


# Synthese und Strukturoptimierung antiplasmodialer 3-Hydroxypropanamidin-Derivate

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Saskia Klein**

aus Waldbröl

Düsseldorf, im Juli 2026

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

Gedruckt mit der Genehmigung der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Thomas Kurz

Korreferent: Prof. Dr. Dr. h.c. Holger Stark

Tag der mündlichen Prüfung: 15.10.2026

Ich versichere eidesstattlich, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Die Dissertation wurde in der vorliegenden oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht und ich habe bisher keinen erfolglosen Promotionsversuch unternommen.

Düsseldorf, den 19.07.2026

Saskia Klein

Die vorliegende Dissertation wurde im Zeitraum von Juli 2021 bis Juli 2026 am Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter Aufsicht von Herrn Prof. Dr. Thomas Kurz angefertigt.

# Publikationen

## Der Dissertation zugrunde liegende Publikation

Klein, S.; Moritz, A.; Pessanha de Carvalho, L.; Knaab, T. C.; Lungerich, B.; Meyer, L.; Sandström, J.; Thibaud, J. L.; de Villiers, K. A.; Fidock, D. A.; Wittlin, S.; Rottmann, M.; Held, J.; Burckhardt, B. B.; Kurz, T. Structure–Activity Relationships of 3-Hydroxypropanamidines (HPAs) with Potent In Vivo Antimalarial Activity. *J. Med. Chem*. **2025**, *68* (18), 19229–19248. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5c01337.

Der Eigenanteil von Saskia Klein umfasst die Synthese, Aufarbeitung und Charakterisierung der beschriebenen Verbindungen sowie die maßgebliche Mitwirkung an der Erstellung des Manuskripts, einschließlich Textfassung, Tabellen, Reaktionsschemata, Abbildungen, Abstract, Literaturverwaltung und Formatierung.

## Weitere Publikationen

Moritz, A.; Hirn-Derksen, B.; Klein, S.; Held, J.; Wittlin, S.; Rottmann, M.; Kurz, T.; Burckhardt, B. B. Integrative Preclinical Strategy for Pharmacokinetic Profiling and Candidate Selection of 3-Hydroxypropanamidines: A Promising Antimalarial Class. *Malar. J.* **2026**, *25* (1), 151. https://doi.org/10.1186/s12936-026-05837-9.

Knaab, T. C.; Moritz, A.; Pessanha de Carvalho, L.; Klein, S.; Lungerich, B.; Lohse, K.; Kruse, L.; Mombo-Ngoma, G.; Orta, L.; Thibaud, J. L.; de Villiers, K. A.; Fidock, D. A.; Burckhardt, B. B.; Held, J.; Wittlin, S.; Kurz, T. TKK130 Is a 3-Hydroxy-Propanamidine (HPA) with Potent Antimalarial In Vivo Activity and a High Barrier to Resistance. *J. Med. Chem.* **2025**, *68* (1), 95–107. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.4c01465.

Hiermit bestätige ich, dass die vorstehenden Angaben zum Eigenanteil von Saskia Klein an der Publikation Klein et al. (2025) nach meiner Kenntnis zutreffend und glaubhaft sind.

| | |
|---|---|
| Ort, Datum | Prof. Dr. Thomas Kurz |

# Danksagung

Allen voran danke ich Prof. Dr. *Thomas Kurz* für die Möglichkeit, diese Dissertation mit diesem spannenden Thema in seinem Arbeitskreis anfertigen zu dürfen. Des Weiteren möchte ich ihm für die freundliche und wissenschaftliche Unterstützung während der gesamten Promotion danken.
Für die Übernahme des Zweitgutachtens möchte ich Prof. Dr. Dr. h.c. *Holger Stark* danken.

*Petra Stahlke* danke ich für die synthetische Unterstützung im Rahmen der Synthese meiner Edukte, sodass ich den Kopf frei hatte für die komplexeren Fragestellungen. Zudem danke ich *Beate Lungerich* neben dem Instandhalten sämtlicher Laborgeräte auch für die synthetische Unterstützung bei den verschiedensten Syntheserouten. Ich habe sehr vom Austausch und von ihrer Erfahrung profitiert. Auch bedanke ich mich bei *Anita Hübsch* für die Ausstattung mit Büromaterialien und die Unterstützung bei organisatorischen Fragestellungen. Ich danke dem CeMSA@HHU (Center for Molecular and Structural Analytics an der Heinrich-Heine-Universität) für die Aufnahme der massenspektrometrischen und NMR-spektroskopischen Daten.

Ich danke allen aktuellen sowie ehemaligen Mitgliedern der Arbeitskreise Kurz und Stark für die angenehme Zusammenarbeit sowie die Hilfsbereitschaft, auf die ich mich jederzeit verlassen konnte. Ich hatte sehr viel Spaß während der Promotionszeit und habe viele schöne Erinnerungen gesammelt - danke!
Ich danke insbesondere Dr. *Fabian Fischer* für die stetige Unterstützung während meiner kompletten Zeit am Arbeitskreis *Kurz* hinweg, vom ersten Tag meiner Masterarbeit bis zum Einreichen dieser Dissertation. Jedes verzweifelte, initiale Kopfschütteln seinerseits ging am Ende einher mit einer guten Idee, von der ich sehr profitiert habe. Dr. *Oliver Michel* danke ich für die freundliche Aufnahme im Arbeitskreis schon während eines Forschungspraktikums, das ich bei ihm während meines Masterstudiums absolviert habe. Ich danke ihm für alle Tipps und Tricks, die ich in meinen Laboralltag integrieren konnte. Außerdem danke ich Dr. *Hendrik Pols* für jegliche Unterstützung bei dieser Promotion. Wir haben das komplette Studium zusammen durchlaufen. Passend, dass wir es auch am gleichen Arbeitskreis beenden.
Last but not least danke ich *Franziska Kinnen.* Es war mir die allergrößte Freude, das Labor mit dir zu teilen. Gerne erzähle ich von *Franzi* als meine „Labormitbewohnerin“. Jedes Hoch und Tief haben wir gemeinsam überstanden, im am besten ausgestatteten Labor überhaupt. Meinen WPP-StudentInnen *Joséphine Stellmann*, *Femi Rasheed*, *Jona Sandström* und *Lukas Meyer* danke ich für spaßige Zeiten im Labor und die motivierte Synthesearbeit, mit der sie mich unterstützt haben. Auch *Antonia Goerke* danke ich für die schöne Zeit im Labor und ihre

Unterstützung. Zusammenfassend danke ich noch einmal ausdrücklich allen kurz- oder langfristigen Labor 25-BewohnerInnen. Es war mir ein Fest.
Über den Arbeitskreis Kurz hinaus danke ich *Frederic Krüger, Elias Böttger, Markus Schultes, Dr. Martin Stark, Tobias Werner, Dr. Nina Jahnke, Daniel Engelberth, Malte Wendel, Paula Brüßler* und all meinen anderen FreundInnen. Eine Dissertation schreibt sich nicht ohne Unterstützung und Spaß und da wart ihr alle auf unterschiedliche Weise ein wichtiger Teil von.
Außerdem danke ich *Quang Nguyen* für die technische Unterstützung beim Schreiben dieser Dissertation - ohne diese wäre es so viel schrecklicher geworden!
Danke auch an meine engsten Wirtschaftschemie-FreundInnen. Entstanden ist über all die Jahre eine große Freundesgruppe, die jeden noch so anstrengenden Tag aushaltbar, wenn nicht sogar richtig schön gemacht hat und mittlerweile eine zweite Familie für mich darstellt. Danke Wichems!
Insbesondere danke ich *Lena Marek*. Egal, wie gestresst ich war und völlig egal, wie weit sie gerade weg war, sie war immer zur Stelle. Es gibt sicherlich über 49 Gründe, warum sie fantastisch ist. Das Wichtigste aber: Ich habe mich immer sehr verstanden gefühlt. Danke, *Lena*.

Ich bedanke mich bei meinen Schwestern *Sabrina Klein* und *Mareike Klein* und natürlich bei Mama und Papa. Danke für das Verständnis und jegliche Unterstützung sowie für die Ermöglichung des Studiums. Nichts ist während so einem Studium und einer Promotion mehr wert, als ein Papa, der sich dafür interessiert, was du eigentlich den ganzen Tag machst und eine Mama, die immer mit ganzem Herzen mitleidet, auch wenn sie eigentlich nicht ganz genau weiß, woran du überhaupt forschst.
Danke vor allem auch noch mal an meine kleine Schwester, *Sabrina Klein*. Es ist großartig, sie in der gleichen Stadt mit den gleichen Flausen im Kopf zu wissen! Sie ist ein Stück Heimat in Düsseldorf.
Auch dem Rest meiner großen Familie im Oberbergischen Kreis danke ich. Sie sind chaotisch und laut, aber ich ja auch - also schön zu wissen, wo es herkommt. Ganz ausdrücklich danke ich in diesem Rahmen Dr. *Anke Johanns* und *Prof. Dr. Bernd Waas* für jegliche (auch sehr spontane) Unterstützung von der Schule bis zur Universität. Korrekturlesen über Nacht? Kein Problem, auch wenn es an den eigenen Baustellen ebenfalls vorne und hinten brennt.
Zuletzt bedanke ich mich bei *Filip König.* Fürs Essen kochen. Fürs Sicherstellen, dass ich meinen Laptop nicht nach einem frustrierenden Schreibtag aus dem Fenster schmeiße. Für den technischen Support. Für Freundschaft und Liebe. Ich bin so dankbar.

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis ..... I

1 Einleitung ..... 1

1.1 *Plasmodium species (Plasmodium spp.)* als Erreger von Malaria ..... 2

1.1.1 Arten ..... 2

1.1.2 Lebenszyklus ..... 2

1.2 Einteilung der Malaria-Arten ..... 6

1.2.1 *Malaria tropica* ..... 6

1.2.2 *Malaria tertiana* ..... 7

1.2.3 *Malaria quartana* ..... 7

1.2.4 *Knowlesi*-Malaria ..... 7

1.3 Malaria-Prophylaxe ..... 7

1.3.1 Maßnahmen zur Vermeidung von Moskitobissen ..... 8

1.3.2 Chemoprophylaxe ..... 8

1.4 Diagnose ..... 9

1.5 Therapie ..... 10

1.5.1 Therapie der komplizierten Malaria ..... 10

1.5.2 Therapie der unkomplizierten Malaria ..... 10

1.5.3 Stadien des Lebenszyklus von *Plasmodium spp.* als pharmakologisches und immunologisches Ziel ..... 11

1.6 Resistenzentwicklung als Herausforderung der Malariatherapie ..... 15

1.7 Entwicklung von Malaria-Therapeutika ..... 16

1.7.1 Aktueller Forschungsstand ..... 16

1.7.2 Die Finanzierung von Forschung und Entwicklung ..... 19

1.8 Arylaminoalkohole als Arzneistoffe ..... 21

1.8.1 Chinin, Mefloquin, Halofantrin und Lumefantrin ..... 21

1.8.2 Neue Arylaminoalkohol-Analoga ..... 23

1.8.3 Wirkmechanismus der Arylaminoalkohole ..... 25

2 Zielsetzung ..... 26

3 Ergebnisse und Diskussion ..... 29

3.1 Synthese der Aza-basierten 3-Hydroxypropanamidinderivate ..... 29
3.1.1 Synthese des phenanthrolinbasierten 3-Hydroxypropanamidins ..... 29
3.1.2 Synthese der phenanthridinbasierten 3-Hydroxypropanamidine ..... 33
3.1.3 Synthese und biologische Evaluation der 3-Hydroxypropanamidine ..... 39
3.2 Synthese des Lumefantrin-basierten 3-Hydroxypropanamidins **LVIII** ..... 116
3.2.1 Retrosynthese des Lumefantrin-basierten 3-Hydroxypropanamidins **LVIII** ..... 116
3.2.2 Literaturübersicht zur Darstellung von Lumefantrin **XXII** ..... 118
3.2.3 Synthese und Diskussion des Lumefantrin-basierten 3-Hydroxypropanamidins . 120
3.3 Synthese des Pyronaridin-basierten 3-Hydroxypropanamidins ..... 131
3.3.1 Retrosynthese des Pyronaridin-basierten 3-Hydroxypropanamidins ..... 131
3.3.2 Literaturübersicht zur Darstellung von Pyronaridin ..... 132
3.3.3 Synthese und Diskussion des Pyronaridin-basierten 3-Hydroxypropanamidins .. 133
4 Zusammenfassung und Ausblick ..... 141
5 Experimenteller Teil ..... 146
5.1 Angaben zu allgemeinen Versuchsbedingungen und Analytik ..... 146
5.2 Synthese des Lumefantrinderivats **7w** ..... 148
5.2.1 Synthese von 5-Chlor-2-iod-3-methylbenzoesäure **8** ..... 148
5.2.2 Synthese von Methyl-5-chlor-2-iod-3-methylester **10** ..... 149
5.2.3 Synthese von Methyl-4,4'-dichlor-6-methyl-[1,1'-biphenyl]-2-carboxylat **11** ..... 150
5.2.4 Synthese von 4,4'-Dichlor-6-methyl-[1,1'-biphenyl]-2-carboxylsäure **9** ..... 151
5.2.5 Synthese von 2,7-Dichlor-4-methyl-9*H*-fluoren-9-on **13** ..... 152
5.2.6 Synthese von 2,7-Dichlor-4-methyl-9*H*-fluoren **14** ..... 153
5.2.7 Synthese von (*Z*)-2,7-dichlor-9-(4-chlorobenzyliden)-4-methyl-*9H*-fluoren **1w** .... 154
5.2.8 Synthese von 2-Chlor-1-(2,7-dichlor-*9H*-fluoren-4-yl)ethan-1-on **16** ..... 155
5.2.9 Synthese von 2-(2,7-Dichlor-*9H*-fluoren-4-yl)oxiran **17** ..... 156
5.2.10 Synthese von 3-(2,7-Dichlor-9-oxo-*9H*-fluoren-4-yl)-3-hydroxypropannitril **18** .. 157
5.2.11 Synthese von (*Z*)-2-(2,7-Dichlor-9-(4-chlorobenzyliden)-9*H*-fluoren-4-yl)oxiran **20** ..... 158
5.2.12 Synthese von (*Z*)-3-(2,7-Dichlor-9-(4-chlorobenzylidene)-*9H*-fluoren-4-yl)-3-hydroxypropanenitril **3w** ..... 159

5.3 Synthese des Pyronaridinderivats **7x** ..... 160
5.3.1 Synthese von 7-Chlor-2-methoxy-10-methylbenzo[*b*]-1,5-naphthyridin **1x** ..... 160
5.3.2 Synthese von Methoxybenzo[*b*][1,5]naphthyridin-10-carbaldehyd **2x** ..... 161
5.3.3 Synthese von 3-(7-Chlor-2-methoxybenzo[*b*][1,5] naphthyridin-10-yl)-3-hydroxypropanenitril **3x** ..... 162
5.4 Synthese des Phenanthrolinderivats **4a** ..... 163
5.4.1 Synthese von 6-Methyl-1,7-phenanthrolin **1a** ..... 163
5.4.2 Synthese von 1,7-Phenanthrolin-6-carbaldehyd **2a** ..... 164
5.4.3 Synthese von 3-Hydroxy-3-(1,7-phenanthrolin-6-yl)propanenitril **3a** ..... 165
5.5 Synthese der Phenanthridinderivate **4b-e** ..... 166
5.5.1 Synthese von 4,4'-Difluor-2-nitro-1,1'-biphenyl **5** ..... 166
5.5.2 Synthese von 4,4'-Difluor-[1,1'-biphenyl]-2-amin **6** ..... 167
5.5.3 Synthese von *N*-(4,4'-Difluor-[1,1'-biphenyl]-2-yl)acetamid **7** ..... 168
5.5.4 Synthese von 3,8-Difluor-6-methylphenanthridin **1e** ..... 169
5.5.5 *AAV 1*: Synthese der Methylphenanthridine **1b-1d** ..... 170
5.5.6 *AAV 2*: Synthese der Phenanthridincarbaldehyde **2b-e** ..... 174
5.5.7 *AAV* 3: Synthese der Phenanthridinnitrile **3b-d** ..... 179
5.5.8 Synthese von 3-(3,8-Difluorphenanthridin-6-yl)-3-hydroxypropannitril **3e** ..... 183
5.6 Synthese der 3-Hydroxypropanamidine **4a-e** und **7a-v** ..... 184
5.6.1 *AAV* 4: Synthese der 3-Hydroxypropanamidine **4a-e** und **7a-s** ..... 184
5.6.2 *AAV* 5: Synthese der 3-Hydroxypropanamidine **(7t, 7u)** ..... 210
*N,N*- ..... 211
6 Literaturverzeichnis ..... 213

# Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| AAV | Allgemeine Arbeitsvorschrift |
| ACN | Acetonitril |
| ACT | (engl.) *artemisinin-based combination therapy*, Artemisinin-basierte Kombinationstherapie |
| AMA1 | (engl.) *Apical membrane antigen 1*, apikales Membranantigen 1 |
| AMF | *Against Malaria Foundation* |
| AS01 | Liposomales Adjuvanssystem AS01 |
| AUC | (engl.) *area under the curve*, integrierte chromatographische Peakfläche (HPLC) |
| ber. | berechnet |
| BMGF | *Bill & Melinda Gates Foundation* |
| $CDCl_3$ | deuteriertes Chloroform |
| CSP | (engl.) *circumsporozoite protein*, Circumsporozoitenprotein |
| d | Dublett |
| DC | Dünnschichtchromatographie |
| DCM | Dichlormethan |
| dd | Dublett von Dubletts |
| ddd | Dublett von Dubletts von Dubletts |
| DDQ | 2,3-Dichlor-5,6-dicyan-1,4-benzochinon |
| ddt | Dublett von Dubletts von Tripletts |
| DEET | *N*,*N*-Diethyl-3-methylbenzamid |
| dh | Dublett von Heptetts |
| DMF | *N*,*N*-Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DMSO-$d_6$ | deuteriertes Dimethylsulfoxid |
| DNA | (engl.) *deoxyribonucleic acid*, Desoxyribonukleinsäure |
| dp | Dublett von Pentetts |
| dqd | Dublett von Quartetts von Dubletts |
| dt | Dublett von Tripletts |
| eEF2 | (engl.) *Eukaryotic elongation factor 2*, eukaryotischer Elongationsfaktor 2 |
| ESI | (engl.) *Electrospray ionization*, Elektrosprayionisation |
| *et al.* | (lat.) *et alii, et aliae, et alia,* und andere |
| E/Z | Entgegen/zusammen (Konfigurationsdeskriptoren für Doppelbindungen) |

| | |
|---|---|
| FDA | *Food and Drug Administration,* US-Behörde für Lebens- und Arzneimittel |
| FGI | (engl.) *functional group interconversion,* Funktionelle Gruppeninterkonversion |
| FPIX | Ferriprotoporphyrin IX |
| g | Gramm |
| G6PD | Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase |
| GAF | (engl.) *Gametocyte Activating Factor*, Gametozyten-Aktivierungsfaktor |
| gef. | gefunden |
| GSK | GlaxoSmithKline |
| h | Stunden |
| HBsAg | (engl.) *hepatitis B surface antigen*, Hepatitis-B-Oberflächenantigen |
| HepG2 | humane Hepatozellkarzinom-Zelllinie |
| hept | Heptett |
| hERG | (engl.) *human ether-à-go-go-related gene* |
| HPLC | (engl.) *High-Performance Liquid Chromatography,* Hochleistungsflüssigkeitschromatographie |
| HR-MS | (engl.) High Resolution Mass Spectrometry, hochauflösende Massenspektrometrie |
| HSPG(s) | (engl.) *heparan sulfate proteoglycan(s)*, Heparansulfat-Proteoglykan(e) |
| HV | Hochvakuum |
| Hz | Hertz |
| IBX | 2-Iodoxybenzoesäure |
| $IC_{50}$ | halbmaximale inhibitorische Konzentration (50 % Hemmung) |
| IPr | 1,3-Bis(2,6-diisopropylphenyl)imidazol-2-yliden (NHC) |
| L6 | Rattenmyoblasten-Zelllinie L6 |
| LC-MS | (engl.) *Liquid chromatography-mass spectrometry* Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung |
| LDA | Lithiumdiisopropylamid |
| m | Multiplett |
| MEF | (engl.) *Mosquito Exflagellation Factor*, Exflagellationsfaktor der Mücke |
| MeOH | Methanol |
| MHz | Megahertz |
| min | Minuten |

| | |
|---|---|
| mL | Milliliter |
| MMV | *Medicines for Malaria Venture* |
| mol% | Molprozent |
| MPL | Monophosphoryl-Lipid A |
| MS | Massenspektrometrie |
| MSD | (engl.) *Mean survival days*, mittlere Überlebenszeit in Tagen |
| MSP1 | (engl.) *Merozoite surface protein 1*, Merozoiten-Oberflächenprotein 1 |
| m/z | Masse-zu-Ladung-Verhältnis (Massenspektrometrie) |
| NBS | *N*-Bromsuccinimid |
| *n*-BuLi | n-Butyllithium |
| NHC | *N*-heterocyclisches Carben |
| $^{n}J$ | Kopplungskonstante über n Bindungen (NMR) |
| nM | nanomolar |
| NMR | (engl.) *nuclear magnetic resonance*, Kernspinresonanz |
| NP | (engl.) *normal phase*, Normalphase (Chromatographie) |
| *P.* | *Plasmodium* |
| *p.o.* | (lat.) *per os,* orale Verabreichung |
| Pd/C | Palladium auf Aktivkohle |
| *Pf*3D7 | *P. falciparum*, Laborklon 3D7 (chloroquinsensitiv) |
| *Pf*7G8 | *P. falciparum*, Laborklon 7G8 |
| *Pf*CRT | (engl.) *Plasmodium falciparum* chloroquin resistance transporter, *Plasmodium falciparum* Chloroquin-Resistenztransporter |
| *Pf*Dd2 | *P. falciparum,* Laborklon Dd2 (multiresistent) |
| *Pf*EEF | exoerythrozytäre Formen von P. falciparum (Leberstadien) |
| *Pf*EMP1 | (engl.) *Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1*, *Plasmodium falciparum* Erythrozytenmembranprotein-1 |
| *Pf*ESG | (engl.) *Plasmodium falciparum early-stage gametocytes*, frühe Gametozytenstadien von *P. falciparum* |
| *Pf*K1 | *P. falciparum,* Laborklon K1 |
| *Pf*LSG | (engl.) *Plasmodium falciparum late-stage gametocytes*, späte Gametozytenstadien von *P. falciparum* |
| *Pf*MDR1 | (engl.) *Plasmodium falciparum* multidrug resistance protein 1 |
| *Pf*NF54 | *P. falciparum*, Laborstamm NF54 |
| *Pf*RSG | reife Gametozytenstadien von *P. falciparum* |
| PI4K | Phosphatidylinositol-4-Kinase |
| *Plasmodium spp.* | (engl.) *Plasmodium species* |
| PMD | *p*-Menthan-3,8-diol |

| | |
|---|---|
| PPIX | Protoporphyrin IX |
| ppm | (engl.) *Parts per million*, Millionstel (NMR: chemische Verschiebung) |
| PRR | (engl.) *Parasite Reduction Ratio*, parasitenreduktionsverhältnis |
| q | Quartett |
| qd | Quartett von Dubletts |
| R | Rest |
| ROS | (engl.) *reactive oxygen species*, reaktive Sauerstoffspezies |
| RP | (engl.) *reversed* phase, Umkehrphase (Chromatographie) |
| RT | Raumtemperatur |
| RTS,S | Rekombinanter CSP-/HBsAg-basierter Malariaimpfstoff-Antigenkomplex |
| s | Singulett |
| SD | (engl.) *standard deviation*, Standardabweichung |
| SI | Selektivitätsindex |
| $S_NAr$ | (engl.) *nucleophilic aromatic substitution*, nukleophile aromatische Substitutionsreaktion |
| SRI | *Stanford Research Institute* (heute SRI International) |
| T | Temperatur |
| t | Zeit; Triplett (bei NMR) |
| TBV | (engl.) *transmission-blocking vaccine*, Transmission-blockierender Impfstoff |
| TCP | (engl.) *target candidate profile(s)*, Wirkstoff-Kandidatenprofile |
| *tert* | *Tertiär* |
| TFA | (engl.) *trifluoroacetic acid*, Trifluoressigsäure |
| THF | Tetrahydrofuran |
| TMB | Trimethylboroxin |
| TMSAN | Trimethylsilylacetonitril |
| TPP | (engl.) *Target Product Profiles*, Zielproduktprofile |
| TRAP | (engl.) *thrombospondin-related anonymous protein,* thrombospondinverwandtes Adhäsionsprotein |
| tt | Triplett von Tripletts |
| UK FCDO | *UK Foreign, Commonwealth & Development Office* (britisches Außen- und Entwicklungsministerium) |
| UV | Ultraviolett |
| v/v | Volumen/Volumen-Verhältnis |
| WHO | *World Health Organization*, Weltgesundheitsorganisation |
| $\delta$ | chemische Verschiebung |

| | |
|---|---|
| °C | Grad Celsius |
| 3-HPA | 3-Hydroxypropanamidin |

Bei der Erstellung und Überarbeitung des Abkürzungsverzeichnisses wurde ChatGPT (OpenAI, 2026) unterstützend zur Identifikation fehlender Abkürzungen, alphabetischer Sortierung und sprachlicher Vereinheitlichung eingesetzt.

