
	(m, 1 H), 3.98 – 4.10 (m, 1 H), 4.42 – 4.54 (m, 1 H), 5.11
	(s, 2 H), 6.07 (d, J = 6.3 Hz, 1 H), 7.30 – 7.38 (m, 5 H),

	7.47 (t, <i>J</i> = 7.8 Hz, 2 H), 7.64 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1 H), 8.09 (d, <i>J</i> = 7.5 Hz, 2 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl₃)	δ 26.27, 27.88, 31.97, 53.49, 53.63, 66.81, 126.70,
	128.00, 128.10, 128.53, 128.72, 130.17, 134.24, 136.44,
	155.51, 163.74, 168.70.
HPLC (Methode A, 220 nm)	t _R : 13.66 min, ≥ 99 % Reinheit.
HRMS (ESI) m/z	ber. für $C_{21}H_{23}N_2O_5$: 383.1601, gef.: 383.1603.

(S)-3-Amino-2-oxoazepan-1-yl benzoat (58)

. .. .



[248.12]

Die Synthese erfolgte gemäß der einer modifizierten Vorschrift von WU *et al.*³⁰¹ In einem 250 mL Rundkolben wurde (*S*)-3-(((Benzyloxy)carbonyl)amino)-2-oxoazepan-1-yl benzoat (**57**) (2.28 g, 7.50 mmol, 1.00 Äq.) in 30 mL Methanol und 7.5 mL Trifluoressigsäure unter Stickstoffatmosphäre gelöst und Palladium auf Aktivkohle (10 % *m/m*, 798 mg, 0.75 mmol) hinzugegeben. Unter Wasserstoffatmosphäre (Ballon) wurde der Ansatz bei Raumtemperatur 1 h lang gerührt. Anschließend wurde die Suspension über wenig Kieselgel filtriert und mit Methanol nachgespült. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 15 mL Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wurde mit gesättigter atriumhydrogencarbonat-Lösung (2 x 10 mL) und gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung (1 x 10 mL) gewaschen, mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. (*S*)-3-Amino-2-oxoazepan-1-yl benzoat (**58**) wurde als farbloser Feststoff (1.68 g, 6.77 mmol, 90 %) erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Veröffentlichung von WU *et al.* überein.³⁰¹

t _R : 6.66 min. ⁷
δ 1.94 (s, 6 H), 3.52 – 3.80 (m, 2 H), 3.84 – 4.16 (m, 1 H),
6.14 (s, 2 H), 7.34 – 7.46 (m, 2 H), 7.51 – 7.62 (m, 1 H),
7.76 (dt, $J = 8.6$, 2.0 Hz, 1 H), 8.03 (td, $J = 7.6$, 1.4 Hz,
1 H).
ber. für C ₁₃ H ₁₇ N ₂ O ₃ : 249.1234, gef.: 249.1238.

⁷ Aufgrund sehr schlechter Absorption war keine Reinheitsangabe möglich.

3-(((Benzyloxy)carbonyl)amino)-N-(tert-butoxycarbonyl)-L-alanin (60)



Die Synthese erfolgte gemäß einer modifizierten Vorschrift von MITRA und GANESH.⁴⁶⁵ In einem 250 mL Rundkolben wurde 3-Amino-*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-L-alanin (**59**) (5.00 g, 24.5 mmol, 1.00 Äq.) in 50 mL entmineralisiertem Wasser gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Natriumhydrogencarbonat (8.23 g, 97.9 mmol, 4.00 Äq.) wurde portionsweise hinzugefügt und anschließend Benzylchloroformat (4.28 mL, 29.4 mmol, 1.20 Äq.) tropfenweise zugegeben. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur 6 h lang gerührt und die wässrige Phase anschließend mit Diethylether (3 x 50 mL) gewaschen. Danach wurde die wässrige Phase mit 10 %iger wässriger Zitronensäure-Lösung angesäuert und mit Ethylacetat (3 x50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. 3- (((Benzyloxy)carbonyl)amino)-*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-L-alanin (**60**) wurde als farbloser Feststoff (5.61 g, 16.6 mmol, 68 %) erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Veröffentlichung von WU *et al.* überein.³⁰¹

R _f	0.31 (Dichlormethan/Aceton/Methanol 65/20/15 v/v/v).
Schmelzpunkt	99-101 °C.
¹ H-NMR (300 MHz, CD ₃ OD)	δ 1.38 – 1.59 (m, 2 H), 1.65 – 2.05 (m, 4 H), 3.95 (t,
	J = 6.9 Hz, 2 H), 4.20 (dd, J = 8.9, 4.7 Hz, 1 H), 5.05 (s,
	2 H), 7.21 – 7.38 (m, 5 H), 7.38 – 7.53 (m, 3 H), 7.80 (s,
	1 H), 8.22 – 8.33 (m, 2 H).
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 10.88 min, 95.3 % Reinheit.

(S,Z)-N-(5-(((Benzyloxy)carbonyl)amino)-5-carboxypentyl)-1-phenylmethaniminoxid (64)



C₂₁H₂₄N₂O₅ [384.17]

Die Synthese erfolgte gemäß einer modifizierten Vorschrift von WALZ et al.³⁰⁷ In einem 500 mL Rundkolben wurde Kaliumhydroxid (741 mg, 13.2 mmol, 1.05 Äg.) in 150 mL Methanol gelöst und mit 3 Å Molsieb (5.00 g) sowie Cbz-L-Lysin (50) (3.60 g, 12.6 mmol, 1.00 Äg.) versetzt. Sobald sich Cbz-L-Lysin vollständig gelöst hat, wurde frisch destilliertes Benzaldehyd (1.41 mL, 13.8 mmol, 1.10 Äg.) zugegeben und die Reaktion bei Raumtemperatur 16 h lang gerührt. Die Suspension wurde filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das entstandene (E/Z)- N^6 -Benzyliden- N^2 -((benzyloxy)carbonyl)-L-lysin (62) wurde in 120 mL Methanol gelöst und mittels Eisbad auf 0 °C abgekühlt (Lösung 1). In einem zweiten 500 mL Rundkolben wurde mit Wasser angefeuchtete *m*-Chlorperbenzoesäure (77 % w/w) (3.38 g, 15.1 mmol, 1.20 Äq.) in 150 mL Methanol gelöst (Lösung 2). Die Lösung 2 wurde tropfenweise über einen Zeitraum von einer Stunde zur Lösung 1 gegeben und bei 0 °C weitere 2 h lang gerührt. Die Reaktionslösung wurde filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. (2S)-2-(((Benzyloxy)carbonyl)amino)-6-(3-phenyl-1,2-oxaziridin-2-yl)hexansäure (63) wurde als farbloses Öl erhalten und ohne weitere Reinigung für den nächsten Reaktionsschritt verwendet. Unter Stickstoffatmosphäre wurde 63 in 25 mL Dichlormethan und 25 mL Trifluoressigsäure gelöst und bei Raumtemperatur 1 h lang gerührt, um die Isomerisierung zum Nitron 68 zu vervollständigen. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in 180 mL Ethylacetat aufgenommen und unter Stickstoffatmosphäre mittels Eisbad auf 0 °C abgekühlt. 3 mL Benzaldehyd wurde zu dem Ansatz gegeben und bei Raumtemperatur 16 h lang gerührt. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Dichlormethan/Aceton 4/1 $v/v \rightarrow$ Dichlormethan/Aceton/Methanol 65/20/15 v/v/vgereinigt. (S,Z)-N-(5-(((Benzyloxy)carbonyl)amino)-5-carboxypentyl)-1-phenylmethaniminoxid (64) wurde als gelbes Öl (2.10 g, 5.47 mmol, 43 %) erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Veröffentlichung von WALZ et al. überein.³⁰⁷

Analytische Daten

 R_f 0.31 (Dichlormethan/Aceton/Methanol 65/20/15 v/v/v).¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 1.38 - 1.59 (m, 2 H), 1.65 - 2.05 (m, 4 H), 3.95 (t,
J = 6.9 Hz, 2 H), 4.20 (dd, J = 8.9, 4.7 Hz, 1 H), 5.05 (s,

2 H), 7.21 – 7.38 (m, 5 H), 7.38 – 7.53 (m, 3 H), 7.80 (s, 1 H), 8.22 – 8.33 (m, 2 H).

*N*²-((Benzyloxy)carbonyl)-*N*⁶-hydroxy-L-lysin (65)



[296.14]

Die Synthese erfolgte gemäß einer modifizierten Vorschrift von WALZ *et al.*³⁰⁷ In einem 100 mL Rundkolben wurden (*S*,*Z*)-*N*-(5-(((Benzyloxy)carbonyl)amino)-5-carboxypentyl)-1phenylmethaniminoxid (**64**) (2.10 g, 5.56 mmol, 1.00 Äq) und Hydroxylamin•HCI (418 mg, 6.01 mmol, 1.10 Äq.) in 20 mL Methanol gelöst und 20 min lang auf 60 °C erhitzt. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstrand in 20 mL entmineralisiertem Wasser aufgenommen und mit Diethylether (5 x 20 mL) gewaschen. Das Wasser wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt im Hochvakuum getrocknet. *N*²-((Benzyloxy)carbonyl)-*N*⁶-hydroxy-L-lysin (**65**) wurde als farbloser Feststoff (1.60 g, 5.40 mmol, 99 %) gewonnen. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Veröffentlichung von WALZ *et al.* überein.³⁰⁷

¹ H-NMR (300 MHz, CD₃OD)	δ 1.43 – 2.01 (m, 6 H), 3.22 (t, J = 7.7 Hz, 2 H), 3.73 (s,
	1 H), 4.19 (dd, J = 8.9, 4.8 Hz, 1 H), 5.11 (d, J = 1.7 Hz,
	2 H), 7.25 – 7.43 (m, 5 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CD ₃ OD)	δ 23.8, 24.1, 32.1, 51.9, 55.1, 67.7, 128.8, 129.1, 129.5,
	138.1, 158.7, 174.4.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 8.58 min, ≥ 99 % Reinheit.

Benzyl (S)-(1-((tert-butyldiphenylsilyl)oxy)-2-oxoazepan-3-yl)carbamat (66)



C₃₀H₃₆N₂O4Si [516.24]

Die Synthese erfolgte gemäß einer modifizierten Vorschrift von GHOSH et al.²⁹⁸ N²-((Benzyloxy)carbonyl)-N⁶-hydroxy-L-lysin (69) (3.36 g, 11.3 mmol, 1.00 Äq.) in 320 mL Acetonitril und 92 mL N,N-Dimethylformamid gelöst und über einen Zeitraum von 4 h zu einer O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorphosphat Lösung aus (HATU) (5.17 g, 13.6 mmol, 1.20 Äg.) und *N*,*N*-Diisopropylethylamin (2.94 mL, 16.8 mmol, 1.48 Äq.) in 178 mL Acetonitril und 51 mL N,N-Dimethylformamid in einem 1000 mL Rundkolben getropft. Anschließend wurde der Ansatz bei Raumtemperatur 24 h lang gerührt. Der Reaktionsansatz wurde unter vermindertem Druck auf ca. 50 mL eingeengt, mithilfe einer Pipette in einen 250 mL Rundkolben überführt und auf 0 °C abgekühlt. Unter Rühren wurden tert-Butyldiphenylchlorsilan (7.37 mL, 28.3 mmol, 2.50 Äq.) und Imidazol (3.71 g, 54.4 mmol, 4.80 Äq.) zugegeben und bei 40 °C 24 h lang gerührt. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in 120 mL Ethylacetat aufgenommen und mit gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung (3 x 120 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (n-Hexan/Ethylacetat 3/1 v/v) gereinigt und Benzyl (S)-(1-((tert-butyldiphenylsilyl)oxy)-2oxoazepan-3-yl)carbamat (66) als farbloses Öl (2.30 g, 4.45 mmol, 39 %) gewonnen.

R _f	0.61 (Cyclohexan/Ethylacetat 1/1 v/v).
¹ H-NMR (300 MHz, CD₃OD)	δ 1.09 (s, 9 H), 1.40 – 1.75 (m, 4 H), 3.40 – 3.70 (m, 2 H),
	4.08 (dd, J = 10.3, 8.2 Hz, 1 H), 5.02 (s, 2 H), 5.85 (s,
	1 H), 7.11 – 7.80 (m, 15 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CD₃CN)	δ 19.7, 25.7, 26.9, 27.5, 31.5, 53.7, 54.4, 66.5, 128.1,
	128.1, 128.3, 128.4, 129.0, 130.7, 130.7, 132.7, 133.1,
	136.5, 136.7, 155.8, 170.9.

9.6.6. Darstellung von Siderophor-Konjugaten

Diethyl ((3-((6-aminohexyl)oxy)phenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2oxoethyl)thio)methyl)phosphonat (67a)



C₂₀H₃₅N₂O₆PS [462.20]

((3-((6-(1,3-dioxoisoindolin-2-yl)hexyl)oxy)phenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-Diethyl oxoethyl)thio)methyl)phosphonat (27c) (2.00 g, 3.37 mmol, 1.00 Äq) wurde in 35 mL Ethanol gelöst und mit Hydrazin•H₂O (327 µL, 6.75 mmol, 2.00 Äq.) versetzt. Das Lösemittel wurde mittels Stickstoffstrom entfernt, der Rückstand in wenig Dichlormethan gelöst und mittels Rotationsverdampfer ohne Hitze an Kieselgel adsorbiert. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Dichlormethan/Methanol 3/1 v/v + 1 % Triethylamin) wurde ein Gemisch aus Diethyl ((3-((6-(1,3-dioxoisoindolin-2-yl)hexyl)oxy)phenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2oxoethyl)thio)methyl)-phosphonat (67a) und Triethylamin als farbloses Öl erhalten. Die ¹H-NMR Ausbeute von Diethyl ((3-((6-(1,3-dioxoisoindolin-2-yl)hexyl)oxy)phenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)thio)methyl)phosphonat (67a) beträgt (827 mg, 1.79 mmol, 53 %). Das Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung für die nachfolgende Reaktion verwendet.

R _f	0.26 (Dichlormethan/Methanol 3/1 v/v + 1 % Triethyl-
	amin).
¹ H-NMR (300 MHz, CD ₃ OD)	δ 1.16 (td, J = 7.1, 0.7 Hz, 3 H), 1.34 (td, J = 7.1, 0.6 Hz,
	3 H), 1.40 – 1.64 (m, 4 H), 1.71 (td, <i>J</i> = 8.4, 4.4 Hz, 2 H),
	1.77 – 1.89 (m, 2 H), 2.90 – 2.99 (m, 2 H), 3.19 (s, 3 H),
	3.28 (s, 0.5 H, Signal überlagert mit CD $_3$ OD), 3.63 (dd,
	J = 14.5, 2.5 Hz, 1 H), 3.83 – 4.05 (m, 4 H), 4.13 – 4.25
	(m, 2 H), 4.57 (d, $J = 20.7$ Hz, 1 H), 6.88 (dq, $J = 8.3$,
	1.4 Hz, 1 H), 7.00 – 7.07 (m, 1 H), 7.09 (q, J = 2.1 Hz,
	1 H), 7.26 (t, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1 H), 8.44 (s, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃)	δ 16.5, 16.8, 26.7, 27.2, 28.5, 30.0, 36.4, 40.7, 49.3 (d,
	$^{4}J_{C,P}$ = 74.3 Hz), 115.5, 116.6, 123.0, 130.5 (d,
	${}^{4}J_{C,P}$ = 1.8 Hz), 137.5, 160.6 (d, ${}^{4}J_{C,P}$ = 2.1 Hz), 168.2.
³¹ P-NMR (121 MHz, CD ₃ OD)	δ22.31.

HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 7.58 min, 97.6 % Reinheit ⁸ .
MS (ESI) m/z	ber. für C ₂₀ H ₃₆ N ₂ O ₆ PS: 463.20, gef.: 463.20.

⁸ Die angegebene HPLC-Reinheit entspricht nicht der tatsächlichen Reinheit der Verbindung, da die Methode nicht geeignet ist, um Triethylamin zu quantifizieren.

Diethyl ((4-((6-aminohexyl)oxy)phenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-

oxoethyl)thio)methyl)phosphonat (67b)



C₂₀H₃₅N₂O₆PS [462.20]

Diethyl ((4-((6-(1,3-dioxoisoindolin-2-yl)hexyl)oxy)phenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2oxoethyl)thio)methyl)phosphonat (27d) (593 mg, 1.00 mmol, 1.00 Äg) wurde in 10 mL Ethanol gelöst und mit Hydrazin•H₂O (97 µL, 2.00 mmol, 2.00 Äq.) versetzt. Das Lösemittel wurde mittels Stickstoffstrom entfernt, der Rückstand in wenig Dichlormethan gelöst und mittels Rotationsverdampfer ohne Hitze an Kieselgel adsorbiert. Nach säulenchromatographischer Reinigung mit einem Eluentengemisch bestehend aus Dichlormethan/Methanol 3/1 v/v + 1 %Triethylamin wurde ein Gemisch Diethyl ((4-((6-(1,3-dioxoisoindolin-2aus yl)hexyl)oxy)phenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)thio)methyl)-phosphonat (67b) und Triethylamin als farbloses Öl erhalten. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung für die nachfolgende Reaktion verwendet.

R _f	0.26 (Dichlormethan/Methanol 3/1 v/v + 1 % Triethyl-
	amin).
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 1.05 (t, J = 7.1 Hz, 3 H), 1.30 – 1.46 (m, 4 H),
	1.49 – 1.64 (m, 2 H), 1.65 – 1.78 (m, 2 H), 2.75 (t,
	<i>J</i> = 7.5 Hz, 2 H), 3.06 (s, 3 H), 3.51 (dd, <i>J</i> = 14.8, 1.8 Hz,
	1 H), 3.69 – 4.15 (m, 6 H), 4.50 (d, J = 19.6 Hz, 1 H),
	6.83 – 6.95 (m, 2 H), 7.24 – 7.36 (m, 2 H), 10.16 (s, 1 H).
¹³ C-NMR (150 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 16.5 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 5.5 Hz), 16.7 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 5.5 Hz), 25.5,
	26.0, 27.3, 28.9, 32.6 (d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 6.6 Hz), 39.1, 43.3 (d,
	$^{1}J_{C,P}$ = 145.1 Hz), 62.9 (d, $^{2}J_{C,P}$ = 7.0 Hz), 63.0 (d,
	$^{2}J_{C,P}$ = 6.6 Hz), 67.7, 114.7, 127.6 (d, $^{2}J_{C,P}$ = 4.5 Hz),
	130.9 (d, ³ J _{C,P} = 6.6 Hz), 158.5, 169.0.
³¹ P-NMR (243 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ22.22.
HPLC (Methode A, 254 nm)	t _R : 8.41 min, ≥ 99 % Reinheit.
HRMS (ESI) m/z	ber. für C ₂₀ H ₃₆ N ₂ O ₆ PS: 463.2026, gef.: 463.2034.

Diethyl ((3-((6-(2,3-dihydroxybenzamido)hexyl)oxy)phenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)thio)methyl)phosphonat (68a)



2,3-Dihydroxybenzoesäure (91 mg, 0.59 mmol, 1.10 Äq) wurde in 3 mL trockenem Tetrahydrofuran in einem ausgeheizten Rundkolben vorgelegt, mit 1,1'-Carbonyldiimidazol (130 mg, 0.80 mmol, 1.50 Äq.) versetzt und 1 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Diethyl ((3-((6-aminohexyl)oxy)phenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)thio)methyl)phosphonat (67a) (250 mg, 0.54 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 2 mL trockenem Tetrahydrofuran gelöst, dem Reaktionssatz zugegeben und weitere 16 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde mittels C¹⁸-Umkehrphasen-Flashchromatographie mit einem Eluentengemisch bestehend aus Wasser/Acetonitril isoliert und Diethyl ((3-((6-(2,3-dihydroxybenzamido)hexyl)oxy)phenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)thio)methyl)phosphonat (68a) als farbloses Öl (156 mg, 0.26 mmol, 49 %) erhalten.