# 1 Einleitung

Die Weltgesundheitsorganisation berichtet im *World Malaria Report 2025* bezogen auf das Jahr 2024 bei insgesamt rund 282 Millionen Neuinfektionen von etwa 610.000 Todesfällen durch Malaria. Bei Malaria handelt es sich um eine tropische Infektionskrankheit. Die Krankheit wird durch infizierte weibliche Stechmücken der Gattung *Anopheles* auf den Menschen übertragen.[1,2] Verursacht wird Malaria dabei von *Plasmodien*. Dies sind Parasiten, die zur Gattung der einzelligen Eukaryoten gehören.[2] Derzeit sind fünf verschiedene humanpathogene Arten von *Plasmodien* bekannt. Diese fünf Arten sind *Plasmodium vivax (P. vivax)*, *Plasmodium ovale (P. ovale)*, *Plasmodium malariae (P. malariae)*, *Plasmodium knowlesi (P. knowlesi)* und *Plasmodium falciparum (P. falciparum)*.[3]

Neben Subsahara-Afrika, wo die meisten Malariafälle auftreten, zeigt vor allem Südostasien im Jahr 2024 laut *World Malaria Report 2025* einen hohen Anteil an den weltweit aufgetretenen Malariainfektionen (Abbildung 1).[4]

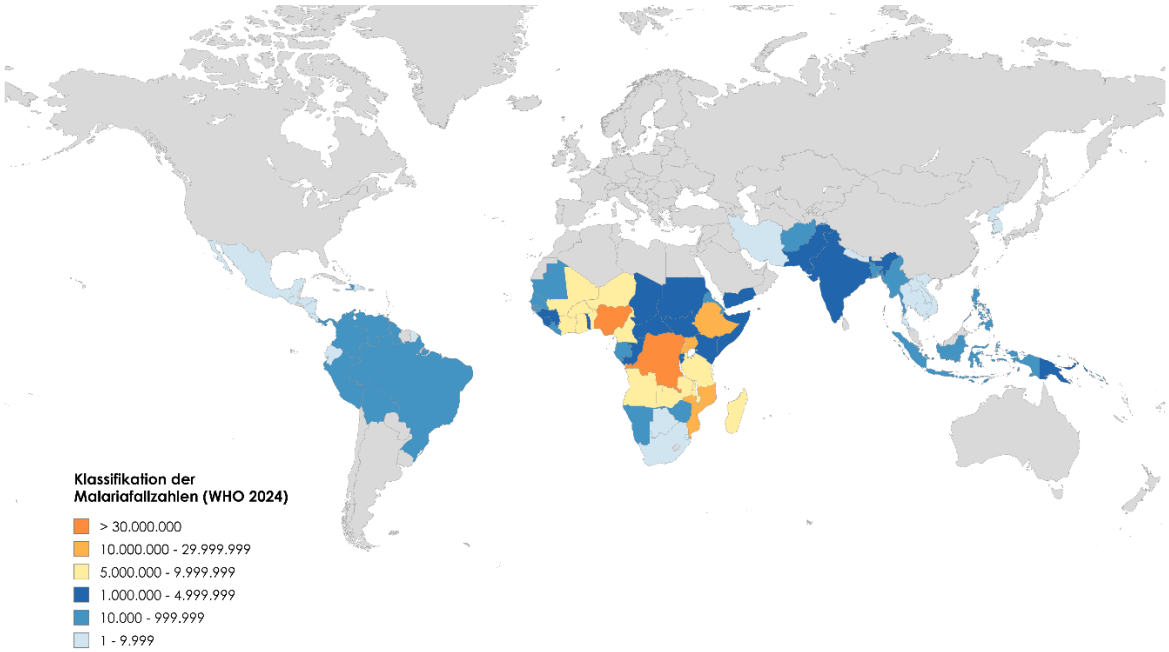



*Abbildung 1: WHO-berichtete Schätzungen der Malariafallzahlen für 2024 nach Ländern (World Malaria Report 2025).*[4]

Neben den durch die WHO beschriebenen fünf humanpathogenen *Plasmodium*-Arten wurden in den letzten Jahren zunehmend auch zoonotische Infektionen durch *Plasmodium cynomolgi (P. cynomolgi)*, *Plasmodium inui (P. inui)* und *Plasmodium simium (P. simium)* beschrieben. Die klinischen Verläufe der durch diese *Plasmodien*-Stämme hervorgerufenen Infektionen sind überwiegend mild.[5,6,7] Auch wenn diesen Erregern epidemiologisch zum jetzigen Zeitpunkt noch eine geringe Bedeutung zugeschrieben wird, zeigt die Existenz solcher zoonotischen

Malariaerreger deutlich die Notwendigkeit wirksamer Kontrollstrategien sowie einen Bedarf an neuen antiplasmodialen Wirkstoffen.[8,9]

Zwar ist die globale Malariabelastung seit dem Jahr 2000 deutlich zurückgegangen, jedoch zeigte sich in den letzten Jahren wieder ein leichter Anstieg der Fall- und Todeszahlen. Die für das Jahr 2024 angenommenen 610.000 Todesfälle bedeuten einen Anstieg um etwa 12.000 Todesfälle gegenüber 2023. Dabei gehen 85 % des Anstiegs auf die Länder Madagaskar, Äthiopien und Jemen zurück. Die steigenden Fall- und Todeszahlen lassen sich beispielsweise mit Bevölkerungswachstum, klimatischen Veränderungen sowie bewaffneten Konflikten und den daraus resultierenden Einschränkungen der Gesundheitsversorgung erklären. Auch Resistenzen sowohl gegen Antimalariamittel als auch gegen Insektizide stellen eine Ursache für den Anstieg dar.[4]

## 1.1 *Plasmodium species (Plasmodium spp.)* als Erreger von Malaria

Die Gattung *Plasmodium spp.* umfasst einzellige Parasiten. Diese werden typischerweise durch weibliche Stechmücken der Gattung *Anopheles* (Familie *Culicidae*) übertragen.[10] Die Malaria-Infektion des Menschen durch die fünf humanpathogenen Erreger (*P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. falciparum* und *P. knowlesi)* erfolgt in erster Linie durch einen Stich einer weiblichen Anophelesmücke.[11,8]

### 1.1.1 Arten

Es werden über 200 verschiedene Arten von *Plasmodien* unterschieden, von denen jedoch lediglich fünf humanpathogen sind.[12] Andere Arten können beispielsweise Mäuse und Ratten (*Plasmodium berghei*, *Plasmodium vinckei*) oder Vögel (*Plasmodium relictum*) befallen.[13,14] Dabei wird *Plasmodium berghei* aufgrund seiner guten Eignung in Mausmodellen häufig als Modellorganismus in der präklinischen Entwicklung neuer Antimalariamittel eingesetzt.[15] Darüber hinaus existieren einige ursprünglich bei nicht-menschlichen Primaten vorkommende Arten (*P. cynomolgi, P. inui und P. simium),* die gelegentlich jedoch auch auf den Menschen übergehen können.[16,17,18]

### 1.1.2 Lebenszyklus

Der Lebenszyklus der Plasmodien beginnt mit der ungeschlechtlichen Vermehrung im Wirbeltier (exoerythrozytäre und erythrozytäre Phase) sowie einer geschlechtlichen Vermehrung in der *Anopheles*-Mücke. Dazu ist ein Wirtswechsel zwischen Insekt und Wirbeltier notwendig.[19,20] Aufgrund der Ähnlichkeit der Lebenszyklen der humanpathogenen *Plasmodium*-Arten wird im Folgenden exemplarisch der Zyklus von *P. falciparum,* dem Erreger mit den schwersten bis zu potenziell letalen Malariaverläufen, diskutiert (*Abbildung* 2).

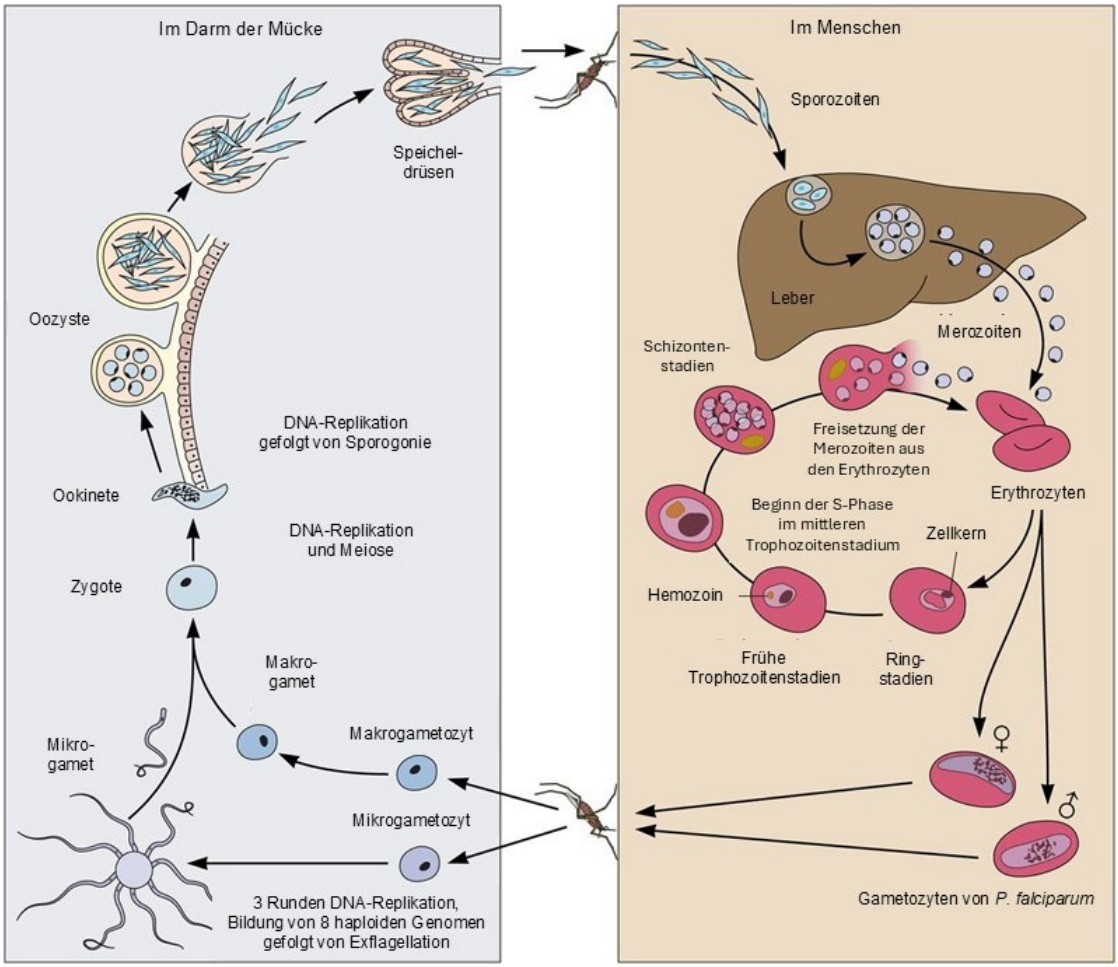



*Abbildung 2: Lebenszyklus der Plasmodien in der Mücke sowie im menschlichen Körper.*[21]

### *Exoerythrozytäre Phase*

Der initiale Stich einer Stechmücke überträgt im geometrischen Mittel zwischen 4.5 (*Anopheles gambiae*) und 5.4 (*Anopheles stephensi*) infektiöse Sporozoiten von der Speicheldrüse der Stechmücke auf den Menschen, wobei die tatsächliche Anzahl stark schwanken kann.[22,23,24] Von dort aus gelangen die in die Dermis injizierten Sporozoiten infolge eines hämatogenen oder lymphatischen Transports in die Hepatozyten und vermehren sich dort.[25] Bei Eintritt in das lymphatische System besteht neben dem Transport in die Hepatozyten auch die Möglichkeit des Transports der Sporozoiten in die Lymphknoten. Hier resultiert ein Abbau durch dendritische Zellen oder die Sporozoiten werden in exoerythrozytäre Formen überführt, die letztlich phagozytiert werden können.[26,27] Bei der Beförderung der Sporozoiten von der Dermis in die Leber wurde ursprünglich angenommen, dass die Sporozoiten die Leber innerhalb weniger Minuten erreichen. Eine Studie des *Plasmodium yoelii* im Nagetier zeigte jedoch, dass ein Großteil der infektiösen Sporozoiten über Stunden an der Injektionsstelle verweilt und nur sehr langsam in den Blutkreislauf übergeht.[25] In der Leber angekommen, infizieren die Sporozoiten die Hepatozyten und verweilen dort für neun bis 16 Tage. Einige humanpathogene Plasmodienarten können in

diesem Stadium Hypnozoiten ausbilden. Es handelt sich dabei um dormeszente Formen, die über Monate persistieren und zu Malariarezidiven führen können. Zu den humanpathogenen Formen, die Hypnozoiten ausbilden, gehören *P. vivax* und *P. ovale*.[28,29] Infolge der Invasion der Hepatozyten erfolgt die asexuelle Replikation beziehungsweise die exoerythrozytäre Schizogonie.[2] Dazu interagieren das Circumsporozoit-Protein (CSP) sowie das Thrombospondin-verwandte Haft-Protein (TRAP), die auf der Oberfläche der Sporozoiten lokalisiert sind, mit den Heparansulfat-Proteoglykanen (HSPGs) auf den Hepatozyten.[30] Die an die HSPG haftenden Sporozoiten gelangen über die Kupffer-Zellen in den Raum zwischen sinusoidem Endothel und Hepatozyten, den sogenannten Disse-Raum und können von dort in die Hepatozyten eindringen.[27] Die exoerythrozytäre Vermehrung von *P. falciparum* verläuft bei Menschen symptomfrei.[31]

Jeder Sporozoit kann in Hepatozyten mehrere tausend Merozoiten erzeugen. Merozoiten sind invasive Entwicklungsstadien des *Plasmodium*, die bei der ungeschlechtlichen Vermehrung entstehen und Erythrozyten infizieren.[32] Nach Freisetzung aus der Leber befallen die Merozoiten die roten Blutkörperchen und leiten die erythrozytäre Phase der Malaria ein. Dazu schützen die von den Hepatozyten abgeleiteten Merosomen die Merozoiten vor dem Immunsystem und transportieren diese ins Blut.[2]

### *Erythrozytäre Phase*

Der Invasionsprozess, bei dem die Merozoiten die Erythrozyten befallen, gliedert sich in vier Phasen. Bei einer Ersterkennung erfolgt zunächst eine reversible Anlagerung der Merozoiten an die Erythrozytenmembran. Nach einer Neuorientierung ergibt sich schließlich eine irreversible Bindung zwischen dem apikalen Ende des Merozoiten und dem Erythrozyten.[33] Für die Bindungsbildung sind Rhoptrien und Mikroneme als sekretorische, parasitäre Organellen im apikalen Ende des Protozoons von Bedeutung.
Es wird vermutet, dass das Mikronem die Erythrozytenbindung initiiert, woraufhin das Rhoptrium Proteine sekretiert und eine Vakuole erzeugt. Diese Vakuole stellt ein intrazelluläres Kompartiment dar, in dem der Parasit überleben kann.[34,35,36] Innerhalb dieser parasitären Vakuole entwickeln sich zuerst Trophozoiten im Ringstadium, die sich zu ausgereiften Trophozoiten fortentwickeln.[37]

Beim Abbau von Hämoglobin werden Aminosäuren gewonnen, die der Parasit zur Proteinbiosynthese benötigt.[38] Dabei wird zudem die Häm-Gruppe freigesetzt, die in der Nahrungsvakuole in Form von Ferriprotoporphyrin IX (FPIX) vorliegt. Dieses Zwischenprodukt ist toxisch für den Parasiten, da es eine reaktive Sauerstoffspezies (ROS) erzeugt und infolgedessen oxidativen Stress verursacht. Daher polymerisiert der Parasit FPIX zu schwerlöslichen Hämozoinkristallen, die für den Parasiten nicht toxisch sind.[39,40,41]
Aus den ausgereiften Trophozoiten entstehen Tochtermerozoiten, die durch das Platzen der parasitären Vakuole in den Blutkreislauf übergehen und erneut Erythrozyten invadieren

können.[42]

Das Freisetzen der Merozoiten erfolgt hierbei bei *P. falciparum* nach 48 Stunden.[2] Dieser Zyklus wiederholt sich mehrfach, bevor eine Entwicklung zu männlichen Mikrogametozyten und weiblichen Makrogametozyten erfolgt.[42,43]

Bei *P. falciparum* dauert die Gametozytogenese zehn bis zwölf Tage an.[2] Der Teil der Parasiten, der sich zur geschlechtlichen Spezies differenziert, kann sich in Abhängigkeit von Wirts- und Umweltfaktoren verändern. So tritt unter ungünstigen Bedingungen, wie medikamentösen Stress oder immunologischen Druck, ein erhöhter Anteil der Trophozoiten nicht in die asexuelle Replikation ein, sondern entwickelt sich zu Gametozyten *(*Abbildung 2*)*.[44]

### *Sporogonie*

Beim Stich einer Stechmücke im Rahmen einer Blutmahlzeit werden von der Stechmücke Gametozyten aufgenommen, die in den Mitteldarm der Mücke gelangen. Hier startet die Gametogenese, die durch die sich im Mitteldarm der Mücke abrupt veränderten physikochemischen Bedingungen ausgelöst wird. Zu diesen Bedingungen zählen vor allem ein Temperaturabfall, ein Anstieg des pH-Werts sowie mückenabgeleitete Aktivierungsfaktoren wie der Gametocyte Activating Factor (GAF) und der Mosquito Exflagellation Factor (MEF).[45] Aus den Mikrogametozyten entwickeln sich Mikrogameten und aus den Makrogametozyten entstehen Makrogameten.[46] Die weiblichen und männlichen Gameten fusionieren, woraufhin sich eine Zygote bildet.[47] Aus der zunächst unbeweglichen Zygote entwickelt sich eine bewegliche Ookinete. Zudem wird die Blutmahlzeit durch Flüssigkeitsentzug konzentriert.

Das Mitteldarmepithel der Mücke sondert anschließend eine chitinhaltige, extrazelluläre, peritrophe Matrix ab, die die Blutmahlzeit umgibt. Es entsteht ein äußerer und ein innerer peritropher Raum.[48]

Die Ookineten erreichen den äußeren peritrophen Raum, indem sie die lokale extrazelluläre peritrophe Matrix mit Chitinasen auflösen.[49] Durch letztendliches Eindringen der Ookineten in die äußere Darmschleimhaut entstehen Oozysten.[50,51] Beim Platzen der Oozyte werden Sporozoiten freigesetzt, die zur Speicheldrüse migrieren.[52] Der Zyklus beginnt erneut *(Abbildung 3).*

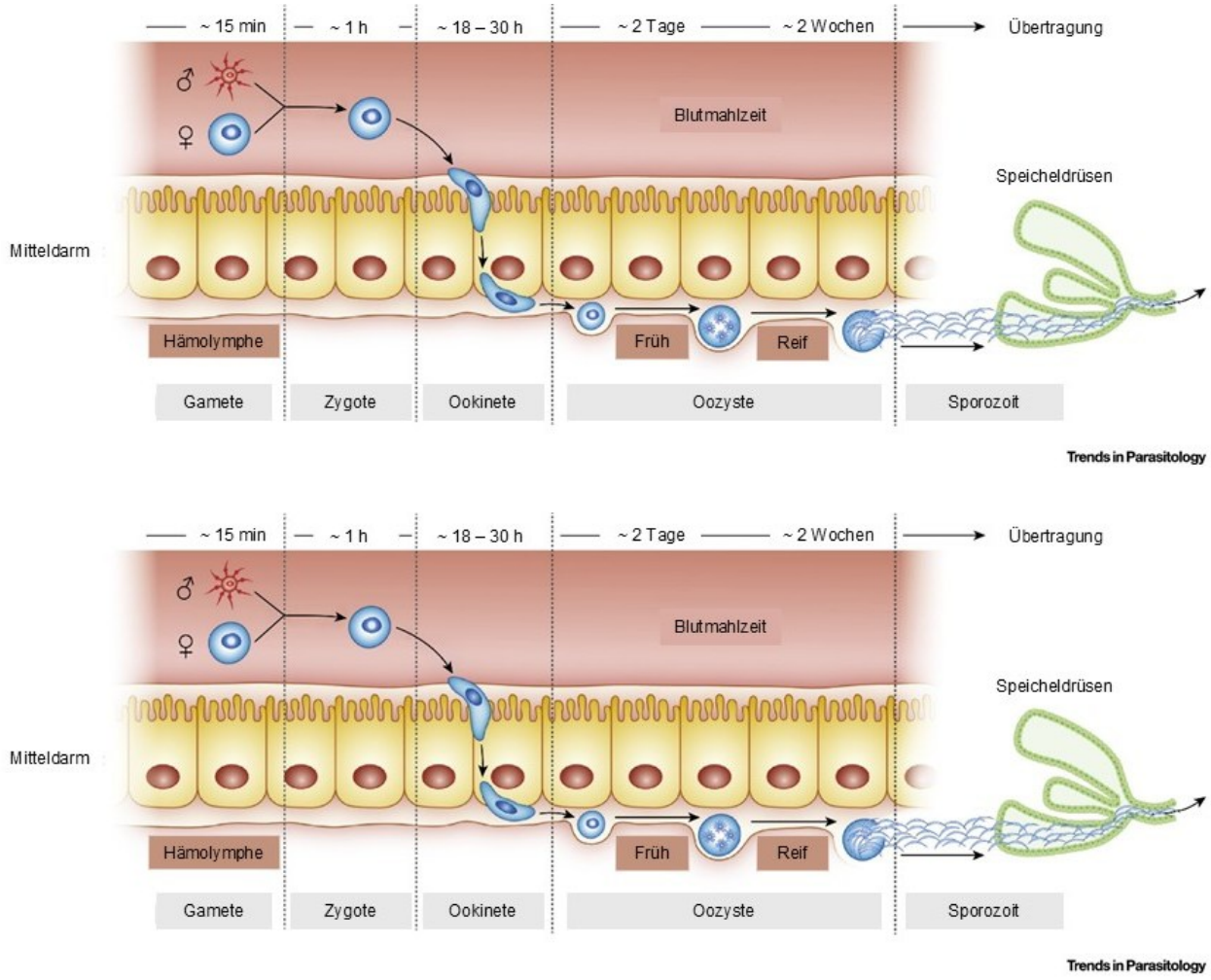



*Abbildung 3: Entwicklung des Parasiten in der Stechmücke durch geschlechtliche Vermehrung.*[53]

## 1.2 Einteilung der Malaria-Arten

Malaria stellt weiterhin in vielen Ländern Subsahara-Afrikas eine der häufigsten Todesursachen dar. Eine schnelle Diagnose ist daher außerordentlich wichtig. Hervorgerufen durch die erythrozytären Phasen der bereits erwähnten fünf humanpathogenen Arten (*P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. knowlesi* und *P. falciparum)*, treten unspezifische Symptome wie Fieber, Kopfschmerzen, Schüttelfrost, Gliederschmerzen, Übelkeit sowie Erbrechen auf.[11,54,55]

### 1.2.1 *Malaria tropica*

Die klinisch schwerste Verlaufsform der Malaria ist die durch das *P. falciparum* hervorgerufene *Malaria tropica*.[56] Die klinische Inkubationszeit liegt zwischen sechs und 30 Tagen.[57] Besteht eine Teilimmunität, kann die Inkubationszeit sogar mehrere Jahre betragen. Eine Teilimmunität tritt bei Personen auf, die zu einem früheren Zeitpunkt bereits mit dem Erreger infiziert wurden.[58] Typische Symptome sind zunächst schwierig zuzuordnen, da sie unspezifisch sind. Auftreten können beispielsweise Kopfschmerzen, Schwindel, Diarrhoe, Abgeschlagenheit und Schüttelfrost. Im Verlauf können lebensbedrohliche Komplikationen

auftreten, die eine schwere Form der Malaria kennzeichnen, darunter beispielsweise Dyspnoe, Krampfanfälle oder Lungenödeme.[59] Zu den gravierendsten Komplikationen der *Malaria tropica* gehört zudem die zerebrale Malaria. Diese entsteht durch die Sequestration von parasitären Erythrozyten in die zerebralen Kapillaren.[60] Als Folge entstehen Mikrozirkulationsstörungen, die unter anderem zu Krampfanfällen und Bewusstseinsstörungen sowie Koma mit teilweise anhaltenden neurologischen Defiziten führen können.[61] Die Sequestration wird durch parasitäre Proteine, wie z.B. *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1 (*Pf*EMP1), an der Erythrozytenmembran vermittelt. Diese Proteine fungieren als Liganden zu Gefäßendothelrezeptoren, woraus eine fast vollständige Sequestration der Erythrozyten, die mit heranreifenden Blutschizonten befallen sind, resultiert.[62] Die gegenüber anderen Formen der Malaria hohe Sterberate beruht bei der *Malaria tropica,* neben diesen Pathomechanismen zudem auf einer asynchronen Vermehrung des Erregers, sodass alle Erythrozyten befallen werden können.[63]

### 1.2.2 *Malaria tertiana*

Die *Malaria tertiana* wird durch die Erreger *P. ovale* und *P. vivax* hervorgerufen. Die Inkubationszeit liegt zwischen zehn und 20 Tagen. Charakteristisch für die *Malaria tertiana* ist das Auftreten von Fieberschüben, die alle 48 Stunden auftreten. Diese Fieberschübe werden von Symptomen, die einem grippalen Infekt ähneln, begleitet und enden häufig nach drei bis vier Stunden plötzlich.[64] Außerdem treten bei der *Malaria tertiana* im Vergleich mit anderen Malariaformen häufiger Rückfälle auf, die sich auf die Reaktivierung von ruhenden Hypnozoiten zurückführen lassen.[65]

### 1.2.3 *Malaria quartana*

*Malaria quartana* wird durch das *P. malariae* verursacht und weist eine Inkubationszeit von 16 bis 50 Tagen auf. Auch diese Form der Malaria weist typische Fieberschübe auf, die charakteristischerweise alle 72 Stunden auftreten.[66] Zumeist verläuft die *Malaria quartana* komplikationslos.[57] Selten führt sie zu Nierenschäden, wie etwa akutem Nierenversagen.[67]

### 1.2.4 *Knowlesi*-Malaria

Die *Knowlesi*-Malaria ist in Südostasien vertreten und tritt hauptsächlich bei Affen auf. Sie kann jedoch auch auf den Menschen übertragen werden.[68] Die Inkubationszeit beträgt etwa 12 Tage.[66] Fieberschübe treten in einem Intervall von 24 Stunden auf.[69, 70]

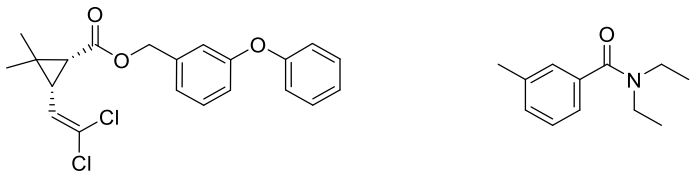
## 1.3 Malaria-Prophylaxe

Bei geplanten Aufenthalten in Malaria-Risikogebieten werden Präventionsmaßnahmen empfohlen, sowohl durch gezielte Expositionsprophylaxe als auch durch Chemoprophylaxe. Auch die Vorbereitung auf eine Infektion im Sinne einer Stand-by-Therapie kann in Regionen,

in denen eine schnelle medizinische Versorgung nicht gewährleistet ist, empfehlenswert sein.[71]

### 1.3.1 Maßnahmen zur Vermeidung von Moskitobissen

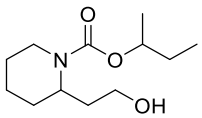
Moskitos stechen zwischen Sonnenuntergang und Sonnenaufgang, sodass in dieser Zeitspanne präventive Maßnahmen getroffen werden sollten. So wird empfohlen, nach Sonnenuntergang helle Kleidung mit langen Ärmeln und Hosenbeinen sowie Socken und Schuhe zu tragen.[72] Schlafbereiche sollten entweder abgeschirmt sein oder über Klimaanlagen verfügen. Der Einsatz von Moskitonetzen, die mit dem Insektizid Permethrin **I** behandelt wurden, wird empfohlen.[73] Auch Kleidung sollte mit Permethrin bearbeitet werden. Zudem wird das Auftragen von Mückenschutzmitteln auf die Haut empfohlen. *N,N*-diethyl-3-methylbenzamide (DEET) **II** gilt hierbei als eines der wirksamsten Hautrepellentien.[74] Der Wirkungsmechanismus von DEET **II** ist zum jetzigen Stand noch nicht ganzheitlich entschlüsselt. Es wird davon ausgegangen, dass DEET **II** elektrophysiologische Reaktionen der Geruchssinne der Moskitos blockiert.[75] Alternativen zu DEET **II** stellen Picaridin **III** (KBR3023) sowie das pflanzliche Repellens *p*-Menthan-3,8-diol (PMD) **IV** dar *(Abbildung 4)*.[76]



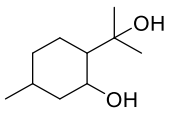

Permethrin **(I)**




DEET **(II)**




Picaridin **(III)**




PMD **(IV)**

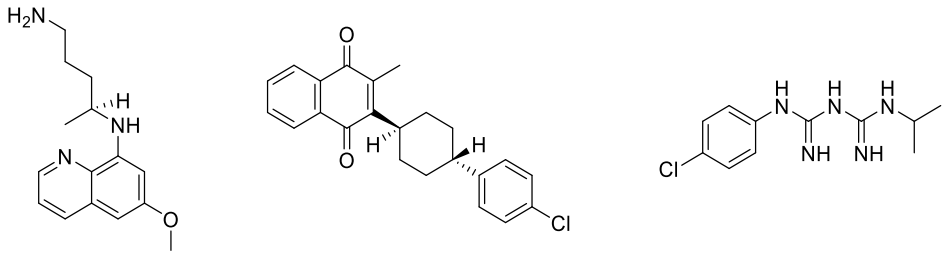
*Abbildung 4: Strukturformeln der Repellentien Permethrin **(I)**, DEET **(II)**, Picaridin **(III)** und PMD **(IV)**.*

### 1.3.2 Chemoprophylaxe

Ob und welche Arzneimittel prophylaktisch eingenommen werden sollten, hängt von der jeweiligen Region und der jeweiligen Erregerempfindlichkeit ab. Wenngleich durch die Gabe von antiparasitären, prophylaktischen Arzneimitteln kein vollständiger Schutz erzielt werden kann, so kann doch das Risiko eines fatalen Verlaufs reduziert werden.[77]

Prophylaktische Arzneimittel können an zwei Stellen in den Lebenszyklus von Malaria eingreifen. Sie verhindern die Infektion nicht wie eine sterilisierende Immunität, sondern wirken antiparasitär in den Hepatozyten (Leberstadium- oder kausale Prophylaxe) oder Erythrozyten (Blutstadium- bzw. suppressive Prophylaxe), sodass hierdurch die klinische Erkrankung verhindert wird.[78]

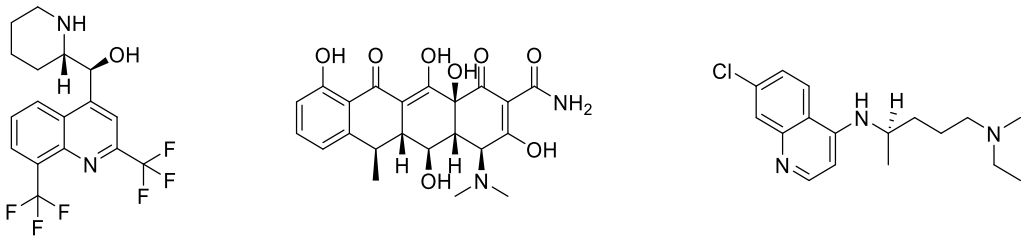
Eine kausalprophylaktische Chemoprophylaxe wirkt in der Leberphase des Parasiten. Da sie die hepatischen Entwicklungsstadien adressiert, kann die Einnahme eines kausalprophylaktischen Arzneimittels schon wenige Tage nach Verlassen des Expositionsgebiets beendet werden.[79] Mögliche Wirkstoffe für eine kausale Chemoprophylaxe sind Primaquin **V** und Atovaquon **VI**/Proguanil **VII** (Malarone®) (*Abbildung 5*). Primaquin **V** ist auch gegen Hypnozoiten effektiv und kann somit die spät ausgelösten Erkrankungen durch die Erreger *P. ovale* und *P. vivax* verhindern.[80]



Primaquin **(V)** Atovaquon **(VI)** Proguanil **(VII)**

*Abbildung 5: Strukturformeln von Primaquin **(V)**, Atovaquon **(VI)** und Proguanil **(VII)** als kausalprophylaktische Wirkstoffe.*

Im Gegensatz zur kausalen Chemoprophylaxe wirkt die suppressive Chemoprophylaxe auf die Blutstadien der Parasiten. Wirkstoffe, die suppressionsprophylaktisch wirken, müssen daher noch weitere vier Wochen nach der Exposition eingenommen werden.[79] Zu den suppressiv wirksamen Arzneimitteln zählen Mefloquin **VIII**, Doxycyclin **IX** und Chloroquin **X** *(Abbildung 6)*. Mefloquin **VIII**, als klassischer Vertreter der suppressiven Chemoprophylaxe, zeigt insbesondere gegen *P. falciparum* eine hohe Wirksamkeit, wird jedoch aufgrund neuropsychiatrischer Nebenwirkungen nur nach sorgfältiger Indikationsstellung eingesetzt.[57,81,82,83]



Mefloquin **(VIII)** Doxycyclin **(IX)** Chloroquin **(X)**

*Abbildung 6: Strukturformeln von Mefloquin **(VIII)**, Doxycyclin **(IX)** und Chloroquin **(X)** als suppressionsprophylaktische Wirkstoffe.*

## 1.4 Diagnose

Ein Verdacht auf Malaria ergibt sich nach der Befragung des Erkrankten sowie den Befunden aus der körperlichen Untersuchung. Gesichert werden kann ein solcher Verdacht im Rahmen mikroskopischer Untersuchungen dünner Blutausstriche (Giemsa-Färbung) und dem sogenannten „Dicken Tropfen“.[84] Im „Dicken Tropfen“ werden die Plasmodien angereichert

und können dadurch nachgewiesen werden. Die Bestimmung der Plasmodien-Spezies kann daraufhin über Anfärbung der Blutausstriche erfolgen.[85]

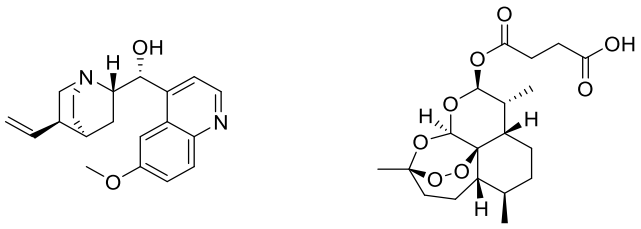
## 1.5 Therapie

Die Wahl einer geeigneten Therapie ist abhängig von der Art der Malaria, des Alters der erkrankten Person und dem Schweregrad der Erkrankung. Hinsichtlich des Schweregrades wird in die unkomplizierte und komplizierte Malaria unterteilt.[57]

### 1.5.1 Therapie der komplizierten Malaria

Eine komplizierte Malaria weist mindestens ein, häufig aber eine Kombination aus folgenden klinischen und laborchemischen Merkmalen auf:[86] Bewusstseinsstörung, azidotische Atmung, Hypoglykämie, akute Lungenödeme, Krampfanfälle oder eine Hyperparasitämie von über 10 %.[86]

Die komplizierte Malaria ist ein akut lebensbedrohlicher Zustand, der eine schnelle Therapie erfordert. Die Leitlinien der *WHO* empfehlen zur Behandlung einer komplizierten Malaria zunächst die parenterale Gabe von Artemisinin-basierten Kombinationstherapien (ACT). Eingesetzt werden neben Artemisinin-Derivaten auch Chinolin-Alkaloide wie Chinin (**XI**). Therapie der ersten Wahl ist die intramuskuläre oder intravenöse Gabe von Artesunat (**XII**), da dieses neben einem schnelleren Wirkeintritt und vereinfachter Handhabung gegenüber parenteralem Chinin (**XI**) in randomisierten klinischen Studien eine um 7 % verringerte Mortalität zeigte *(Abbildung 7).*[4,87,88]

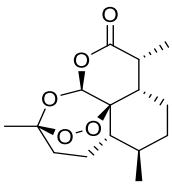



Chinin **(XI)** Artesunat **(XII)**

*Abbildung 7: Strukturformeln von Chinin **(XI)** und Artesunat **(XII)** zur Therapie von komplizierter Malaria.*

### 1.5.2 Therapie der unkomplizierten Malaria

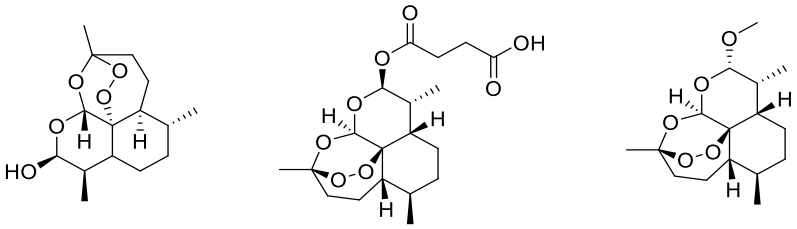
Als unkompliziert wird eine Malariaerkrankung definiert, wenn keine Kriterien einer komplizierten Malaria vorliegen. Zu den Kriterien einer komplizierten Malaria zählen beispielsweise eine Organdysfunktion oder Bewusstseinsstörungen.[4,86] Wird eine unkomplizierte Malaria diagnostiziert, erfolgt die Behandlung gemäß WHO-Leitlinien mit einer Artemisinin (**XIII**) *(Abbildung 8)*-basierten Kombinationstherapie (ACT). ACT bestehen aus einem schnell wirksamen Artemisinin-Derivat und einer langsameren, dafür länger wirkenden anderen Wirkstoffklasse (*Tabelle 1*).[4,81]



Artemisinin **(XIII)**

*Abbildung 8: Strukturformel von Artemisinin (**XIII**).*[89]

Nach den WHO-Richtlinien kommen als Artemisinin-basierte Wirkstoffe standardgemäß Dihydroartemisinin **XIV**, Artesunat **XII** und Artemether **XVI** (*Abbildung 9*) zum Einsatz.



Dihydroartemisinin **(XIV)** Artesunat **(XII)** Artemether **(XVI)**

*Abbildung 9: Strukturformeln von Dihydroartemisinin (**XIV**), Artesunat (**XII**) und Artemether (**XVI**).*

Mögliche Kombinationen sind beispielsweise mit den Wirkstoffen Lumefantrin, Mefloquin **VIII**, Amodiaquin oder Sulfadoxin-Pyrimethamin möglich (*Tabelle 1*).[81,90]

*Tabelle 1: Therapieempfehlungen der WHO bei unkomplizierter Malaria (modifiziert nach WHO).*[91]

| Artemisinin-basierter Wirkstoff | Kombinationspräparat |
|---|---|
| Artemether **XVI** | Lumefantrin **XXII** |
| Artesunat **XII** | Amodiaquin |
| Artesunat **XII** | Mefloquin **VIII** |
| Artesunat **XII** | Sulfadoxin-Pyrimethamin |
| Dihydroartemisinin **XIV** | Piperaquin |
| Artesunat **XII** | Pyronaridin **XXX** |

Vorteile der ACT sind ein schneller Wirkeintritt sowie eine anhaltende Parasitenreduktion. Die Kombination aus einem schnell wirksamen und einem lang wirkenden Arzneimittel macht eine vollständige Elimination der Parasiten möglich und erschwert die Bildung von Resistenzen.[92,93]

### 1.5.3 Stadien des Lebenszyklus von *Plasmodium spp.* als pharmakologisches und immunologisches Ziel

Der Lebenszyklus einer *Plasmodium*-Spezies ist komplex und umfasst mehrere Entwicklungsstadien, die sowohl im Menschen als auch in der Anophelesmücke ablaufen. Jedes dieser Stadien stellt ein mögliches therapeutisches Target dar.[19] Die verschiedenen

Lebenszyklen sind sowohl bei der Forschung an Impfstoffen als auch an neuen niedermolekularen Wirkstoffen zur akuten oder prophylaktischen Behandlung im Fokus der medizinalchemischen Entwicklung.[20,94]

### *Sporozoiten*

Nach dem Stich durch eine Anopheles-Mücke infiltrieren die Sporozoiten über den menschlichen Blutkreislauf die Hepatozyten und leiten dort die exoerythrozytäre Phase des Lebenszyklus ein.[95]

Sporozoiten nutzen im Rahmen der Invasion der Hepatozyten bestimmte parasitäre Oberflächenmoleküle, wie zum Beispiel das CSP.[96,97] Das CSP bindet an HSPG auf der Oberfläche des Hepatozyten und vermittelt so die Anheftung sowie anschließende Invasion der Leberzellen.[95,96,98]

Bereits 1992 beschrieben *Cerami* et al. das CSP und insbesondere dessen Region II als wichtiger Vermittler der Hepatozyteninvasion.[97] Durch Eingreifen in das präerythrozytäre Stadium kann eine Infektion möglicherweise unterbunden werden, da eine Unterbrechung der Invasion der Hepatozyten durch die Sporozoiten eine Infektion und damit die nachfolgende erythrozytäre Vermehrung verhindern kann.[99] *Cerami* et al. legten nahe, dass sich aufgrund dessen die Sporozoiteninvasion als mögliches immuno- und chemoprophylaktisches Ziel eignet.[97]

Bei diesem präerythrozytären Stadium setzt die Impfstoffentwicklung an. Der Impfstoff Mosquirix® (RTS,S/AS01) wurde von GlaxoSmithKline (GSK) in Zusammenarbeit mit der PATH Malaria Vaccine Initiative entwickelt und stellt den ersten zugelassenen Malaria-Impfstoff dar. Der Impfstoff setzt sich zusammen aus einer RTS,S-Komponente und dem Adjuvans AS01. RTS ist dabei das Fusionsprotein aus CSP und dem Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg). S bezeichnet den zusätzlichen HBsAg-Anteil zur Bildung virusähnlicher Partikel. Das Adjuvans AS01 ist ein Liposom-basiertes Adjuvanssystem mit Monophosphoryl-Lipid A (MPL) und QS-21 zur Verstärkung der Immunantwort.[99] Seit 2019 empfiehlt die WHO den Einsatz von Mosquirix® in Hochrisikogebieten (Malawi, Ghana, Kenia) im Rahmen von Pilotprojekten. 2021 erklärte die WHO eine generelle Empfehlung für den flächendeckenden Einsatz von Mosquirix® bei Kindern in endemischen Gebieten südlich der Sahara in Afrika.[100]

### *Leberphase*

Sind die Sporozoiten in die Hepatozyten eingedrungen, beginnt die exoerythrozytäre Phase. Während der exoerythrozytären Phase verläuft die Infektion typischerweise asymptomatisch, obwohl sich die Parasiten rasant vermehren. Arzneistoffe, die die Leberphase adressieren, wirken somit kausalprophylaktisch, noch bevor die Parasiten in den Blutkreislauf eintreten und Erythrozyten befallen.[101]

Die Hemmung der elektronentransportabhängigen mitochondrialen Funktionen im Parasiten bewirkt beispielsweise Malarone® (Atovaquon/Proguanil). Malarone® ist wirksam gegen alle *Plasmodium*-Arten, jedoch nicht gegen die Hypnozoiten, die von *P. vivax* und *P. ovale* gebildet werden.[102] Primaquin **V** und Tafenoquin sind die einzigen Arzneistoffe mit einer Wirksamkeit gegen Hypnozoiten. Die Wirksamkeit der beiden Wirkstoffe Primaquin **V** und Tafenoquin geht dabei auf Redoxreaktionen im Parasiten zurück, wobei der genaue Wirkmechanismus nicht gänzlich aufgeklärt ist.[101]

Sowohl Primaquin **V** als auch Tafenoquin können bei Personen mit einem Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD)-Mangel hämolytische Anämien auslösen, sodass vor Verabreichung der Wirkstoffe ein G6PD-Mangel ausgeschlossen werden muss.[103]

Die Identifikation weiterer Zielstrukturen in der Leberphase ist somit weiterhin erforderlich, da persistierende Hypnozoiten derzeit nur durch zwei Wirkstoffe, Primaquin **V** und Tafenoquin, adressiert werden können. Der Einsatz dieser beiden Wirkstoffe ist jedoch durch das Risiko hämolytischer Anämien bei G6PD-Mangel eingeschränkt. Die Wirkstoffforschung fokussiert sich hier unter anderem auf Enzyme des Parasitenmetabolismus oder intrazelluläre Transportprozesse.[104,105]

Warum die Entwicklung wirksamer Therapieansätze in der Leberphase erschwert ist, lässt sich anhand der Vorgänge in den Hepatozyten erklären. Da die Parasiten sich in der Leberphase zunächst in einer parasitophoren Vakuolenmembran in den Hepatozyten befinden, sind sie vor immunologischer Erkennung und autophagischen Abwehrmechanismen der Wirtszelle geschützt.[106] Sind die Merozoiten in den Hepatozyten ausgereift, werden sie nicht durch Zelllyse freigesetzt, sondern Merosomen gebildet. Diese vesikulären Strukturen entstehen durch Abschnürung der Hepatozytenmembran. Die Hepatozytenmembran umgibt die Merozoiten, wodurch der Parasit weiterhin gegenüber zellulären Abwehrmechanismen immunologisch maskiert bleibt.[107] Durch diese Maskierungsmechanismen ist eine therapeutische Intervention in diesem Stadium nach wie vor erschwert.[106,107]

### *Erythrozytäre Phase*

Eine Mehrzahl der derzeit verfügbaren Wirkstoffe richtet sich gegen Parasiten in der erythrozytären Phase. In dieser Phase durchläuft der Parasit im Erythrozyten verschiedene Entwicklungsformen, bevor er Merozoiten freisetzt, die erneut Erythrozyten befallen. In diesem klinisch relevanten Stadium treten die Krankheitssymptome der Malariainfektion auf.[108]

Wirkstoffe, die die erythrozytäre Phase adressieren, greifen in die mitochondriale DNA- und Proteinbiosynthese oder den Hämoglobinabbau des Parasiten ein und werden als Blutschizontozide bezeichnet.[109,110,111,112,113] Die meisten Kombinationspräparate zielen auf diese Phase des Lebenszyklus einer Malariainfektion. Bestehend aus einem schnell

wirksamen Artemisinin-Derivat und einem langsamer wirkenden Partnerpräparat, sind sie derzeit der klinische Standard, da sie die Parasitenlast effizient und schnell senken und dadurch Resistenzen vorbeugen. Blutschizontozide führen schnell zur Symptomfreiheit, zeigen aber keine Wirksamkeit gegen die in *P. vivax* und *P. ovale* vorkommenden Hypnozoiten.[4,108,114,115]

Ein aus immunologischer Sicht vielversprechendes Ziel stellt die erythrozytäre Phase dar, da Antikörper gegen Merozoitenoberflächenproteine, wie merozoite surface protein 1 (MSP1) und apical membrane antigen 1 (AMA1) die Erythrozyteninvasion hemmen oder opsonieren können.[116,117] Auch andere Proteine, wie das *Pf*EMP1, stellen Zielstrukturen in der Wirkstoffentwicklung dar.[118]
*Pf*EMP1 wird auf der Oberfläche von infizierten Erythrozyten exponiert und ermöglicht dem intraerythrozytären Parasiten die Immunevasion. Ferner vermittelt es die Adhäsion infizierter Erythrozyten an die Endothelzellen von Blutgefäßen.[119,120,121]

Parasiten im erythrozytären Stadium können durch Antigenvariation einer Erkennung oder Abwehr durch das Immunsystem entgehen.[122] Zudem setzen sie hochfrequent Merozoiten frei. Daraus ergibt sich, dass Impfstoffe, die in der erythrozytären Phase wirken, nur die Parasitenlast senken, aber nicht zur Eradikation des Parasiten führen können. Derzeit ist kein Impfstoff gegen Parasiten in der erythrozytären Phase zugelassen.[117,118,123]

### *Gametozyten*

Die sexuellen Entwicklungsstadien stellen ein wichtiges Ziel im Rahmen der Eliminationsstrategie von Malaria dar, da sie für die epidemiologische Ausbreitung des Erregers verantwortlich sind.[124] Blutschizontozide Standardtherapien zielen nicht auf das Gametozyten-Stadium ab, sodass eine Übertragung des Erregers weiterhin möglich ist. Primaquin sowie Tafenoquin zeichnen sich durch eine gametozytozide Aktivität aus.[101]

Transmission-blockierende Impfstoffe (TBV) zielen hingegen darauf ab, eine Weiterentwicklung des Parasiten in der Mücke und somit eine erneute Übertragung des Erregers von der Mücke auf den Menschen zu verhindern. TBV beruhen beispielsweise auf Antikörpern gegen Pfs25, einem Oberflächenantigen, welches in reifen, weiblichen Gameten vorliegt. Durch die Ingestion der Antikörper im Rahmen der Blutmahlzeit verhindern sie die Befruchtung und/oder die Entwicklung zu Ookineten im Darm der Mücke.[125]

Reife Gametozyten können mehrere Wochen überleben und weisen eine geringe metabolische Aktivität auf. Dadurch ist eine Eliminierung aus pharmakologischer Sicht schwierig. Dennoch könnten effektive TBV die Weiterverbreitung in der Bevölkerung eindämmen und als eine Ergänzung zur Standardtherapie betrachtet werden.[124,126]

## 1.6 Resistenzentwicklung als Herausforderung der Malariatherapie

Die derzeit zugelassenen Arzneistoffe zur Prophylaxe und zur Therapie stehen zunehmend vor dem Problem neu auftretender Resistenzen. Insbesondere *P. falciparum* hat im Laufe der vergangenen Jahrzehnte Resistenzen gegen zahlreiche Wirkstoffe entwickelt. Es ergeben sich daraus erhebliche Herausforderungen bei der Behandlung und Prophylaxe von Malaria.

Bereits 1910 wurde erstmals eine Resistenz gegenüber Chinin beschrieben. In den Folgejahren folgten Resistenzen gegen Proguanil (1949) und Chloroquin (1957). Resistenzen gegen weitere gängige Wirkstoffe wie Amodiaquin (1971), Mefloquin (1982) und Artesunat (2002) folgten. Auch gegen Wirkstoffkombinationen wie Dihydroartemisinin-Piperaquin sind Resistenzen beschrieben. Besondere Bedeutung kommt dabei dem Auftreten von Resistenzen gegen ACT zu, da sie derzeit nach den WHO-Leitlinien den Goldstandard in der Behandlung der unkomplizierten Malaria darstellen *(Abbildung 10)*.[4,127]

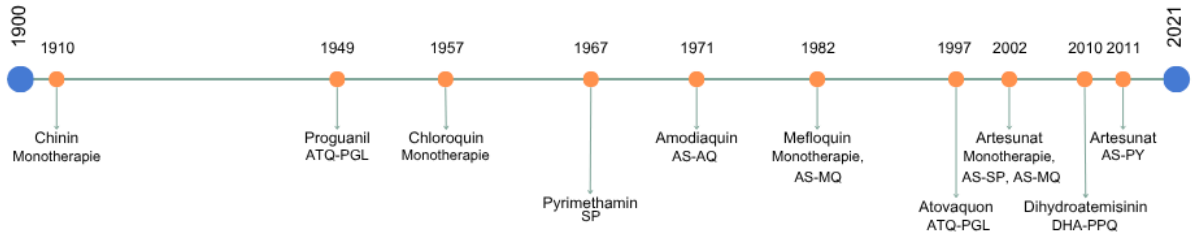



*Abbildung 10: Zeitlicher Verlauf der erstmaligen Berichte über Resistenzen gegenüber ausgewählten Antimalariawirkstoffen unter Angabe der verfügbaren Mono- und Kombinationstherapien. Amodiaquin (AQ), Artesunat (AS), Atovaquon (ATQ), Dihydroartemisinin (DHA), Mefloquin (MQ), Pyrimethamin (P), Proguanil (PGL), Pyronaridin (PY), Sulfadoxin (S). (schematische Darstellung nach Ippolito et al.).*[127]

Resistenzen gegen Antimalariawirkstoffe lassen sich häufig auf Mutationen in Transporterproteinen zurückführen. Das *Plasmodium falciparum* Chloroquin-Resistenzprotein (*Pf*CRT) befindet sich in der Membran der Verdauungsvakuole der Plasmodien. Mutationen in diesem Transmembranprotein führen dazu, dass Chloroquin und strukturell verwandte Wirkstoffe, wie z.B. Amodiaquin, nicht mehr ausreichend am Wirkort akkumulieren, da sie aus der Vakuole heraustransportiert werden.[128,129]

Ebenfalls bedeutend für die Resistenzbildung ist das *Multidrug Resistance Protein 1* (*Pf*MDR1), das die Empfindlichkeit gegenüber den verschiedenen antimalarial wirksamen Arzneistoffen beeinflusst. Wird *Pf*MDR1 überexprimiert, kann die intrazelluläre Konzentration der verschiedenen Antimalariamittel wie Mefloquin oder Lumefantrin unter den therapeutischen Bereich sinken.[130,131]

Auch Mutationen in Zielproteinen können zur Entstehung von Resistenzen beitragen. Ein Beispiel stellt das K13-Propellerprotein dar, das durch Mutationen im *kelch13*-Gen verändert werden kann.[132] Infolge dieser Mutationen werden Prozesse wie die Endozytose von Hämoglobin verlangsamt.[133] Dadurch entsteht weniger freies Häm, das für die Aktivierung von Artemisinin notwendig ist *(Abbildung 11)*.[134]

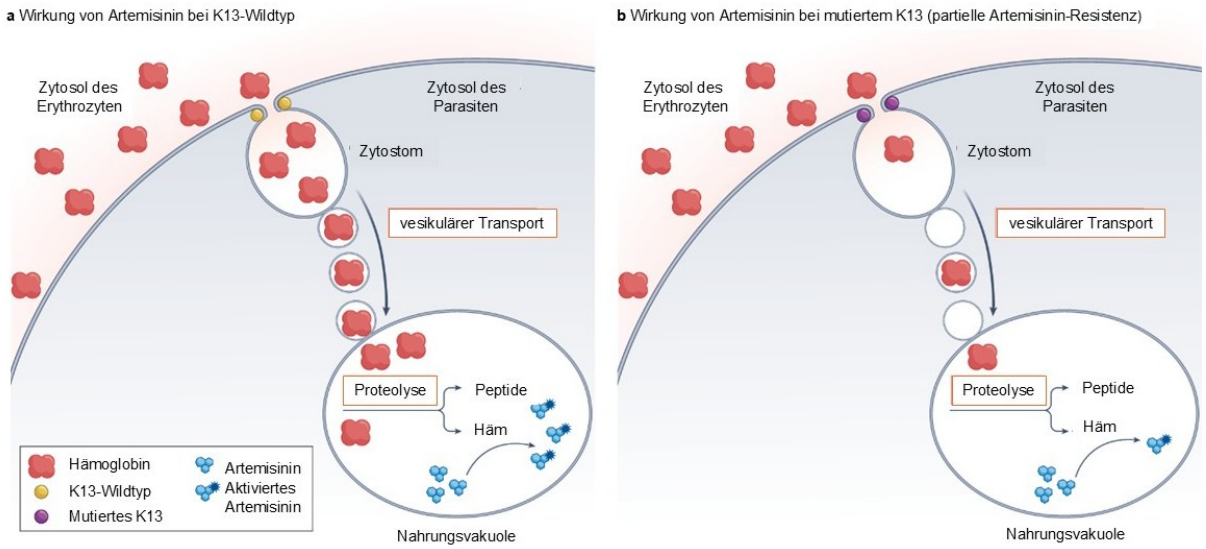



*Abbildung 11: Vereinfachte Darstellung des Artemisinin-Aktivierungsmechanismus und der Wirkung von kelch13-Mutationen, die durch verringerte Hämoglobinaufnahme zu reduzierter Wirkstoffaktivierung und verzögerter Parasiten-Clearance führen.*[135]

## 1.7 Entwicklung von Malaria-Therapeutika

Die Entwicklung neuer Malariatherapeutika steht vor diversen Herausforderungen. Zunächst stellt die schnelle Resistenzentwicklung sowohl gegen neue als auch etablierte Antimalariamittel eine große Herausforderung dar.[114] Zudem steht die Zulassung von Arzneimitteln vor regulatorischen Hürden. Entwicklungsprozesse erfordern umfangreiche präklinische und klinische Daten, die hohe Anforderungen an den Nachweis von Sicherheit und Wirksamkeit stellen. Multinationale Studien werden zusätzlich durch unterschiedliche regulatorische Anforderungen auf nationaler Ebene erschwert.[136,137] Die Durchführung klinischer Studien in endemischen Regionen, in denen lokale, resistente Parasitenstämme zirkulieren, ist logistisch anspruchsvoll.[138,139] Darüber hinaus zeigt die Zielpopulation in diesen Gebieten häufig eine partielle, erworbene Immunität.[118] Die Beurteilung der Effektivität neuer therapeutischer Ansätze in betroffenen endemischen Gebieten wird dadurch deutlich erschwert.[140,141] Ferner sind Forschung und Entwicklung in hohem Maße von einer nachhaltigen Finanzierung abhängig.[142,143,144]

### 1.7.1 Aktueller Forschungsstand

Die aktuelle Forschung konzentriert sich auf verschiedene grundlegende Strategien. Sogenannte *Liver-Stage*-Inhibitoren sollen eine klinische Erkrankung verhindern, indem sie frühe Leberstadien bekämpfen.[145] *Transmission-Blocking-Agents* sollen die Übertragung des Erregers vom Menschen auf die Mücke im Rahmen der Blutmahlzeit unterbinden. Dies kann durch die Wirkung auf Gametozyten im Menschen oder auf Parasitenstadien im Vektor erfolgen.[146,147] Multistage-wirksame Moleküle sollen die Erreger in unterschiedlichen Entwicklungsstadien bekämpfen, wodurch sie sowohl prophylaktische als auch therapeutische Eigenschaften aufweisen können.[148]

Zur Unterstützung der Entwicklung neuer Antimalariamittel hat Medicines for Malaria Venture (MMV), eine internationale, gemeinnützige Organisation zur Entwicklung neuer Medikamente gegen Malaria, *Target Product Profiles (TPP)* und *Target Candidate Profiles (TCP)* als Kriterien zur Beurteilung möglicher Arzneistoffe eingeführt. *TCP (TCP-1* bis *TCP-6)* kategorisieren einzelne Wirkstoffe nach dem Stadium des Lebenszyklus des Parasiten in dem sie wirksam sind. Bei *TPP* wird zwischen *TPP* zur Behandlung von Patienten und Patientinnen (*TPP-1)* und *TPP* zur Chemoprotektion (*TPP-2*) unterschieden. Somit können mehrere *TCP* zu einem *TPP* beitragen *(Abbildung 12).*[149,150]

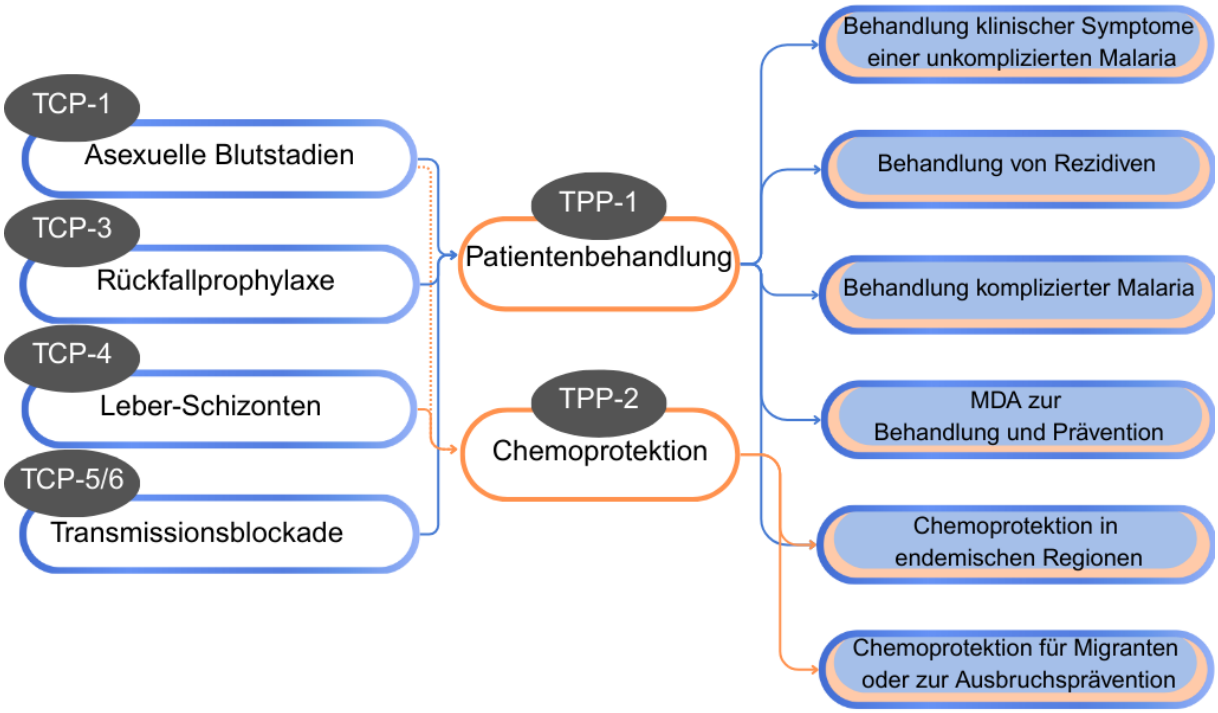



*Abbildung 12: Beziehungen zwischen den TPP (Mitte) und den jeweiligen TCP (links) mit ihren Anwendungsbereichen (rechts) (modifiziert nach Burrows et al.).*[150]

Einige Wirkstoffkandidaten zeigen vielversprechende Ergebnisse und befinden sich derzeit in unterschiedlichen Phasen klinischer Studien.