R _f	0.13 (Dichlormethan/Methanol 10/1 v/v).
Schmelzpunkt	158 °C.
¹ H NMR (300 MHz, CD₃OD)	δ 1.14 (td, J = 7.1, 0.7 Hz, 3 H), 1.32 (td, J = 7.1, 0.6 Hz,
	3 H), 1.43 – 1.66 (m, 7 H), 1.73 – 1.88 (m, 2 H), 3.17 (s,
	3 H), 3.24 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1 H), 3.61 (dd, <i>J</i> = 14.5, 2.5 Hz,
	1 H), 3.81 – 4.06 (m, 2 H), 4.00 (t, J = 6.4 Hz, 2 H),
	4.10 – 4.22 (m, 2 H), 4.54 (d, J = 20.8 Hz, 1 H),
	6.82 - 6.93 (m, 2 H), $6.98 - 7.11$ (m, 2 H), 7.24 (t,
	J = 7.9 Hz, 1 H), 7.27 (dd, J = 7.9, 1.6 Hz, 1 H), 7.74 (dd,
	<i>J</i> = 8.0, 1.7 Hz, 1 H).
¹³ C-NMR (75 MHz, CD₃OD)	δ 16.5 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 5.9 Hz), 16.7 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 5.6 Hz), 26.8,
	27.5, 30.2, 30.7, 32.4 (d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 8.3 Hz), 36.4, 42.0, 65.0
	(d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 10.2 Hz), 68.9, 115.4, 115.5 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 2.4 Hz),
	116.8 (d, ${}^{5}J_{C,P}$ = 6.5 Hz), 119.3, 123.0, 128.4, 129.9,
	130.5, 137.5 (d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 4.9 Hz), 140.8, 156.0, 156.8,
	160.6, 171.5, 173.4.
³¹ P-NMR (121 MHz, CD ₃ OD)	δ 22.32.

MS (ESI) m/z:

ber. für $C_{27}H_{38}N_2O_9PS$ + 2 Na+: 643.18, gef.: 643.21.

Diethyl ((3-((6-(2-chloro-3,4-dihydroxybenzamido)hexyl)oxy)phenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)thio)methyl)phosphonat (68b)



[632.17]

2-Chlor-3,4-dihydroxybenzoesäure (32) (233 mg, 1.23 mmol, 1.10 Äq) wurde in 3 mL trockenem Tetrahydrofuran in einem ausgeheizten Rundkolben vorgelegt, mit 1,1'-Carbonyldiimidazol (200 mg, 1.23 mmol, 1.50 Äq.) versetzt und bei Raumtemperatur 1 h lang gerührt. Diethyl ((3-((6-aminohexyl)oxy)phenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2oxoethyl)thio)methyl)phosphonat (67a) (480 mg, 1.03 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 2 mL trockenem Tetrahydrofuran gelöst, dem Reaktionssatz zugegeben und bei Raumtemperatur weitere 16 h lang gerührt. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde mittels C¹⁸-Umkehrphasen-Flashchromatographie mit einem Eluentengemisch Wasser/Acetonitril bestehend aus isoliert und Diethyl ((3-((6-(2-chlor-3,4dihydroxybenzamido)hexyl)oxy)phenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)thio)methyl)phosphonat (68b) als farbloses Öl (327 mg, 0.52 mmol, 50 %) erhalten.

¹ H NMR (300 MHz, CD₃OD)	δ 1.14 (td, J = 7.1, 0.7 Hz, 3 H), 1.32 (td, J = 7.1, 0.6 Hz,
	3 H), 1.49 – 1.55 (m, 7 H), 1.64 (q, <i>J</i> = 7.0 Hz, 1 H), 1.80
	(q, J = 6.7 Hz, 2 H), 3.17 (s, 3 H), 3.18 – 3.28 (m, 3 H),
	3.61 (dd, <i>J</i> = 14.5, 2.6 Hz, 1 H), 3.77 – 4.07 (m, 2 H), 4.01
	(t, J = 6.4 Hz, 2 H), 4.03 – 4.25 (m, 2 H), 4.55 (d,
	J = 20.5 Hz, 1 H), 6.87 (dd, $J = 8.6$, 2.7 Hz, 2 H),
	6.97 – 7.11 (m, 2 H), 7.24 (t, J = 8.0 Hz, 1 H), 7.69 (d,
	<i>J</i> = 8.7 Hz, 1 H).
¹³ C-NMR (151 MHz, CD ₃ OD)	δ 16.5 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 5.8 Hz), 16.7 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 6.0 Hz), 26.8 (d,
	J = 3.9 Hz), 27.5, 30.3 (d, J = 4.7 Hz), 30.7 (d, J = 3.3 Hz),
	32.5 (d, J = 7.6 Hz), 36.4, 42.1, 45.9 (d, J = 146.0 Hz),
	64.8 (d, J = 7.2 Hz), 65.0 (d, J = 7.2 Hz), 68.9, 115.2,
	115.5, 116.8 (d, <i>J</i> = 6.2 Hz), 123.0 (d, <i>J</i> = 6.5 Hz), 130.5,
	130.7, 130.9, 137.5 (d, <i>J</i> = 4.6 Hz), 137.9, 155.8, 156.0,
	160.7 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz), 168.5, 171.5.
³¹ P-NMR (121 MHz, CD ₃ OD)	δ22.35.

MS (ESI) m/z:

ber. für $C_{27}H_{36}CIN_2O_9PS$ + 2 Na⁺: 677.17, gef.: 677.18.

Diethyl ((4-((6-aminohexyl)oxy)phenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-

oxoethyl)thio)methyl)phosphonat (68c)



[632.17]

2-Chlor-3,4-dihydroxybenzoesäure (32) (1.22 g, 0.55 mmol, 1.10 Äq) wurde in 3 mL Tetrahydrofuran einem ausgeheizten Rundkolben trockenem vorgelegt, mit in 1,1'-Carbonyldiimidazol (122 mg, 0.75 mmol, 1.50 Äq.) versetzt und 1 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Diethyl ((4-((6-aminohexyl)oxy)phenyl)((2-(hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)thio)methyl)phosphonat (67b) (233 mg, 0.50 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 2 mL trockenem Tetrahydrofuran gelöst, dem Reaktionssatz zugegeben und weitere 16 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels C₁₈-Umkehrphasen-Flashchromatographie (Wasser/Acetonitril) isoliert und ((4-((6-(2-chlor-3,4-dihydroxybenzamido)hexyl)oxy)phenyl)((2-Diethyl (hydroxy(methyl)amino)-2-oxoethyl)thio)methyl)phosphonat (68c) als farbloses Öl (100 mg, 0.16 mmol, 15 %) erhalten.

¹ H-NMR (600 MHz, CD₃OD)	δ 1.14 (td, J = 7.1, 1.6 Hz, 3 H), 1.31 (t, J = 7.1 Hz, 3 H),
	1.45 – 1.57 (m, 4 H), 1.62 (qt, <i>J</i> = 7.1, 5.5 Hz, 2 H), 1.80
	(p, J = 6.7 Hz, 2 H), 3.17 (s, 2 H), 3.20 – 3.26 (m, 3 H),
	3.57 – 3.61 (m, 1 H), 3.83 – 3.88 (m, 1 H), 3.98 (dt,
	J = 17.5, 6.7 Hz, 3 H), 4.10 – 4.18 (m, 2 H),
	4.49 – 4.55 (m, 1 H), 6.85 – 6.92 (m, 3 H), 7.37 (dt,
	<i>J</i> = 7.0, 2.4 Hz, 2 H), 7.72 (d, <i>J</i> = 8.7 Hz, 1 H).
¹³ C-NMR (151 MHz, CD₃OD)	δ 16.5 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 5.8 Hz), 16.7 (d, ${}^{3}J_{C,P}$ = 6.0 Hz), 26.8,
	27.5, 30.3, 30.7, 32.3 (d, ² J _{C,P} = 7.4 Hz), 36.4, 42.0, 45.2
	(d, ${}^{1}J_{C,P}$ = 147.5 Hz), 64.7 (d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 7.2 Hz), 64.9 (d,
	$^{2}J_{C,P}$ = 7.1 Hz), 69.0, 115.2, 115.6, 127.5 (d,
	${}^{3}J_{C,P}$ = 4.7 Hz), 130.7, 130.9, 131.9 (d, ${}^{2}J_{C,P}$ = 6.5 Hz),
	138.0, 155.8, 156.1, 160.5, 168.4, 171.6.
³¹ P-NMR (243 MHz, CD ₃ OD)	δ 22.67.

MS (ESI) m/z

ber. für $C_{27}H_{36}CIN_2O_9PS$ + 2 Na⁺: 677.17, gef.: 677.17

10. Literaturverzeichnis

- [1] Global Tuberculosis Report 2023. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2023.
 Lizenz: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- World Malaria Report 2023. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2023. Lizenz: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- WHO Guidelines for Malaria. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2023. Lizenz: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- [4] Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report: 2022. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2022. Lizenz: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- [5] 2021 Antibacterial Agents in Clinical and Preclinical Development: An Overview and Analysis.Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2022. CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- [6] N. Rehberg, et al. Chlorflavonin Targets Acetohydroxyacid Synthase Catalytic Subunit IIvB1 for Synergistic Killing of Mycobacterium tuberculosis. ACS Infectious Diseases 2018, 4(2), 123-134, DOI:10.1021/acsinfecdis.7b00055.
- [7] M. Fumagalli, *et al.* Signatures of Environmental Genetic Adaptation Pinpoint Pathogens as the Main Selective Pressure through Human Evolution. *PLOS Genetics* 2011, 7(11), e1002355, DOI:10.1371/journal.pgen.1002355.
- [8] A. Bartlett, *et al.* A Comprehensive List of Bacterial Pathogens Infecting Humans. *Microbiology* 2022, 168(12), DOI:10.1099/mic.0.001269.
- [9] R. E. Baker, *et al.* Infectious Disease in an Era of Global Change. *Nature Reviews Microbiology* 2022, 20(4), 193-205, DOI:10.1038/s41579-021-00639-z.
- [10] C. J. L. Murray, et al. Global Burden of Bacterial Antimicrobial Resistance in 2019: A Systematic Analysis. The Lancet 2022, 399(10325), 629-655, DOI:10.1016/s0140-6736(21)02724-0.
- K. S. Ikuta, *et al.* Global Mortality Associated With 33 Bacterial Pathogens in 2019: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet* 2022, 400(10369), 2221-2248, DOI:10.1016/S0140-6736(22)02185-7.
- [12] A. Fleming. On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, With Special Reference to Their Use in the Isolation of *B. influenzae*. *The British Journal of Experimental Pathology* 1929, 10(3), 226-236.
- [13] R. B. Woodward, W. E. Doering. The Total Synthesis of Quinine. Journal of the American Chemical Society 1944, 66(5), 849-849, DOI:10.1021/ja01233a516.
- [14] R. Quinn. Rethinking Antibiotic Research and Development: World War II and the Penicillin Collaborative. *American Journal of Public Health* 2012, 103(3), 426-434, DOI:10.2105/AJPH.2012.300693.
- [15] F. Krammer. SARS-CoV-2 Vaccines in Development. Nature 2020, 586, 516-527, DOI:10.1038/s41586-020-2798-3.
- [16] N. C. Kyriakidis, et al. SARS-CoV-2 Vaccines Strategies: A Comprehensive Review of Phase 3 Candidates. npj Vaccines 2021, 6(1), 28, DOI:10.1038/s41541-021-00292-w.
- [17] M. S. Dodd, *et al.* Evidence for Early Life in Earth's Oldest Hydrothermal Vent Precipitates. *Nature* 2017, 543, 60-64, DOI:10.1038/nature21377.

- [18] M. Grinberg, et al. Bacterial Surface Colonization, Preferential Attachment and Fitness Under Periodic Stress. PLOS Computational Biology 2019, 15(3), e1006815, DOI:10.1371/journal.pcbi.1006815.
- [19] S. Doron, S. L. Gorbach. Bacterial Infections: Overview. In International Encyclopedia of Public Health, Heggenhougen, H. K., Ed. Academic Press: Oxford, 2008; Seite 273-282, DOI:10.1016/B978-012373960-5.00596-7.
- [20] N. Rolhion, B. Chassaing. When Pathogenic Bacteria Meet the Intestinal Microbiota. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 2016, 371(1707), 20150504, DOI:10.1098/rstb.2015.0504.
- [21] J. Soni, et al. Understanding Bacterial Pathogenicity: A Closer Look at the Journey of Harmful Microbes. Frontiers in Microbiology 2024, 15:1370818, DOI:10.3389/fmicb.2024.1370818.
- [22] A. Kumar, H. P. Schweizer. Bacterial Resistance to Antibiotics: Active Efflux and Reduced Uptake. Advanced Drug Delivery Reviews 2005, 57(10), 1486-1513, DOI:10.1016/j.addr.2005.04.004.
- [23] M. A. Webber, L. J. V. Piddock. The Importance of Efflux Pumps in Bacterial Antibiotic Resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2003, 51(1), 9-11, DOI:10.1093/jac/dkg050.
- [24] L. Fernández, E. W. Hancock Robert. Adaptive and Mutational Resistance: Role of Porins and Efflux Pumps in Drug Resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 2012, 25(4), 661-681, DOI:10.1128/cmr.00043-12.
- [25] G. D. Wright. Bacterial Resistance to Antibiotics: Enzymatic Degradation and Modification. Advanced Drug Delivery Reviews 2005, 57(10), 1451-1470, DOI:10.1016/j.addr.2005.04.002.
- [26] G. De Pascale, G. D. Wright. Antibiotic Resistance by Enzyme Inactivation: From Mechanisms to Solutions. *ChemBioChem* 2010, 11(10), 1325-1334, DOI:10.1002/cbic.201000067.
- [27] E. M. Darby, et al. Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance Revisited. Nature Reviews Microbiology 2023, 21(5), 280-295, DOI:10.1038/s41579-022-00820-y.
- [28] P. A. Lambert. Bacterial Resistance to Antibiotics: Modified Target Sites. Advanced Drug Delivery Reviews 2005, 57(10), 1471-1485, DOI:10.1016/j.addr.2005.04.003.
- [29] P. R. Ball, et al. Plasmid-Mediated Tetracycline Resistance in Escherichia coli Involves Increased Efflux of the Antibiotic. Biochemical and Biophysical Research Communications 1980, 93(1), 74-81, DOI:10.1016/S0006-291X(80)80247-6.
- [30] D. N. Wilson, et al. Target Protection as a Key Antibiotic Resistance Mechanism. Nature Reviews Microbiology 2020, 18(11), 637-648, DOI:10.1038/s41579-020-0386-z.
- [31] V. M. D'Costa, et al. Antibiotic Resistance Is Ancient. Nature 2011, 477, 457-461, DOI:10.1038/nature10388.
- [32] K. Bhullar, *et al.* Antibiotic Resistance Is Prevalent in an Isolated Cave Microbiome. *PLOS ONE* 2012, 7(4), e34953, DOI:10.1371/journal.pone.0034953.
- [33] K. M. Overbye, J. F. Barrett. Antibiotics: Where Did We Go Wrong? *Drug Discovery Today* 2005, 10(1), 45-52, DOI:10.1016/S1359-6446(04)03285-4.
- [34] M. S. Butler, et al. Antibiotics in the Clinical Pipeline as of December 2022. The Journal of Antibiotics 2023, 76(8), 431-473, DOI:10.1038/s41429-023-00629-8.

- [**35**] J. O'Neill. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations. Review on Antimicrobial Resistance; **2016**.
- [36] L. N. Segal, et al. Anaerobic Bacterial Fermentation Products Increase Tuberculosis Risk in Antiretroviral-Drug-Treated HIV Patients. Cell Host & Microbe 2017, 21(4), 530-537, DOI:10.1016/j.chom.2017.03.003.
- [37] R. M. G. J. Houben, P. J. Dodd. The Global Burden of Latent Tuberculosis Infection: A Reestimation Using Mathematical Modelling. *PLOS Medicine* 2016, 13(10), e1002152, DOI:10.1371/journal.pmed.1002152.
- [38] M. L. Silva, et al. Tuberculosis Caused by Mycobacterium africanum: Knowns and Unknowns.
 PLOS Pathogens 2022, 18(5), e1010490, DOI:10.1371/journal.ppat.1010490.
- [39] I. Comas, et al. Out-of-Africa Migration and Neolithic Coexpansion of Mycobacterium tuberculosis With Modern Humans. Nature Genetics 2013, 45(10), 1176-1182, DOI:10.1038/ng.2744.
- [40] S. T. Cole, *et al.* Deciphering the Biology of *Mycobacterium tuberculosis* From the Complete Genome Sequence. *Nature* **1998**, 393, 537-544, DOI:10.1038/31159.
- [41] J. C. Leemans, et al. Depletion of Alveolar Macrophages Exerts Protective Effects in Pulmonary Tuberculosis in Mice. The Journal of Immunology 2001, 166(7), 4604-4611, DOI:10.4049/jimmunol.166.7.4604.
- [42] F. J. Sheedy, M. Divangahi. Targeting Immunometabolism in Host Defence Against Mycobacterium tuberculosis. Immunology 2021, 162(2), 145-159, DOI:10.1111/imm.13276.
- [43] M. Sköld, S. M. Behar. Tuberculosis Triggers a Tissue-Dependent Program of Differentiation and Acquisition of Effector Functions by Circulating Monocytes. *The Journal of Immunology* 2008, 181(9), 6349-6360, DOI:10.4049/jimmunol.181.9.6349.
- [44] A. R. Martineau, et al. Neutrophil-Mediated Innate Immune Resistance to Mycobacteria. The Journal of Clinical Investigation 2007, 117(7), 1988-1994, DOI:10.1172/jci31097.
- [45] J. D. Ernst. The Immunological Life Cycle of Tuberculosis. *Nature Reviews Immunology* 2012, 12(8), 581-591, DOI:10.1038/nri3259.
- [46] L. Huang, et al. Growth of Mycobacterium tuberculosis In Vivo Segregates With Host Macrophage Metabolism and Ontogeny. Journal of Experimental Medicine 2018, 215(4), 1135-1152, DOI:10.1084/jem.20172020.
- [47] G. Kaplan, et al. Mycobacterium tuberculosis Growth at the Cavity Surface: A Microenvironment With Failed Immunity. Infection and Immunity 2003, 71(12), 7099-7108, DOI:10.1128/iai.71.12.7099-7108.2003.
- [48] E. Vynnycky, P. E. Fine. Lifetime Risks, Incubation Period, and Serial Interval of Tuberculosis. *American Journal of Epidemiology* **2000**, 152(3), 247-263, DOI:10.1093/aje/152.3.247.
- [49] N. A. Menzies, et al. Progression From Latent Infection to Active Disease in Dynamic Tuberculosis Transmission Models: A Systematic Review of the Validity of Modelling Assumptions. The Lancet Infectious Diseases 2018, 18(8), e228-e238, DOI:10.1016/S1473-3099(18)30134-8.
- [50] B. Kalsdorf, *et al.* Tuberkulose Standards der Diagnostik und Therapie 2018. *Pneumo News* 2018, 10(5), 38-50, DOI:10.1007/s15033-018-0816-z.