MMV048 **XVII** ist ein Inhibitor der Phosphatidylinositol-4-Kinase (PI4K), der eine hohe Aktivität gegenüber allen Stadien des *P. falciparum* zeigt und in Phase IIa-Studien untersucht wurde.[151] Zu den weiteren Wirkstoffkandidaten gehören der Phospholipid-Metabolismus-Inhibitor CDRI-97/78 **XVIII**, der eine hohe Aktivität gegen multiresistente *P. falciparum*-Stämme aufweist und sich derzeit in der Phase-I-Entwicklung befindet.[152] INE963 **XIX**, ein Inhibitor des eukaryotischen Elongationsfaktors 2 (eEF2), wird aktuell in Phase-I-Studien evaluiert und stellt aufgrund einer langen Halbwertszeit und einem schnellen Wirkungseintritt einen Kandidaten für Einzeldosis-Therapien bei unkomplizierter Malaria dar. Der Imidazolopiperazin-Wirkstoff Ganaplacid (KAF156) **XX** weist ein breites Wirkungsspektrum gegen Blut- und Leberstadien

von *P. falciparum* sowie transmissionsblockierende Aktivität auf. Zum Zeitpunkt der Recherche wurden für Ganaplacid in Kombination mit Lumefantrin positive Ergebnisse einer Phase-III-Studie berichtet *(Abbildung* 13*).*[153,154]

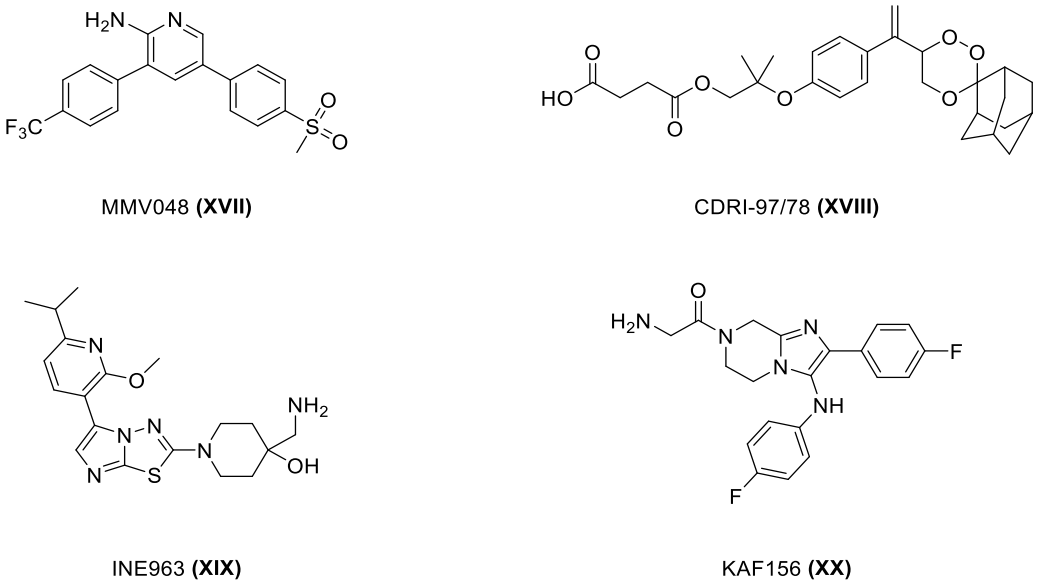



*Abbildung 13: Neue Wirkstoffkandidaten MMV048 (**XVII**), CDRI-97/78 (**XVIII**), INE963 (**XIX**) und KAF156 (**XX**).*

Potenzielle Arzneistoffe müssen frühzeitig auf ihre antiplasmodiale Aktivität hin getestet werden. *In vitro*-Assays an *P. falciparum* dienen der quantitativen Bestimmung ($IC_{50}$) der parasitenhemmenden Wirkung. Üblich sind Aktivitätsmessungen gegen Zelllinien asexueller Blutstadien, wie beispielsweise *Pf*3D7 (chloroquin-sensitiv), *Pf*Dd2 (resistent gegen Chloroquin, Pyrimethamin, Mefloquin, Sulfadoxin), *Pf*NF54 (Ursprungsstamm von 3D7 mit hoher Gametozytenproduktion), *Pf*7G8 (resistent gegen Chloroquin, Sulfadoxin, Pyrimethamin) und *Pf*K1 (resistent gegen Chloroquin, Pyrimethamin, teilweise Mefloquin), Leberstadien wie *Pf*EEF (exoerythrozytäre Formen) und Gametozytenstadien wie *Pf*ESG (frühe Gametozytenstadien), *Pf*RSG (reife Gametozytenstadien) und *Pf*LSG (späte Gametozytenstadien). Vielversprechende Wirkstoffkandidaten können dann im Rahmen von *in vivo*-Assays in Tiermodellen hinsichtlich ihrer Aktivität evaluiert werden. Studien zur Zytotoxizität, Löslichkeit, Membranpermeabilität und metabolischen sowie chemischen Stabilität folgen *(Abbildung 14).*

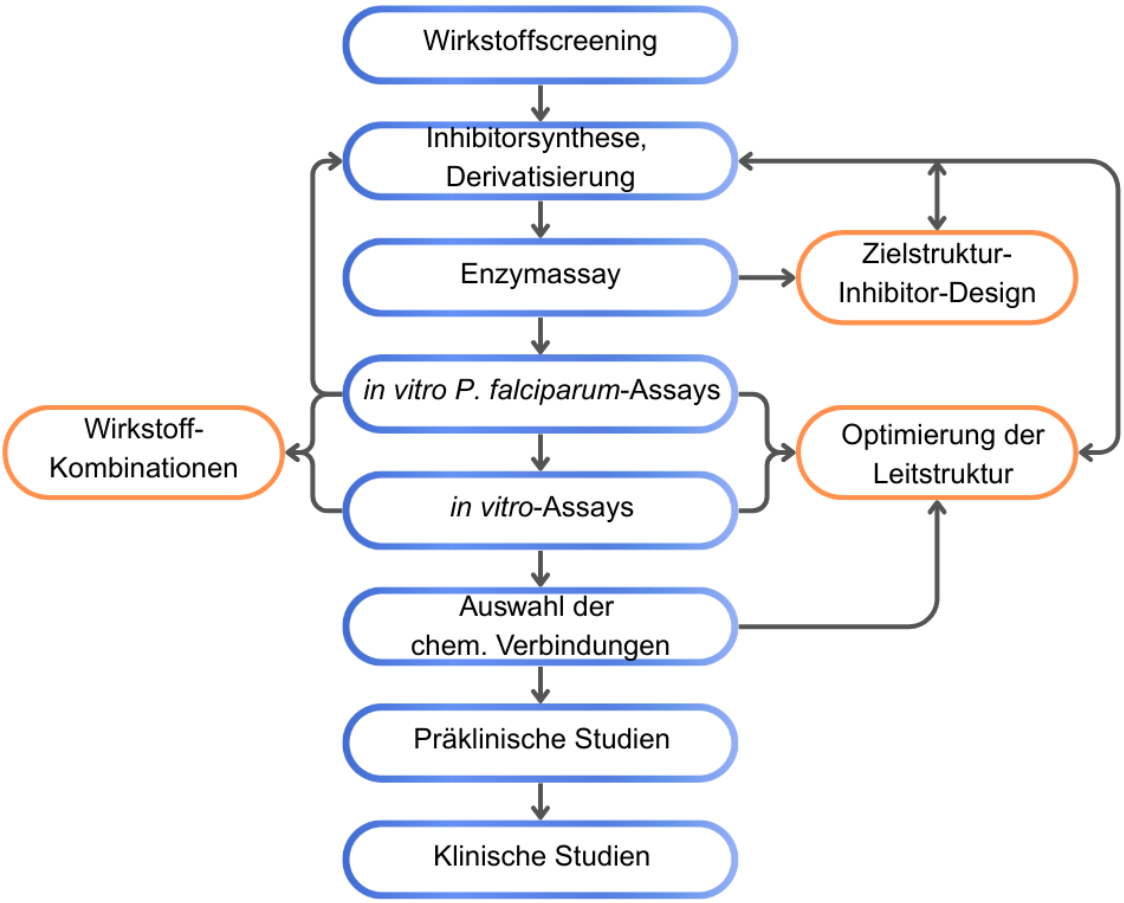



*Abbildung 14: Ein exemplarischer Ablauf der Schlüsselphasen in der Entwicklung von Wirkstoffkandidaten gegen Malaria.*

### 1.7.2 Die Finanzierung von Forschung und Entwicklung

Die Finanzierung der Forschung und Entwicklung im Bereich Malaria ist zu einem entscheidenden Anteil abhängig von dem Engagement gemeinnütziger Organisationen sowie öffentlicher Institutionen.[143]

Eine große Rolle bei der klinischen Entwicklung von Wirkstoffen gegen Malaria nimmt MMV ein. Hierbei handelt es sich um eine 1999 gegründete öffentlich-private Partnerschaft mit Sitz in der Schweiz. [143,142] Über 20 neue Medikamente sind durch MMV in die klinische Entwicklung gelangt. Finanziert wird die Arbeit von MMV hauptsächlich durch verschiedene private Stiftungen oder öffentliche Behörden, wie beispielsweise die Bill & Melinda Gates Foundation (BMGF), das Commonwealth & Development Office (UK FCDO) sowie das Irische Ministerium für Auswärtige Angelegenheiten und Handel (Irish Aid). Hinzu kommen weitere staatliche und private Geldgeber. MMV veröffentlicht jedes Jahr eine Übersicht zum aktuellen Stand der Forschung im Bereich Malaria. Die Übersicht beinhaltet auch eine Darstellung des Sachstands der von MMV unterstützten Projekte unter Einbeziehung der gesamten Entwicklungskette beginnend mit präklinischen Projekten über klinische Studien bis hin zur Zulassung *(Abbildung 15)*.[144]

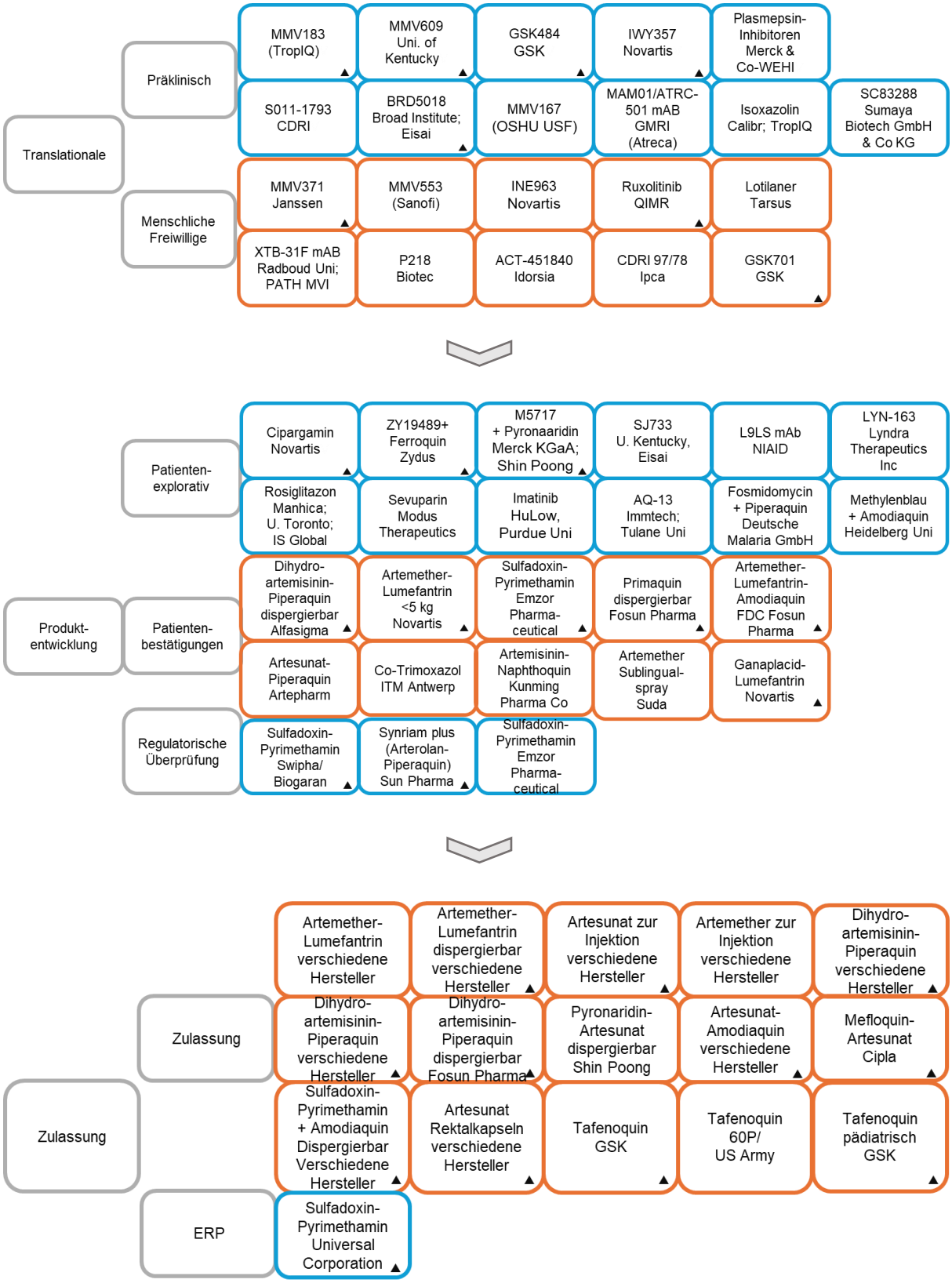



*Abbildung 15: MMV-unterstützte Projekte in verschiedenen Stadien der klinischen Entwicklung nach MMV. ▲ kennzeichnet von MMV unterstützte Projekte: Kann Finanz-, Sach- oder Beratungsaktivitäten umfassen (schematische Darstellung modifiziert nach MMV).*[144]

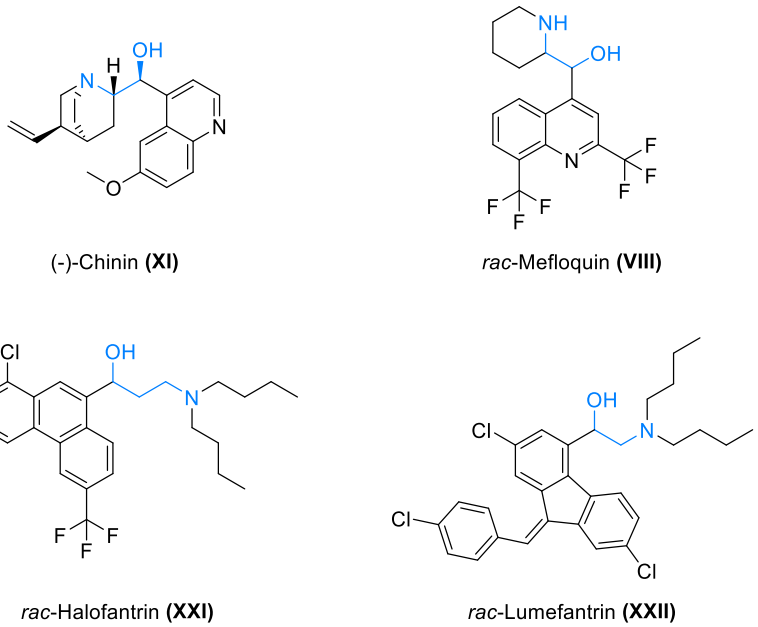
BMGF stellt die größte private Stiftung der Welt dar und hat in 25 Jahren über 100 Milliarden US-Dollar für die globale Gesundheit ausgegeben. Ein großer Anteil dieses Geldes ist in die Malariaforschung investiert worden. Neben der Entwicklung von innovativen Malariaimpfstoffen unterstützt die BMGF auch genetische Methoden zur Vektorkontrolle.[155,156,157]

Ergänzend zu diesen gemeinnützigen Organisationen beschäftigt sich die Against Malaria Foundation (AMF) mit Insektizid-behandelten Moskitonetzen zur Prävention von Malaria.[158] Das sogenannte Malaria Consortium implementiert Programme zur saisonalen Malariaprophylaxe.[159]

## 1.8 Arylaminoalkohole als Arzneistoffe

### 1.8.1 Chinin, Mefloquin, Halofantrin und Lumefantrin

Arylaminoalkohole basieren auf einem aromatischen Ringsystem, einer sekundären oder tertiären Aminogruppe und einem sekundären Alkohol. Vertreter dieser Wirkstoffklasse sind beispielsweise Chinin **XI** und die darauf basierenden strukturell verwandten Analoga Mefloquin **VIII**, Halofantrin **XXI** und Lumefantrin **XXII** *(Abbildung 16).*



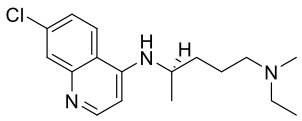

(-)-Chinin **(XI)** *rac*-Mefloquin **(VIII)**

*rac*-Halofantrin **(XXI)** *rac*-Lumefantrin **(XXII)**

*Abbildung 16: Die Arylaminoalkohole (-)-Chinin (XI), rac-Mefloquin (VIII), rac-Halofantrin (XXI) und rac-Lumefantrin (XXII) als Malariawirkstoffe mit dem Aminoalkoholgrundgerüst in blau.*

Chinin **XI** tritt in der Rinde von Cinchona-Bäumen auf. Bereits im 17. Jahrhundert wurde die Rinde zur Behandlung von intermittierendem Fieber eingesetzt.[160,161] Schließlich wurde sie im 18. Jahrhundert gegen Malaria verwendet, indem die Rinde in Wein suspendiert und oral eingenommen wurde. Im Jahr 1820 konnten die Cinchona-Alkaloide Chinin **XI** und Cinchonin schließlich aus der Rinde isoliert werden, sodass bis in die 1940er Jahre die Standardtherapie von Malaria in der Einnahme von Chinin **XI** bestand. [161]

Durch die Entwicklung von Chloroquin **X** *(Abbildung 17)* als effizienten, synthetischen Malariawirkstoff ging der Einsatz von Chinin **XI** zurück.




Chloroquin **(X)**

*Abbildung 17: Strukturformel von Chloroquin (**X**).*

Da während des Vietnam-Kriegs jedoch vermehrt chloroquinresistente Plasmodienstämme auftraten, testete das Walter Reed Army Institute of Research über 250.000 Verbindungen auf ihre antiplasmodiale Wirkung. In den 1960er Jahren wurde Mefloquin **VIII** schließlich in einem Screening durch das Walter Reed Army Institute of Research entdeckt.[162,161] Die Marktzulassung erfolgte daraufhin 1984 durch die Firma Hoffmann-La Roche unter dem Handelsnamen Lariam®. Zugelassen ist Mefloquin **VIII** als Hydrochloridsalz des Racemats.[163,164] Mefloquin **VIII** weist eine lange Eliminationshalbwertszeit von 14 bis 28 Tagen auf und ist sehr wirksam gegen die meisten Chloroquin-resistenten Parasiten der Gattung *P. vivax* und *P. falciparum*.[165,166] Im Zusammenhang mit Mefloquin **VIII** wurden allerdings schwere, insbesondere neuropsychiatrische Nebenwirkungen beobachtet.[167]

1992 wurde Halofantrin (Halfan®) **XXI** durch die Firma SmithKline Beecham (heute GlaxoSmithKline) durch die FDA zugelassen, nachdem es im Auftrag des Walter Reed Army Institute of Research entwickelt wurde.[168,169] Kurz nach der Markteinführung wurden kardiotoxische Nebenwirkungen beobachtet, die auf einer Verlängerung des QT-Intervalls beruhen und dadurch zu gefährlichen ventrikulären Arrhythmien führen können.[170,171] Halofantrin **XXI** wird daher von der WHO nicht mehr zur routinemäßigen Behandlung von Malaria empfohlen.[169]

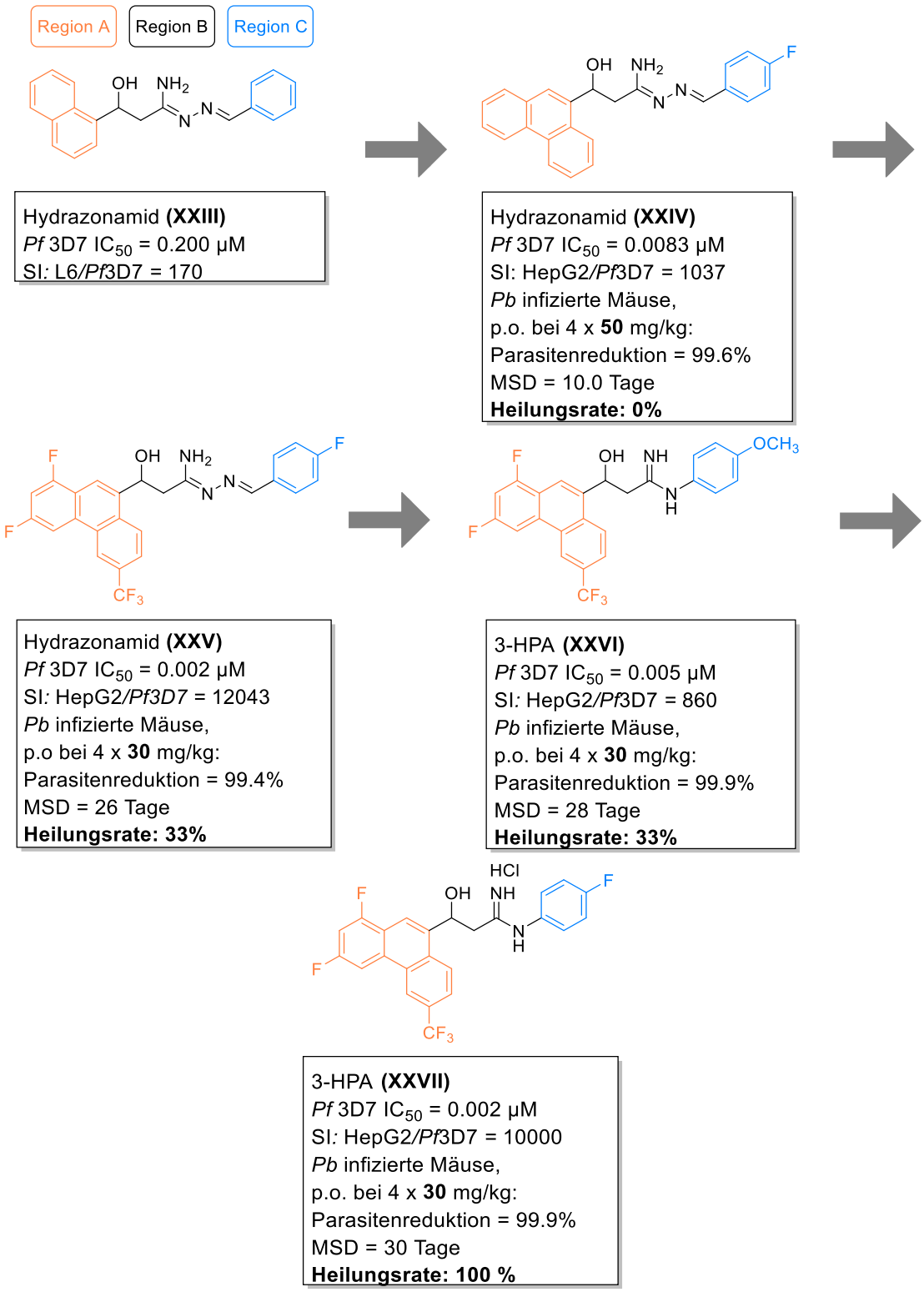
Lumefantrin **XXII** wurde 1976 bei dem chinesischen Forschungsprogramm „Project 523“ entdeckt, wobei es von der Chinese Academy of Military Sciences entwickelt wurde.[172,173] Unter dem Handelsnamen Riamet® wurde das Lumefantrin **XXII**-Artemether **XVI**-Kombinationspräparat 1999 von Novartis entwickelt und zunächst in der Schweiz durch Swissmedic zugelassen.[174] 2009 wurde dann Coartem® (Lumefantrin-Artemether-Kombinationspräparat) durch die FDA zugelassen.[175,173,176] Die Kombination von Lumefantrin **XXII** als langsamen, dafür länger wirkenden Wirkstoff und Artemether **XVI** als schnell wirksamen Wirkstoff ist eine der weltweit am häufigsten verwendeten ACT.[177,178]

### 1.8.2 Neue Arylaminoalkohol-Analoga

Arylaminoalkohole gehören zu den ältesten antimalarialen Wirkstoffklassen und besitzen weiterhin eine hohe therapeutische Relevanz.[179] Lumefantrin ist bis heute Bestandteil einer der weltweit am häufigsten eingesetzten ACT. Mefloquin wird in ausgewählten Regionen weiterhin therapeutisch sowie zur Chemoprophylaxe eingesetzt. Die zunehmende Ausbreitung von Resistenzen gegenüber Artemisinin-Derivaten und ACT-Partnerwirkstoffen stellt zunehmend eine Herausforderung dar.[4] Daher besteht das große Interesse an einer Weiterentwicklung von Arylaminoalkoholen weiterhin fort.[180] Ziel ist es, die günstigen pharmakologischen Eigenschaften dieser Wirkstoffklasse, insbesondere ihre hohe Aktivität gegen erythrozytäre Blutstadien und ihre Eignung als ACT-Partner, durch gezielte strukturelle Modifikationen weiter zu verbessern. Darüber hinaus sollen Verträglichkeit, pharmakokinetische Eigenschaften und Aktivität gegenüber resistenten Parasiten optimiert werden.[179] Aus diesem Grund werden nach wie vor neue Arylaminoalkohol-Derivate entwickelt, von denen einige im Folgenden vorgestellt werden.