- [51] E. Eisenhuber, et al. Radiologische Diagnostik der pulmonalen Tuberkulose und der nicht typischen Mykobakteriosen. Radiologie up2date 2013, 13(04), 345-363, DOI:10.1055/s-0033-1358941.
- [52] WHO Consolidated Guidelines on Tuberculosis: Module 3: Diagnosis: Rapid Diagnostics for Tuberculosis Detection, Third Edition. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2024. Lizenz: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- [53] G. W. Procop. Laboratory Diagnosis and Susceptibility Testing for *Mycobacterium tuberculosis*.
 Microbiology Spectrum 2016, 4(6), DOI:10.1128/microbiolspec.tnmi7-0022-2016.
- [54] E. W. Tiemersma, et al. Natural History of Tuberculosis: Duration and Fatality of Untreated Pulmonary Tuberculosis in HIV Negative Patients: A Systematic Review. PLOS ONE 2011, 6(4), e17601, DOI:10.1371/journal.pone.0017601.
- [55] V. Singh, et al. The Implication of Mycobacterium tuberculosis-Mediated Metabolism of Targeted Xenobiotics. Nature Reviews Chemistry 2023, 7(5), 340-354, DOI:10.1038/s41570-023-00472-3.
- [56] H. Ghajavand, et al. High Prevalence of Bedaquiline Resistance in Treatment-Naive Tuberculosis Patients and Verapamil Effectiveness. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2019, 63(3), e02530-02518, DOI:10.1128/aac.02530-18.
- [57] C. Nimmo, et al. Population-Level Emergence of Bedaquiline and Clofazimine Resistance-Associated Variants Among Patients With Drug-Resistant Tuberculosis in Southern Africa: A Phenotypic and Phylogenetic Analysis. *The Lancet Microbe* 2020, 1(4), e165-e174, DOI:10.1016/S2666-5247(20)30031-8.
- [58] C. Villellas, et al. Unexpected High Prevalence of Resistance-Associated Rv0678 Variants in MDR-TB Patients Without Documented Prior Use of Clofazimine or Bedaquiline. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2016, 72(3), 684-690, DOI:10.1093/jac/dkw502.
- [59] S. Yuan, et al. Oxazolidinone: A Promising Scaffold for the Development of Antibacterial Drugs.
 European Journal of Medicinal Chemistry 2023, 250, 115239, DOI:10.1016/j.ejmech.2023.115239.
- [60] V. Singh, K. Chibale. Strategies to Combat Multi-Drug Resistance in Tuberculosis. Accounts of Chemical Research 2021, 54(10), 2361-2376, DOI:10.1021/acs.accounts.0c00878.
- [61] N. Kumar, *et al.* Unlocking Translational Machinery for Antitubercular Drug Development. *Trends in Biochemical Sciences* **2024**, 49(3), 195-198, DOI:10.1016/j.tibs.2023.12.008.
- [62] V. A. Dartois, E. J. Rubin. Anti-tuberculosis Treatment Strategies and Drug Development: Challenges and Priorities. *Nature Reviews Microbiology* 2022, 20(11), 685-701, DOI:10.1038/s41579-022-00731-y.
- [63] S. Lancione, et al. Tracking Changes in National BCG Vaccination Policies and Practices Using the BCG World Atlas. BMJ Global Health 2022, 7(1), e007462, DOI:10.1136/bmjgh-2021-007462.
- [64] D. R. Tait, et al. Final Analysis of a Trial of M72/AS01_E Vaccine to Prevent Tuberculosis. New England Journal of Medicine 2019, 381(25), 2429-2439, DOI:10.1056/NEJMoa1909953.
- [65] N. J. White, et al. Malaria. The Lancet 2014, 383(9918), 723-735, DOI:10.1016/S0140-6736(13)60024-0.

- [66] L. H. Miller, et al. Malaria Biology and Disease Pathogenesis: Insights for New Treatments. Nature Medicine 2013, 19(2), 156-167, DOI:10.1038/nm.3073.
- [67] A. F. Cowman, et al. Malaria: Biology and Disease. Cell 2016, 167(3), 610-624, DOI:10.1016/j.cell.2016.07.055.
- [68] M. A. Phillips, et al. Malaria. Nature Reviews Disease Primers 2017, 3(1), 17050, DOI:10.1038/nrdp.2017.50.
- [69] K. Maitland. Severe Malaria in African Children The Need for Continuing Investment. New England Journal of Medicine 2016, 375(25), 2416-2417, DOI:10.1056/NEJMp1613528.
- [70] C. Naing, et al. Is Plasmodium vivax Malaria a Severe Malaria?: A Systematic Review and Meta-Analysis. PLOS Neglected Tropical Diseases 2014, 8(8), e3071, DOI:10.1371/journal.pntd.0003071.
- [71] N. J. White. Determinants of Relapse Periodicity in *Plasmodium vivax* Malaria. *Malaria Journal* 2011, 10(1), 297, DOI:10.1186/1475-2875-10-297.
- [72] M. A. Ahmed, J. Cox-Singh. Plasmodium knowlesi An Emerging Pathogen. ISBT Science Series 2015, 10(Suppl. 1), 134-140, DOI:10.1111/voxs.12115.
- [73] S. Bhatt, et al. The Effect of Malaria Control on Plasmodium falciparum in Africa Between 2000 and 2015. Nature 2015, 526, 207-211, DOI:10.1038/nature15535.
- [74] D. A. Baker. Malaria Gametocytogenesis. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2010, 172(2), 57-65, DOI:10.1016/j.molbiopara.2010.03.019.
- [75] A. P. Waters. Epigenetic Roulette in Blood Stream *Plasmodium*: Gambling on Sex. *PLOS Pathogens* 2016, 12(2), e1005353, DOI:10.1371/journal.ppat.1005353.
- S. C. Wassmer, et al. Investigating the Pathogenesis of Severe Malaria: A Multidisciplinary and Cross-Geographical Approach. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2015, 93(Suppl. 3), 42-56, DOI:10.4269/ajtmh.14-0841.
- [77] S. C. Wassmer, G. E. R. Grau. Severe Malaria: What's New on the Pathogenesis Front? International Journal for Parasitology 2017, 47(2), 145-152, DOI:10.1016/j.ijpara.2016.08.002.
- [78] WHO. Severe Malaria. *Tropical Medicine & International Health* 2014, 19, 7-131, DOI:10.1111/tmi.12313.
- [79] A. M. Dondorp, N. P. J. Day. The Treatment of Severe Malaria. Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 2007, 101(7), 633-634, DOI:10.1016/j.trstmh.2007.03.011.
- [80] M. Bernabeu, J. D. Smith. EPCR and Malaria Severity: The Center of a Perfect Storm. *Trends in Parasitology* 2017, 33(4), 295-308, DOI:10.1016/j.pt.2016.11.004.
- [81] T. Notomi, *et al.* Loop-Mediated Isothermal Amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* 2000, 28(12), e63, DOI:10.1093/nar/28.12.e63.
- [82] S. Pholwat, et al. The Malaria TaqMan Array Card Includes 87 Assays for Plasmodium falciparum Drug Resistance, Identification of Species, and Genotyping in a Single Reaction. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2017, 61(5), e00110-00117, DOI:10.1128/aac.00110-17.

- [83] E. Chanda, et al. Scale-up of a Programme for Malaria Vector Control Using Long-Lasting Insecticide-Treated Nets: Lessons From South Sudan. Bulletin of the World Health Organization 2014, 92(4), 290-296, DOI:10.2471/blt.13.126862.
- [84] A. Burt. Heritable Strategies for Controlling Insect Vectors of Disease. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 2014, 369(1645), 20130432, DOI:10.1098/rstb.2013.0432.
- [85] R. S. Lees, et al. Review: Improving our Knowledge of Male Mosquito Biology in Relation to Genetic Control Programmes. Acta Tropica 2014, 132, S2-S11, DOI:10.1016/j.actatropica.2013.11.005.
- [86] C. F. Oliva, et al. Current Status and Future Challenges for Controlling Malaria With the Sterile Insect Technique: Technical and Social Perspectives. Acta Tropica 2014, 132, S130-S139, DOI:10.1016/j.actatropica.2013.11.019.
- [87] K. Bourtzis, et al. More Than One Rabbit Out of the Hat: Radiation, Transgenic and Symbiont-Based Approaches for Sustainable Management of Mosquito and Tsetse Fly Populations. Acta Tropica 2016, 157, 115-130, DOI:10.1016/j.actatropica.2016.01.009.
- [88] W. C. I. V. Black, et al. Why RIDL Is Not SIT. Trends in Parasitology 2011, 27(8), 362-370, DOI:10.1016/j.pt.2011.04.004.
- [89] J. K. Baird. Tafenoquine for Travelers' Malaria: Evidence, Rationale and Recommendations. *Journal of Travel Medicine* **2018**, 25(1), tay110, DOI:10.1093/jtm/tay110.
- [90] M. Cairns, et al. Estimating the Potential Public Health Impact of Seasonal Malaria Chemoprevention in African Children. Nature Communications 2012, 3(1), 881, DOI:10.1038/ncomms1879.
- [91] A. M. Noor, et al. Sub-National Targeting of Seasonal Malaria Chemoprevention in the Sahelian Countries of the Nouakchott Initiative. PLOS ONE 2015, 10(8), e0136919, DOI:10.1371/journal.pone.0136919.
- [92] A. L. Wilson, I. T. on behalf of the. A Systematic Review and Meta-Analysis of the Efficacy and Safety of Intermittent Preventive Treatment of Malaria in Children (IPTc). *PLOS ONE* 2011, 6(2), e16976, DOI:10.1371/journal.pone.0016976.
- [93] I. Zongo, et al. Randomized Noninferiority Trial of Dihydroartemisinin-Piperaquine Compared With Sulfadoxine-Pyrimethamine plus Amodiaquine for Seasonal Malaria Chemoprevention in Burkina Faso. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2015, 59(8), 4387-4396, DOI:10.1128/aac.04923-14.
- [94] Deutsche Gesellschaft für Tropenmedizin, Reisemedizin und Globale Gesundheit e.V. (DTG) S1-Leitlinie Diagnostik und Therapie der Malaria. 2021. AWMF online: AWMF-Register-Nr. 042-001.
- [95] K. Haldar, et al. Drug Resistance in Plasmodium. Nature Reviews Microbiology 2018, 16(3), 156-170, DOI:10.1038/nrmicro.2017.161.
- [96] F. Lu, et al. Emergence of Indigenous Artemisinin-Resistant *Plasmodium falciparum* in Africa. New England Journal of Medicine 2017, 376(10), 991-993, DOI:10.1056/NEJMc1612765.
- [97] C. J. Sutherland, *et al. pfk13*-Independent Treatment Failure in Four Imported Cases of *Plasmodium falciparum* Malaria Treated With Artemether-Lumefantrine in the United Kingdom.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy **2017**, 61(3), e02382-02316, DOI:10.1128/aac.02382-16.

- [98] R. Amato, et al. Genetic Markers Associated With Dihydroartemisinin–Piperaquine Failure in Plasmodium falciparum Malaria in Cambodia: A Genotype–Phenotype Association Study. The Lancet Infectious Diseases 2017, 17(2), 164-173, DOI:10.1016/S1473-3099(16)30409-1.
- [99] F. Ariey, *et al.* A Molecular Marker of Artemisinin-Resistant *Plasmodium falciparum* Malaria. *Nature* 2014, 505, 50-55, DOI:10.1038/nature12876.
- [100] L. A. Gonçalves, et al. Emerging Plasmodium vivax Resistance to Chloroquine in South America: An Overview. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 2014, 109(5), 534-539, DOI:10.1590/0074-0276130579.
- [101] P. Ojuka, et al. Early Biting and Insecticide Resistance in the Malaria Vector Anopheles Might Compromise the Effectiveness of Vector Control Intervention in Southwestern Uganda. Malaria Journal 2015, 14, 148, DOI:10.1186/s12936-015-0653-z.
- P. L. Alonso, *et al.* A Research Agenda to Underpin Malaria Eradication. *PLOS Medicine* 2011, 8(1), e1000406, DOI:10.1371/journal.pmed.1000406.
- [103] J. N. Burrows, *et al.* Designing the Next Generation of Medicines for Malaria Control and Eradication. *Malaria Journal* 2013, 12(1), 187, DOI:10.1186/1475-2875-12-187.
- [104] F.-J. Gamo, *et al.* Thousands of Chemical Starting Points for Antimalarial Lead Identification. *Nature* 2010, 465, 305-310, DOI:10.1038/nature09107.
- [105] Medicines for Malaria Venture (MMV). MMV's Pipeline of Antimalarial Drugs. www.mmv.org/mmv-pipeline-antimalarial-drugs (21.02.2024).
- [106] Zydus Lifesciences Limited. A Study to Determine Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of Different Orally Administered Regimens of the Combination ZY19489-Ferroquine in Adult Asymptomatic *Plasmodium Falciparum* Carriers (ClinicalTrials.gov ID NCT05911828). (18.03.2024).
- [107] J. S. McCarthy, et al. A Phase II Pilot Trial to Evaluate Safety and Efficacy of Ferroquine Against Early Plasmodium falciparum in an Induced Blood-Stage Malaria Infection Study. Malaria Journal 2016, 15(1), 469, DOI:10.1186/s12936-016-1511-3.
- [108] J. Held, et al. Ferroquine and Artesunate in African Adults and Children With Plasmodium falciparum Malaria: A Phase 2, Multicentre, Randomised, Double-Blind, Dose-Ranging, Non-Inferiority Study. The Lancet Infectious Diseases 2015, 15(12), 1409-1419, DOI:10.1016/S1473-3099(15)00079-1.
- [109] J. B. Mengue, et al. AQ-13 An Investigational Antimalarial Drug. Expert Opinion on Investigational Drugs 2019, 28(3), 217-222, DOI:10.1080/13543784.2019.1560419.
- [110] A. P. Phyo, et al. Antimalarial Activity of Artefenomel (OZ439), a Novel Synthetic Antimalarial Endoperoxide, in Patients With *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* Malaria: An Open-Label Phase 2 Trial. *The Lancet Infectious Diseases* 2016, 16(1), 61-69, DOI:10.1016/S1473-3099(15)00320-5.
- [111] R. Kiplin Guy. Efficacy of SJ733 in Adults With Uncomplicated *Plasmodium Falciparum* or *Vivax* Malaria (ClinicalTrials.gov ID NCT04709692). (05.03.2024).

- [112] N. J. White, et al. Spiroindolone KAE609 for *Falciparum* and *Vivax* Malaria. *New England Journal of Medicine* 2014, 371(5), 403-410, DOI:10.1056/NEJMoa1315860.
- [113] M. B. Jiménez-Díaz, et al. (+)-SJ733, a Clinical Candidate for Malaria that Acts Through ATP4 to Induce Rapid Host-Mediated Clearance of *Plasmodium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2014, 111(50), E5455-E5462, DOI:10.1073/pnas.1414221111.
- [114] K. L. Kuhen, et al. KAF156 Is an Antimalarial Clinical Candidate With Potential for Use in Prophylaxis, Treatment, and Prevention of Disease Transmission. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2014, 58(9), 5060-5067, DOI:10.1128/aac.02727-13.
- [115] N. J. White, et al. Antimalarial Activity of KAF156 in *Falciparum* and *Vivax* Malaria. *New England Journal of Medicine* 2016, 375(12), 1152-1160, DOI:10.1056/NEJMoa1602250.
- [116] A. Llanos-Cuentas, et al. Antimalarial Activity of Single-Dose DSM265, a Novel Plasmodium Dihydroorotate Dehydrogenase Inhibitor, in Patients With Uncomplicated Plasmodium falciparum or Plasmodium vivax Malaria Infection: A Proof-of-Concept, Open-Label, Phase 2a Study. The Lancet Infectious Diseases 2018, 18(8), 874-883, DOI:10.1016/S1473-3099(18)30309-8.
- [117] S. Bélard, M. Ramharter. DSM265: A Novel Drug for Single-Dose Cure of *Plasmodium falciparum* Malaria. *The Lancet Infectious Diseases* 2018, 18(8), 819-820, DOI:10.1016/S1473-3099(18)30374-8.
- [118] Jomaa Pharma GmbH. Evaluation of Fosmidomycin and Piperaquine in the Treatment of Acute *Falciparum* Malaria (FOSPIP) (ClinicalTrials.gov ID NCT02198807). (05.03.2024).
- [119] Jomaa Pharma GmbH. Fosmidomycin and Azithromycin for Acute Uncomplicated *Plasmodium Falciparum* Malaria (P. Malaria) in Adults (JP011) (ClinicalTrials.gov ID NCT01464125). (05.03.2024).
- [120] Zentopharm GmbH. Evaluation of Fosmidomycin and Clindamycin in the Treatment of Acute Uncomplicated *Plasmodium Falciparum* Malaria (ClinicalTrials.gov ID NCT01361269). (05.03.2024).
- [121] Nurex S.r.I. Triple Antimalarial Combination to Accelerate the Parasite Clearance and to Prevent the Selection of Resistant Parasites (Artesynib) (ClinicalTrials.gov ID NCT03697668). (24.02.2024).
- [122] H. D. Chien, et al. Imatinib Augments Standard Malaria Combination Therapy Without Added Toxicity. Journal of Experimental Medicine 2021, 218(10), e20210724, DOI:10.1084/jem.20210724.
- [123] Centro de Investigacao em Saude de Manhica. Rosiglitazone Adjunctive Therapy for Severe Malaria in Children (ROSI) (ClinicalTrials.gov ID NCT02694874). (05.03.2024).
- [124] P. Hyman. Phages for Phage Therapy: Isolation, Characterization, and Host Range Breadth. *Pharmaceuticals* 2019, 12(1), 35, DOI:10.3390/ph12010035.
- [125] S. McCallin, et al. Current State of Compassionate Phage Therapy. Viruses 2019, 11(4), 343, DOI:10.3390/v11040343.
- [126] C. H. Chen, T. K. Lu. Development and Challenges of Antimicrobial Peptides for Therapeutic Applications. *Antibiotics* 2020, 9(1), 24, DOI:10.3390/antibiotics9010024.

- [127] C. D. Fjell, et al. Designing Antimicrobial Peptides: Form Follows Function. Nature Reviews Drug Discovery 2012, 11(1), 37-51, DOI:10.1038/nrd3591.
- [128] S. Jani, *et al.* Silencing Antibiotic Resistance With Antisense Oligonucleotides. *Biomedicines* 2021, 9(4), 416, DOI:10.3390/biomedicines9040416.
- [129] M. H. Kollef, K. D. Betthauser. Monoclonal Antibodies as Antibacterial Therapies: Thinking Outside of the Box. *The Lancet Infectious Diseases* 2021, 21(9), 1201-1202, DOI:10.1016/S1473-3099(21)00062-1.
- [130] M. Tyers, G. D. Wright. Drug Combinations: A Strategy to Extend the Life of Antibiotics in the 21st Century. *Nature Reviews Microbiology* 2019, 17(3), 141-155, DOI:10.1038/s41579-018-0141-x.
- [131] M. T. Sorbara, E. G. Pamer. Microbiome-Based Therapeutics. *Nature Reviews Microbiology* 2022, 20(6), 365-380, DOI:10.1038/s41579-021-00667-9.
- [132] J. A. Hotinger, *et al.* The Case Against Antibiotics and for Anti-virulence Therapeutics. *Microorganisms* 2021, 9(10), 2049, DOI:10.3390/microorganisms9102049.
- [133] M. S. Mulani, et al. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. Frontiers in Microbiology 2019, 10, 539, DOI:10.3389/fmicb.2019.00539.
- [134] C. R. MacNair, et al. Alternative Therapeutic Strategies to Treat Antibiotic-Resistant Pathogens. Nature Reviews Microbiology 2023, 22, 262-275, DOI:10.1038/s41579-023-00993-0.
- [135] M. Igarashi. New Natural Products to Meet the Antibiotic Crisis: A Personal Journey. The Journal of Antibiotics 2019, 72(12), 890-898, DOI:10.1038/s41429-019-0224-6.
- [136] A. G. Atanasov, et al. Discovery and Resupply of Pharmacologically Active Plant-Derived Natural Products: A Review. *Biotechnology Advances* 2015, 33(8), 1582-1614, DOI:10.1016/j.biotechadv.2015.08.001.
- [137] A. L. Harvey, et al. The Re-Emergence of Natural Products for Drug Discovery in the Genomics Era. Nature Reviews Drug Discovery 2015, 14(2), 111-129, DOI:10.1038/nrd4510.
- [138] S. E. Rossiter, *et al.* Natural Products as Platforms to Overcome Antibiotic Resistance. *Chemical Reviews* 2017, 117(19), 12415-12474, DOI:10.1021/acs.chemrev.7b00283.
- [139] J. Bérdy. Thoughts and Facts About Antibiotics: Where We Are Now and Where We Are Heading. *The Journal of Antibiotics* 2012, 65(8), 385-395, DOI:10.1038/ja.2012.27.
- [140] M. Feher, J. M. Schmidt. Property Distributions: Differences Between Drugs, Natural Products, and Molecules From Combinatorial Chemistry. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* 2003, 43(1), 218-227, DOI:10.1021/ci0200467.
- [141] E. C. Barnes, et al. The Use of Isolated Natural Products as Scaffolds for the Generation of Chemically Diverse Screening Libraries for Drug Discovery. Natural Product Reports 2016, 33(3), 372-381, DOI:10.1039/C5NP00121H.
- [142] J. W.-H. Li, J. C. Vederas. Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier? Science 2009, 325(5937), 161-165, DOI:10.1126/science.1168243.
- [143] J. Clardy, C. Walsh. Lessons From Natural Molecules. Nature 2004, 432, 829-837, DOI:10.1038/nature03194.

- [144] B. C. Doak, et al. Oral Druggable Space Beyond the Rule of 5: Insights From Drugs and Clinical Candidates. Chemistry & Biology 2014, 21(9), 1115-1142, DOI:10.1016/j.chembiol.2014.08.013.
- [145] H. Lachance, et al. Charting, Navigating, and Populating Natural Product Chemical Space for Drug Discovery. Journal of Medicinal Chemistry 2012, 55(13), 5989-6001, DOI:10.1021/jm300288g.
- [146] E. Patridge, *et al.* An Analysis of FDA-Approved Drugs: Natural Products and their Derivatives. *Drug Discovery Today* **2016**, 21(2), 204-207, DOI:10.1016/j.drudis.2015.01.009.
- [147] D. J. Newman, G. M. Cragg. Natural Products as Sources of New Drugs Over the Nearly Four Decades From 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products* 2020, 83(3), 770-803, DOI:10.1021/acs.jnatprod.9b01285.
- [148] R. Gyawali, S. A. Ibrahim. Natural Products as Antimicrobial Agents. Food Control 2014, 46, 412-429, DOI:10.1016/j.foodcont.2014.05.047.
- [149] T. P. Cushnie, A. J. Lamb. Antimicrobial Activity of Flavonoids. International Journal of Antimicrobial Agents 2005, 26(5), 343-356, DOI:10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002.
- [150] B. Havsteen. Flavonoids, a Class of Natural Products of High Pharmacological Potency. Biochemical Pharmacology 1983, 32(7), 1141-1148, DOI:10.1016/0006-2952(83)90262-9.
- [151] J. M. Grange, R. W. Davey. Antibacterial Properties of Propolis (Bee Glue). *Journal of the Royal Society of Medicine* 1990, 83(3), 159-160, DOI:10.1177/014107689008300310.
- [152] R. Hossain, *et al.* Propolis: An Update on Its Chemistry and Pharmacological Applications. *Chinese Medicine* 2022, 17(1), 100, DOI:10.1186/s13020-022-00651-2.
- [153] A. N. Panche, et al. Flavonoids: An Overview. Journal of Nutritional Science 2016, 5, e47, DOI:10.1017/jns.2016.41.
- [154] S. M. Nabavi, et al. Flavonoid Biosynthetic Pathways in Plants: Versatile Targets for Metabolic Engineering. Biotechnology Advances 2020, 38, 107316, DOI:10.1016/j.biotechadv.2018.11.005.
- [155] V. S. Pillai Bhinu, S. Swarup. Elucidation of the Flavonoid Catabolism Pathway in *Pseudomonas putida* PML2 by Comparative Metabolic Profiling. *Applied and Environmental Microbiology* 2002, 68(1), 143-151, DOI:10.1128/AEM.68.1.143-151.2002.
- [156] M. Richards, J. E. Munden. Antibiotic Production Using a Strain of Aspergillus candidus. The United States Patent and Trademark Office, 1966, US3632477A.
- [157] J. E. Munden, *et al.* Production of Chlorflavonin, an Antifungal Metabolite of Aspergillus candidus. Applied Microbiology 1970, 19(5), 718.
- [158] S. Watanabe, *et al.* CJ-19,784, a New Antifungal Agent From a Fungus, *Acanthostigmella sp. The Journal of Antibiotics* 2001, 54(12), 1031-1035, DOI:10.7164/antibiotics.54.1031.
- [159] M. Richards, *et al.* Chlorflavonin, a New Antifungal Antibiotic. *The Journal of Antibiotics* 1969, 22, 388, DOI:10.7164/antibiotics.22.388.
- [160] S.-U. Kim, *et al.* Isolation and Characterization of Antifungal Compound Produced by *Aspergillus candidus* F1484. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology* **1996**, 24(5), 574-578.
- [161] A. E. Bird, A. C. Marshall. Structure of Chlorflavonin. *Journal of the Chemical Society C: Organic* 1969, (19), 2418-2420, DOI:10.1039/j39690002418.

- [162] S. L. Sampson, et al. Protection Elicited by a Double Leucine and Pantothenate Auxotroph of Mycobacterium tuberculosis in Guinea Pigs. Infection and Immunity 2004, 72(5), 3031-3037, DOI:10.1128/iai.72.5.3031-3037.2004.
- [163] S. L. Sampson, *et al.* Extended Safety and Efficacy Studies of a Live Attenuated Double Leucine and Pantothenate Auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis* as a Vaccine Candidate. *Vaccine* 2011, 29(29-30), 4839-4847, DOI:10.1016/j.vaccine.2011.04.066.
- [164] M. K. Hondalus, et al. Attenuation of and Protection Induced by a Leucine Auxotroph of Mycobacterium tuberculosis. Infection and Immunity 2000, 68(5), 2888-2898, DOI:10.1128/iai.68.5.2888-2898.2000.
- [165] A. N. Radhakrishnan, *et al.* Biosynthesis of Valine and Isoleucine: III. α-Keto-β-Hydroxy Acid Reductase and α-Hydroxy-β-Keto Acid Reductoisomerase. *Journal of Biological Chemistry* 1960, 235(8), 2322-2331, DOI:10.1016/S0021-9258(18)64621-6.
- [166] K. J. Choi, et al. Characterization of acetohydroxyacid synthase from Mycobacterium tuberculosis and the identification of its new inhibitor from the screening of a chemical library. FEBS Lett 2005, 579(21), 4903-4910, DOI:10.1016/j.febslet.2005.07.055.
- [167] M. K. Hondalus, et al. Attenuation of and protection induced by a leucine auxotroph of Mycobacterium tuberculosis. Infect Immun 2000, 68(5), 2888-2898.
- [168] V. K. Sambandamurthy, et al. A pantothenate auxotroph of Mycobacterium tuberculosis is highly attenuated and protects mice against tuberculosis. Nat Med 2002, 8(10), 1171-1174, DOI:10.1038/nm765.
- [169] S. L. Sampson, et al. Protection elicited by a double leucine and pantothenate auxotroph of Mycobacterium tuberculosis in guinea pigs. Infect Immun 2004, 72(5), 3031-3037.
- [170] Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation on Protein and Amino Acid Requirements in Human Nutrition. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2007.
- [171] J. W. Miller, R. B. Rucker. Pantothenic Acid. In Present Knowledge in Nutrition, Erdman, J. W.; Macdonald, I. A.; Zeisel, S. H., Eds. 2012; Seite 375-390, DOI:10.1002/9781119946045.ch24.
- [172] Y. S. Low, et al. Triazolopyrimidine Herbicides are Potent Inhibitors of Aspergillus fumigatus Acetohydroxyacid Synthase and Potential Antifungal Drug Leads. Scientific Reports 2021, 11(1), 21055, DOI:10.1038/s41598-021-00349-9.
- [173] K. Gokhale, B. Tilak. Mechanisms of Bacterial Acetohydroxyacid Synthase (AHAS) and Specific Inhibitors of Mycobacterium tuberculosis AHAS as Potential Drug Candidates Against Tuberculosis. Current Drug Targets 2015, 16(7), 689-699, DOI:10.2174/1389450116666150416115547.
- [174] R. S. Chaleff, C. J. Mauvais. Acetolactate synthase is the site of action of two sulfonylurea herbicides in higher plants. *Science* 1984, 224(4656), 1443-1445, DOI:10.1126/science.224.4656.1443.
- [175] D. L. Shaner, et al. Imidazolinones Potent Inhibitors of Acetohydroxyacid Synthase. Plant Physiology 1984, 76(2), 545-546, DOI:Doi 10.1104/Pp.76.2.545.
- [176] M. Dong, *et al.* In vitro efficacy of acetohydroxyacid synthase inhibitors against clinical strains of Mycobacterium tuberculosis isolated from a hospital in Beijing, China. *Saudi Med J* 2011, 32(11), 1122-1126.

- [**177**] Y. Liu, *et al.* Evaluation of the in vivo efficacy of novel monosubstituted sulfonylureas against H37Rv and extensively drug-resistant tuberculosis. *Jpn J Infect Dis* **2014**, 67(6), 485-487.
- [178] H. Sohn, et al. In vitro and ex vivo activity of new derivatives of acetohydroxyacid synthase inhibitors against Mycobacterium tuberculosis and non-tuberculous mycobacteria. Int J Antimicrob Agents 2008, 31(6), 567-571, DOI:10.1016/j.ijantimicag.2008.01.016.
- [179] D. Wang, et al. Evaluation of the in vitro and intracellular efficacy of new monosubstituted sulfonylureas against extensively drug-resistant tuberculosis. Int J Antimicrob Agents 2012, 40(5), 463-466, DOI:10.1016/j.ijantimicag.2012.06.012.
- [180] D. Wang, et al. Discovery of Novel Acetohydroxyacid Synthase Inhibitors as Active Agents Against Mycobacterium tuberculosis by Virtual Screening and Bioassay. Journal of Chemical Information and Modeling 2013, 53(2), 343-353, DOI:10.1021/ci3004545.
- [181] L. H. Briggs, R. H. Locker. 459. Flavonols From the Bark of *Melicope ternata*. Part I. The Isolation of Four New Flavonols, Meliternatin, Meliternin, Ternatin, and Wharangin. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* 1949, (0), 2157-2162, DOI:10.1039/JR9490002157.
- [182] J. M. J. Favela-Hernández, et al. Antibacterial and Antimycobacterial Lignans and Flavonoids From Larrea tridentata. Phytotherapy Research 2012, 26(12), 1957-1960, DOI:10.1002/ptr.4660.
- [183] M. F. Souza, et al. Anti-anaphylactic and Anti-inflammatory Effects of Ternatin, a Flavonoid Isolated from Egletes viscosa Less. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 1992, 25(10), 1029-1032.
- [184] C. M. O. Simöes, et al. Antiviral Activity of Ternatin and Meliternatin, 3-Methoxyflavones From Species of Rutaceae. Journal of Natural Products 1990, 53(4), 989-992, DOI:10.1021/np50070a036.
- [185] I. J. Schalk. A Trojan-Horse Strategy Including a Bacterial Suicide Action for the Efficient Use of a Specific Gram-Positive Antibiotic on Gram-Negative Bacteria. *Journal of Medicinal Chemistry* 2018, 61(9), 3842-3844, DOI:10.1021/acs.jmedchem.8b00522.
- [186] R. K. Saha, et al. In Review Microbial Siderophores: A Mini Review, 2012; 2012.
- [187] M. Miethke, M. A. Marahiel. Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2007, 71(3), 413-451, DOI:10.1128/mmbr.00012-07.
- [188] B. R. Wilson, et al. Siderophores in Iron Metabolism: From Mechanism to Therapy Potential. Trends in Molecular Medicine 2016, 22(12), 1077-1090, DOI:10.1016/j.molmed.2016.10.005.
- [189] T. Zheng, E. M. Nolan. Siderophore-Based Detection of Fe(III) and Microbial Pathogens. *Metallomics* 2012, 4(9), 866-880, DOI:10.1039/C2MT20082A.
- [190] R. C. Hider, X. Kong. Chemistry and Biology of Siderophores. *Natural Product Reports* 2010, 27(5), 637-657, DOI:10.1039/B906679A.
- [191] J. L. Corbin, W. A. Bulen. Isolation and Identification of 2,3-Dihydroxybenzoic Acid and N², N⁶-Di(2,3-Dihydroxybenzoyl)-L-Lysine Formed by Iron-Deficient Azotobacter vinelandii. Biochemistry 1969, 8(3), 757-762, DOI:10.1021/bi00831a002.
- [192] C. Ratledge. Iron, Mycobacteria and Tuberculosis. *Tuberculosis* 2004, 84(1), 110-130, DOI:10.1016/j.tube.2003.08.012.

- [193] J. Gobin, et al. Iron Acquisition by Mycobacterium tuberculosis: Isolation and Characterization of a Family of Iron-Binding Exochelins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1995, 92(11), 5189-5193, DOI:10.1073/pnas.92.11.5189.
- [194] D. K. Wong, et al. Characterization of Exochelins of Mycobacterium avium: Evidence for Saturated and Unsaturated and for Acid and Ester Forms. Journal of Bacteriology 1996, 178(21), 6394-6398, DOI:10.1128/jb.178.21.6394-6398.1996.
- [195] C. Ratledge, M. Ewing. The Occurrence of Carboxymycobactin, the Siderophore of Pathogenic Mycobacteria, as a Second Extracellular Siderophore in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology* 1996, 142(8), 2207-2212, DOI:10.1099/13500872-142-8-2207.
- [196] S. J. Lane, et al. Novel Extracellular Mycobactins, the Carboxymycobactins From Mycobacterium avium. Tetrahedron Letters 1995, 36(23), 4129-4132, DOI:10.1016/0040-4039(95)00676-4.
- [197] J. J. De Voss, et al. Iron Acquisition and Metabolism by Mycobacteria. Journal of Bacteriology 1999, 181, 4443-4451, DOI:10.1128/jb.181.15.4443-4451.1999.
- [198] C. Ratledge, et al. Iron Transport in Mycobacterium smegmatis: The Location of Mycobactin by Electron Microscopy. Microbiology 1982, 128(7), 1559-1565, DOI:10.1099/00221287-128-7-1559.
- [199] K. Patel, et al. Mycobacterial Siderophore: A Review on Chemistry and Biology of Siderophore and Its Potential as a Target for Tuberculosis. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2018, 157, 783-790, DOI:10.1016/j.ejmech.2018.08.030.
- [200] L. E. N. Quadri. Iron Uptake by *Mycobacterium tuberculosis*. In Handbook of Tuberculosis, Kap.
 5, Prof. Dr. Dr. h.c. Stefan H. E. Kaufmann; Prof. Dr. Eric Rubin; Prof. Dr. Warwick J. Britton; Helden, P. D. P. v., Eds. 2008; Seite 91-110, DOI:10.1002/9783527611614.ch5.
- [201] K. H. Chan, J. T. Groves. Concise Modular Synthesis and NMR Structural Determination of Gallium Mycobactin T. *The Journal of Organic Chemistry* 2021, 86(21), 15453-15468, DOI:10.1021/acs.joc.1c01966.
- [202] I. J. Schalk, L. Guillon. Fate of Ferrisiderophores after Import Across Bacterial Outer Membranes: Different Iron Release Strategies are Observed in the Cytoplasm or Periplasm Depending on the Siderophore Pathways. *Amino Acids* 2013, 44(5), 1267-1277, DOI:10.1007/s00726-013-1468-2.
- [203] A. Chao, *et al.* Iron Acquisition in *Mycobacterium tuberculosis*. *Chemical Reviews* 2019, 119(2), 1193-1220, DOI:10.1021/acs.chemrev.8b00285.
- [204] G. M. Rodriguez, I. Smith. Identification of an ABC Transporter Required for Iron Acquisition and Virulence in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology* 2006, 188(2), 424-430, DOI:10.1128/jb.188.2.424-430.2006.
- [205] D. Wagner, et al. fecB, a Gene Potentially Involved in Iron Transport in Mycobacterium avium, Is Not Induced Within Macrophages. FEMS Microbiology Letters 2005, 247, 185-191, DOI:10.1016/j.femsle.2005.05.005.
- [206] G. A. Snow. Mycobactins: Iron-Chelating Growth Factors From Mycobacteria. Bacteriological Reviews 1970, 34(2), 99-125, DOI:10.1128/br.34.2.99-125.1970.
- [207] B. C. H. Chu, H. J. Vogel. A Structural and Functional Analysis of Type III Periplasmic and Substrate Binding Proteins: Their Role in Bacterial Siderophore and Heme Transport. *Biological Chemistry* 2011, 392(1-2), 39-52, DOI:10.1515/BC.2011.012.
- [208] R. de Miranda, et al. Differentiating the Roles of Mycobacterium tuberculosis Substrate Binding Proteins, FecB and FecB2, in Iron Uptake. PLOS Pathogens 2023, 19(9), e1011650, DOI:10.1371/journal.ppat.1011650.
- [209] K. Brillet, et al. An ABC Transporter With Two Periplasmic Binding Proteins Involved in Iron Acquisition in Pseudomonas aeruginosa. ACS Chemical Biology 2012, 7(12), 2036-2045, DOI:10.1021/cb300330v.
- [210] G. Ganne, et al. Iron Release From the Siderophore Pyoverdine in Pseudomonas aeruginosa Involves Three New Actors: FpvC, FpvG, and FpvH. ACS Chemical Biology 2017, 12(4), 1056-1065, DOI:10.1021/acschembio.6b01077.
- [211] I. J. Schalk, et al. Recycling of Pyoverdin on the FpvA Receptor after Ferric Pyoverdin Uptake and Dissociation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* 2002, 41(5), 1663-1671, DOI:10.1021/bi0157767.
- [212] E. Yeterian, et al. An Efflux Pump Is Required for Siderophore Recycling by Pseudomonas aeruginosa. Environmental Microbiology Reports 2010, 2(3), 412-418, DOI:10.1111/j.1758-2229.2009.00115.x.
- [213] W. Xu, et al. Chemical Genetic Interaction Profiling Reveals Determinants of Intrinsic Antibiotic Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2017, 61(12), e01334-01317, DOI:10.1128/aac.01334-17.
- [214] F. M. Arnold, et al. The ABC Exporter IrtAB Imports and Reduces Mycobacterial Siderophores. Nature 2020, 580, 413-417, DOI:10.1038/s41586-020-2136-9.
- [215] M. B. Ryndak, et al. The Mycobacterium tuberculosis High-Affinity Iron Importer, IrtA, Contains an FAD-Binding Domain. Journal of Bacteriology 2010, 192(3), 861-869, DOI:10.1128/jb.00223-09.
- [216] L. M. Hürlimann, et al. The Heterodimeric ABC Transporter EfrCD Mediates Multidrug Efflux in Enterococcus faecalis. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2016, 60(9), 5400-5411, DOI:10.1128/aac.00661-16.
- [217] M. K. Al-Shawi, et al. Transition State Analysis of the Coupling of Drug Transport to ATP Hydrolysis by P-Glycoprotein. *Journal of Biological Chemistry* 2003, 278(52), 52629-52640, DOI:10.1074/jbc.M308175200.
- [218] I. Schröder, et al. Microbial Ferric Iron Reductases. FEMS Microbiology Reviews 2003, 27(2-3), 427-447, DOI:10.1016/s0168-6445(03)00043-3.
- [219] M. P. Schmitt, et al. Characterization of an iron-dependent regulatory protein (IdeR) of Mycobacterium tuberculosis as a functional homolog of the diphtheria toxin repressor (DtxR) from Corynebacterium diphtheriae. *Infection and immunity* 1995, 63(11), 4284-4289, DOI:10.1128/iai.63.11.4284-4289.1995.
- [220] R. M. Wells, et al. Discovery of a Siderophore Export System Essential for Virulence of Mycobacterium tuberculosis. PLOS Pathogens 2013, 9(1), e1003120, DOI:10.1371/journal.ppat.1003120.