*Khankischpur* et al. beschrieben 2010 das entwickelte Hydrazonamid **XXIII**. Es zeigte eine gute antiplasmodiale *in vitro*-Aktivität gegen den *P. falciparum*-Stamm *Pf*3D7 ($IC_{50}$: 0.200 µM).[181,182] Die Zytotoxizität gegenüber L6-Rattenmyoblasten fiel gering aus, was sich in einem Selektivitätsindex (SI) von 170 zeigte. Durch den Austausch des Naphthylsubstituenten gegen einen Phenanthrensubstituenten in der Region A synthetisierten *Kurz* et al. das Hydrazonamid **XXIV**. Aufgrund seiner hohen antiplasmodialen *in vitro*-Aktivität (*Pf*3D7 $IC_{50}$: 0.0083 µM) wurde das Hydrazonamid **XXIV** darüber hinaus im *P. berghei*-Mausmodell *in vivo* getestet. Trotz einer hohen Aktivität von 99.6 % konnte keine Heilung der Mäuse bei einer oralen Gabe von 4 × 50 mg/kg beobachtet werden (MSD = 10 Tage). Ein SI von 1037 ließ sich zudem auf eine gesteigerte Selektivität gegenüber *P. falciparum* bei geringer Toxizität gegenüber HepG2-Zellen zurückführen.[182,183] Die Einführung von Halogeniden in den Phenanthrenring in Region A führte zu dem Hydrazonamid **XXV** und einer Verbesserung der *in vitro*-Aktivität (*Pf*3D7 $IC_{50}$: 0.002 µM). Das fluorsubstituierte Hydrazonamid **XXV** wies mit einer Aktivität von 99.4 % bei 1/3 Mäusen im *P. berghei*-Mausmodell bei 4 × 30 mg/kg p.o. nach 30 Tagen keine Parasiten mehr im Blut auf.[184] Da eine Freisetzung von Hydrazin aus den synthetisierten Hydrazonamiden denkbar war, konzentrierte sich die Arbeitsgruppe *Kurz* auf die Variation der Region B. Es entstanden eine Reihe von 3-Hydroxypropanamidinen (3-HPAs). Einige 3-HPAs zeigten sehr gute *in vitro*-Aktivitäten, wobei das 3-HPA **XXVI** eine Hemmung von *Pf*3D7 ($IC_{50}$: 0.005 µM) im nanomolaren Bereich bei einer hervorragenden Selektivität gegenüber der humanen HepG2-Zelllinie (SI: 860) erzielte. Mit einer Aktivität von 99.9 % *in vivo* wurden 1/3 der Mäuse bei 4 × 30 mg/kg p.o. geheilt. Weitere Derivatisierungen konzentrierten sich auf die Variation der Region C, woraus das potenteste 3-HPA **XXVII** hervorging. Dieses zeigt neben einer hohen

*in vitro*-Aktivität im nanomolaren Bereich (*Pf*3D7 $IC_{50}$: 0.002 µM) auch eine hohe Aktivität von 99.9 % *in vivo,* wobei eine Heilung aller Mäuse bei 4 × 30 mg/kg p.o. erzielt werden konnte (*Schema 1*).[185]




*Schema 1: Potente 3-Hydrazonamide (**XXIII-XXV**) und 3-HPAs (**XXVI-XXVII**) synthetisiert durch die Arbeitsgruppe Kurz. Die biologischen Daten stammen aus den zitierten Vorarbeiten und wurden in Kooperation ermittelt. $IC_{50}$: halbmaximale inhibitorische Konzentration gegen P. falciparum 3D7 (Pf3D7). SI: Selektivitätsindex ($IC_{50}$ L6 bzw. HepG2/$IC_{50}$ Pf3D7); p.o.: orale Verabreichung; MSD: mittlere Überlebenszeit. Die in vivo-Daten wurden im P. berghei-Mausmodell erhoben; Heilungsrate: Anteil der bis Tag 30 nach Infektion überlebenden Mäuse ohne mikroskopisch nachweisbare Parasiten im Blut.*[181,182,183,184,185]

### 1.8.3 Wirkmechanismus der Arylaminoalkohole

Der genaue Wirkmechanismus von Arylaminoalkoholen ist nicht abschließend geklärt. Es wird dennoch vermutet, dass diese in den durch den Hämoglobinabbau entstehenden Häm-Entgiftungsprozess eingreifen. Hierbei wird das freigesetzte FPIX normalerweise durch Kristallisation zu Hämozoin entgiftet. Arylaminoalkohole hemmen diesen Vorgang, wodurch toxisches freies FPIX akkumuliert und letztlich zum Absterben des Parasiten führt.

In der sauren Nahrungsvakuole wird die basische Aminfunktion der Arylaminoalkohole protoniert. Die Wirkstoffe reichern sich dann überwiegend in kationischer Form in der Nahrungsvakuole an. Die Arylaminoalkohole koordinieren an das Fe(III)-Zentrum des FPIX. Zusätzlich stabilisieren π-π-Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrückenbindungen den entstandenen Komplex. Dadurch wird eine Entgiftung des FPIX durch Kristallisation zum Hämazoin verhindert und das toxische FPIX akkumuliert. Parasitäre Membranen werden dadurch geschädigt, dass der Parasit schließlich stirbt.

Gestützt wird dieser Mechanismus unter anderem durch Kristallstrukturanalysen von Wirkstoff-Häm-Komplexen, *in vitro*-Kristallisationsassays (*β*-Hematin-Assays) und *in vitro*-Parasitenassays. *De Villiers* et al. gelang die Aufnahme einer Kristallstruktur des Halofantrin-FPIX-Komplexes *(Abbildung 18)*. Für den Halofantrin-Fe(III)PPIX-Komplex konnte durch Kristallstrukturanalyse gezeigt werden, dass Halofantrin über seine Aminoalkohol-Funktion an das zentrale Fe(III)-Ion des FPIX koordiniert. Dabei entstehen fünfgliedrige Komplexe. Zudem wurden π-π-Stacking-Wechselwirkungen zwischen dem Phenanthrengerüst des Halofantrins und dem Porphyrinring des freien Häms beobachtet.[186]

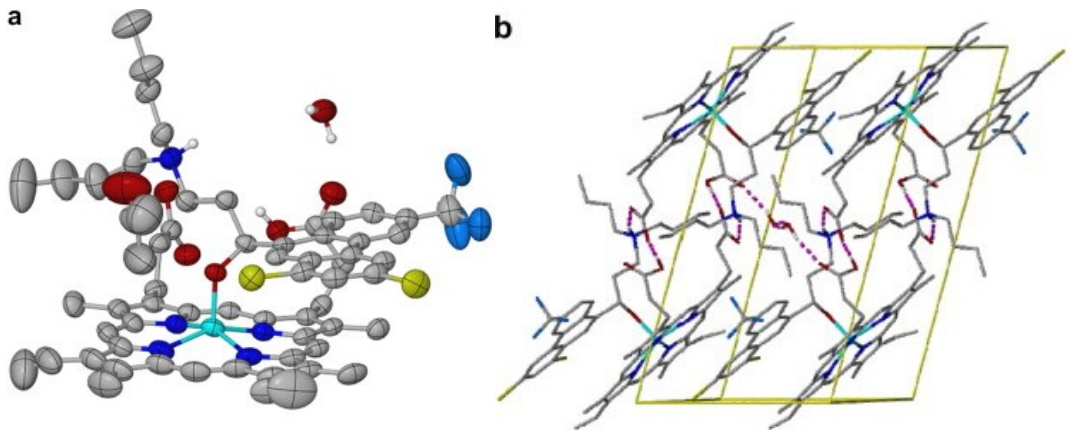



*Abbildung 18: Kristallstruktur von Halofantrin mit Fe(III)PPIX (links) und die π-π-Stacking-Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen im Kristall (rechts) nach De Villiers et al.*[186]

# 2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Derivatisierung der antiplasmodial wirkenden Leitstruktur **XXVII**, die zuvor im Rahmen der Dissertation von *T. Knaab* im Arbeitskreis *Kurz* synthetisiert wurde.[185] Dabei erfolgte eine Fokussierung auf systematische Modifikationen in Region A sowie C *(Abbildung* 19*)*.

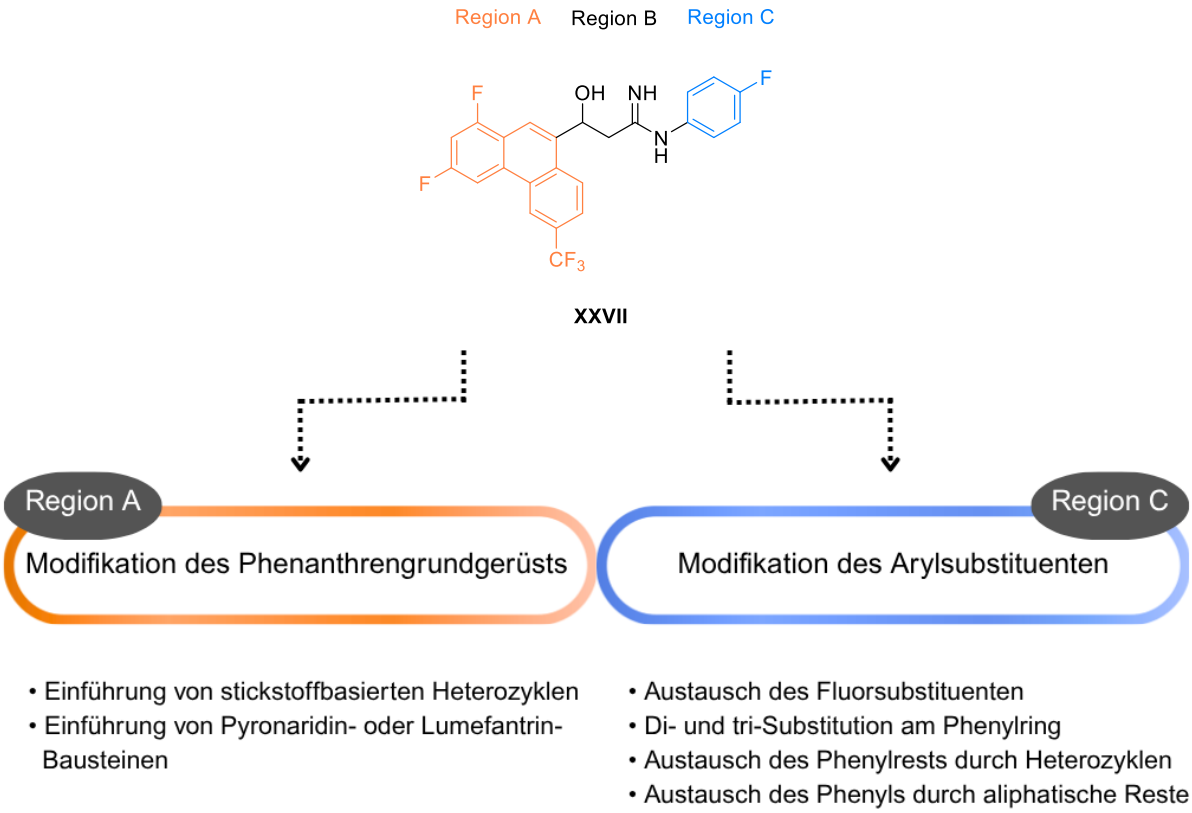



*Abbildung 19: TKK130* ***(XXVII)*** *als Leitstruktur für nachfolgende Modifikationen. Die orangefarbene Markierung zeigt Region A und die blaue Markierung zeigt Region C.*

Zum einen sollte dazu das lipophile, hochfluorierte Phenanthren-Motiv in Region A durch trizyklische Azaanaloga wie 1,7-Phenanthrolin **XXVIII** oder Phenanthridin **XXIX** ersetzt werden, wodurch der Einfluss von Heteroatomen auf die antiplasmodiale Wirkung untersucht werden sollte *(Abbildung 20)*.

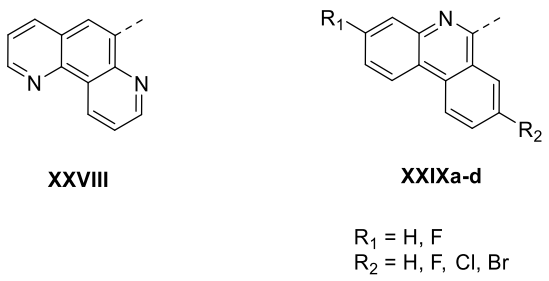
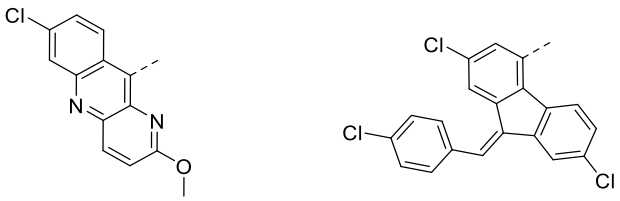



*Abbildung 20: Strukturformeln des 1,7-Phenanthrolin-* ***(XXVIII)*** *und Phenanthridin-Bausteins* ***(XXIXa-d)****, der in Region A eingeführt werden sollte.*

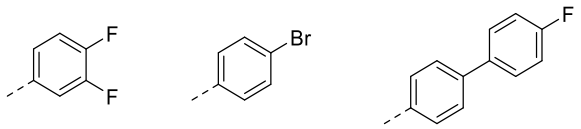
Darüber hinaus sollte die synthetische Zugänglichkeit und chemische Stabilität von möglichen Pyronaridin- **XXX** und Lumefantrinanaloga **XXII** bewertet werden *(Abbildung 21)*. Dabei sollten sowohl implementierte Syntheserouten als auch limitierende Faktoren wie beispielsweise instabile Zwischenstufen, konkurrierende Nebenreaktionen sowie analytische Herausforderungen, systematisch erfasst und diskutiert werden.




**XXX** **XXII**

*Abbildung 21: Strukturformeln des Pyronaridin- (**XXX**) und Lumefantrin (**XXII**)-Bausteins, der in Region A eingeführt werden sollte.*

Ferner sollten weitere Variationen in Region C untersucht werden. Dazu sollten verschiedene Substitutionsmuster und Halogene am Phenylring eingeführt sowie der Phenylrest durch Heteroaromaten oder aliphatische Gruppen ersetzt werden, um die Notwendigkeit einer aromatischen Gruppe und den Einfluss eines aliphatischen Systems in Region C auf die antiplasmodiale Aktivität oder metabolische Stabilität zu diskutieren *(Abbildung 22)*.




**XXXI** **XXXII** **XXXIII**

*Abbildung 22: 1,2-Difluorbenzyl **XXXI**, Brombenzyl **XXXII** und 4-Fluor-1,1'-biphenyl **XXXIII** als Beispiele für mögliche Variationen in Region C.*

Die Wirkstoffkandidaten sollten daraufhin entlang eines präklinischen Testprogramms, das in *Abbildung 23* dargestellt ist, evaluiert werden. Dieses abgestimmte Entwicklungsprogramm erlaubt es, chemische Modifikationen frühzeitig anhand von Potenz, Selektivität, Resistenzbarriere und pharmakokinetischem Profil zu priorisieren und so mögliche Kandidaten mit einem hohen Entwicklungspotenzial zu identifizieren. Darüber hinaus sollten Untersuchungen zum Wirkmechanismus dazu beitragen, den Einfluss der strukturellen Modifikationen auf die antiplasmodiale Aktivität besser zu verstehen.

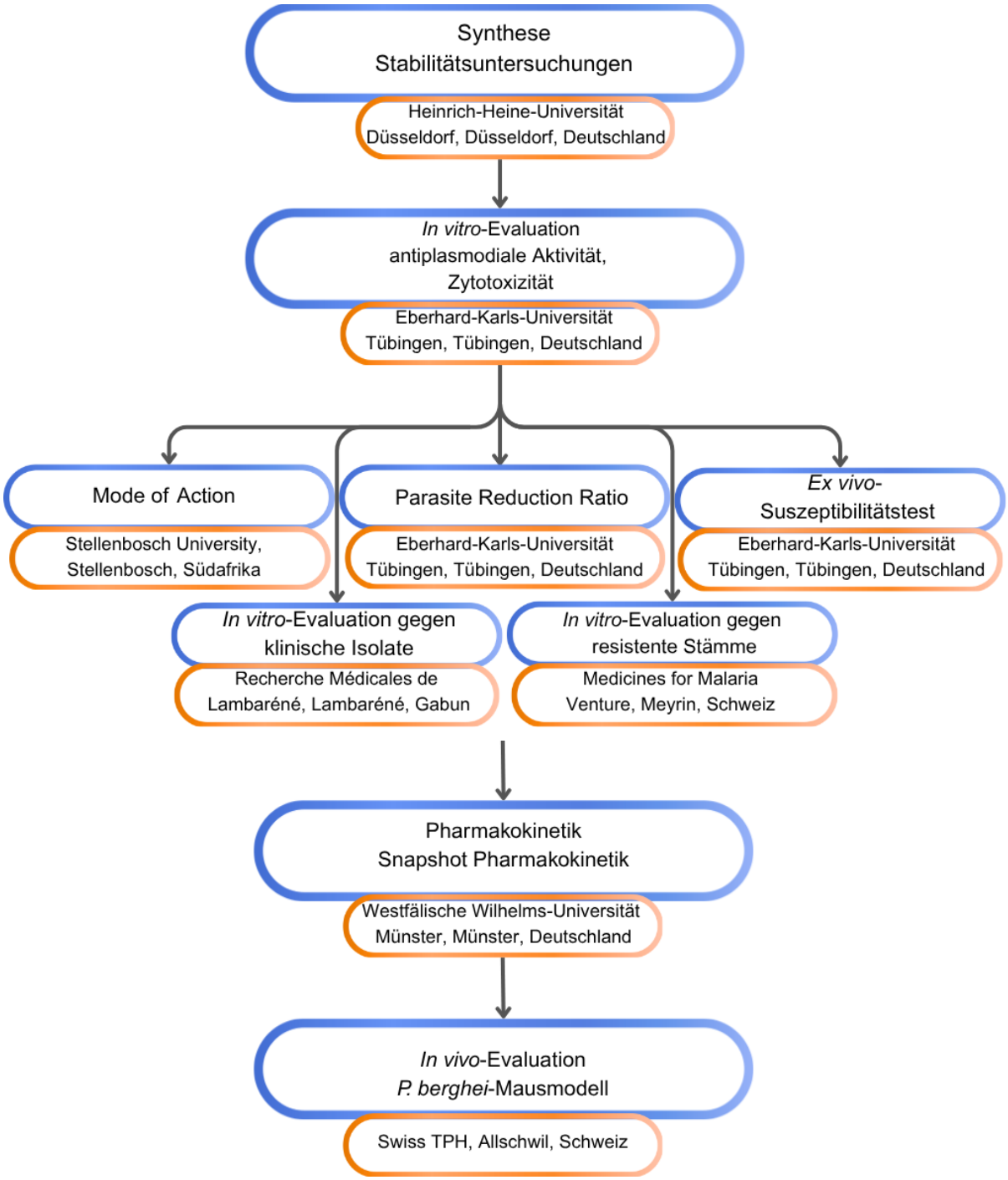


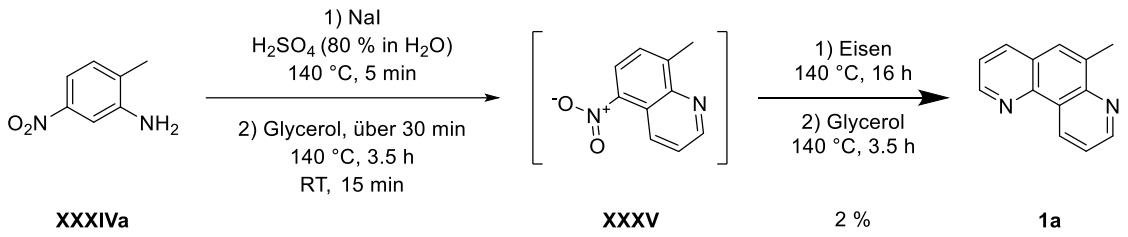

*Abbildung 23: Schematische Darstellung des präklinischen Entwicklungs- und Testablaufs für **TKK130**-Analoga.*

# 3 Ergebnisse und Diskussion

## 3.1 Synthese der Aza-basierten 3-Hydroxypropanamidinderivate

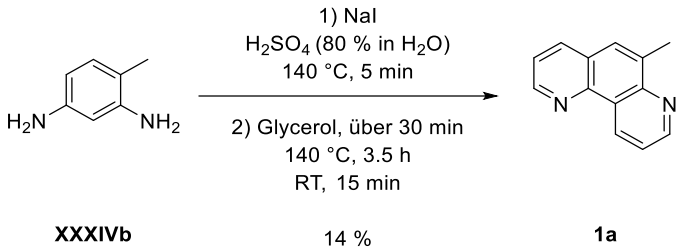
### 3.1.1 Synthese des phenanthrolinbasierten 3-Hydroxypropanamidins

Zur Darstellung des 1,7-Phenanthrolin-Analogons **4a** wurde im ersten Schritt ein sequenzieller Syntheseansatz im Ein-Topf-Verfahren verfolgt. Dabei wurde zu Beginn eine Skraup-Reaktion ausgehend von 2-Methyl-5-nitroanilin **XXXIVa** unter Verwendung von Natriumiodid und konzentrierter Schwefelsäure durchgeführt. Das daraus resultierende 5-Nitrochinolin **XXXV** wurde zu einem 5-Aminochinolin reduziert. Anschließend wurde eine zweite Skraup-Reaktion am entstandenen Amin durchgeführt *(Schema 2)*.[187,188] Die Reaktion verlief mit geringer Gesamtausbeute zum 1,7-Phenanthrolin **1a** (2 %). Dies kann auf verschiedene Gründe zurückgehen. Denkbar wäre, dass die Nitrogruppe den Aromaten durch den stark elektronenziehenden (-M/-I-Effekt) desaktiviert und dadurch die elektrophile intramolekulare Cyclisierung erschwert. Ferner kann das Anilin durch die Schwefelsäure protoniert und so die Nukleophilie der Aminogruppe gesenkt werden. Darüber hinaus könnte eine unvollständige Reduktion der Nitrogruppe eine Cyclisierung im Rahmen der Skraup-Synthese verhindern.




*Schema 2: Skraup-Reaktion zur Synthese des 1,7-Phenanthrolinbausteins **1a** ausgehend vom Nitroanilin **XXXIVa**.*

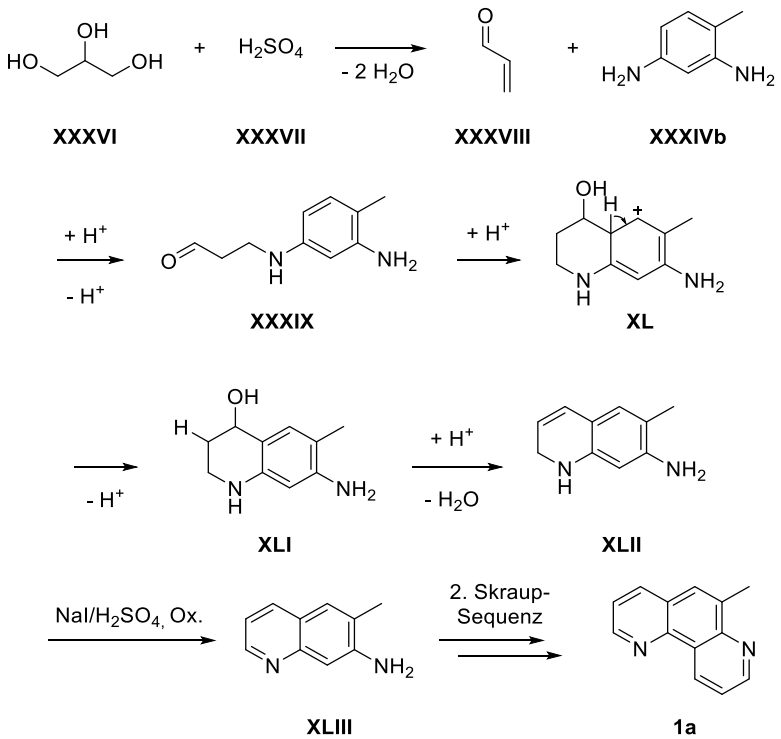
Um die Ausbeute zu verbessern, wurde ein alternativer Skraup-Ansatz erprobt. Dabei wurde zum 2,4-Diaminotoluol **XXXIVb** bereits zu Beginn eine für einen zweifachen Ringschluss ausreichende Menge Glycerol (2 Äq.) zugesetzt *(Schema 3)*. Auch hierbei wurde jedoch nur eine geringe, wenngleich gegenüber der Ein-Topf-Synthesesequenz ausgehend vom Nitroanilin **XXXIVa** verbesserte Ausbeute erzielt (14 %). Dies könnte darauf zurückgeführt werden, dass die Cyclisierung der 4-Aminofunktion nicht ausschließlich in der für den Reaktionsverlauf erforderlichen Regiochemie erfolgt. Bei alternativer Ringbildung wird die für den zweiten Ringschluss ausgehend von der 2-Aminofunktion erforderliche Position bereits besetzt. Die Bildung des gewünschten Produktes ist dann nicht möglich.




*Schema 3: Skraup-Reaktion zur Synthese des 1,7-Phenanthrolinbausteins **1a** ausgehend vom 2,4-Diaminotoluol **XXXIVb**.*

Für das Verständnis der geringen Ausbeuten ist es wichtig, den Mechanismus der Skraup-Reaktion nachzuvollziehen.

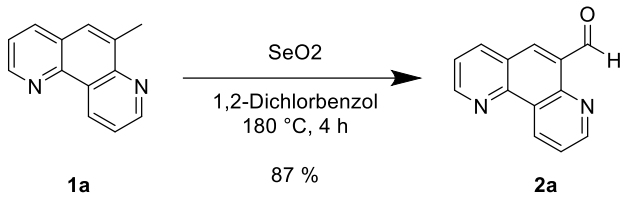
Bei der Skraup-Synthese werden als Edukte ein Anilinderivat, hier 2,4-Diaminotoluol **XXXIVb**, und eine *α,β*-ungesättigte Carbonylverbindung benötigt. Unter sauren Bedingungen wird durch zweifache Dehydratisierung aus Glycerol **XXXVI** das hochreaktive Acrolein **XXXVIII** gewonnen, das als *α,β*-ungesättigter Aldehyd die reaktive $C_3$-Komponente darstellt. Eine der primären Aminogruppen des 2,4-Diaminotoluol **XXXIVb** addiert in einer nukleophilen 1,4-Addition (Aza-Michael-Addition) an das Acrolein **XXXVIII**. Anschließende Protonentransfers führen zu dem *β*-Aminoaldehyd **XXXIX**. Eine Protonierung der Aldehydfunktion ermöglicht eine intramolekulare elektrophile Substitution, wobei der Wheland-Komplex **XL** entsteht. Nach Deprotonierung entsteht **XLI**, welches durch eine säurekatalysierte Dehydratisierung zum Dihydrochinolin **XLII** umgesetzt wird. Eine anschließende oxidative Aromatisierung unter Einsatz von NaI bei sauren Bedingungen liefert das Chinolin **XLIII.** Nach einem zweiten Reaktionsablauf entsteht schließlich das 1,7-Phenanthrolin **1a** (*Schema 4*).[189,188]




*Schema 4: Mechanismus der Skraup-Synthese ausgehend vom 2,4-Diaminotoluol **XXXIVb**.*

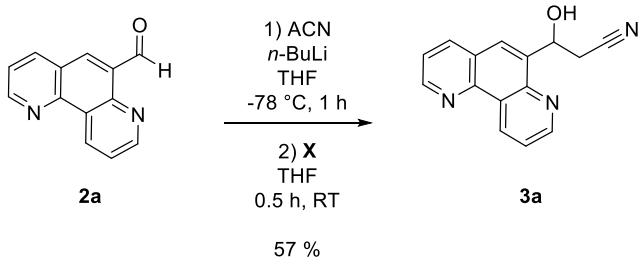
Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die mehrstufige Skraup-Sequenz in beiden Varianten durch die harschen Bedingungen und Fehlcyclisierungen erschwert wird.[190,191] Neben der bereits beschriebenen Deaktivierung des Aromaten durch die Nitrogruppe sowie der herabgesetzten Nukleophilie der Aminogruppe infolge der Protonierung des Anilins durch Schwefelsäure könnten auch Nebenreaktionen eine Rolle spielen. So wird beispielsweise die Bildung von oligomeren oder polymeren Nebenprodukten durch eine säurekatalysierte Polymerisation von *α,β*-ungesättigten Aldehyden für die Skraup-Reaktion beschrieben.[192]

Die anschließende Riley-Oxidation mit Selen(IV)-oxid verlief selektiv an der benzylischen Methylgruppe des 1,7-Phenanthrolins **1a** und lieferte den entsprechenden Aldehyd **2a** in hoher Ausbeute (87 %) *(Schema 5).*[193] Eine Überoxidation zur Carbonsäure wurde vermieden, indem auf den Zusatz von Wasser verzichtet wurde.




*Schema 5: Selen(IV)-oxid-vermittelte Oxidation des 1,7-Phenanthrolinbausteins **1a** zur Darstellung des entsprechenden Aldehyds **2a**.*

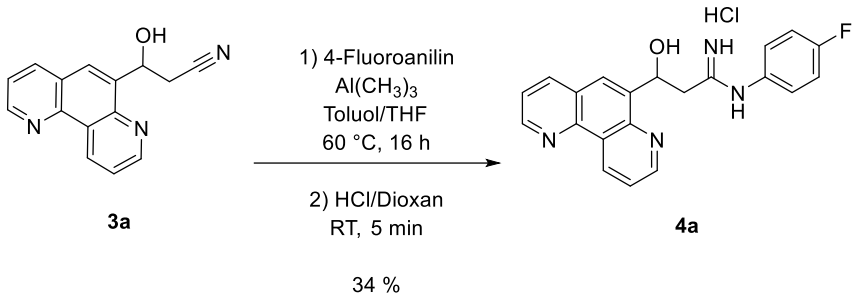
Der durch die Riley-Oxidation erhaltene 1,7-Phenanthrolin-6-Carbaldehyd **2a** wurde schließlich in einer nukleophilen Addition zum Nitril **3a** umgesetzt. Zu diesem Zweck wurde Acetonitril mit *n*-Butyllithium bei -78 °C deprotoniert, wodurch das entsprechende Cyanomethyllithium gebildet wurde. Dieses stark basische Nukleophil greift den Aldehyd am Carbonylkohlenstoff an.[183] Die Reaktion liefert das gewünschte Produkt in einer Ausbeute von 57 % (*Schema 6*).




*Schema 6: Darstellung des Phenanthrolinnitrils **3a** in einer n-Butyllithium-vermittelten Reaktion.*

Die Umsetzung des Nitrils **3a** mit 4-Fluoranilin wurde analog zum bereits von *Knaab* etablierten $Al(CH_3)_3$-vermittelten Amidierungsprotokoll durchgeführt. Dabei stellte bereits *Knaab* bei dieser Reaktion eine ausgeprägte Temperaturempfindlichkeit fest. Bei höheren Temperaturen bilden sich bevorzugt höhermolekulare Produkte, die auf dimerisierte Nebenprodukte zurückzuführen sind.[184,194]

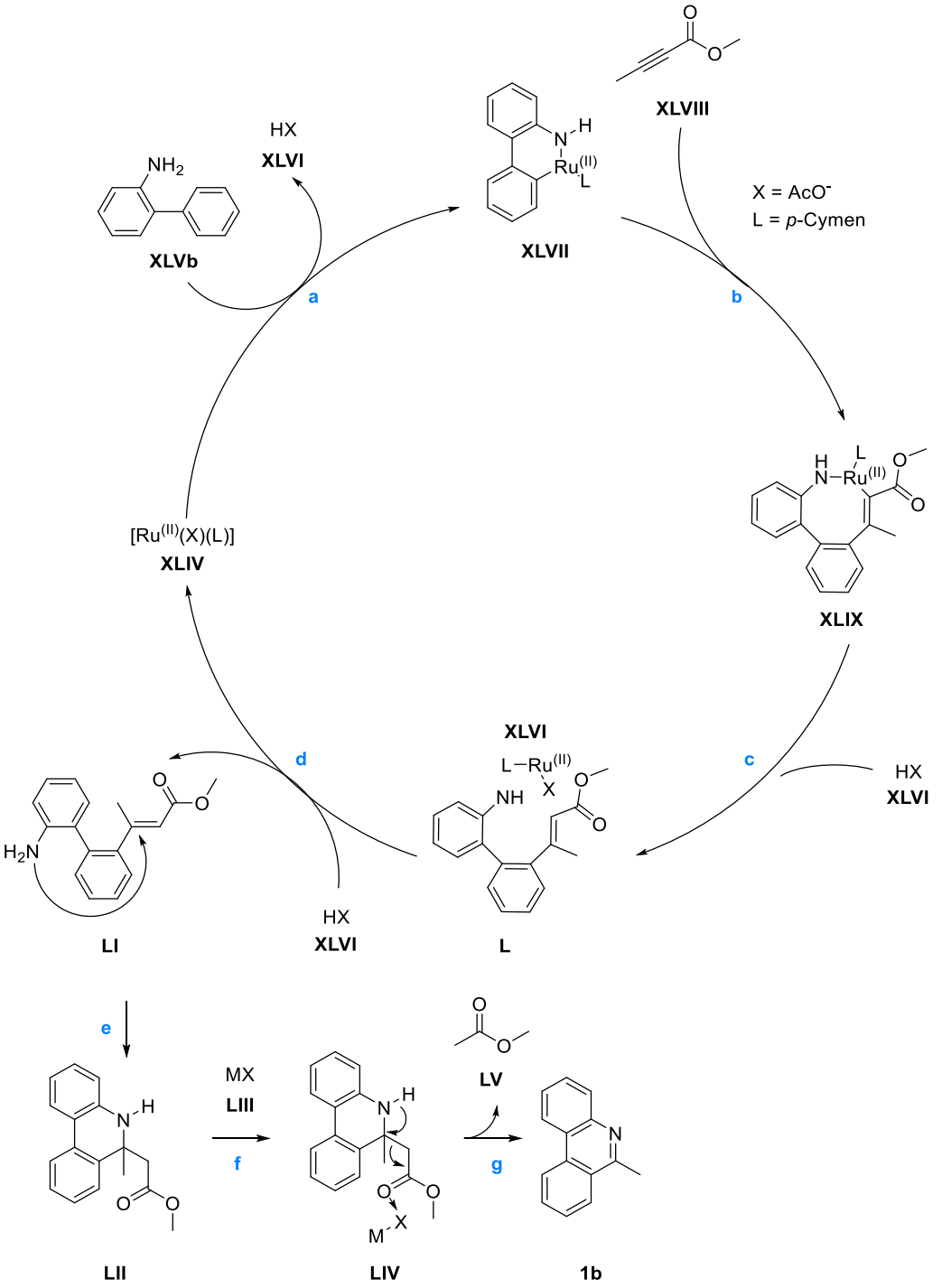
Um eine Überreaktion zu vermeiden, wurde die Temperatur auf 60 °C begrenzt. Eine vollständige Umsetzung des Nitrils **3a** konnte dabei jedoch nicht erzielt werden, sodass Edukt zurückgewonnen wurde. Das gewünschte 3-Hydroxypropanamidin **4a** konnte in einer moderaten Ausbeute von 34 % isoliert werden *(Schema 7).*




*Schema 7: Synthese des 3-HPAs **4a**.*

### 3.1.2 Synthese der phenanthridinbasierten 3-Hydroxypropanamidine

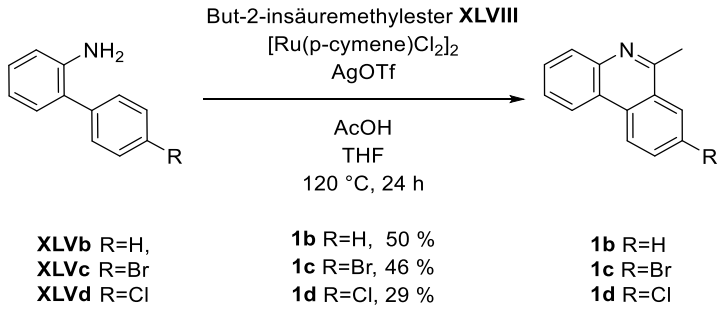
Zur Darstellung der Phenanthridine **1b-d** wurde eine von *Xu* et al.[195] beschriebene Kaskadenreaktion verwendet, die den Aufbau der Phenanthridine **1b-d** ausgehend vom *o*-substituierten Biphenylamin **XLVb-d** in einem Schritt ermöglicht. *Xu* et al. haben einen möglichen Mechanismus postuliert, der im Folgenden systematisch am Beispiel des Phenanthridins **1b** dargestellt wird *(Schema 8)*.




*Schema 8: Metallkatalysierte Kaskadenreaktion zum Aufbau von Phenanthridin **1b** nach Xu et al.*[195]

Dabei durchläuft das jeweilige Biphenylamin **XLVb** unter katalytischen Bedingungen ([Ru(*p*-cymene)$Cl_2$]$_2$, AgOTf) in Anwesenheit von Essigsäure zunächst eine *o*-selektive C(sp²)-H-Aktivierung und N-H-Deprotonierung (Schritt a). Dabei koordiniert die aktive Ru(II)-Spezies **XLIV** an das Stickstoffatom und unter Abspaltung von HX **XLVI** folgt eine cyclometallierende *o*-C-H-Aktivierung, sodass der Ru-C-gebundene Komplex **XLVII** entsteht. In die Bindung des *o*-cyclometallierten Intermediats **XLVII** wird anschließend die Alkinyl-Einheit von **XLVIII** inseriert (Schritt b). Das entstehende Vinyl-Intermediat **XLIX** wird protoniert (Schritt c) und anschließend wieder protodemetalliert (Schritt d). In einer intramolekularen Aza-Michael-Addition (Schritt e-g) entsteht das Produkt **1b** (*Schema 8*).[195]

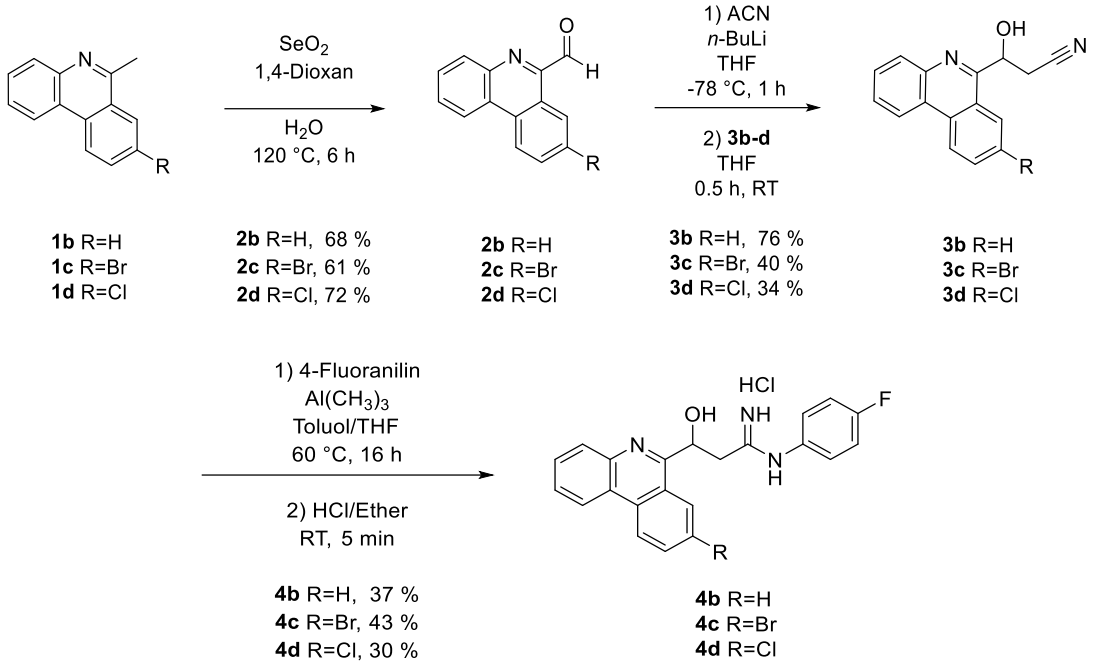
Diese Ein-Topf-Kaskadenreaktion erfolgt in einem einzigen Reaktionsgefäß und toleriert sowohl Wasserstoff- als auch Halogensubstituenten am Biphenyl.[195] Die Zielverbindungen **1b-d** wurden in moderaten bis guten Ausbeuten (29-50 %) erhalten, was zeigt, dass die Methode einen effizienten Zugang zu funktionalisierten Phenanthridinen ermöglicht (*Schema 9*).




*Schema 9: Synthese der Phenanthridine **1b-d**.*

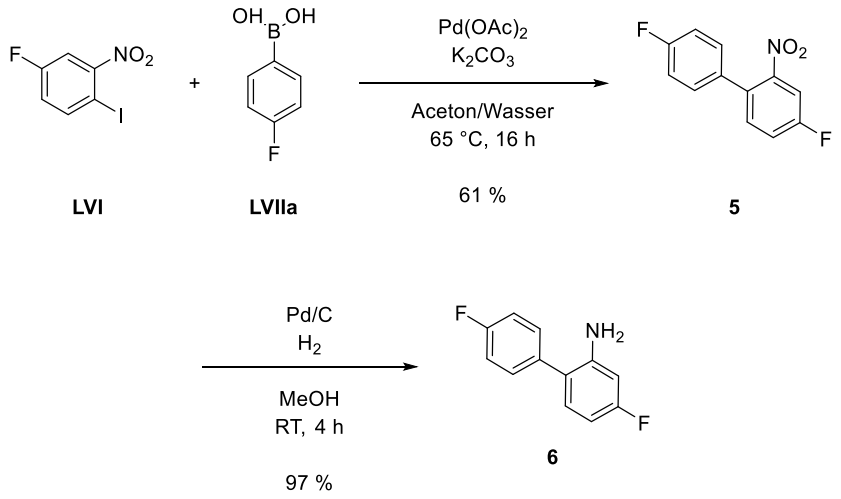
Zunächst wurde analog zum Phenanthrolin-Analogon **1a** die Methylgruppe der Phenanthridine **1b-d** mittels Selen(IV)-oxid selektiv zur entsprechenden Aldehydfunktion **2b-d** oxidiert, wobei die Aldehyde **2b-d** (61-72 %) in moderaten bis guten Ausbeuten isoliert wurden. Die Ausbeuten zeigen dabei den erwarteten Trend und sinken mit der zunehmenden elektronischen Desaktivierung durch den jeweiligen Halogensubstituenten (H > Br > Cl), da elektronenziehende Substituenten die Elektronendichte im aromatischen System verringern, wodurch die Reaktivität der benzylischen Methylgruppe gegenüber der Oxidation herabgesetzt wird.[193]

Im anknüpfenden funktionellen Aufbau der 3-Hydroxypropannitrile **3b-d** wurde die von *Leven* et al. etablierte Synthesesequenz angewendet. Zunächst wurde dabei mit *n*-Butyllithium und Acetonitril das jeweilige Phenanthridinnitril **3b-d** in moderaten bis guten Ausbeuten aufgebaut, das dann unter Lewis-sauren Bedingungen mit 4-Fluoranilin umgesetzt werden konnte. Dadurch konnten die 3-HPAs **4b-d** dargestellt werden *(Schema 10).*[183,184]




*Schema 10: Synthesesequenz der Phenanthridin-basierten 3-HPAs **4b-4d**.*

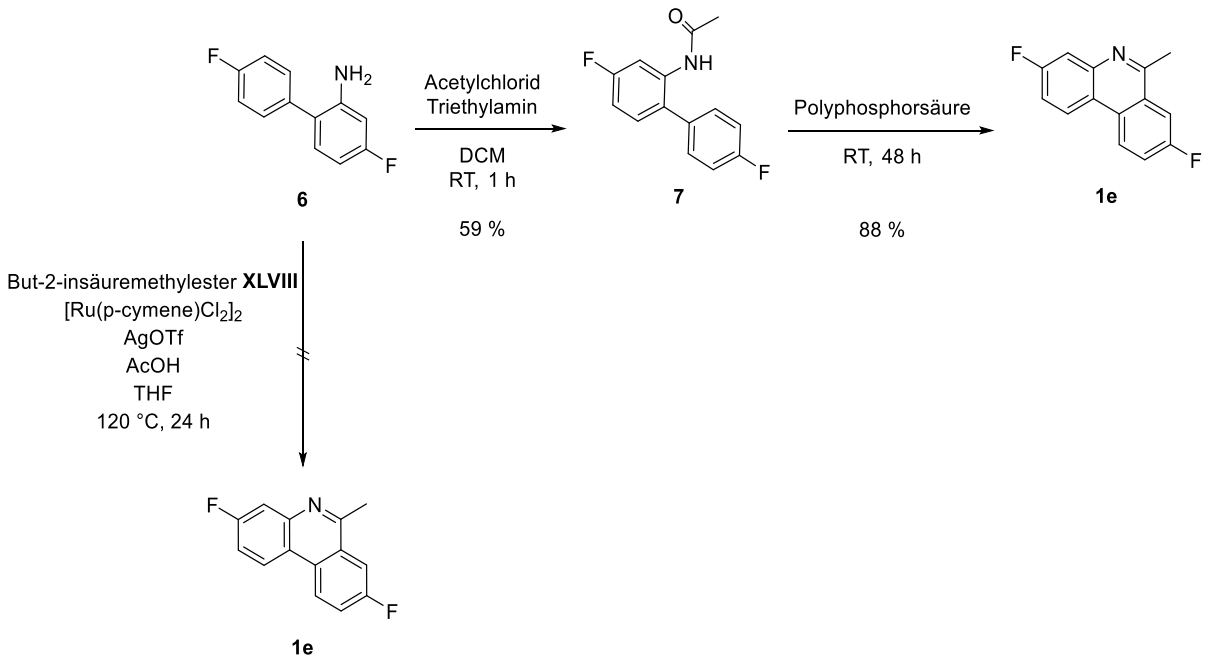
Zusätzlich sollte ein zweifach fluoriertes Phenanthridin-Derivat synthetisiert werden. Hierfür war ein schrittweiser Aufbau aus kleineren, funktionalisierten Aromaten zweckmäßig. Das Biarylsystem wurde zunächst in einer Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung ausgehend von dem Nitrobenzol **LVI** und der Boronsäure **LVIIa** hergestellt. Unter Einsatz von 10 mol% $Pd(OAc)_2$ und Kaliumcarbonat gelang die Umsetzung unter milden Bedingungen und lieferte das Fluor-substituierte Biarylsystem **5** in einer hohen Ausbeute von 61 %.[196] Dieses diente als Ausgangspunkt für den weiteren Gerüstaufbau. Die Nitrogruppe des Biaryls **5** wurde anschließend in einer katalytischen Hydrierung (Pd/C, $H_2$) selektiv reduziert.[197] Die Reaktion verlief in Methanol bei Raumtemperatur und lieferte das Anilin **6** in einer hohen Ausbeute von 97 % (*Schema 11*).




*Schema 11: Suzuki-Miyaura-Kupplung zur Darstellung des Fluor-substituierten Biarylsystems **5** und anschließende Pd/C-katalysierte Reduktion der Nitrogruppe zum Anilin **6**.*

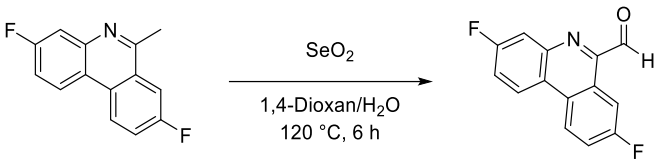
Während die rutheniumkatalysierte Kaskadenreaktion nach *Xu* et al. für die unsubstituierten sowie Brom- und Chlor-halogenierten Biphenylamine **XLVb-d** zu den entsprechenden Phenanthridinen **1b-d** in moderaten bis guten Ausbeuten führte, zeigte das zweifach fluorierte Diphenylanilin **6** ein abweichendes Reaktionsverhalten.[195] Die entstandene Reaktionsmischung wurde mithilfe der HPLC auf den Umsatz des Biphenylamins **6** zum Phenanthridin **1e** überprüft. Es konnte kein signifikanter Umsatz zum Zielprodukt festgestellt werden, stattdessen entstand ein komplexes Gemisch aus Nebenprodukten, die chromatographisch nicht abgetrennt werden konnten. Dies kann auf die stark elektronenziehende Wirkung der beiden Fluorsubstituenten zurückgeführt werden, die den Aromaten desaktivieren und somit die für die Metallkatalyse entscheidende C-H-Aktivierung, beziehungsweise die Bildung des Cycloruthenium-Intermediats, hemmen.

Als alternative Syntheseroute wurde das Biphenylamin **6** anschließend mittels Acetylchlorid in Gegenwart von Triethylamin acyliert.[198] Die Umsetzung erfolgte in Dichlormethan bei Raumtemperatur und führte zum entsprechenden Acetanilid **7** mit einer Ausbeute von 59 %. Die anschließende Umsetzung von **7** in Polyphosphorsäure führte nach 48 h zum Ringschluss und ergab das Phenanthridin **1e** in einer Ausbeute von 88 % (*Schema 12*).[199]




*Schema 12: Geplante und tatsächlich realisierte Synthesesequenz zum Aufbau des Fluor-substituierten Phenanthridins **1e** ausgehend vom Biphenylamin **6**.*

Die selektive Oxidation der Methylgruppe des polycyclischen Aza-Aromaten **1e** wurde mittels Selen(IV)-oxid in 1,4-Dioxan/Wasser durchgeführt.[193] Unter moderaten Temperaturen (120 °C) entstand der entsprechende Aldehyd **2e**, der in einer Ausbeute von 47 % isoliert werden konnte *(Schema 13).*



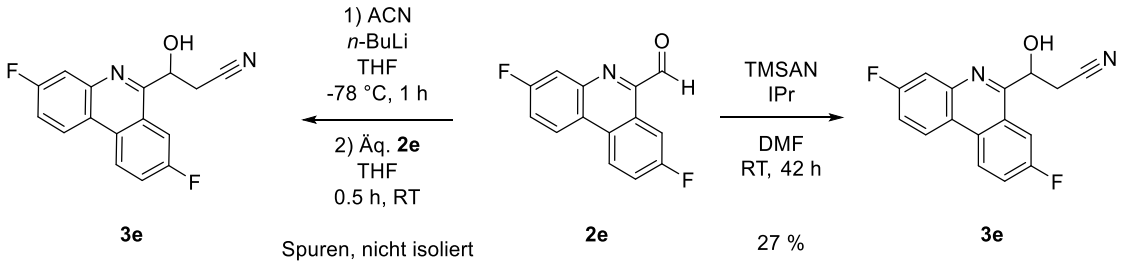

**1e** **2e**

47 %

*Schema 13: Selen(IV)-oxid-vermittelte Oxidation des Phenanthridinbausteins **1e**.*

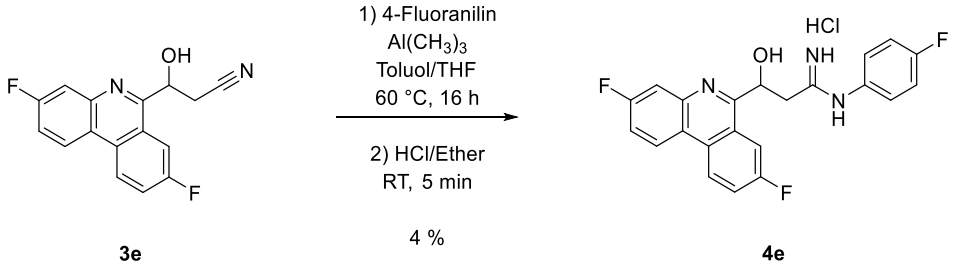
Die ursprünglich geplante Einführung der Nitrilfunktionalität sollte entsprechend den zuvor von *Leven* am Arbeitskreis *Kurz* etablierten Bedingungen durch die Addition von Cyanomethyllithium an den Aldehyd **2e** erfolgen.[183,184] Im Unterschied zu den vorherigen Derivaten führte der Einsatz von *n*-BuLi/ACN bei dem fluorierten Phenanthridin-Derivat jedoch zu erheblicher Nebenproduktbildung, vermutlich aufgrund von ausgeprägter Fragmentierung. Folglich konnten nur Spuren des entsprechenden Nitrils in verwertbarer Reinheit isoliert werden. Eine mögliche Ursache für die beobachtete Fragmentierung und Nebenproduktbildung könnte die erhöhte Reaktivität des Fluor-substituierten Phenanthridin-Derivats **2e** sein. Im Vergleich zu den zuvor synthetisierten Chlor- und Bromsubstituierten Derivaten weist Fluor einen stärker negativen, induktiven Effekt auf. Da Fluor eine deutlich bessere Abgangsgruppe in nukleophilen aromatischen Substitutionsreaktionen ($S_NAr$) darstellt, sind unter den vorliegenden Bedingungen konkurrierende $S_NAr$-Reaktionen durch Angriff des Cyanomethylanions an den Aromaten denkbar.

Um Nebenreaktionen zu limitieren, wurde auf eine mildere, selektivere Cyanierungsstrategie zurückgegriffen. Die Umsetzung des Aldehyds **2e** mit Trimethylsilylacetonitril (TMSAN) in Gegenwart eines *N*-heterocyclischen Carbens (NHC, hier IPr) ermöglichte die direkte Umwandlung zum *β*-Hydroxynitril **3e**. Dabei aktiviert das NHC (IPr) das TMSAN durch einen nukleophilen Angriff am Siliziumatom. Dies führt zur Bildung eines hexavalenten Siliziumintermediats, wodurch eine polare Si-C-Bindung entsteht. Das Cyanomethylfragment wird dadurch stark nukleophil und greift den Aldehyd **2e** an. Unter saurer Abspaltung des Silylrestes entsteht das *β*-Hydroxynitril **3e**.[200] Durch Anpassung der Syntheseroute konnte **3e** in einer Ausbeute von 27 % gewonnen werden. Die alternative Route erwies sich damit für dieses elektronisch modifizierte Phenanthridinsystem als effektiver als die klassische *n*-BuLi-basierte Route (*Schema 14*).




*Schema 14: Syntheserouten vom Aldehyd **2e** zum Nitril **3e**.*

Unter Lewis-sauren Bedingungen wurde das Nitril **3e** analog zu den vorherigen Derivaten mit 4-Fluoranilin umgesetzt, wodurch das 3-HPA **4e** dargestellt wurde (*Schema 15*).[184]




*Schema 15: Synthesesequenz des Phenanthridin-basierten 3-HPAs **4e**.*

### 3.1.3 Synthese und biologische Evaluation der 3-Hydroxypropanamidine

Der folgende Abschnitt entspricht der veröffentlichten Arbeit *Klein*, S.; et al. *J. Med. Chem.* **2025** und wird in der Originalformatierung und -nummerierung wiedergegeben.[201]

Journal of Medicinal Chemistry

pubs.acs.org/jmc Article

# Structure–Activity Relationships of 3-Hydroxypropanamidines (HPAs) with Potent In Vivo Antimalarial Activity

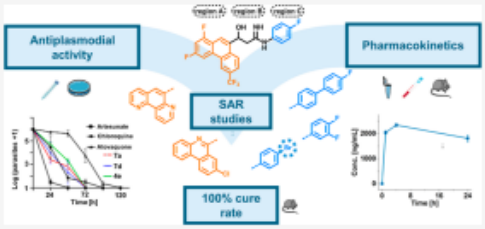
Saskia Klein,[†] Alena Moritz,[†] Lais Pessanha de Carvalho,[†] Tanja C. Knaab, Beate Lungerich, Lukas Meyer, Jona Sandström, Jessica L. Thibaud, Katherine A. de Villiers, David A. Fidock, Sergio Wittlin, Matthias Rottmann, Jana Held,* Bjoern B. Burckhardt,* and Thomas Kurz*

Cite This: https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5c01337 Read Online

ACCESS | Metrics & More | Article Recommendations | Supporting Information

Downloaded via DUESSELDORF LIBRARIES on September 16, 2025 at 09:35:46 (UTC).
See https://pubs.acs.org/sharingguidelines for options on how to legitimately share published articles.

**ABSTRACT:** New treatment strategies are required to combat the spread of drug-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. The synthesis and preclinical evaluation of novel 3-hydroxy-propanamidines (HPAs), with modifications of the phenanthrene and the 4-fluorobenzamidine moieties, has yielded several analogs exhibiting excellent in vitro growth inhibition of drug-sensitive or resistant *P. falciparum* fresh clinical isolates and culture-adapted strains. No cytotoxicity in the human HepG2 cell line was observed, demonstrating notable parasite selectivity. The most active HPA **7d**, which features a 4-bromobenzamidine moiety, inhibited the formation of synthetic hemozoin ($\beta$-hematin) with $IC_{50}$ values lower than chloroquine and the lead compound **TKK130**. Additionally, **7d** showed a killing rate comparable to chloroquine. In initial in vivo pharmacokinetics, **7d** displayed a favorable pharmacokinetic profile, with a fast onset and slow elimination phase. In vivo, **7d** demonstrated dose-dependent curative activity after oral administration in the *Plasmodium berghei* mouse model, without apparent signs of toxicity.