- [221] P. Domenech, et al. Contribution of the Mycobacterium tuberculosis MmpL Protein Family to Virulence and Drug Resistance. Infection and Immunity 2005, 73(6), 3492-3501, DOI:10.1128/iai.73.6.3492-3501.2005.
- [222] P. Sandhu, Y. Akhter. The Drug Binding Sites and Transport Mechanism of the RND Pumps From *Mycobacterium tuberculosis*: Insights From Molecular Dynamics Simulations. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2016, 592, 38-49, DOI:10.1016/j.abb.2016.01.007.
- [223] P. Ruggerone, et al. RND Efflux Pumps: Structural Information Translated Into Function and Inhibition Mechanisms. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2013, 13(24), 3079-3100, DOI:10.2174/15680266113136660220.
- [224] C. Chalut. MmpL Transporter-Mediated Export of Cell-Wall Associated Lipids and Siderophores in Mycobacteria. *Tuberculosis* 2016, 100, 32-45, DOI:10.1016/j.tube.2016.06.004.
- [225] A. Viljoen, et al. The Diverse Family of MmpL Transporters in Mycobacteria: From Regulation to Antimicrobial Developments. *Molecular Microbiology* 2017, 104(6), 889-904, DOI:10.1111/mmi.13675.
- [226] J. M. Tufariello, et al. Separable Roles for Mycobacterium tuberculosis ESX-3 Effectors in Iron Acquisition and Virulence. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 2016, 113(3), E348-E357, DOI:10.1073/pnas.1523321113.
- [227] A. Pramanik, V. Braun. Albomycin Uptake via a Ferric Hydroxamate Transport System of Streptococcus pneumoniae R6. Journal of Bacteriology 2006, 188(11), 3878-3886, DOI:10.1128/jb.00205-06.
- [228] T. Aoki, et al. Cefiderocol (S-649266), a New Siderophore Cephalosporin Exhibiting Potent Activities Against *Pseudomonas aeruginosa* and Other Gram-Negative Pathogens Including Multi-Drug Resistant Bacteria: Structure Activity Relationship. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2018, 155, 847-868, DOI:10.1016/j.ejmech.2018.06.014.
- [229] A. Ito, et al. Siderophore Cephalosporin Cefiderocol Utilizes Ferric Iron Transporter Systems for Antibacterial Activity Against *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2016, 60(12), 7396-7401, DOI:10.1128/aac.01405-16.
- [230] T. Sato, K. Yamawaki. Cefiderocol: Discovery, Chemistry, and In Vivo Profiles of a Novel Siderophore Cephalosporin. Clinical Infectious Diseases 2019, 69(Suppl. 7), S538-S543, DOI:10.1093/cid/ciz826.
- [231] G. G. Zhanel, et al. Cefiderocol: A Siderophore Cephalosporin With Activity Against Carbapenem-Resistant and Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli. Drugs 2019, 79(3), 271-289, DOI:10.1007/s40265-019-1055-2.
- [232] K. H. Negash, et al. Siderophore–Antibiotic Conjugate Design: New Drugs for Bad Bugs? Molecules 2019, 24(18), 3314, DOI:10.3390/molecules24183314.
- [233] M. J. Miller, et al. Design, Synthesis, and Study of a Mycobactin–Artemisinin Conjugate That Has Selective and Potent Activity Against Tuberculosis and Malaria. *Journal of the American Chemical Society* 2011, 133(7), 2076-2079, DOI:10.1021/ja109665t.
- [234] M. A. Abdullaziz, *et al.* Reverse *N*-Substituted Hydroxamic Acid Derivatives of Fosmidomycin Target a Previously Unknown Subpocket of 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate

Reductoisomerase (DXR). *ACS Infectious Diseases* **2024**, 10(5), 1739-1752, DOI:10.1021/acsinfecdis.4c00100.

- [235] A. Kunfermann, et al. IspC as Target for Antiinfective Drug Discovery: Synthesis, Enantiomeric Separation, and Structural Biology of Fosmidomycin Thia Isosters. *Journal of Medicinal Chemistry* 2013, 56(20), 8151-8162, DOI:10.1021/jm4012559.
- [236] J. Roosenberg, M. II, et al. Studies and Syntheses of Siderophores, Microbial Iron Chelators, and Analogs as Potential Drug Delivery Agents. *Current Medicinal Chemistry* 2000, 7(2), 159-197, DOI:10.2174/0929867003375353.
- [237] K. v. Auwers, K. Müller. Umwandlung von Benzal-Cumaranonen in Flavonole. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft 1908, 41(3), 4233-4241, DOI:10.1002/cber.190804103137.
- [238] E. J. Corey. Name Reactions in Heterocyclic Chemistry. Vol. 1, John Wiley & Sons. Inc.. Hoboken, New Jersey, 2005; DOI:10.1002/0471704156.
- [239] K. v. Auwers, P. Pohl. Über die Umwandlung von Benzalcumaranonen in Flavonole. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* 1914, 405(3), 243-294, DOI:10.1002/jlac.19144050302.
- [240] K. v. Auwers, P. Pohl. Eine Synthese des Fisetins. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft 1915, 48(1), 85-90, DOI:10.1002/cber.19150480114.
- [241] H. F. Dean, M. Nierenstein. Attempts to Synthesize Myricetin. Journal of the American Chemical Society 1925, 47(6), 1676-1684, DOI:10.1021/ja01683a024.
- [242] J. Kalff, R. Robinson. CCLXIV. A Synthesis of Datiscetin. *Journal of the Chemical Society, Transactions* 1925, 127, 1968-1973, DOI:10.1039/CT9252701968.
- [243] T. H. Minton, H. Stephen. CXCI. Studies in the Coumaranone Series. Part II. The Preparation of 4- and 6-Chlorocoumaran-2-ones and Their Conversion into 2- and 4-Chloroflavonols Respectively, and Some Derivatives of o- and p-Chlorophenoxyacetic Acids. *Journal of the Chemical Society, Transactions* 1922, 121, 1598-1603, DOI:10.1039/CT9222101598.
- [244] Z. Wang. Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents. Vol. 1, John Wiley & Sons, Hoboken NJ, 2009; DOI:10.1002/9780470638859.
- [245] R. Kshatriya, et al. In Memory of Prof. Venkataraman: Recent Advances in the Synthetic Methodologies of Flavones. *Tetrahedron* 2018, 74(8), 811-833, DOI:10.1016/j.tet.2017.12.052.
- [246] W. Baker. 322. Molecular Rearrangement of Some *o*-Acyloxyacetophenones and the Mechanism of the Production of 3-Acylchromones. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* 1933, 1381-1389, DOI:10.1039/JR9330001381.
- [247] J. J. Ares, et al. A Convenient Large-Scale Synthesis of 5-Methoxyflavone and Its Application to Analog Preparation. The Journal of Organic Chemistry 1993, 58(27), 7903-7905, DOI:10.1021/jo00079a041.
- [248] T. C. Chadha, et al. 344. Synthetical Experiments in the Chromone Group. Part X. Coumarin and Chromone Formation. Journal of the Chemical Society (Resumed) 1933, 1459-1462, DOI:10.1039/JR9330001459.
- [249] H. S. Mahal, K. Venkataraman. A Synthesis of Flavones at Room Temperature. *Current Science* 1933, 2(6), 214-215.

- [250] H. S. Mahal, K. Venkataraman. 387. Synthetical Experiments in the Chromone Group. Part XIV. The Action of Sodamide on 1-Acyloxy-2-Acetonaphthones. *Journal of the Chemical Society* (*Resumed*) 1934, 1767-1769, DOI:10.1039/JR9340001767.
- [251] P. K. Jain, et al. A Facile Baker-Venkataraman Synthesis of Flavones Using Phase Transfer Catalysis. Synthesis (Germany) 1982, 1982(3), 221-222, DOI:10.1055/s-1982-29755.
- [252] K. Ashish, et al. A highly Efficient Eco-friendly AFO Reaction Using Grinding Technique: Synthesis of 3-Hydroxy-2-Phenyl-4H-Chromen-4-ones. Green Processing and Synthesis 2013, 2(4), 329-333, DOI:10.1515/gps-2013-0042.
- [253] M. Bennett, *et al.* Aspects of the Algar-Flynn-Oyamada (AFO) Reaction. *Tetrahedron* 1996, 52(20), 7163-7178, DOI:10.1016/0040-4020(96)00334-1.
- [254] S. Bhattacharyya, K. Hatua. Computational Insight of the Mechanism of Algar–Flynn–Oyamada (AFO) Reaction. RSC Advances 2014, 4(36), 18702-18709, DOI:10.1039/C3RA46623J.
- [255] X. Shen, et al. Synthesis of 5-Subsituted Flavonols via the Algar-Flynn-Oyamada (AFO) Reaction: The Mechanistic Implication. *Tetrahedron* 2017, 73(32), 4822-4829, DOI:10.1016/j.tet.2017.06.064.
- [256] D. Ferreira, et al. Parameters Regulating the α and β -Cyclization of Chalcones. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1 1975, (15), 1437-1446, DOI:10.1039/P19750001437.
- [257] D. Nhu, et al. Phase Transfer Catalysis Extends The Scope of The Algar–Flynn–Oyamada Synthesis of 3-Hydroxyflavones. Australian Journal of Chemistry 2015, 68(7), 1102-1107, DOI:10.1071/CH14620.
- [258] M. El Sous, et al. Total Synthesis of (-)-Episilvestrol and (-)-Silvestrol. Angewandte Chemie International Edition 2007, 46(41), 7835-7838, DOI:10.1002/anie.200702700.
- [259] G. A. Kraus, et al. New Approach to Flavonols via Base-Mediated Cyclization: Total Synthesis of 3,5,6,7-Tetramethoxyflavone. Synlett 2012, 2012(3), 385-388, DOI:10.1055/s-0031-1290207.
- [260] A. Hasan, *et al.* Isolation and Synthesis of Flavonols and Comparison of Their Antioxidant Activity. *Natural Product Research* 2010, 24(11), 995-1003, DOI:10.1080/14786410902847302.
- [261] X. Zhao, et al. A One-Pot Synthesis of Aurones From Substituted Acetophenones and Benzaldehydes: A Concise Synthesis of Aureusidin. Synthesis 2012, 44(14), 2217-2224, DOI:10.1055/s-0031-1291153.
- [262] H. Holt Jr., et al. Reaction of Chalcones With Basic Hydrogenperoxide: A Structure and Activity Study. *Heterocyclic Communications* 2005, 11(6), 465-470, DOI:10.1515/HC.2005.11.6.465.
- [263] D. Ashok, et al. Microwave-Assisted One-Pot Synthesis of Some New Flavonols by Modified Algar–Flynn–Oyamada Reaction and Their Antimicrobial Activity. Chemistry of Heterocyclic Compounds 2016, 52(3), 172-176, DOI:10.1007/s10593-016-1852-4.
- [264] D. Ashok, et al. Microwave Assisted One Pot Synthesis of Tetrazole Based 3-Hydroxy-4H-Chromen-4-ones by Modified Algar-Flynn-Oyamada Reaction and Their Antimicrobial Activity. *Journal of Mexican Chemical Society* 2019, 63(4), 123-131.
- [265] D. Ashok, et al. One-Pot Synthesis of Carbazole Based 3-Hydroxy-4H-Chromen-4-ones by a Modified Algar–Flynn–Oyamada Reaction and Their Antimicrobial Activity. Journal of the Serbian Chemical Society 2015, 80(11), 1361-1366, DOI:10.2298/JSC141203051A.

- [266] G. D. Hatnapure, et al. Synthesis and Biological Evaluation of Novel 2',4',5'-Trimethoxyflavonol Derivatives as Anti-inflammatory and Antimicrobial Agents. *Medicinal Chemistry Research* 2014, 23(1), 461-470, DOI:10.1007/s00044-013-0651-z.
- [267] C. J. Adams, L. Main. Cyclisation and Subsequent Reactions of 2'-Hydroxy-6'-methoxychalcone Epoxide and Related Compounds. *Tetrahedron* 1991, 47(27), 4979-4990, DOI:10.1016/S0040-4020(01)80961-3.
- [268] I. E. Serdiuk, et al. Quantum-Chemical Analysis of the Algar–Flynn–Oyamada Reaction Mechanism. Chemistry of Heterocyclic Compounds 2014, 50(3), 396-403, DOI:10.1007/s10593-014-1487-2.
- [269] W. Adam, et al. Epoxidation of Flavones by Dimethyldioxirane. The Journal of Organic Chemistry 1991, 56(26), 7292-7297, DOI:10.1021/jo00026a020.
- [270] A. M. B. S. R. C. S. Costa, et al. Lithiation in Flavones, Chromones, Coumarins, and Benzofuran Derivatives. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1 1985, 799-808, DOI:10.1039/P19850000799.
- [271] A. L. Tökés, R. Bognár. Synthesis of Chlorflavonin (V). *Acta Chimica (Academiae Scientiarum) Hungaricae* 1981, 107(4), 365-368.
- [272] A. L. Toekes, R. Bognar. Synthesis of Chlorflavonin. *Acta Chimica Academiae Scientiarum Hungaricae* 1981, 107, 365-368.
- [273] J. Yang, et al. Asymmetric Synthesis of Sakuranetin-Relevant Flavanones for the Identification of New Chiral Antifungal Leads. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2022, 70(11), 3409-3419, DOI:10.1021/acs.jafc.1c07557.
- [274] C. A. Gray, et al. Chromone Studies. Part 13. Synthesis and Electron-Impact Mass Spectrometric Studies of 5-Hydroxy-2-IsopropyI-7-Methoxychromone, a Constituent of the Medicinal Plant Baeckea frutescens, and Side-Chain Analogues. Journal of Natural Products 2003, 66(8), 1144-1146, DOI:10.1021/np030097d.
- [275] Z. Sipos, K. Kónya. Synthesis of Benzopyran-Fused Flavone Derivatives via Microwave-Assisted Intramolecular C–H Activation. Synthesis 2018, 50(08), 1610-1620, DOI:10.1055/s-0036-1591773.
- [276] L. H. Briggs, R. H. Locker. 175. Flavonols From the Bark of *Melicope ternata*. Part III. A Synthesis of Quercetin 3:3'-Dimethyl Ether, Quercetin 3:7:3'-Trimethyl Ether, Quercetin 3:5:7:3'-Tetramethyl Ether, Ternatin, and Related Benzyl Ethers. *Journal of the Chemical Society* (*Resumed*) 1950, 864-867, DOI:10.1039/JR9500000864.
- [277] C. Lienau. Synthese und Biologische Evaluation Inverser β -Thia-Isosterer Fosmidomycin-Analoga. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf, 2015.
- [278] C. Lienau, et al. Novel Reverse Thia-Analogs of Fosmidomycin: Synthesis and Antiplasmodial Activity. European Journal of Medicinal Chemistry 2019, 181, 111555, DOI:10.1016/j.ejmech.2019.07.058.
- [279] M. Mikolajczyk, et al. Organosulfur Compounds. 23. Addition of Elemental Sulfur to Phosphonate Carbanions and Its Application for Synthesis of α-Phosphoryl Organosulfur Compounds. Synthesis of Aromatic Ketones. *The Journal of Organic Chemistry* **1979**, 44(17), 2967-2972, DOI:10.1021/jo01331a003.

- [280] J.-F. Biellmann, J.-B. Ducep. Allylic and Benzylic Carbanions Substituted by Heteroatoms. In Organic Reactions, 2015; Seite 1-456, DOI:10.1002/0471264180.or027.01.
- [281] M. Gulea, *et al.* Synthesis of Chiral, Nonracemic α -Sulfanylphosphonates and Derivatives. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, 14(13), 1829-1836, DOI:10.1016/S0957-4166(03)00316-1.
- [282] P. Lassaux, et al. Mercaptophosphonate Compounds as Broad-Spectrum Inhibitors of the Metallo-β-Lactamases. Journal of Medicinal Chemistry 2010, 53(13), 4862-4876, DOI:10.1021/jm100213c.
- [283] C. Zhang, et al. Straightforward Synthesis of Aromatic Acid: Metal-Free Catalyzed Oxidation of Benzyl Alcohol With Ozone. Shihezi Daxue Xuebao, Ziran Kexueban 2015, 33(6), 761-765, DOI:10.13880/j.cnki.65-1174/n.2015.06.019.
- [284] M. Almeida, et al. Synthesis of N-(2-Chloro-3,4-Dimethoxybenzylideneamino)guanidinium Acetate [α-¹⁴C]. Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals 2002, 45(5), 371-377, DOI:10.1002/jlcr.559.
- [285] N. T. T. Chau, et al. Competition of Substituents for ortho Direction of Metalation of Veratric Acid. Tetrahedron 2008, 64(46), 10552-10557, DOI:10.1016/j.tet.2008.08.086.
- [286] Y. Nishitani, et al. Cephalosporin Having Catechol Group. European Patent Office, 2009, WO 2010/050468.
- [287] M. Schnabelrauch, et al. New Synthetic Catecholate-Type Siderophores Based on Amino Acids and Dipeptides. *Biometals* 2000, 13(4), 333-348, DOI:10.1023/A:1009297610755.
- [288] S. Miyanaga, et al. Synthesis and Evaluation of Myxochelin Analogues as Antimetastatic Agents. Bioorganic & Medicinal Chemistry 2009, 17(7), 2724-2732, DOI:10.1016/j.bmc.2009.02.040.
- [289] Y. Yokoyama, et al. Does Water Suppress the Racemization and Decomposition of Amino Acids? Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1 2001, (12), 1431-1434, DOI:10.1039/B102254G.
- [290] A. R. Poreddy, et al. Solid-Phase Synthesis of Methyl Carboxymycobactin T 7 and Analogues As Potential Antimycobacterial Agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2003, 13(15), 2553-2556, DOI:10.1016/S0960-894X(03)00473-6.
- [291] A. R. Poreddy, et al. Corrigendum to 'Solid-Phase Synthesis of Methyl Carboxymycobactin T 7 and Analogues As Potential Antimycobacterial Agents' [Bioorg. Med. Chem. Lett. 13 (2003) 2553]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2003, 13(21), 3879, DOI:10.1016/j.bmcl.2003.08.011.
- [292] D. C. Young, et al. Synthesis of Dideoxymycobactin Antigens Presented by CD1a Reveals T Cell Fine Specificity for Natural Lipopeptide Structures. *Journal of Biological Chemistry* 2009, 284(37), 25087-25096, DOI:10.1074/jbc.M109.000802.
- [293] J. Hu, M. J. Miller. Total Synthesis of a Mycobactin S, a Siderophore and Growth Promoter of Mycobacterium Smegmatis, and Determination of Its Growth Inhibitory Activity Against Mycobacterium tuberculosis. Journal of the American Chemical Society 1997, 119(15), 3462-3468, DOI:10.1021/ja963968x.