## INTRODUCTION

Malaria is transmitted through the blood meals of infected female *Anopheles* mosquitoes carrying *Plasmodium* parasites.[1] In 2023, an estimated 263 million cases of malaria were reported worldwide.[2] Between 2000 and 2023, malaria infections were responsible for approximately 16 million deaths globally with children comprising the majority of the nearly 600,000 annual deaths.[2,3] After decades of joint efforts, the RTS,S vaccine, also known as Mosquirix, has been approved for use in children in high-risk malaria areas in sub-Saharan Africa. Additionally, R21/Matrix-M, a similar vaccine developed by Novavax in collaboration with the University of Oxford, is available for the prevention of malaria in children.[4−6] However, the limited efficacy and short-term protection offered by current malaria vaccines make it challenging to evaluate their long-term impact. As such, chemotherapy will continue to play a central role in malaria treatment in the foreseeable future. The recommended treatment of malaria is a combination of a fast-acting artemisinin derivative and a longer-lasting partner, like lumefantrine.[7] In several regions, *Plasmodium falciparum* has developed resistance to approved drugs, underscoring the urgent need for new treatment alternatives.[8] Novel antimalarials should preferably exhibit high potency, multistage activity, a low propensity for resistance, and a pharmacokinetic profile that enables infrequent dosing. In recent years, significant efforts have been made to develop new antimalarial drugs with novel mechanisms of action aimed at improving therapeutic options, tolerability, and safety, particularly for infants and pregnant women. These research endeavors have led to the discovery of innovative molecules, which are already in late-stage clinical development.[9,10] Thus, artesunate-pyronaridine (Pyramax) was recently approved for the treatment of uncomplicated *P. falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria in adults and children (≥5 kg).[11] Despite these advances, very few new drugs with innovative modes of action have been approved in recent decades for the treatment of malaria.[9]

3-Hydroxypropanamidines (HPAs) have recently been reported as a novel chemotype with potent in vivo antimalarial activity and a high barrier to resistance.[12,13] Among these, our lead compound, **TKK130**, has shown the most promising activity to date. To gain deeper insights into their structure–activity relationship, novel 3-hydroxypropanamidines (HPAs) were synthesized with structural modifications in regions A

Received: May 15, 2025
Revised: July 29, 2025
Accepted: August 18, 2025

ACS Publications © XXXX American Chemical Society

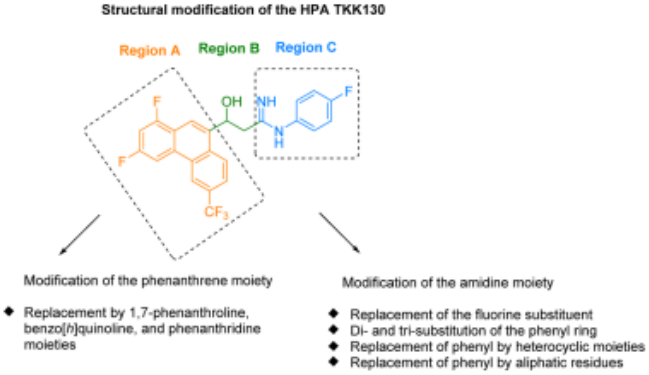



**Figure 1.** Structural modifications of **TKK130** highlighting Region A (orange, phenanthrene moiety), Region B (green), and Region C (blue, 4-fluorobenzamidine moiety). Structural modifications were introduced in regions A and C, marked by dashed-line rectangles.

(phenanthrene moiety) and C (benzamidine moiety). Initially, the lipophilic, fluorinated phenanthrene moiety in region A was replaced with tricyclic aza-analogous ring systems, such as 1,7-phenanthroline, benzo[*h*]quinoline, and phenanthridine. A primary objective was to study how replacing the lipophilic, fluorinated phenanthrene moiety with tricyclic heterocyclic alternatives, along with modifications to the 4-fluorobenzamidine structure, would affect the antiplasmodial activity and pharmacokinetic properties of the lead compound, **TKK130** (Figure 1).

## RESULTS

**Synthesis of HPAs with 1,7-Phenanthroline, Benzo-[h]quinoline, and Phenanthridine Moieties for the Replacement of the Phenanthrene Moiety in Region A.** 6-Methyl-1,7-phenanthroline (**1a**), the central building block for the synthesis of HPA **4a**, was prepared via a Skraup synthesis, following the method described by O'Murchu.[14] 4-Methylbenzo[h]quinoline (**1b**) and four halogen-substituted 6-methylphenanthridines (**1c–f**) were also synthesized according to established literature procedures and used as key intermediates for the preparation of benzo[h]quinoline- and phenanthridine-based HPAs (**4b–f**).[15−21] First, the methyl groups of **1a–f** were oxidized with selenium dioxide to produce the corresponding heterocyclic carbaldehydes (**2a–f**).[22,23] The *β*-hydroxynitriles (**3a–f**) were obtained by reacting **2a–f** with lithioacetonitrile, following a method described by Leven et al.[24] Finally, all HPAs (**4a–f**) were synthesized by reacting the *β*-hydroxynitriles (**3a-f**) with 4-fluoroaniline in the presence of trimethylaluminum in toluene (Scheme 1).[12,13]

**In Vitro evaluation of the antiplasmodial activity of the 1,7-phenanthroline-, benzo[h]quinoline-, and phenanthridine-based analogs 4a–f, as well as their cytotoxicity against human HepG2 cells.** Replacement of the unsubstituted phenanthrene system of the previously described HPA **TKK93**[12] with unsubstituted aza-analogous phenanthrene residues (**4a**, **4b**, **4c**) resulted in a reduction of the antiplasmodial in vitro activity against the *P. falciparum* drug-sensitive *Pf*3D7 and multidrug-resistant *Pf*Dd2 strains (Table 1).[12] This reduction was particularly pronounced with the 1,7-phenanthroline derivative **4a**, which showed only micromolar activity against asexual blood stage parasites. The most active derivatives of this small compound series, the 8-bromo- and 8-chlorophenanthridine derivatives **4d** and **4e**, exhibited plasmodial growth inhibition comparable to **TKK93**, which contains an unsubstituted phenanthrene system. However, their activity was reduced compared to **TKK130**, which features a fluorinated phenanthrene system, likely contributing to its enhanced potency. Specifically, **4d** demonstrated $IC_{50}$ values of 19.5 nM against *Pf*3D7 and 46.3 nM against *Pf*Dd2, while **4e** showed $IC_{50}$ values of 18.7 nM against *Pf*3D7 and 49.9 nM against *Pf*Dd2. Surprisingly, the 3,8-difluoro substituted phenanthridine derivative **4f** exhibited significantly reduced antiplasmodial in vitro activity compared to **TKK130** and **TKK93** with approximately 10-fold higher $IC_{50}$ values.[12,13] All tested HPAs **4a–f** exhibited low cytotoxicity in the human HepG2 cell line and their parasite selectivity was remarkable (Table 1). Although compounds **4d** and **4e** did not exhibit improved antiplasmodial in vitro activity, their speed of activity, mode of action and in vivo activity was still evaluated as they displayed the most potent activity from this new small series of aza-analogues (see SI).

**Structural Modification of Region C: Modification of the Amidine Moiety.** Since the aza-analogous HPAs **4a–f** did not show an improvement in antiplasmodial activity, we next focused on modifying the amidine structure in region C. To enhance the antiplasmodial activity and to gain deeper insights into the structure–activity relationship (SAR), we performed extensive modifications of the 4-fluorobenzamidine structure. First, we altered the substituents and the substitution pattern on the phenyl ring. Based on previous SAR results, several halogen-substituted anilines were used.[12,13] Subsequently, we introduced both aromatic and nonaromatic heterocyclic amines, as well as aliphatic residues derived from primary and secondary amines. The amines chosen for the synthesis of the amidine moiety were either bioisosteres of 4-fluoroaniline or represented a wide range of steric and electronic properties. This selection strategy was intended to enable a comprehensive structure–activity relationship (SAR) analysis of the amidine moiety.

**Synthesis of 3-Hydroxypropanamidines (HPAs) 7a–v with Modified Amidine-Moieties.** The synthesis of the novel HPAs **7a–v** with structural modifications in region C was carried out according to the procedure reported by Knaab et al.[12,13] In case of HPAs **7a–s** the amidine moiety was


https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5c01337
J. Med. Chem. XXXX, XXX, XXX−XXX

**Scheme 1. Synthesis of 4a–f; (i) (a) 1a/1e, Selenium Oxide, 1,4-Dioxane, 110 °C, 4–6 h; (i) (b) 1b/1f, Selenium Dioxide, *tert*-Butyl Hydroperoxide, 1,4-Dioxane/$H_2O$, 110 °C, 4–6 h; (i) (c) 1c/1d, Selenium Dioxide, 1,4-Dioxane/$H_2O$, 110 °C, 5–6 h; (ii) (a) (1) Acetonitrile, *n*-BuLi, −78 °C, 1 h; (2) 2a–e, Room Temperature (RT), 0.5–1 h; (ii) (b) 2f, TMSAN, 1,3-Bis(2,6-Diisopropylphenyl) Imidazole-2-yli-dene, DMF, RT, 30 h; (iii) 4-Fluoroaniline, Al$(CH_3)_3$, Toluene/THF, RT to 60 °C, 16 h; RT, Room Temperature**

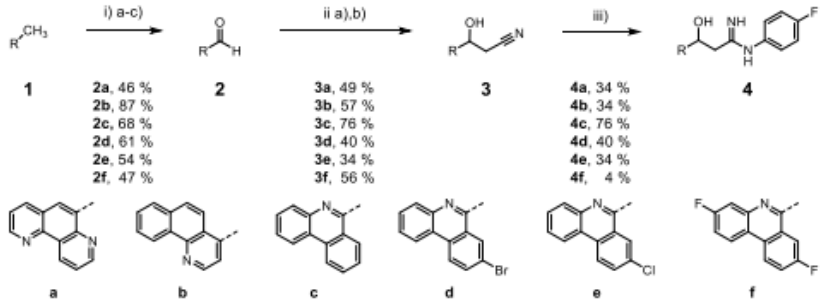
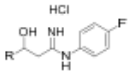



**Table 1. In Vitro Antiplasmodial Evaluation of 3-Hydroxypropanamidines 4a–f and Their Cytotoxicity against Human HepG2 Cells**



**TKK130, TKK93, 4a-f**

| Entry | R | *Pf*3D7 $IC_{50}$ ± SD [nM][a] | *Pf*Dd2 $IC_{50}$ ± SD [nM][a] | HepG2[b] $CC_{50}$ ± SD [μM][a] | SI[c] ($CC_{50}$HepG2/ $IC_{50}$*Pf*3D7) | RI[g] ($IC_{50}$ *Pf*Dd2/ $IC_{50}$ *Pf*3D7) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **CQ**[d] | | 3.3 ± 2.3 | 240 ± 130 | 168 ± 15.6 | 50909 | 72.2 |
| **LUM**[e,f] | | 6.4 ± 3.2 | 2.3 ± 0.5 | >250 | >40000 | 0.3 |
| **TKK130**[f] |  | 2.3 ± 1.1 | 3.5 ± 2.4 | 20.7 ± 2.2 | 10000 | 1.5 |
| **TKK93** |  | 27.2 ± 8.7 | 40.4 ± 10.2 | 10.1 ± 2.1 | 371 | 1.4 |
| **4a** |  | 3195 ± 825 | 8778 ± 1078 | 265 ± 26.6 | 82.9 | 2.7 |
| **4b** |  | 207 ± 66.4 | 531 ± 95.3 | 33.3 ± 2.6 | 160 | 2.6 |
| **4c** |  | 123 ± 44.3 | 89.2 ± 31.3 | 48.5 ± 2.1 | 392 | 0.7 |
| **4d** |  | 19.5 ± 0.6 | 46.3 ± 4.7 | >25 | >1000 | 2.4 |
| **4e** |  | 18.7 ± 2.3 | 49.9 ± 3 | >25 | >1000 | 2.6 |
| **4f** |  | 407 ± 16.6 | 936 ± 15.5 | 19.4 ± 19.6 | 47.5 | 2.2 |

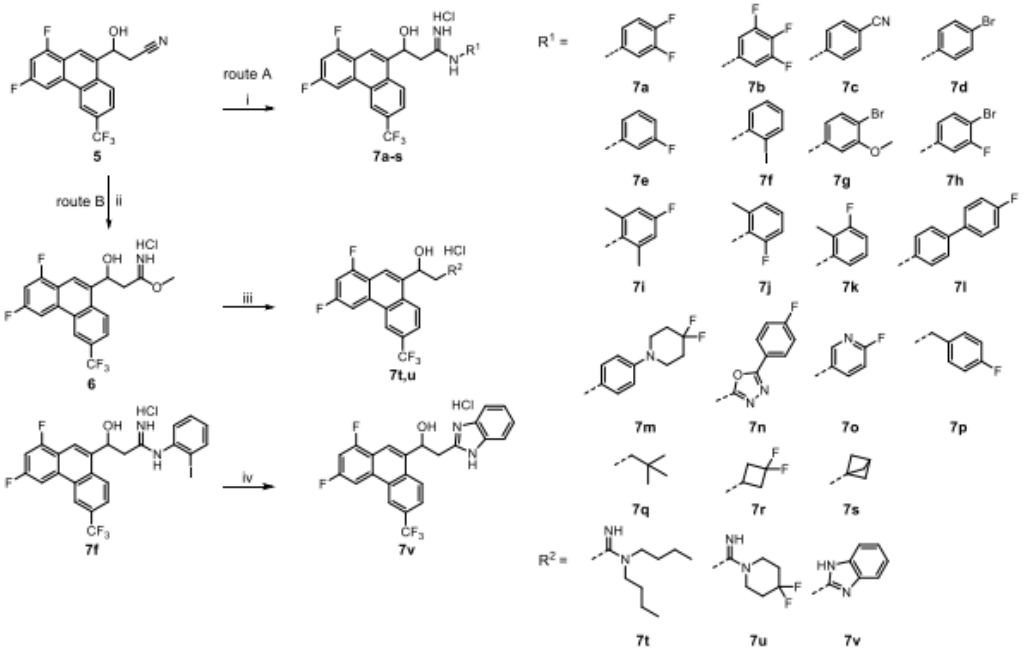
[a]Values show the mean ± standard deviation (SD) of at least three independent experiments conducted in duplicate. [b]Results from 3 different assays in duplicate. [c]Selectivity Index. [d]Chloroquine. [e]**LUM**: Lumefantrine. [f]Previously published by Knaab et al.[12,13] [g]Resistance index.

introduced in the final step of the synthetic sequence by reacting the 3-hydroxypropanenitrile **5** with an aromatic or aliphatic primary amine in the presence of trimethylaluminum (route A, Scheme 2).[12,13] The *β*-hydroxyimidate **6** was obtained by a Pinner reaction of 3-hydroxypropanenitrile **5** with methanol according to a method described by Leven et al.[25] The amidine moiety of HPAs **7t** and **7u** was obtained by treating the *β*-hydroxyimidate **6** with secondary amines. **7v** was synthesized from **7f** and benzimidazole in the presence of $Cu_2O$, *N′N*-dimethylethylenediamine and $K_2CO_3$ (route B, Scheme 2).[26]

**In Vitro Antiplasmodial Evaluation of HPAs 7a–v and Their Cytotoxicity Against Human HepG2 Cell.** Several mono-, di-, and trisubstituted benzamidine analogs (**7a**, **7b**, **7d**, **7f**, **7h**, **7k**) of **TKK130** exhibited in vitro antiplasmodial activity, with single-digit nanomolar $IC_{50}$ values against at least one of the *P. falciparum* strains (Table 2). While HPA **7e** ($IC_{50}$ ~ 2 nM), bearing a 3-fluorophenyl moiety, fully retained the activity of **TKK130**, HPAs **7g**, **7i**, **7j**, and **7u** also exhibited potent antiplasmodial activity, albeit with slightly reduced potency. Among the bulkier compounds, the rigid 4-fluorobiphenyl derivative **7l** nearly retained the potent in


https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5c01337
J. Med. Chem. XXXX, XXX, XXX−XXX

**Scheme 2. Synthesis of 7a–v; (i) (1) primary Amine, $Al(CH_3)_3$, Toluene/THF, RT to 60 °C, 16 h; (2) Diethyl Ether/HCl, RT, 5 min (ii) Methanol, Diethyl Ether, THF, HCl (g), −20 °C to −10 °C, 30 min (iii) (1) secondary Amine, Methanol, RT, 16 h; (2) 1,4-Dioxane/HCl, RT, 5 min (iv) $Cu_2O$, *N,N'*-Dimethylethylenediamine, Potassium Carbonate, Water, RT to 100 °C, 30 h; RT, Room Temperature**




vitro activity of **TKK130** against both *P. falciparum* strains ($IC_{50}$ ~ 5 nM). In contrast, the activity of **7m** with a 4,4-difluoropiperidine moiety was slightly reduced ($IC_{50}$ ~ 32 nM), and **7n** was the only inactive compound. Compared to the highly active biphenyl analog **7l**, compound **7n** features a polar 1,3,4-oxadiazole ring within the amidine moiety, which appears to be responsible for the loss of activity. The bioisosteric 2-fluoro-pyridine analog **7o** demonstrated a 20-fold weaker plasmodial growth inhibition ($IC_{50}$ values ~ 45 nM) than **TKK130**. Surprisingly, the more flexible 4-fluorobenzyl substituted amidine **7p**—prolonged by just one methylene group compared to **TKK130**—showed significantly decreased plasmodial growth inhibition ($IC_{50}$ values > 100 nM). No improvement of the antiplasmodial activity was observed in the bioisosteric bicyclo[1.1.1]pentan analog **7s** and the difluorocyclobutyl derivative **7r**. Significant reduction in antiplasmodial activity was observed for the mono- and dialkyl-substituted amidines **7q**, **7t** and the benzimidazole derivative **7v**. Their activity was only in the micromolar range. The compounds **7a**, **7d**, and **7e** also showed single-digit nanomolar activity against *Plasmodium knowlesi* (the species genetically closer to other non-*falciparum* species infecting humans), suggesting a multispecies activity. All tested compounds exhibited low cytotoxicity in the human HepG2 cell line and their parasite selectivity was high (Table 2).

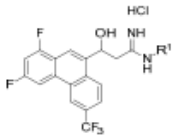
**Ex Vivo Susceptibilities of Clinical Isolates.** The activity of several promising compounds was assessed against *P. falciparum* isolated from participants with uncomplicated malaria (20 children and 9 adults) between January and August 2024 in Gabon (Lambaréné and surroundings). The clinical isolates were susceptible to the compounds with $IC_{50}$ values in the low nM range, confirming their potent activity. The basic demographic data and $IC_{50}$ values are shown in Tables 3 and 4, respectively.

**In Vitro Studies with Multidrug-Resistant *P. falciparum* Parasites.** When developing new antimalarial therapies, it is crucial to identify the risk of resistance early in the preclinical development phase and eliminate compounds with significant resistance liabilities. Due to their availability in larger quantities and to assess this risk, the highly active compounds **7a** and **7d** were tested against various laboratory-adapted *P. falciparum* strains from different geographical regions, each with varying resistance profiles. Compounds **7a** and **7d** demonstrated potent growth inhibition of the strains tested at nanomolar concentrations, regardless of their origin and resistance profile, when compared with the drug-sensitive NF54 strain (Table 5). In addition, compounds **7a** and **7d** were tested against a panel of laboratory culture-adapted strains with mutations in recently identified antimalarial targets, with results showing no cross-resistance (Tables 5, and 6).[27,28]

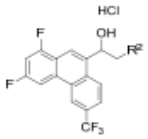
**In Vitro Parasite Reduction Ratio (PRR).** The PRR assay enables a direct comparison of the speed of action of different compound types, regardless of their mechanisms of action, and can be used to characterize and prioritize new antimalarial candidates in early stages of development. We determined the


https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5c01337
J. Med. Chem. XXXX, XXX, XXX−XXX

**Table 2. In Vitro Antiplasmodial Evaluation of HPAs 7a–v and Their Cytotoxicity against Human HepG2 Cell**




TKK130, 7a-s




7t-v

| Entry | $R^1$ | $R^2$ | *Pf* 3D7 $IC_{50} \pm SD$ [nM][a] | *Pf*Dd2 $IC_{50} \pm SD$ [nM][a] | *Pk*. *A1-H.1* $IC_{50} \pm SD$ [nM][a] | HepG2[b] $IC_{50} \pm SD$ [μM][a] | SI[c] HepG2/ *Pf*3D7 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **CQ**[d] | | | 3.3 ± 2.3 | 240 ± 130 | 19.5 ± 3.1 | 168 ± 15.6 | 51060 |
| **LUM**[e,f] | | | 6.4 ± 3.2 | 2.3 ± 0.5 | | >250 | >40000 |
| **TKK130**[f] |  | | 2.3 ± 1.1 | 3.5 ± 2.4 | | 20.7 ± 2.2 | 10000 |
| **7a** |  | | 7.2 ± 1.1 | 9.8 ± 0.2 | 2.4 ± 1.2 | 7.8 ± 1.3 | 1083 |
| **7b** |  | | 8.7 ± 0.8 | 10.6 ± 0.3 | | 18.3 ± 5.8 | 2103 |
| **7c** |  | | 24.7 ± 4.9 | 52.4 ± 3.6 | | >25 | >1000 |
| **7d** |  | | 6.1 ± 2.6 | 6.4 ± 4.2 | 3.3 ± 0 | 9.7 ± 2.1 | 1590 |
| **7e** |  | | 2.1 ± 0.4 | 2.2 ± 0.5 | 6.4 ± 0.2 | 11.4 ± 4.3 | 5428 |
| **7f** |  | | 10.9 ± 0.4 | 9.2 ± 1.8 | | 160.5 ± 22.3 | 5550 |
| **7g** |  | | 13.6 ± 1.8 | 10.2 ± 2.1 | | 15.3 ± 5.8 | 1125 |
| **7h** |  | | 5.3 ± 2.2 | 4.6 ± 2.5 | | 28.2 ± 1.9 | 5320 |
| **7i** |  | | 11.6 ± 1.3 | 14.7 ± 2.5 | | 6.3 ± 0.4 | 543 |
| **7j** |  | | 13.2 ± 2.6 | 10 ± 1.2 | | 22.8 ± 5.1 | 1727 |
| **7k** |  | | 9.3 ± 1 | 10.5 ± 0.9 | | 11.3 ± 3 | 1215 |
| **7l** |  | | 8.1 ± 0.1 | 5.7 ± 1.9 | | 10.5 ± 0.2 | 1296 |
| **7m** |  | | 33.6 ± 1.5 | 32.7 ± 1.8 | | 53.8 ± 10.9 | 1630 |
| **7n** |  | | >37000 | >37000 | | ND | |
| **7o** |  | | 43.5 ± 3.9 | 48.8 ± 0.1 | | 19.7 ± 4.3 | 452 |
| **7p** |  | | 1111 ± 28.8 | 558 ± 42.3 | | 7.2 ± 3 | 64.5 |
| **7q** |  | | 6019 ± 344 | 6074 ± 1053 | | ND | |
| **7r** |  | | 80.2 ± 12 | 102 ± 31.1 | | 7.2 ± 1.5 | 89.7 |
| **7s** |  | | 21.7 ± 1.2 | 61 ± 23.3 | | 10.2 ± 0.3 | 470 |
| **7t** | |  | 1110 ± 17.2 | 58.8 ± 18.8 | | 16.6 ± 2 | 149 |
| **7u** | |  | 14.4 ± 2.1 | 10.8 ± 2.3 | | 15.7 ± 1.1 | 1090 |
| **7v** | |  | 5593 ± 2740 | 3089 ± 695 | | ND | - |

[a]Values show the mean ± standard deviation (SD) of at least three independent experiments conducted in duplicate. [b]Results from 3 different assays in duplicate. [c]Selectivity Index. [d]Chloroquine. [e]**LUM**: Lumefantrine. [f]Previously published by Knaab et al.[12,13] [g]*P. knowlesi* strain A1-H.1. ND: not determined.



https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5c01337
J. Med. Chem. XXXX, XXX, XXX−XXX

**Table 3. Demographic Data of Patients Included in the Study**

| demographics | | | |
|---|---|---|---|
| age (years)[a] | parasitemia (p/μL)[a] | male (n) | female (n) |
| 11 (2-63) | 20757 (1102-439401) | 16 | 13 |

[a]All numbers before parentheses are medians while parentheses have the range for the data set.

speed of action of compounds **7a**, and **7d**, with the control drugs artesunate (fast-acting), chloroquine (medium-acting) and atovaquone (slow-acting) included for comparison (Figure 2). All compounds were tested at 10-fold of their $IC_{50}$ values, as determined in a standard growth inhibition assay. The new compounds **7a** and **7d** exhibited a killing rate that was slower than artesunate and the lead compound **TKK130**, but faster than chloroquine, effectively eliminating parasites within 72 h of exposure. In contrast, chloroquine and atovaquone eliminated all parasites only after 96 and 120 h of drug incubation, respectively (Figure 2).

**Mechanism of Action Studies.** Mechanism of action studies were conducted based on our previous finding that HPAs target the heme detoxification in a similar way to the structurally related drugs halofantrine (**Hf**) and lumefantrine (**LUM**).[12,13] Results from the NP-40 detergent assay revealed that **7a** and **7d** inhibit β-hematin formation with $IC_{50}$ values significantly lower than **CQ** (Table 7) and slightly lower than **TKK130**.[33−35] The markedly weaker inhibitory activity of **4d** and **4e** aligns with their reduced antiplasmodial activity (Table S1). This finding suggests that the HPAs disrupt the biocrystallization of heme, a critical process for *Plasmodium* survival.

To further explore how HPAs may disrupt the biocrystallization of heme, an *in silico* docking study was carried out using established methods.[35,36] Briefly, a 3 × 3 × 3 crystal lattice of the ferriprotoporphyrin IX μ-propionato dimer unit cell was prepared,[37] and ligands were docked to this to determine each compound's adsorption energy ($E_{ads}$) to the fastest-growing (001) face of the β-hematin crystal lattice. The size-independent ligand efficiency (SILE) was also evaluated for all ligands. This metric takes into account the number of non-hydrogen atoms (N) in each compound, and yields a modified docking score ($E_{ads}/N^{0.3}$) which is a measure in this case of a compound's inherent surface binding strength that might otherwise be skewed in favor of larger molecules.[38] Linear correlations were found between β-hematin inhibition activity ($IC_{50}$) and both docking ($E_{ads}$) and SILE scores (Figure S30). The results indicate that **7d** exhibits superior adsorption capabilities compared to the standards, suggesting a strong interaction with the target site. The findings also confirm that the inhibitory effect of HPAs on β-hematin formation is attributable to their intrinsic efficiency rather than their molecular size, further supporting their potential as antimalarial agents.

**Ex Vivo Pharmacokinetic (PK) Evaluation.** Owing to their superior levels of activity against several multidrug-resistant *P. falciparum* parasites, the halo-substituted benzamidine analogs **7a** and **7d** were selected for ex vivo pharmacokinetic evaluation.

*Plasma Stability.* Human plasma stability of **7a** and **7d** was investigated at two concentrations over 24 h. Within the observed period, **7a** was degraded by 27.5% at 2.5 ng/mL and by 37.8% at 50 ng/mL, respectively. Recovery of **7d** decreased by 43.5% for 2.5 ng/mL and by 46.5% for 50 ng/mL in plasma (Figure 3A). Calculated plasma half-lives were 51−65 h for **7a** and 33−38 h for **7d**. The observed degradation was mainly attributable to enzymatic metabolism in plasma, as the chemical stability of both compounds over 24 h was confirmed in bovine serum albumin (BSA) solutions.