- [294] Y. Xu, M. J. Miller. Total Syntheses of Mycobactin Analogues as Potent Antimycobacterial Agents Using a Minimal Protecting Group Strategy. *The Journal of Organic Chemistry* 1998, 63(13), 4314-4322, DOI:10.1021/jo9800630.
- [295] Y. Ying, J. Hong. Synthesis of Brasilibactin A and Confirmation of Absolute Configuration of β-Hydroxy Acid Fragment. *Tetrahedron Letters* 2007, 48(46), 8104-8107, DOI:10.1016/j.tetlet.2007.09.112.
- [296] R. Kikkeri, et al. Toward Iron Sensors: Bioinspired Tripods Based on Fluorescent Phenol-Oxazoline Coordination Sites. Inorganic Chemistry 2007, 46(7), 2485-2497, DOI:10.1021/ic061952u.
- [297] K. M. Nelson, et al. Total Synthesis and Biological Evaluation of Transvalencin Z. Journal of Natural Products 2012, 75(6), 1037-1043, DOI:10.1021/np200972s.
- [298] C. Ghosh, et al. Total Synthesis of the Proposed Structure of Mycobactin J. Organic Letters 2018, 20(20), 6511-6515, DOI:10.1021/acs.orglett.8b02832.
- [299] A. Sakakura, et al. Dehydrative Cyclization Catalyzed by the Combination of Molybdenum(VI) Oxides and Benzoic Acids: First Synthesis of the Antitumour Substance BE-70016. Advanced Synthesis & Catalysis 2007, 349(4-5), 551-555, DOI:10.1002/adsc.200600550.
- [300] M. J. Miller, Y. Xu. Antimycobacterial Agents. United States Patent and Trademark Office, 2000, US 6,310,058 B1.
- [301] J. Wu, et al. Scalable Total Synthesis of a Mycobactin T Analogue Utilizing a Novel Synthetic and Protection Strategy. Organic Chemistry Frontiers 2019, 6(14), 2467-2470, DOI:10.1039/C9Q000502A.
- [**302**] P. J. Maurer, M. J. Miller. Total Synthesis of a Mycobactin: Mycobactin S2. *Journal of the American Chemical Society* **1983**, 105(2), 240-245, DOI:10.1021/ja00340a017.
- [303] J. A. Shapiro, T. A. Wencewicz. Acinetobactin Isomerization Enables Adaptive Iron Acquisition in Acinetobacter baumannii through pH-Triggered Siderophore Swapping. ACS Infectious Diseases 2016, 2(2), 157-168, DOI:10.1021/acsinfecdis.5b00145.
- [304] A. R. Kaplan, W. M. Wuest. Promiscuous Pseudomonas: Uptake of Non-Endogenous Ligands for Iron Acquisition. *Tetrahedron Letters* 2021, 75, 153204, DOI:10.1016/j.tetlet.2021.153204.
- P. J. Maurer, M. J. Miller. Microbial Iron Chelators: Total Synthesis of Aerobactin and its Constituent Amino Acid, N⁶-Acetyl-N⁶-Hydroxylysine. *Journal of the American Chemical Society* 1982, 104(11), 3096-3101, DOI:10.1021/ja00375a025.
- [306] J. Hu, M. J. Miller. A New Method for the Synthesis of N^ε-Acetyl-N^ε-Hydroxy-L-Lysine, the Iron-Binding Constituent of Several Important Siderophores. *The Journal of Organic Chemistry* 1994, 59(17), 4858-4861, DOI:10.1021/jo00096a030.
- [307] A. J. Walz, et al. Synthesis and Studies of Catechol-Containing Mycobactin S and T Analogs. Organic & Biomolecular Chemistry 2007, 5(10), 1621-1628, DOI:10.1039/B703116E.
- [308] P. J. Maurer, M. J. Miller. Mycobactins: Synthesis of (-)-Cobactin T From ε-Hydroxynorleucine. *The Journal of Organic Chemistry* **1981**, 46(13), 2835-2836, DOI:10.1021/jo00326a061.
- [309] L. Dong, M. J. Miller. Total Synthesis of Exochelin MN and Analogues. Journal of Organic Chemistry 2002, 67(14), 4759-4770, DOI:10.1021/jo0256078.

- [310] S.-M. Yang, et al. Mild and Efficient Lewis Acid-Promoted Detritylation in the Synthesis of N-Hydroxy Amides: A Concise Synthesis of (-)-Cobactin T. *The Journal of Organic Chemistry* 2007, 72(21), 8123-8126, DOI:10.1021/jo701411d.
- [**311**] T. Rogge, et al. C–H Activation. Nature Reviews Methods Primers **2021**, 1(1), 43, DOI:10.1038/s43586-021-00041-2.
- [312] L. Massignan, et al. C-H Oxygenation Reactions Enabled by Dual Catalysis With Electrogenerated Hypervalent Iodine Species and Ruthenium Complexes. Angewandte Chemie International Edition 2020, 59(8), 3184-3189, DOI:10.1002/anie.201914226.
- [313] A. Berger, et al. Total Synthesis of the Antimycobacterial Natural Product Chlorflavonin and Analogs via a Late-Stage Ruthenium(II)-Catalyzed ortho-C(sp²)-H-Hydroxylation. *Pharmaceuticals* 2022, 15(8), 984, DOI:10.3390/ph15080984.
- [314] R. J. Glyn, G. Pattison. Effects of Replacing Oxygenated Functionality With Fluorine on Lipophilicity. *Journal of Medicinal Chemistry* 2021, 64(14), 10246-10259, DOI:10.1021/acs.jmedchem.1c00668.
- [315] N. A. Meanwell. Fluorine and Fluorinated Motifs in the Design and Application of Bioisosteres for Drug Design. *Journal of Medicinal Chemistry* 2018, 61(14), 5822-5880, DOI:10.1021/acs.jmedchem.7b01788.
- [316] E. P. Gillis, *et al.* Applications of Fluorine in Medicinal Chemistry. *Journal of Medicinal Chemistry* 2015, 58(21), 8315-8359, DOI:10.1021/acs.jmedchem.5b00258.
- [317] M. A. M. Subbaiah, N. A. Meanwell. Bioisosteres of the Phenyl Ring: Recent Strategic Applications in Lead Optimization and Drug Design. *Journal of Medicinal Chemistry* 2021, 64(19), 14046-14128, DOI:10.1021/acs.jmedchem.1c01215.
- [**318**] H.-J. Böhm, *et al.* Fluorine in Medicinal Chemistry. *ChemBioChem* **2004**, 5(5), 637-643, DOI:10.1002/cbic.200301023.
- [319] Y. Zafrani, et al. Difluoromethyl Bioisostere: Examining the "Lipophilic Hydrogen Bond Donor" Concept. Journal of Medicinal Chemistry 2017, 60(2), 797-804, DOI:10.1021/acs.jmedchem.6b01691.
- [320] Y. Zafrani, et al. CF₂H, a Functional Group-Dependent Hydrogen-Bond Donor: Is It a More or Less Lipophilic Bioisostere of OH, SH, and CH₃? *Journal of Medicinal Chemistry* 2019, 62(11), 5628-5637, DOI:10.1021/acs.jmedchem.9b00604.
- [321] M. linuma, et al. Flavonoids Syntheses. IV. : Syntheses of 2', 3, 4', 5, 5', 6, 7, 8-Octaoxygenated Flavones. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 1986, 34(5), 2228-2230, DOI:10.1248/cpb.34.2228.
- [322] T. G. Miller, J. W. Thanassi. The Preparation of Aryl Difluoromethyl Ethers. *The Journal of Organic Chemistry* **1960**, 25(11), 2009-2012, DOI:10.1021/jo01081a048.
- [323] C. S. Thomoson, W. R. Dolbier. Use of Fluoroform as a Source of Difluorocarbene in the Synthesis of Difluoromethoxy- and Difluorothiomethoxyarenes. *The Journal of Organic Chemistry* 2013, 78(17), 8904-8908, DOI:10.1021/jo401392f.
- [324] W. R. Dolbier, *et al.* Three Step Procedure for the Preparation of Aromatic and Aliphatic Difluoromethyl Ethers From Phenols and Alcohols Using a Chlorine/Fluorine Exchange

Methodology. *Journal of Fluorine Chemistry* **2014**, 160, 72-76, DOI:10.1016/j.jfluchem.2014.01.018.

- [325] P. S. Fier, J. F. Hartwig. Synthesis of Difluoromethyl Ethers With Difluoromethyltriflate. Angewandte Chemie International Edition 2013, 52(7), 2092-2095, DOI:10.1002/anie.201209250.
- [326] L. Zhang, et al. 2-Chloro-2,2-Difluoroacetophenone: A Non-ODS-Based Difluorocarbene Precursor and Its Use in the Difluoromethylation of Phenol Derivatives. *The Journal of Organic Chemistry* 2006, 71(26), 9845-9848, DOI:10.1021/jo061799I.
- [327] J. Yang, et al. Visible-Light Photoredox Difluoromethylation of Phenols and Thiophenols With Commercially Available Difluorobromoacetic Acid. Organic Letters 2017, 19(10), 2758-2761, DOI:10.1021/acs.orglett.7b01118.
- [328] Q.-Y. Chen, S.-W. Wu. A Simple Convenient Method for Preparation of Difluoromethyl Ethers Using Fluorosulfonyldifluoroacetic Acid as a Difluorocarbene Precursor. *Journal of Fluorine Chemistry* 1989, 44(3), 433-440, DOI:10.1016/S0022-1139(00)82808-0.
- [329] J. Zheng, et al. Chlorodifluoromethyl Phenyl Sulfone: A Novel Non-Ozone-Depleting Substance-Based Difluorocarbene Reagent for O- and N-Difluoromethylations. Chemical Communications 2007, (48), 5149-5151, DOI:10.1039/B713156A.
- [**330**] J. B. I. Sap, *et al.* Late-Stage Difluoromethylation: Concepts, Developments and Perspective. *Chemical Society Reviews* **2021**, 50(14), 8214-8247, DOI:10.1039/D1CS00360G.
- [331] Y. Zafrani, et al. Diethyl Bromodifluoromethylphosphonate: A Highly Efficient and Environmentally Benign Difluorocarbene Precursor. *Tetrahedron* 2009, 65(27), 5278-5283, DOI:10.1016/j.tet.2009.04.082.
- [332] L. Li, et al. Synthesis of gem-Difluorocyclopropa(e)nes and O-, S-, N-, and P-Difluoromethylated Compounds With TMSCF₂Br. Angewandte Chemie International Edition 2013, 52(47), 12390-12394, DOI:10.1002/anie.201306703.
- [333] J. P. E. Spencer, et al. Cellular Uptake and Metabolism of Flavonoids and Their Metabolites: Implications for Their Bioactivity. Archives of Biochemistry and Biophysics 2004, 423(1), 148-161, DOI:10.1016/j.abb.2003.11.010.
- [334] N. L. Dang, et al. The Metabolic Rainbow: Deep Learning Phase I Metabolism in Five Colors. Journal of Chemical Information and Modeling 2020, 60(3), 1146-1164, DOI:10.1021/acs.jcim.9b00836.
- [335] D. Zhong, et al. Discovery of Metal Ions Chelator Quercetin Derivatives with Potent Anti-HCV Activities. *Molecules* 2015, 20(4), 6978-6999, DOI:10.3390/molecules20046978.
- [336] Y. Xiong, et al. Metal-Catalyzed Cascade Rearrangements of 3-Alkynyl Flavone Ethers. Organic Letters 2013, 15(8), 1962-1965, DOI:10.1021/ol400631b.
- [337] D. Dziuba, et al. A Mild and Efficient Protocol for the Protection of 3-Hydroxychromones Under Phase-Transfer Catalysis. Synthesis 2011, 2011(13), 2159-2164, DOI:10.1055/s-0030-1260034.
- [338] C. Lardy, et al. New Nitromethyl Ketones, Process for Preparing Them and Compositions Containing Them. Publ. of the Int. Appl. with Int. search report - World Intellectual Property Organization, 1998, WO9852906.

- [**339**] A. E. Feiring. Chemistry in Hydrogen Fluoride. 7. A Novel Synthesis of Aryl Trifluoromethyl Ethers. *The Journal of Organic Chemistry* **1979**, 44(16), 2907-2910, DOI:10.1021/jo01330a017.
- [340] W. A. Sheppard. α-Fluorinated Ethers. I. Aryl Fluoroalkyl Ethers. The Journal of Organic Chemistry 1964, 29(1), 1-11, DOI:10.1021/jo01024a001.
- [341] M. Kuroboshi, et al. Oxidative Desulfurization-Fluorination of Xanthates. A Convenient Synthesis of Trifluoromethyl Ethers and Difluoro(methylthio)methyl Ethers. *Tetrahedron Letters* 1992, 33(29), 4173-4176, DOI:10.1016/S0040-4039(00)74681-8.
- [342] M. Kuroboshi, et al. Oxidative Desulfurization-Fluorination: A Facile Entry to a Wide Variety of Organofluorine Compounds Leading to Novel Liquid-Crystalline Materials. Advanced Synthesis & Catalysis 2001, 343(3), 235-250, DOI:10.1002/1615-4169(20010330)343:3<235::AID-ADSC235>3.0.CO;2-0.
- [343] M. Yoritate, et al. Sequential Xanthalation and O-Trifluoromethylation of Phenols: A Procedure for the Synthesis of Aryl Trifluoromethyl Ethers. *The Journal of Organic Chemistry* 2019, 84(24), 15767-15776, DOI:10.1021/acs.joc.9b02717.
- [344] T. Khotavivattana, et al. ¹⁸F-Labeling of Aryl-SCF₃, -OCF₃ and -OCHF₂ With [¹⁸F]Fluoride.
 Angewandte Chemie International Edition 2015, 54(34), 9991-9995, DOI:10.1002/anie.201504665.
- [345] N. N. Yarovenko. New Method of Introduction of the Trihalomethyl Group Into Organic Compounds. *Zhurnal Obshchei Khimii* **1958**, 28, 2502-2504.
- [346] Y. Hagooly, et al. Preparation of Alkyl and Aryl Chlorodifluoromethyl Ethers Using BrF₃. European Journal of Organic Chemistry 2008, 2008(17), 2875-2880, DOI:10.1002/ejoc.200800231.
- [347] C. E. Raab, et al. Carbon-14 Labeling of a Trifluoromethoxy Group: Synthesis of a Substance P Antagonist. Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals 2001, 44(12), 815-829, DOI:10.1002/jlcr.502.
- [348] M. Zhou, et al. O-Trifluoromethylation of Phenols: Access to Aryl Trifluoromethyl Ethers by O-Carboxydifluoromethylation and Decarboxylative Fluorination. Organic Letters 2016, 18(15), 3754-3757, DOI:10.1021/acs.orglett.6b01779.
- [349] S. Krishanmoorthy, et al. Fluorodecarboxylation: Synthesis of Aryl Trifluoromethyl Ethers (ArOCF₃) and Thioethers (ArSCF₃). Journal of Fluorine Chemistry 2017, 203, 130-135, DOI:10.1016/j.jfluchem.2017.07.017.
- [350] J.-B. Liu, et al. Silver-Mediated Oxidative Trifluoromethylation of Phenols: Direct Synthesis of Aryl Trifluoromethyl Ethers. Angewandte Chemie International Edition 2015, 54(40), 11839-11842, DOI:10.1002/anie.201506329.
- [**351**] K. Stanek, *et al.* Reactivity of a 10-I-3 Hypervalent lodine Trifluoromethylation Reagent With Phenols. *The Journal of Organic Chemistry* **2008**, 73(19), 7678-7685, DOI:10.1021/jo8014825.
- [352] T. Umemoto, et al. CF₃ Oxonium Salts, O-(Trifluoromethyl)dibenzofuranium Salts: In Situ Synthesis, Properties, and Application as a Real CF₃⁺ Species Reagent. The Journal of Organic Chemistry 2007, 72(18), 6905-6917, DOI:10.1021/jo070896r.
- [**353**] H. Egami, *et al.* Benzylic C–H Trifluoromethylation of Phenol Derivatives. *Chemical Communications* **2015**, 51(93), 16675-16678, DOI:10.1039/C5CC07011B.

- [354] J. L. Bolton, T. Dunlap. Formation and Biological Targets of Quinones: Cytotoxic Versus Cytoprotective Effects. *Chemical Research in Toxicology* 2017, 30(1), 13-37, DOI:10.1021/acs.chemrestox.6b00256.
- [**355**] T. Cernak, *et al.* The Medicinal Chemist's Toolbox for Late Stage Functionalization of Drug-like Molecules. *Chemical Society Reviews* **2016**, 45(3), 546-576, DOI:10.1039/C5CS00628G.
- [356] K. Raghuvanshi, et al. Ketone-Assisted Ruthenium(II)-Catalyzed C–H Imidation: Access to Primary Aminoketones by Weak Coordination. ACS Catalysis 2016, 6(5), 3172-3175, DOI:10.1021/acscatal.6b00711.
- [**357**] I. Choi, *et al.* C7-Indole Amidations and Alkenylations by Ruthenium(II) Catalysis. *Angewandte Chemie International Edition* **2020**, 59(30), 12534-12540, DOI:10.1002/anie.202006164.
- [358] S. Pan, et al. Synthesis of Unsymmetrically Disubstituted Tetraphenylenes via Carbonyl-Directed C–H Functionalization. Synlett 2016, 27(13), 1997-2002, DOI:10.1055/s-0035-1561862.
- [**359**] P. Shi, *et al.* Co(III)-Catalyzed Enaminone-Directed C–H Amidation for Quinolone Synthesis. *Organic Letters* **2017**, 19(9), 2418-2421, DOI:10.1021/acs.orglett.7b00968.
- [360] F. Wang, et al. Cobalt(III)- and Rhodium(III)-Catalyzed C–H Amidation and Synthesis of 4-Quinolones: C–H Activation Assisted by Weakly Coordinating and Functionalizable Enaminone. Organic Letters 2017, 19(7), 1812-1815, DOI:10.1021/acs.orglett.7b00583.
- [361] J. Park, et al. Iterative C-H Functionalization Leading to Multiple Amidations of Anilides. Angewandte Chemie International Edition 2017, 56(15), 4256-4260, DOI:10.1002/anie.201701138.
- [362] Y. Kim, et al. A Direct Access to 7-Aminoindoles via Iridium-Catalyzed Mild C–H Amidation of N-Pivaloylindoles With Organic Azides. Organic Letters 2016, 18(8), 1892-1895, DOI:10.1021/acs.orglett.6b00662.
- [363] V. K.-Y. Lo, et al. Highly Selective Intramolecular Carbene Insertion Into Primary C–H Bond of α-Diazoacetamides Mediated by a (p-Cymene)ruthenium(II) Carboxylate Complex. Journal of the American Chemical Society 2012, 134(18), 7588-7591, DOI:10.1021/ja3006989.
- [364] J. Kim, et al. Ruthenium-Catalyzed Direct C-H Amidation of Arenes Including Weakly Coordinating Aromatic Ketones. Chemistry 2013, 19(23), 7328-7333, DOI:10.1002/chem.201301025.
- [365] S. H. Park, et al. Mechanistic Studies of the Rhodium-Catalyzed Direct C–H Amination Reaction Using Azides as the Nitrogen Source. Journal of the American Chemical Society 2014, 136(6), 2492-2502, DOI:10.1021/ja411072a.
- [366] P. G. M. Wuts, T. W. Greene. Protection for the Amino Group. In Greene's Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, Inc.: 2006; Vol. 4, Seite 696-926, DOI:10.1002/9780470053485.ch7.
- [**367**] S.-J. Lou, *et al.* Mild and Versatile Nitrate-Promoted C-H Bond Fluorination. *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, 53(39), 10330-10335, DOI:10.1002/anie.201404423.
- [368] Q. Wu, et al. Pd-Catalysed Direct C(sp²)–H Fluorination of Aromatic Ketones: Concise Access to Anacetrapib. Chemical Communications 2021, 57(37), 4544-4547, DOI:10.1039/D1CC01047F.

- [369] A.-L. I. R. Kiffe-Delf. Functional Characterization of New Antimicrobial Lead Structures Against *Mycobacterium tuberculosis* Dissertation, Heinrich-Heine-University, **2023**.
- [370] A. Daina, et al. SwissADME: A Free Web Tool to Evaluate Pharmacokinetics, Drug-Likeness and Medicinal Chemistry Friendliness of Small Molecules. *Scientific Reports* 2017, 7(1), 42717, DOI:10.1038/srep42717.
- [**371**] A. Bondi. Van der Waals Volumes and Radii. *The Journal of Physical Chemistry* **1964**, 68(3), 441-451, DOI:10.1021/j100785a001.
- [**372**] G. Cavallo, *et al.* The Halogen Bond. *Chemical Reviews* **2016**, 116(4), 2478-2601, DOI:10.1021/acs.chemrev.5b00484.
- [373] K. E. Riley, et al. Halogen Bond Tunability I: The Effects of Aromatic Fluorine Substitution on the Strengths of Halogen-Bonding Interactions Involving Chlorine, Bromine, and Iodine. Journal of Molecular Modeling 2011, 17(12), 3309-3318, DOI:10.1007/s00894-011-1015-6.
- [374] Millipore. Sicherheitsdatenblatt MidDLebrook 7H9 Bouillon Basis. In 2022.
- [375] J. Pflaum, et al. Structure and Electronic Properties of CH₃- and CF₃-Terminated Alkanethiol Monolayers on Au(111): A Scanning Tunneling Microscopy, Surface X-Ray and Helium Scattering Study. Surface Science 2002, 498(1), 89-104, DOI:10.1016/S0039-6028(01)01495-9.
- [**376**] J. E. Huheey. The Electronegativity of Groups. *The Journal of Physical Chemistry* **1965**, 69(10), 3284-3291, DOI:10.1021/j100894a011.
- [377] M. Albrecht, et al. CF₃: An Electron-Withdrawing Substituent for Aromatic Anion Acceptors?
 "Side-On" Versus "On-Top" Binding of Halides. Chemistry A European Journal 2016, 22(20), 6956-6963, DOI:10.1002/chem.201600249.
- [378] B. Thapa, H. B. Schlegel. Improved pK_a Prediction of Substituted Alcohols, Phenols, and Hydroperoxides in Aqueous Medium Using Density Functional Theory and a Cluster-Continuum Solvation Model. *The Journal of Physical Chemistry A* 2017, 121(24), 4698-4706, DOI:10.1021/acs.jpca.7b03907.
- [379] I. Sharma, G. A. Kaminski. Calculating pK_a Values for Substituted Phenols and Hydration Energies for Other Compounds With the First-Order Fuzzy-Border Continuum Solvation Model. *Journal of Computational Chemistry* 2012, 33(30), 2388-2399, DOI:10.1002/jcc.23074.
- [380] F. Shahidi, C. S. Dissanayaka. Phenolic-Protein Interactions: Insight From *In-Silico* Analyses A Review. *Food Production, Processing and Nutrition* 2023, 5(1), 2, DOI:10.1186/s43014-022-00121-0.
- [381] G. A. Patani, E. J. LaVoie. Bioisosterism: A Rational Approach in Drug Design. Chemical Reviews 1996, 96(8), 3147-3176, DOI:10.1021/cr950066q.
- [382] E. Schweizer, et al. A Fluorine Scan at the Catalytic Center of Thrombin: C-F, C-OH, and C-OMe Bioisosterism and Fluorine Effects on pK_a and log D Values. *ChemMedChem* 2006, 1(6), 611-621, DOI:10.1002/cmdc.200600015.
- [383] H. Koster, et al. Dose-Dependent Shifts in the Sulfation and Glucuronidation of Phenolic Compounds in the Tat In Vivo and in Isolated Hepatocytes: The Role of Saturation of Phenolsulfotransferase. Biochemical Pharmacology 1981, 30(18), 2569-2575, DOI:10.1016/0006-2952(81)90584-0.

- [384] N. Shangari, et al. Sulfation and Glucuronidation of Phenols: Implications in Coenyzme Q Metabolism. In Methods in Enzymology, Academic Press: 2005; Vol. 400, Seite 342-359, DOI:10.1016/S0076-6879(05)00020-0.
- [385] M. Stankovičová, et al. Kinetics of Hydrolysis of Acetyl, Valeroyl and Nicotinoyl Acyl Derivatives of Stobadine. Life Sciences 1999, 65(18), 2007-2010, DOI:10.1016/S0024-3205(99)00466-X.
- [386] J. Rautio, et al. Prodrugs: Design and Clinical Applications. Nature Reviews Drug Discovery 2008, 7(3), 255-270, DOI:10.1038/nrd2468.
- [387] P. M. Potter, R. M. Wadkins. Carboxylesterases Detoxifying Enzymes and Targets for Drug Therapy. *Current Medicinal Chemistry* 2006, 13(9), 1045-1054, DOI:10.2174/092986706776360969.
- [**388**] C. Y. Yang, *et al.* Intestinal Peptide Transport Systems and Oral Drug Availability. *Pharmaceutical Research* **1999**, 16(9), 1331-1343, DOI:10.1023/a:1018982505021.
- [389] E. H. Kerns, L. Di. Drug Like Properties: Concept, Structure, Design and Methods, From ADME to Toxicity Optimization. Vol. 1, Academic Press, Elsevier Inc., Burlington, MA, 2008; DOI:10.1016/B978-012369520-8.50003-6.
- [**390**] V. R. Vemula, *et al.* Solubility Enhancement Techniques. *International journal of pharmaceutical sciences review and research* **2010**, 5(1), 41-51.
- [391] K. T. Savjani, et al. Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques. ISRN Pharmaceutics 2012, 2012, 195727, DOI:10.5402/2012/195727.
- [392] L. Zhou, et al. Development of a High Throughput Equilibrium Solubility Assay Using Miniaturized Shake-Flask Method in Early Drug Discovery. *Journal of Pharmaceutical Science* 2007, 96(11), 3052-3071, DOI:10.1002/jps.20913.
- [393] A. D. Gift, et al. Experimental Determination of pK_a Values by Use of NMR Chemical Shifts, Revisited. *Journal of Chemical Education* 2012, 89(11), 1458-1460, DOI:10.1021/ed200433z.
- [394] A. Dahan, J. M. Miller. The Solubility–Permeability Interplay and Its Implications in Formulation Design and Development for Poorly Soluble Drugs. *The AAPS Journal* 2012, 14(2), 244-251, DOI:10.1208/s12248-012-9337-6.
- [**395**] R. K. Thapa, *et al.* Analysis and Optimization of Drug Solubility to Improve Pharmacokinetics. *Journal of Pharmaceutical Investigation* **2017**, 47(2), 95-110, DOI:10.1007/s40005-016-0299-z.
- [396] X. Dong, et al. A Deep Insight Into the Structure-Solubility Relationship and Molecular Interaction Mechanism of Diverse Flavonoids in Molecular Solvents, Ionic Liquids, and Molecular Solvent/Ionic Liquid Mixtures. *Journal of Molecular Liquids* 2023, 385, 122359, DOI:10.1016/j.molliq.2023.122359.
- [**397**] O. González-González, *et al.* Drug Stability: ICH Versus Accelerated Predictive Stability Studies. *Pharmaceutics* **2022**, 14(11), 2324, DOI:10.3390/pharmaceutics14112324.
- [398] P. Sengupta, et al. Current Regulatory Requirements and Practical Approaches for Stability Analysis of Pharmaceutical Products: A Comprehensive Review. International Journal of Pharmaceutics 2018, 543(1), 328-344, DOI:10.1016/j.ijpharm.2018.04.007.
- [399] K. M. Knights, et al. In Vitro Drug Metabolism Using Liver Microsomes. Current Protocols in Pharmacology 2016, 74(1), 7.8.1-7.8.24, DOI:10.1002/cpph.9.

- [400] C. M. Masimirembwa, et al. Metabolic Stability for Drug Discovery and Development. Clinical Pharmacokinetics 2003, 42(6), 515-528, DOI:10.2165/00003088-200342060-00002.
- [401] M. Leven, et al. 3-Hydroxy-N'-Arylidenepropanehydrazonamides With Halo-Substituted Phenanthrene Scaffolds Cure P. berghei Infected Mice When Administered Perorally. Journal of Medicinal Chemistry 2017, 60(14), 6036-6044, DOI:10.1021/acs.jmedchem.7b00140.
- [402] L. Di, *et al.* Experimental Design on Single-Time-Point High-Throughput Microsomal Stability Assay. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2004**, 93(6), 1537-1544, DOI:10.1002/jps.20076.
- [403] R. S. Obach. Prediction of Human Clearance of Twenty-Nine Drugs From Hepatic Microsomal Intrinsic Clearance Data: An Examination of *In Vitro* Half-Life Approach and Nonspecific Binding to Microsomes. *Drug Metabolism and Disposition* **1999**, 27(11), 1350-1359.
- [404] M. Mahmoud. Development of Reverse N-substituted Fosmidomycin Analogs as P. falciparum 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase Inhibitors. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2023.
- [405] A. Citarella, et al. Hydroxamic Acid Derivatives: From Synthetic Strategies to Medicinal Chemistry Applications. ACS Omega 2021, 6(34), 21843-21849, DOI:10.1021/acsomega.1c03628.
- [406] C. A. G. N. Montalbetti, V. Falque. Amide Bond Formation and Peptide Coupling. *Tetrahedron* 2005, 61(46), 10827-10852, DOI:10.1016/j.tet.2005.08.031.
- [407] L. A. Carpino. 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An Efficient Peptide Coupling Additive. Journal of the American Chemical Society 1993, 115(10), 4397-4398, DOI:10.1021/ja00063a082.
- [408] F. Albericio, et al. Use of Onium Salt-Based Coupling Reagents in Peptide Synthesis. The Journal of Organic Chemistry 1998, 63(26), 9678-9683, DOI:10.1021/jo980807y.
- [409] J. Magano. Large-Scale Amidations in Process Chemistry: Practical Considerations for Reagent Selection and Reaction Execution. Organic Process Research & Development 2022, 26(6), 1562-1689, DOI:10.1021/acs.oprd.2c00005.
- [410] A. El-Faham, et al. COMU: A Safer and More Effective Replacement for Benzotriazole-Based Uronium Coupling Reagents. Chemistry – A European Journal 2009, 15(37), 9404-9416, DOI:10.1002/chem.200900615.
- [411] Y. Sixto-López, et al. Hydroxamic Acid Derivatives as HDAC1, HDAC6 and HDAC8 Inhibitors With Antiproliferative Activity in Cancer Cell Lines. *Scientific Reports* 2020, 10(1), 10462, DOI:10.1038/s41598-020-67112-4.
- [412] B. Mondal, et al. Towards a Quantitative Understanding of Palladium Metal Scavenger Performance: An Electronic Structure Calculation Approach. Dalton Transactions 2014, 43(2), 469-478, DOI:10.1039/C3DT52282B.
- P. G. M. Wuts, T. W. Greene. Protection for the Hydroxyl Group, Including 1,2- and 1,3-Diols.
 In Greene's Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, Inc.: 2006; Vol. 4, Seite 16-366, DOI:10.1002/9780470053485.ch2.
- [414] K. Brücher, et al. Prodrugs of Reverse Fosmidomycin Analogues. Journal of Medicinal Chemistry 2015, 58(4), 2025-2035, DOI:10.1021/jm5019719.
- [**415**] K. Brücher, *et al.* α-Substituted β-Oxa Isosteres of Fosmidomycin: Synthesis and Biological Evaluation. *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, 55(14), 6566-6575, DOI:10.1021/jm300652f.

- [416] S. Konzuch, et al. Binding Modes of Reverse Fosmidomycin Analogs Toward the Antimalarial Target IspC. Journal of Medicinal Chemistry 2014, 57(21), 8827-8838, DOI:10.1021/jm500850y.
- [417] H. Firouzabadi, et al. Ph₃P/DDQ/NH₄SCN as a New and Neutral System for Direct Preparation of Diethyl α-Thiocyanatophosphonates From Diethyl α-Hydroxyphosphonates. Synthesis 2004, 2004(2), 290-294, DOI:10.1055/s-2003-815918.
- [418] B. Galabov, et al. Origin of the S_N2 Benzylic Effect. Journal of the American Chemical Society 2008, 130(30), 9887-9896, DOI:10.1021/ja802246y.
- [419] T. B. Phan, et al. Can One Predict Changes From S_N1 to S_N2 Mechanisms? Journal of the American Chemical Society 2009, 131(32), 11392-11401, DOI:10.1021/ja903207b.
- [420] D. A. Brown, et al. ¹H and ¹³C NMR Studies of Isomerism in Hydroxamic Acids. Magnetic Resonance in Chemistry 1991, 29(1), 40-45, DOI:10.1002/mrc.1260290109.
- [421] U. Ritgen. Kernresonanzspektroskopie (NMR). In Analytische Chemie II, Ritgen, U., Ed. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2020; Seite 27-80, DOI:10.1007/978-3-662-60508-0_3.
- [422] G. Zhang, et al. Rh-Catalyzed Oxidative C–H Activation/Annulation: Converting Anilines to Indoles Using Molecular Oxygen as the Sole Oxidant. *Chemical Communications* 2014, 50(33), 4331-4334, DOI:10.1039/C3CC49751H.
- [423] S. Gester, et al. Synthesis of ¹⁸F-Labelled Stilbenes From 4-[¹⁸F]Fluorobenzaldehyde Using the Horner–Wadsworth–Emmons Reaction. Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals 2007, 50(2), 105-113, DOI:10.1002/jlcr.1172.
- [424] Y. Navarro, et al. Synthesis of Diethoxy Arylphosphoryl Functionalized, Fully Substituted 5-Triazenyl-1,2,3-Triazoles via Chelation-Assisted Interrupted Domino Reaction of ortho-Azidophosphonates With Copper(I) Alkynes. Synthesis 2021, 54(01), 199-209, DOI:10.1055/a-1577-5999.
- [425] A. R. Sardarian, B. Kaboudin. Surface-Mediated Solid Phase Reactions: Preparation of Diethyl 1-Hydroxyarylmethylphosphonates on the Surface of Magnesia. *Synthetic Communications* 1997, 27(4), 543-551, DOI:10.1080/00397919708003324.
- [426] T. Knak, et al. Over 40 Years of Fosmidomycin Drug Research: A Comprehensive Review and Future Opportunities. *Pharmaceuticals* 2022, 15(12), 1553, DOI:10.3390/ph15121553.
- [427] CLSI. Methods for Dilution Antimicrobials Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically M07. 11. Edition, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2008; CLSI standard M07.
- [428] H. Noedl, et al. Simple Histidine-Rich Protein 2 Double-Site Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Use in Malaria Drug Sensitivity Testing. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2005, 49(8), 3575-3577, DOI:10.1128/aac.49.8.3575-3577.2005.
- [429] C. T. Behrendt, et al. Reverse Fosmidomycin Derivatives Against the Antimalarial Drug Target IspC (Dxr). Journal of Medicinal Chemistry 2011, 54(19), 6796-6802, DOI:10.1021/jm200694q.
- [430] C. T. Behrendt, et al. Synthesis and Antiplasmodial Activity of Highly Active Reverse Analogues of the Antimalarial Drug Candidate Fosmidomycin. *ChemMedChem* 2010, 5(10), 1673-1676, DOI:10.1002/cmdc.201000276.

- [431] E. Uh, et al. Antibacterial and Antitubercular Activity of Fosmidomycin, FR900098, and Their Lipophilic Analogs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2011, 21(23), 6973-6976, DOI:10.1016/j.bmcl.2011.09.123.
- [432] C. Courtens, et al. Acyloxybenzyl and Alkoxyalkyl Prodrugs of a Fosmidomycin Surrogate as Antimalarial and Antitubercular Agents. ACS Medicinal Chemistry Letters 2018, 9(10), 986-989, DOI:10.1021/acsmedchemlett.8b00223.
- [433] K. Reuter, et al. Crystal Structure of 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase, a Crucial Enzyme in the Non-mevalonate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis. Journal of Biological Chemistry 2002, 277(7), 5378-5384, DOI:10.1074/jbc.M109500200.
- [434] A. Mac Sweeney, et al. The Crystal Structure of E.coli 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase in a Ternary Complex With the Antimalarial Compound Fosmidomycin and NADPH Reveals a Tight-Binding Closed Enzyme Conformation. Journal of Molecular Biology 2005, 345(1), 115-127, DOI:10.1016/j.jmb.2004.10.030.
- [435] R. B. van Breemen, Y. Li. Caco-2 Cell Permeability Assays to Measure Drug Absorption. *Expert Opinion Drug Metabolsm & Toxicology* 2005, 1(2), 175-185, DOI:10.1517/17425255.1.2.175.
- [436] X. Liu, et al. Lipophilicity and Its Relationship With Passive Drug Permeation. Pharmaceutical Research 2011, 28(5), 962-977, DOI:10.1007/s11095-010-0303-7.
- [437] M. Kalanon, G. I. McFadden. Malaria, *Plasmodium falciparum* and Its Apicoplast. *Biochemical Society Transactions* 2010, 38(3), 775-782, DOI:10.1042/bst0380775.
- [438] C. Y. Botté, et al. Plasmodium falciparum apicoplast drugs: targets or off-targets? Chem Rev 2012, 112(3), 1269-1283, DOI:10.1021/cr200258w.
- [439] J. M. Matz, et al. The Parasitophorous Vacuole of the Blood-Stage Malaria Parasite. Nature Reviews Microbiology 2020, 18(7), 379-391, DOI:10.1038/s41579-019-0321-3.
- [440] S. Baumeister, et al. Fosmidomycin Uptake Into Plasmodium and Babesia-Infected Erythrocytes Is Facilitated by Parasite-Induced New Permeability Pathways. PLOS ONE 2011, 6(5), e19334, DOI:10.1371/journal.pone.0019334.
- [441] S. Baumeister, *et al.* Evidence for the Involvement of *Plasmodium falciparum* Proteins in the Formation of New Permeability Pathways in the Erythrocyte Membrane. *Molecular Microbiology* 2006, 60(2), 493-504, DOI:10.1111/j.1365-2958.2006.05112.x.
- [442] H. Ginsburg, et al. New Permeability Pathways Induced in Membranes of Plasmodium falciparum Infected Erythrocytes. Molecular and Biochemical Parasitolgy 1983, 8(2), 177-190, DOI:10.1016/0166-6851(83)90008-7.
- [443] S. A. Desai, R. L. Rosenberg. Pore Size of the Malaria Parasite's Nutrient Channel. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 1997, 94(5), 2045-2049, DOI:10.1073/pnas.94.5.2045.
- [444] S. A. Desai, *et al.* A Nutrient-Permeable Channel on the Intraerythrocytic Malaria Parasite. *Nature* **1993**, 362, 643-646, DOI:10.1038/362643a0.
- [445] K. Basore, et al. How Do Antimalarial Drugs Reach Their Intracellular Targets? Frontiers in Pharmacology 2015, 6, 91, DOI:10.3389/fphar.2015.00091.
- [446] S. A. Ralph, et al. Metabolic Maps and Functions of the Plasmodium falciparum Apicoplast. Nature Reviews Microbiology 2004, 2(3), 203-216, DOI:10.1038/nrmicro843.

- [447] S. C. Nair, et al. Apicoplast isoprenoid precursor synthesis and the molecular basis of fosmidomycin resistance in Toxoplasma gondii. J Exp Med 2011, 208(7), 1547-1559, DOI:10.1084/jem.20110039.
- [448] G. Cai, et al. Expression, Characterization and Inhibition of Toxoplasma gondii 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2013, 23(7), 2158-2161, DOI:10.1016/j.bmcl.2013.01.097.
- [449] Y. Sakamoto, et al. Fosmidomycin Resistance in Adenylate Cyclase Deficient (cya) Mutants of Escherichia coli. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 2003, 67(9), 2030-2033, DOI:10.1271/bbb.67.2030.
- [450] R. Chofor, *et al.* Synthesis and Bioactivity of β-Substituted Fosmidomycin Analogues Targeting 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase. *Journal of Medicinal Chemistry* 2015, 58(7), 2988-3001, DOI:10.1021/jm5014264.
- [451] R. Dhiman, R. Singh. Recent Advances for Identification of New Scaffolds and Drug Targets for Mycobacterium tuberculosis. IUBMB Life 2018, 70(9), 905-916, DOI:10.1002/iub.1863.
- [452] R. K. Dhiman, et al. 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase (IspC) From Mycobacterium tuberculosis: Towards Understanding Mycobacterial Resistance to Fosmidomycin. Journal of Bacteriology 2005, 187(24), 8395-8402, DOI:10.1128/JB.187.24.8395-8402.2005.
- [453] A. Nordqvist, et al. Synthesis of Functionalized Cinnamaldehyde Derivatives by an Oxidative Heck Reaction and Their Use as Starting Materials for Preparation of Mycobacterium tuberculosis 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase Inhibitors. The Journal of Organic Chemistry 2011, 76(21), 8986-8998, DOI:10.1021/jo201715x.
- [454] D. C. Crick, et al. Biosynthesis of the Arabinogalactan-Peptidoglycan Complex of Mycobacterium tuberculosis. Glycobiology 2001, 11(9), 107R-118R, DOI:10.1093/glycob/11.9.107R.
- [455] J. P. Sarathy, et al. The Role of Transport Mechanisms in Mycobacterium tuberculosis Drug Resistance and Tolerance. Pharmaceuticals 2012, 5(11), 1210-1235, DOI:10.3390/ph5111210.
- [456] A. C. Brown, T. Parish. Dxr Is Essential in *Mycobacterium tuberculosis* and Fosmidomycin Resistance Is Due to a Lack of Uptake. *BMC Microbiology* 2008, 8, 78, DOI:10.1186/1471-2180-8-78.
- [457] L. Nguyen, C. J. Thompson. Foundations of Antibiotic Resistance in Bacterial Physiology: The Mycobacterial Paradigm. *Trends in Microbiology* 2006, 14(7), 304-312, DOI:10.1016/j.tim.2006.05.005.
- [458] F. Bardou, et al. Mechanism of Isoniazid Uptake in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology* 1998, 144(9), 2539-2544, DOI:10.1099/00221287-144-9-2539.
- [459] C. The UniProt. UniProt: The Universal Protein Knowledgebase in 2021. Nucleic Acids Research 2021, 49(D1), D480-D489, DOI:10.1093/nar/gkaa1100.
- [460] M. Johnson, et al. NCBI BLAST: A Better Web Interface. Nucleic Acids Research 2008, 36(Suppl. 2), W5-W9, DOI:10.1093/nar/gkn201.
- [461] H. McWilliam, et al. Analysis Tool Web Services From the EMBL-EBI. Nucleic Acids Research 2013, 41(W1), W597-W600, DOI:10.1093/nar/gkt376.

- [462] T. Umeda, *et al.* Molecular Basis of Fosmidomycin's Action on the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum. Scientific Reports* **2011**, 1, 9, DOI:10.1038/srep00009.
- [463] S. Steinbacher, et al. Structural Basis of Fosmidomycin Action Revealed by the Complex With 2-C-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate Synthase (IspC). Implications for the Catalytic Mechanism and Anti-malaria Drug Development. *Journal of Biological Chemistry* 2003, 278(20), 18401-18407, DOI:10.1074/jbc.M300993200.
- [464] B. O. Lindgren, T. Nilsson. Preparation of Carboxylic Acids From Aldehydes (Including Hydroxylated Benzaldehydes) by Oxidation With Chlorite. *Acta Chemica Scandinavica* 1973, 27(3), 888-890, DOI:10.3891/acta.chem.scand.27-0888.
- [465] R. Mitra, K. N. Ganesh. PNAs Grafted With (α/γ, R/S)-Aminomethylene Pendants: Regio and Stereo Specific Effects on DNA Binding and Improved Cell Uptake. *Chemical Communications* 2011, 47(4), 1198-1200, DOI:10.1039/C0CC03988H.
- [466] P. G. M. Wuts, T. W. Greene. Protection for Phenols and Catechols. In Greene's Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, Inc.: 2006; Vol. 4, Seite 367-430, DOI:10.1002/9780470053485.ch3.
- [467] L. D. Freedman, G. O. Doak. The Preparation And Properties Of Phosphonic Acids. Chemical Reviews 1957, 57(3), 479-523, DOI:10.1021/cr50015a003.
- [468] A. L. Green, et al. 316. The Reactivity of Some Active Nucleophilic Reagents With Organophosphorus Anticholinesterases. Journal of the Chemical Society (Resumed) 1958, 1583-1587, DOI:10.1039/JR9580001583.
- [469] S. Wu, et al. Urea Group-Directed Organocatalytic Asymmetric Versatile Dihalogenation of Alkenes and Alkynes. *Nature Catalysis* 2021, 4(8), 692-702, DOI:10.1038/s41929-021-00660-8.
- [470] Q. Wang, et al. Synthesis of Cyclic Amine Boranes through Triazole-Gold(I)-Catalyzed Alkyne Hydroboration. Angewandte Chemie International Edition 2014, 53(21), 5418-5422, DOI:10.1002/anie.201402614.
- [471] L. A. Alves Avelar, et al. Design and Synthesis of Novel Anti-plasmodial Histone Deacetylase Inhibitors Containing an Alkoxyamide Connecting Unit. Archiv der Pharmazie 2017, 350(3-4), 1600347, DOI:10.1002/ardp.201600347.
- [472] S. M. Pond, T. N. Tozer. First-Pass Elimination Basic Concepts and Clinical Consequences. *Clinical Pharmacokinetics* **1984**, 9(1), 1-25, DOI:10.2165/00003088-198409010-00001.
- [473] J. Zhao, et al. Improvement Strategies for the Oral Bioavailability of Poorly Water-Soluble Flavonoids: An Overview. International Journal of Pharmaceutics 2019, 570, 118642, DOI:10.1016/j.ijpharm.2019.118642.
- [474] J. Xiao, *et al.* Advances in the Biotechnological Glycosylation of Valuable Flavonoids. *Biotechnology Advances* 2014, 32(6), 1145-1156, DOI:10.1016/j.biotechadv.2014.04.006.
- [475] M. K. Kim, et al. A Novel Prodrug of Quercetin, 3-N,N-Dimethyl Carbamoyl Quercetin (DCQ), with Improved Stability Against Hydrolysis in Cell Culture Medium. Bulletin of the Korean Chemical Society 2009, 30(9), 2114-2116.

- [476] M. K. Kim, et al. In Vitro Solubility, Stability and Permeability of Novel Quercetin–Amino Acid Conjugates. Bioorganic & Medicinal Chemistry 2009, 17(3), 1164-1171, DOI:10.1016/j.bmc.2008.12.043.
- [477] Y. Peng, *et al.* Preparation and Prodrug Studies of Quercetin Pentabenzensulfonate. YAKUGAKU ZASSHI 2008, 128(12), 1845-1849, DOI:10.1248/yakushi.128.1845.
- [478] C. Chen, et al. The Prodrug of 7,8-Dihydroxyflavone Development and Therapeutic Efficacy for Treating Alzheimer's Disease. Proceedings of the National Academy of Sciences 2018, 115(3), 578-583, DOI:10.1073/pnas.1718683115.
- [479] M. Thanou, et al. Chitosan and Its Derivatives as Intestinal Absorption Enhancers. Advanced Drug Delivery Reviews 2001, 50, S91-S101, DOI:10.1016/S0169-409X(01)00180-6.
- [480] H. M. Ezzat, et al. Improved Oral Bioavailability of the Anticancer Drug Catechin Using Chitosomes: Design, In-Vitro Appraisal and In-Vivo Studies. International Journal of Pharmaceutics 2019, 565, 488-498, DOI:10.1016/j.ijpharm.2019.05.034.
- [481] Y. Xie, et al. Phytic Acid Enhances the Oral Absorption of Isorhamnetin, Quercetin, and Kaempferol in Total Flavones of *Hippophae rhamnoides L. Fitoterapia* 2014, 93, 216-225, DOI:10.1016/j.fitote.2014.01.013.
- [482] J. Khan, et al. Recent Advances and Future Prospects of Phyto-Phospholipid Complexation Technique for Improving Pharmacokinetic Profile of Plant Actives. *Journal of Controlled Release* 2013, 168(1), 50-60, DOI:10.1016/j.jconrel.2013.02.025.
- [483] V. Suvarna, et al. Complexation of Phytochemicals With Cyclodextrin Derivatives An Insight.
 Biomedicine & Pharmacotherapy 2017, 88, 1122-1144, DOI:10.1016/j.biopha.2017.01.157.
- [484] Y. Xie, et al. Preparation and In Vitro Evaluation of Solid Dispersions of Total Flavones of Hippophae rhamnoides L. AAPS PharmSciTech 2009, 10(2), 631-640, DOI:10.1208/s12249-009-9246-x.
- [485] C. L. Ng, et al. Solubilization and Formulation of Chrysosplenol C in Solid Dispersion with Hydrophilic Carriers. International Journal of Pharmaceutics 2016, 512(1), 314-321, DOI:10.1016/j.ijpharm.2016.08.062.
- [486] M. Liu, et al. The Generation of Myricetin–Nicotinamide Nanococrystals by Top Down and Bottom Up Technologies. Nanotechnology 2016, 27(39), 395601, DOI:10.1088/0957-4484/27/39/395601.
- [487] W. Li, et al. A Strategy to Improve the Oral Availability of Baicalein: The Baicalein-Theophylline Cocrystal. *Fitoterapia* 2018, 129, 85-93, DOI:10.1016/j.fitote.2018.06.018.
- [488] N. P. Aditya, et al. Development and Evaluation of Lipid Nanocarriers for Quercetin Delivery: A Comparative Study of Solid Lipid Nanoparticles (SLN), Nanostructured Lipid Carriers (NLC), and Lipid Nanoemulsions (LNE). LWT - Food Science and Technology 2014, 59(1), 115-121, DOI:10.1016/j.lwt.2014.04.058.
- [489] M. Colombo, et al. Flavonoid Delivery by Solid Dispersion: A Systematic Review. Phytochemistry Reviews 2022, 21(3), 783-808, DOI:10.1007/s11101-021-09763-3.
- [490] M. Hesse, et al. Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, 7. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2005.

- [491] S. Ohno, et al. Ni-Catalyzed Cycloisomerization between 3-Phenoxy Acrylic Acid Derivatives and Alkynes via Intramolecular Cleavage and Formation of the C–O Bond To Give 2,3-Disubstituted Benzofurans. Organic Letters 2019, 21(20), 8400-8403, DOI:10.1021/acs.orglett.9b03170.
- [492] E. Jeong, et al. TURN-ON Fluorescence Detection of Cyanide Using an Ensemble System Consisting of a Dansyl-Based Cationic Probe and Dicyanovinyl Derivative. *Dyes and Pigments* 2019, 162, 348-357, DOI:10.1016/j.dyepig.2018.10.033.
- [493] D.-L. Kong, et al. Synthesis and Crystal Structure of Diethyl Tosyloxybenzylphosphonate. Asian Journal of Chemistry 2014, 26(7), 2138-2140, DOI:10.14233/ajchem.2014.16607.
- [494] A. Nordqvist, et al. New Hits as Antagonists of GPR103 Identified by HTS. ACS Medicinal Chemistry Letters 2014, 5(5), 527-532, DOI:10.1021/ml400519h.
- [495] K. Shirokane, et al. Total Synthesis of (±)-Gephyrotoxin by Amide-Selective Reductive Nucleophilic Addition. Angewandte Chemie International Edition 2014, 53(2), 512-516, DOI:10.1002/anie.201308905.
- [496] H. Christensen. Preparation of Salicylaldehydes via the ortho-Lithio Derivatives of Methoxymethyl-Protected Phenols. Synthetic Communications 1975, 5(1), 65-78, DOI:10.1080/00397917508063518.
- [497] A. N. El Dine, *et al.* Synthesis of Chroman-4-ones with gem-Difluoroalkyl Side Chains in Position
 2. Synlett 2014, 25(17), 2451-2454, DOI:10.1055/s-0034-1378579.
- [498] S. Mabic, et al. New Syntheses of the Benzoquinone Primin and Its Water-Soluble Analog Primin Acid via Heck Reactions. Synthesis 1999, 1999(07), 1127-1134, DOI:10.1055/s-1999-3515.
- [499] E. M. McGarrigle, et al. Ligand Tuning in the Chromium–Salen-Mediated Asymmetric Epoxidation of Alkenes. *Tetrahedron: Asymmetry* 2004, 15(8), 1343-1354, DOI:10.1016/j.tetasy.2004.03.010.
- [500] J. R. Dimmock, et al. Syntheses and Bioactivities of I-(Hydroxyphenyl)-I-Nonen-3-ones and Related Ethers and Esters. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1979, 68(10), 1216-1221, DOI:10.1002/jps.2600681006.
- [501] C. Proença, et al. Novel Chromone and Xanthone Derivatives: Synthesis and ROS/RNS Scavenging Activities. European Journal of Medicinal Chemistry 2016, 115, 381-392, DOI:10.1016/j.ejmech.2016.03.043.
- [502] P.-C. Chen, et al. Structure Related α-Glucosidase Inhibitory Activity and Molecular Docking Analyses of Phenolic Compounds From Paeonia suffruticosa. Medicinal Chemistry Research 2022, 31(2), 293-306, DOI:10.1007/s00044-021-02830-6.
- [503] T. J. Heckrodt, J. Mulzer. Synthesis of a Diels-Alder Precursor for the Elisabethin A Skeleton. Synthesis 2002, 2002(13), 1857-1866, DOI:10.1055/s-2002-33919.
- [504] H. Raistrick, *et al.* 19. The Chemistry of *Aspergillus* Colouring Matters. Part I. *Journal of the Chemical Society* **1937**, (0), 80-88, DOI:10.1039/JR9370000080.
- [505] A. O. Terent'ev, et al. Electrochemically Induced Oxidative S-O Coupling: Synthesis of Sulfonates from Sulfonyl Hydrazides and N-Hydroxyimides or N-Hydroxybenzotriazoles. Organic & Biomolecular Chemistry 2019, 17(14), 3482-3488, DOI:10.1039/C8OB03162B.

- [506] M. Bhanuchandra, et al. Ru(ii)-catalyzed intermolecular ortho-C-H amidation of aromatic ketones with sulfonyl azides. Chemical Communications 2013, 49(45), 5225-5227, DOI:10.1039/C3CC41915K.
- [507] E. D. Nacsa, T. H. Lambert. Cross-Coupling of Sulfonic Acid Derivatives via Aryl-Radical Transfer (ART) Using TTMSS or Photoredox. *Organic Chemistry Frontiers* 2018, 5(1), 64-69, DOI:10.1039/C7QO00731K.
- [508] M. Pflieger, et al. Oxa Analogues of Nexturastat A Demonstrate Improved HDAC6 Selectivity and Superior Antileukaemia Activity. ChemMedChem 2021, 16(11), 1799-1804, DOI:10.1002/cmdc.202001011.
- [509] R. Sulsky, J. P. Demers. Alkylation of *N*-Benzyloxyureas and Carbamates. *Tetrahedron Letters* 1989, 30(1), 31-34, DOI:10.1016/S0040-4039(01)80314-2.
- [510] M. A. Staszak, C. W. Doecke. A Facile Synthesis of N,O-Bis(tert-butoxycarbonyl)hydroxylamine. *Tetrahedron Letters* 1993, 34(44), 7043-7044, DOI:10.1016/S0040-4039(00)61592-7.
- [511] M. Shiino, et al. Synthesis of N-Substituted N-Nitrosohydroxylamines as Inhibitors of Mushroom Tyrosinase. Bioorganic & Medicinal Chemistry 2001, 9(5), 1233-1240, DOI:10.1016/S0968-0896(01)00003-7.
- [512] G. Németh, et al. Synthesis and Evaluation of Phosphorus Containing, Specific CDK9/CycT1 Inhibitors. Journal of Medicinal Chemistry 2014, 57(10), 3939-3965, DOI:10.1021/jm401742r.
- [513] S. Chanthamath, et al. Highly Stereoselective Cyclopropanation of α,β-Unsaturated Carbonyl Compounds with Methyl (Diazoacetoxy)acetate Catalyzed by a Chiral Ruthenium(II) Complex. Angewandte Chemie International Edition 2013, 52(22), 5818-5821, DOI:10.1002/anie.201300468.
- [514] E. Arstad, L. Skattebol. Bis-Phosphonate Compounds. Patent Application Publication, 2002, US2002/0042539 A1.
- [515] J. A. Griswold, J. S. Johnson. Stereoconvergent Conjugate Addition of Arylboronic Acids to α-Angelica Lactone Derivatives: Synthesis of Stereochemically Complex γ-Butyrolactones. ACS Catalysis 2019, 9(12), 11614-11618, DOI:10.1021/acscatal.9b04405.
- [516] J. A. McRae, et al. Ortho-Substituted Chlorobenzenes Related to Metameconine. Canadian Journal of Chemistry 1961, 39(5), 995-1004, DOI:10.1139/v61-124.
- [517] M. Tomita, et al. Rearrangement of Bromine Atom in the Demethylation of Bromomethoxybenzoic Acid. YAKUGAKU ZASSHI 1956, 76(10), 1122-1125, DOI:10.1248/yakushi1947.76.10_1122.
- [518] S. K. Fehler, et al. Radical Arylation of Tyrosine Residues in Peptides. Tetrahedron 2016, 72(48), 7888-7893, DOI:10.1016/j.tet.2016.04.084.
- [519] I. Zuravka, et al. Bis-3-Chloropiperidines Containing Bridging Lysine Linkers: Influence of Side Chain Structure on DNA Alkylating Activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2015, 23(6), 1241-1250, DOI:10.1016/j.bmc.2015.01.050.
- [520] B. E. Allred, et al. Siderocalin Outwits the Coordination Chemistry of Vibriobactin, a Siderophore of Vibrio cholerae. ACS Chemical Biology 2013, 8(9), 1882-1887, DOI:10.1021/cb4002552.

- [521] J. Deng. An Efficient Synthesis of Alterobactin A; A Super Siderophore of Marine Origin. Synthesis 1998, 1998(Sup. 1), 627-638, DOI:10.1055/s-1998-5937.
- [522] D. J. Raines, et al. Interactions of a Periplasmic Binding Protein With a Tetradentate Siderophore Mimic. Angewandte Chemie International Edition 2013, 52(17), 4595-4598, DOI:10.1002/anie.201300751.
- [523] G. C. Moraski, et al. Structure–Activity Relationship of New Anti-Tuberculosis Agents Derived from Oxazoline and Oxazole Benzyl Esters. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2010, 45(5), 1703-1716, DOI:10.1016/j.ejmech.2009.12.074.
- [524] Y. Takeuchi, et al. Synthesis of Acinetobactin. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 2010, 58(11), 1552-1553, DOI:10.1248/cpb.58.1552.