*Blood-to-Plasma Ratio.* The distribution of **7a** and **7d** between human plasma and the corresponding red blood cell (RBC) fraction was studied using the blood-to-plasma ratio (K(B/P)). At the concentration level of 2.5 ng/mL, the K(B/P) value of **7a** was 0.97 ± 0.03 (mean ± SD) and 0.93 ± 0.06 for **7d**, respectively. K(B/P) values at 50 ng/mL were 1.12 ± 0.05 for **7a** and 1.00 ± 0.08 for **7d**, respectively (Figure 3B). Thus, all compounds were distributed almost equally between plasma and RBCs. These results were in contrast to **Hf** (0.68 ± 0.06) and **LUM** (0.48 ± 0.09) (see Table 8), which exhibited a preference for distribution in the plasma.[2,39]

*Microsomal Stability.* The metabolic fate of **7a** and **7d** was investigated using pooled human liver microsomes (HLMs) from 150 donors. For **7a**, we observed an intrinsic clearance of 9.4 μL/min/mg and a microsomal binding of 0.980, resulting in an unbound intrinsic clearance of 480.5 μL/min/mg. The hepatic clearance of **7a** was calculated at 1.04 L/min, which corresponds to a hepatic extraction ratio of 0.69 and which classified **7a** as intermediate extraction drug. **7d** was not metabolized by the HLMs. Microsomal binding of **7d** was found to be 0.993 using equilibrium dialysis. Consequently, **7d** can be classified as a low extraction drug. Further details of **7a** and **7d** are compiled in Figure 3C. In comparison, **Hf** showed a higher degree of degradation in HLMs ($Cl_{int}$ = 26.9 μL/min/mg, see Table 8), while intrinsic clearance of **LUM** ($Cl_{int}$ < 7 μL/min/mg) is similar to the investigated analogs indicating that CYP interaction might play a minor role for drug metabolism.[39]

*Plasma Protein Binding.* Plasma protein binding of **7a** was 99.78 ± 0.03% (mean ± SD, 1:10 dilution) and 99.73 ± 0.05% (1:20 dilution). For **7d**, PPB was found to be 99.91 ± 0.01% and 99.86 ± 0.02%, respectively (Figure 3D). The high binding affinity for plasma proteins was considered necessary for appropriate solubility of the lipophilic **7a** (log $D_{7.4}$ = 4.96) and **7d** (log $D_{7.4}$ = 5.37) in plasma.[40] Aforementioned plasma

**Table 4. In Vitro Antiplasmodial Activity of HPAs against Clinical Isolates from Gabon**

| | compounds ($IC_{50}$ in nM) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 4d | 4e | 7a | 7b | 7d | 7e | 7h |
| clinical isolates (n = 29) median (min−max) | 46[a] (2.8−116.7) | 33.2[a] (0.2−111.3) | 4.8[a] (0.4−18) | 6.4[a] (0.2−25.2) | 4.2[a] (0.2−11.1) | 3.1[a] (0.6−7.6) | 12.2[a] (1.7−29.9) |
| 3D7 (mean ± SD) | 19.5 ± 0.6 | 18.7 ± 2.3 | 7.2 ± 1.1 | 8.7 ± 0.8 | 6.1 ± 2.6 | 2.1 ± 0.4 | 5.3 ± 2.2 |

[a]Median (min−max).


https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5c01337
J. Med. Chem. XXXX, XXX, XXX−XXX

**Table 5. In Vitro Antiplasmodial Activity of 7a and 7d against Field Isolates from Malaria Patients**

| field isolates adapted to the laboratory | Resistant against | TKK130 $IC_{50}$ (nM)[a,b] | 7a $IC_{50}$ (nM)[b] | 7d $IC_{50}$ (nM)[b] | CQ $IC_{50}$ (nM)[b] |
|---|---|---|---|---|---|
| NF54[c] | | 12 | 9 | 16 | 11 |
| Dd2 | CQ, PYR, CYC, SUL, MFQ | 15 | 11 | 15 | 172 |
| K1 | CQ, PYR, CYC, SUL | 3 | 5 | 4 | 259 |
| 7G8 | CQ, PYR, CYC, SUL | 3 | 2 | 4 | 763 |
| TM90C2b | CQ, PYR, SUL, MFQ, ATO | 13 | 11 | 14 | 126 |
| RF12 (PH1263-C) | CQ, PYR, CYC, SUL, ART, PPQ | 4 | 4 | 9 | 201 |

[a]Previously published by Knaab et al.[13] [b]72 h [$^3$H]Hypoxanthine incorporation assay, mean values from two independent biological replicates (the majority of the individual values varied not more than 2×). [c]Sensitive strain. CQ: chloroquine; PYR: pyrimethamine; CYC: cycloguanil; SUL: sulfadoxin; MFQ: mefloquine; ATO: atovaquone; ART: artemisinin; PPQ: piperaquine.

**Table 6. In Vitro Antiplasmodial Activity of 7a and 7d against Drug-Resistant Mutant Strains**

| strain generated[a] | mutated locus | TKK130[b] $IC_{50}$ (nM)[c] | 7a $IC_{50}$ (nM)[c] | 7d $IC_{50}$ (nM)[c] | CQ $IC_{50}$ (nM)[c] | mutations references |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Dd2 | parent strain | 15 | 11 | 15 | 172 | |
| Dd2 DDD107498 | *Pf*eEF2 | 16 | 15 | 13 | 241 | 29 |
| Dd2 GNF156 | *Pf*carl I1139K | 7 | 9 | 9 | 166 | 30 |
| Dd2 ELQ300 | *Pf*cytB I22L | 14 | 12 | 13 | 131 | 31 |
| Dd2 SJ557733 | *Pf*atp4 G358S | 11 | 10 | 8 | 246 | 32 |
| Dd2 MMV693183 | *Pf*ACoAS T648M | 13 | 11 | 9 | 172 | |

[a]Mutant *P. falciparum* strains. Resistance-conferring mutations were generated in the Dd2 parental strain following drug selections with compounds indicated to the left of the gene name and mutation. PlasmoDB IDs of mutated genes are *Pf*eEF2 (PF3D7_1451110); *Pf*carl (PF3D7_0321900); *Pf*cytB (PF3D7_MITO02300); *Pf*atp4 (PF3D7_1211900); *Pf*ACoAS (PF3D7_0627800). [b]Previously published by Knaab et al.[13] [c]72 h [$^3$H]-hypoxanthine incorporation assays, with mean values derived from two independent biological replicates. The majority of the individual values varied no more than 2-fold. CQ: Chloroquine as control.

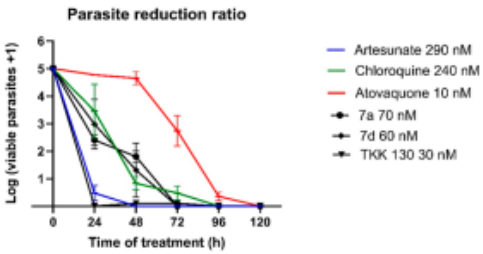



**Figure 2.** Parasite killing time course profiles in response to the newly synthesized compounds (**7a**, **d**), and comparator antimalarial drugs. Parasites were treated with compounds at their respective 10-fold $IC_{50}$ for different lengths of time and allowed to recover in drug-free medium for 28 days. Subsequently, parasite growth was measured using an HRP2-ELISA. Error bars are the SEM of at least three independent experiments in duplicate.

**Table 7. Detergent-Mediated NP-40 Assay to Determine Inhibition of β-Hematin Formation**

| compound | $IC_{50}$ (μM)[a] | adsorption energy[b] (kcal/mol) |
|---|---|---|
| **TKK130**[c] | 9.4 ± 0.3 | −12.1 |
| **7a** | 9.0 ± 0.4 | −10.5 |
| **7d** | 6.6 ± 1.2 | −13.2 |
| **CQ** | 21.0 ± 0.4 | −8.2 |
| **Hf** | 13.4 ± 0.4 | −10.4 |

[a]Values show the mean ± standard deviation (SD) of one independent experiment conducted in technical triplicate. [b]Value is from the top-scoring of five repeat docking poses. [c]Previously published by Knaab et al.[13]

protein binding values are all comparable to **Hf** and **LUM** (both >99%).[39]

**In Vivo Studies with *Plasmodium berghei*-Infected Mice.** Low nanomolar antiplasmodial in vitro activity, and excellent selectivity for *P. falciparum* led us to select compounds **7a** and **7d** for in vivo studies in *P. berghei*-infected mice. In a standard 4 day Peters test, groups of three mice were initially treated orally with four doses of 50 mg of the compounds/kg body weight. The most active compounds, **7a** and **7d**, demonstrated potent antimalarial activity (>99% decrease in % parasitemia) with 100% cure rates. In addition, **7a** and **7d** displayed a clear dose-dependent activity profile when comparing the mean survival time in days (MSD) and cure rate. **7d** maintained its fully curative activity at 30 mg/kg (99.6% activity, 30 MSDs) while at 10 mg/kg the cure rate dropped to 33% (99.7% activity, 21 MSDs). The in vivo efficacy of the HPA was reduced at 3 mg/kg (14 MSD, 0% cure rate), maintaining its significant parasitemia reduction activity of 99.6%. Compound **7a** exhibited a pronounced dose-dependent efficacy, achieving complete curative activity at 50 mg/kg (99.7%, 30 MSDs). At 30 mg/kg, **7a** maintained high efficacy (99.8%, 28 MSDs), whereas at 10 mg/kg the cure rate decreased despite achieving a 99.9% parasitemia reduction (20 MSDs). At 3 mg/kg, **7a** still exhibited a substantial parasitemia reduction of 99.8% (13 MSD, 0% cure rate). This in vivo study demonstrated that the in vivo activity profile of the 4-bromophenyl substituted HPA **7d** is comparable with the so far most active derivative **TKK130**. The in vivo activity of less active compounds **4d**, **4e** and **7b**, **7e**, **7l**, **7h**, **7j** is reported in the SI. No HPAs exhibited obvious signs of toxicity in these in vivo studies (Table 9).

**Snapshot Pharmacokinetics.** Because of its promising ex vivo pharmacokinetics (i.e., its high metabolic stability) and the potent in vivo activity, the in vivo pharmacokinetics of **7d** were further examined in mice infected with *P. berghei*. Following 50 mg/kg oral administration of **7d**, a maximum concentration of 2336.4 ± 57.3 ng/mL (mean ± SD) was observed at 4 ± 0 h (mean ± SD) post dose. The extent of


https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5c01337
J. Med. Chem. XXXX, XXX, XXX−XXX

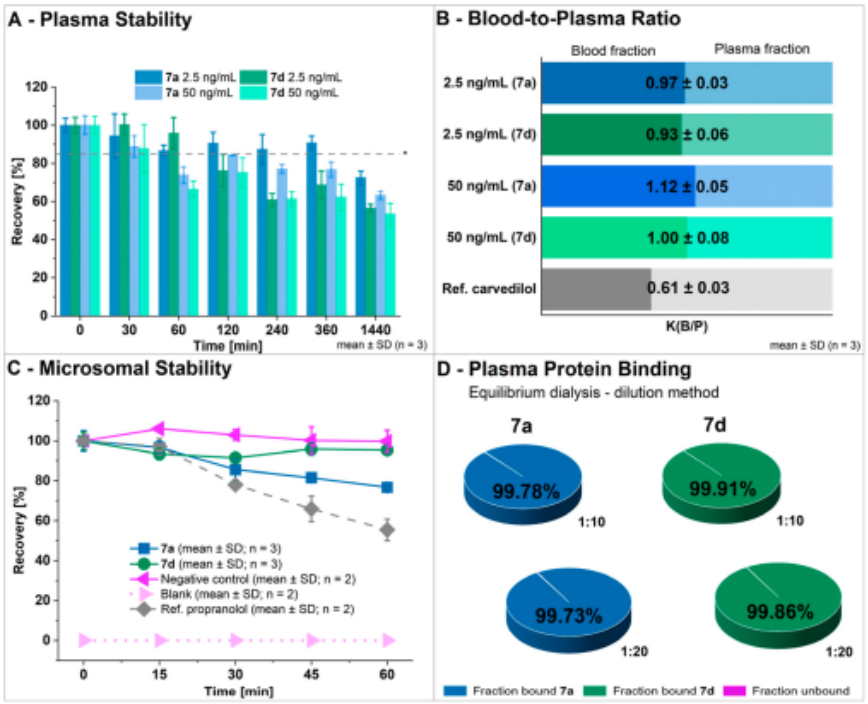



**Figure 3.** Compilation of ex vivo pharmacokinetics of **7a** and **7d**. (A) Plasma stability at 37 °C for 24 h (concentration 2.5 and 50 ng/mL). (B) Blood-to-plasma ratio (concentration 2.5 and 50 ng/mL); carvedilol served as the assay reference. (C) Microsomal stability in human liver microsomes (pooled from 150 donors) over 1 h (concentration 1 μM); propranolol served as the assay reference. (D) Plasma protein binding (concentration 100 ng/mL) was obtained using a standard equilibrium dialysis assay and dilution method; itraconazole served as the assay reference. SD = Standard deviation, * = acceptance criteria according to international bioanalytical guidelines, K(B/P) = Blood-to-Plasma Ratio, ref. = reference.

**Table 8. Ex Vivo Pharmacokinetic Parameters of 7a and 7d Compared to LUM and Hf**

| compound | blood-to-plasma ratio[a] | plasma protein binding | microsomal stability (60 min) |
|---|---|---|---|
| **LUM** | 0.48 ± 0.09[b] | >99%[b] | $Cl_{int}$ = < 7.0 μL/min/mg[b] |
| **Hf** | 0.68 ± 0.06[b] | >99%[b] | $Cl_{int}$ = 26.9 μL/min/mg[b] |
| **TKK130**[13] | 1.12 ± 0.04 | 99.6 ± 0.06%[a] | $Cl_{int}$ = 1.8 μL/min/mg |
| **7a** | 1.04 ± 0.09 | 99.8 ± 0.03%[a] | $Cl_{int}$ = 9.4 μL/min/mg |
| **7d** | 0.97 ± 0.07 | 99.9 ± 0.03%[a] | no degradation |

[a]Mean ± SD. [b]According to Charman et al.[39], $Cl_{int}$ = intrinsic clearance, **LUM** = lumefantrine, **Hf** = halofantrine.

systemic exposure ($AUC_{0-t}$) was 49002 ± 1772 ng/mL·h (mean ± SD). The observed concentration time profile showed an extended elimination phase beyond the observation period of the snapshot design. Although **LUM** exhibits a faster $C_{max}$ in other studies (1.9 h post dose), the extent of systemic exposure was considered a key parameter for 28 day outcomes.[41,42] The extent of systemic exposure was found to positively correlate with the cure rate.[41] The same finding was observed for **7d**, considering antiplasmodial and pharmacokinetic data. The dose-adjusted $AUC_{0-t}$ of **LUM** (6906 μmol·min/L) was slightly higher in comparison to **7d** (5632.42 μmol·min/L).[42] The elimination phase of **7d** was considerably slower than that of **LUM**. This may result in a longer-lasting effect and a potential reduction in the complex dose regimen of **LUM**, which involves administering multiple doses per day at 0, 8, 24, 36, 48, and 60 h, to once a day.[43,44] This could enhance the patient adherence, thereby ensuring an effective therapy. The concentration−time profile of **7d** is compiled in Figure 4A/B.

**hERG Potassium Channel Inhibition.** To assess and compare potential cardiotoxicity of **7d**, we evaluated its inhibition of the hERG potassium channel (Table 10), which is associated with cardiotoxic effects and is a known concern for certain arylamino alcohol antimalarials.[45,46] These data were acquired using a fluorescence polarization assay. **7d** exhibited a significantly weaker hERG potassium channel inhibition compared to **TKK130**, **Hf** and **LUM**, representing an improvement of the inhibitor profile.


https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5c01337
J. Med. Chem. XXXX, XXX, XXX−XXX

**Table 9. In Vivo Antiplasmodial Activity of 7a and 7d**

| compound | oral dose[a] | activity [%][b] | MSD [d][c] | cured[d] |
|---|---|---|---|---|
| **CQ** | 4 × 30 | 99.9 | 21 | 0/10 |
| **ART**[e] | 4 × 30 | 99 | 9 | 0/10 |
| **LUM**[f] | 4 × 30 | 99.8 | >30 | 3/3 |
| **TKK130** | 4 × 50 | 99.8 | 30 | 3/3 |
| **TKK130** | 4 × 30 | 99.9 | 30 | 3/3 |
| **TKK130** | 4 × 10 | 99.9 | 28 | 1/3 |
| **TKK130** | 4 × 3 | 99.9 | 20 | 0/3 |
| **7a**[g] | 4 × 50 | 99.7 | 30 | 3/3 |
| **7a** | 4 × 30 | 99.8 | 28 | 2/3 |
| **7a** | 4 × 10 | 99.9 | 20 | 0/3 |
| **7a** | 4 × 3 | 99.8 | 13 | 0/3 |
| **7d** | 4 × 50 | 99.8 | 30 | 3/3 |
| **7d** | 4 × 30 | 99.6 | 30 | 3/3 |
| **7d** | 4 × 10 | 99.7 | 21 | 1/3 |
| **7d** | 4 × 3 | 99.6 | 14 | 0/3 |
| control | | 0 | 4 | |

[a]Standard four-day Peters test using daily oral doses of indicated compound (mg/kg body weight). Experimental groups ($n$ = 3 mice) were treated four times (at 4, 24, 48, and 72 h) postinfection. [b]Blood for parasitemia determination by FACS analysis was collected on day 4 (96 h after infection). Activity was calculated as the difference between the mean parasitemia for the control and treated groups expressed in % relative to the control group. [c]Mean survival time in days (MSD). Control mice and other mice for which the antimalarial activity was <40% were euthanized on day 4 postinfection. The survival of the animals was monitored by microscopy for up to 30 days. A compound was considered curative (>30), if the animal survived to day 30 postinfection with no detectable parasites (detection limit of 1 parasite per 10,000 erythrocytes). [d]Number of parasite-free mice on day 30. [e]Artemisinin (**ART**). [f]Lumefantrine (**LUM**). [g]Previously published by Knaab et al.[13]

**Table 10. hERG Potassium Channel Inhibition of 7d**

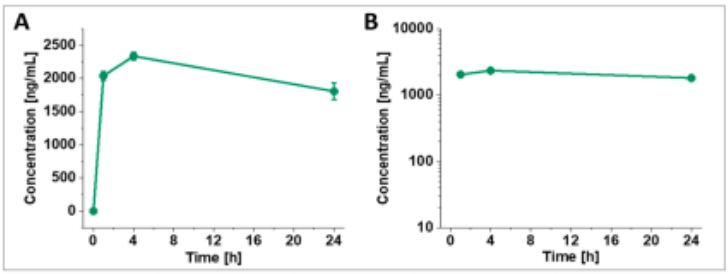
| compound | $IC_{50}$ [$\mu$M][a] |
|---|---|
| **Hf**[b] | 0.16 |
| **LUM**[c] | 0.38 |
| **TKK130**[d] | 0.30 |
| **7d** | 1.95 |

[a]hERG fluorescence polarization assay, $IC_{50}$ values were derived from one experiment conducted with 10-point titrations (each time point conducted in duplicate) with 3-fold serial dilutions. [b]Halofantrine (**Hf**). [c]Lumefantrine (**LUM**). [d]Previously published by Knaab et al.[13]

## DISCUSSION

Malaria drug development faces significant challenges, as evidenced by the limited number of new antimalarial drugs with novel modes of action approved in recent decades. A critical issue is the reliance on artemisinin-based combination therapies (ACTs), which are the cornerstone of malaria treatment. Issues of declining efficacy and the emergence of parasite resistance in several endemic regions pose a growing threat to global malaria control and elimination efforts. These challenges highlight the urgent need for novel chemotypes with distinct mechanisms of action to overcome resistance and improve therapeutic outcomes.

In this work, novel 3-hydroxypropanamidines (HPAs) with structural modifications of the phenanthrene moiety in region A and the benzamidine moiety in region C were synthesized and evaluated for their in vitro and in vivo antiplasmodial activity and pharmacokinetic properties. SAR analysis highlights the critical role of the phenanthrene system in maintaining optimal potency, especially when compared to aza-analogous phenanthrene moieties. Replacing the lipophilic, fluorinated phenanthrene moiety with aza-analogous ring systems, such as 1,7-phenanthroline, benzo[*h*]quinoline, and phenanthridine, resulted in analogs with reduced antiplasmodial in vitro and in vivo activity compared to the lead compound **TKK130**. Additionally, the analysis showed that modifying the para position of the benzamidine moiety with larger substituents e.g. bromine preserves potent antiplasmodial activity while reducing hERG $K^+$ channel inhibition. Among the tested HPAs, several halo-substituted benzamidine analogs (**7a**, **7b**, **7d**, **7e**, **7f**, **7h**, **7k**) exhibited very potent antiplasmodial in vitro activity along with superior parasite selectivity, while mono- and dialkyl-substituted amidines (**7q**, **7t**) and the benzimidazole derivative (**7v**) showed only weak activity. Additional promising antiplasmodial characteristics of the front runner **7d** are a relatively fast-killing rate and potent activity against resistant *P. falciparum* strains as well as clinical isolates. The NP-40 detergent assay for $\beta$-hematin inhibition showed that **7d** inhibits the formation of synthetic hemozoin ($\beta$-hematin), with $IC_{50}$ values lower than **CQ** and **TKK130**. However, further mode of action studies are necessary to




| $C_{max}$ [ng/mL] | $T_{max}$ [h] | $AUC_{0-t}$ [ng/mL*h] |
|---|---|---|
| 2336.4 | 4.0 | 49002.0 |

**Figure 4.** Snapshot pharmacokinetics in *P. berghei*-infected mice treated with **7d** at 50 mg/kg ($n$ = 2). Concentrations over time are shown as the means ± standard deviations. (A) Linear $y$-axis. (B) Logarithmic $y$-axis. $C_{max}$ = maximum concentration; $T_{max}$ = time to maximum concentration; $AUC_{0-t}$ = total exposure from 0 to 24 h.


https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5c01337
J. Med. Chem. XXXX, XXX, XXX−XXX

better understand the antimalarial potential of the HPAs. These studies remain challenging, as evidenced by the lack of knowledge about the precise modes of action of arylamino alcohol-based antimalarials such as **LUM**.

The benzamidine analogs **7a** and **7d** demonstrated microsomal stability comparable to **LUM** and the lead compound **TKK130**. Metabolism rates of **Hf** by CYP450 enzymes is higher compared to the benzamidine analogs **7a** and **7d**.[39] Drug−drug interaction potential might play a minor role for **7a** and **7d**, which exhibited a similar degradation to LUM ($Cl_{int}$ < 7 μL/min/mg). Although area under the curve (AUC) of LUM was found to be moderately increased by 1.7-fold in the presence of CYP3A4 inhibitors, no clinically significant side effects were observed that required dose adjustments.[41,43,44,47,48] Snapshot pharmacokinetic studies in mice underline the promising pharmacokinetic properties of **7d**, with $AUC_{0-t}$ values comparable to **LUM** as a relevant marker for 28 day outcomes. Hereby, the slower elimination phase of **7d** in comparison to **LUM** might be caused by less hepatic degradation. The latter may result in a longer-lasting effect and bears the potential of a less complex dose regimen compared with **LUM**. However, the investigated analogs were less stable against plasma enzymes, resulting in shorter plasma stability compared to **TKK130** and **LUM**. Therefore, developing improved derivatives with longer (plasma) half-lives is still a pharmacokinetic property we are aiming for, as it empowers suitable combinations with other antimalarials, including ones that might leverage synergistic interactions.

The in vivo studies showed, that for curative in vivo antimalarial activity, a fluorinated phenanthrene system and a 4-fluoro- or 4-bromophenyl-substituted benzamidine moiety is required. After oral administration the most active compound **7d** demonstrated curative in vivo activity in the *P. berghei* mouse model at 30 mg/kg and no obvious signs of in vivo toxicity in mice. At a low dose of 3 mg/kg, the antimalarial activity of **7d** was still significant. In contrast, **7e** with a 3-fluoro-substituted benzamidine moiety showed no curative activity even at 50 mg/kg (Table S2) despite exhibiting very potent antiplasmodial in vitro activity. Although in **7d** only the 4-fluoro substituent of **TKK130** is replaced by a bromine substituent, **7d** exhibited significantly weaker inhibition of the hERG potassium channel compared to **TKK130**, **Hf** and **LUM** demonstrating a notable improvement. However, further studies are needed to determine whether larger substituents (e.g., bromine bioisosteres) in this position can further reduce the hERG potassium channel inhibition. Additionally, the inhibition of the hERG potassium channel may be attributed to the phenanthrene moiety present in **Hf**. Therefore, novel replacements for the phenanthrene moiety should be explored in the next optimization cycle to better understand the structural basis of hERG potassium channel inhibition of HPAs.

Overall, the antiplasmodial potency of **7d** is comparable to that of the lead compound **TKK130**, positioning **7d** as a promising new lead for further structural optimization.

## ■ CONCLUSION

3-Hydroxypropanamidines (HPAs) represent a novel antimalarial chemotype that combines an amidine-based scaffold with structural features characteristic of classical aryl amino alcohol antimalarials, such as a lipophilic phenanthrene moiety and a secondary hydroxyl group within the aliphatic linker. The modified structure contributes to a remarkable antiplasmodial profile and the reduced inhibition of the hERG $K^+$ channel. The front runner compound of this study, **7d**, exhibited nanomolar potency against both sensitive and resistant *P. falciparum* strains, high parasite selectivity, relatively rapid parasite clearance, and curative in vivo activity in the *P. berghei* mouse model. Although, hERG $K^+$ channel inhibition remains a challenge for HPAs, **7d** exhibited a significantly weaker inhibition of the hERG potassium channel than **TKK130**, **Hf** and **LUM**. SAR analysis emphasizes the importance of the phenanthrene system in preserving optimal potency, while also suggesting that modifications to the benzamidine moiety provide potent antiplasmodial activity and reduce hERG $K^+$ channel inhibition. Future efforts will focus on replacing the phenanthrene scaffold with alternative structural motifs and further modifying the benzamidine moiety to reduce hERG $K^+$ channel inhibition and improve in vivo efficacy and pharmacokinetic properties, with the goal of developing a new class of antimalarial drugs.

## ■ EXPERIMENTAL SECTION

**General Procedures.** Proton ($^1$H) and carbon ($^{13}$C) NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 600, Bruker Avance NEO Evo −600 (600.13 MHz for $^1$H and 125.76 MHz for $^{13}$C) and Bruker Avance 300 (600.13 MHz for $^1$H and 125.76 MHz for $^{13}$C) using DMSO-$d_6$ or MeOD as solvent. All spectra were performed at room temperature. The coupling constants between two nuclei over n bonds (nJ) are given in Hertz (Hz), and chemical shifts are given in parts per million (ppm). Purity and chemical stability were determined by high performance liquid chromatography (HPLC). Instrument: Knauer HPLC system in combination with a Knauer UV Detector K-2600. Column: Vertex Plus (150 × 4 mm with pre column, Eurospher II 100-5 C18). Mobile phase 1: linear gradient (90−0%) of water with 0.1% trifluoroacetic acid. Mobile phase 2: linear gradient (10−100%) of acetonitrile with 0.1% of trifluoroacetic acid. Run time: 20 min, followed by an isocratic elution with 100% acetonitrile for 10 min. Flow rate: 1 mL/min. Detection: 254 nm. The purity of all compounds is >95.0% (determined by HPLC).

**General Procedure for the Synthesis of 3-Hydroxypropanamidines (TKK130, 4a−f, 7a−s).**[13] Under an argon atmosphere, the respective amine (2.0 equiv) was dissolved in anhydrous toluene (5 mL/mmol) at room temperature. Trimethylaluminum (3.0 equiv, 2 M in toluene) was subsequently added and the solution stirred at 60 °C for 30 min. Then, a solution of the 3-hydroxypropanenitrile **3a−f** or **5** (1.0 equiv) in anhydrous THF (2.5 mL/mmol) and anhydrous toluene (2.5 mL/mmol) was added dropwise to the reaction mixture and stirred at 60 °C for 16 h. After that, the reaction mixture was poured onto an ice−water mixture (10 mL) and ethyl acetate (5 mL) was added. Subsequently, the phases were separated. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate (3 × 20 mL); the combined organic phases were washed with saturated sodium chloride solution (3 × 20 mL) and dried over anhydrous $Na_2SO_4$. After filtration, the solvent was removed under reduced pressure and the oily residue was purified by flash chromatography [dichloromethane/methanol (10%)]. Hydrogen chloride in anhydrous diethyl ether was added slowly and the reaction mixture stirred for 5 min. The precipitant was washed twice with acetonitrile and dried.

*(Z)-3-(1,3-Difluoro-6-(trifluoromethyl)phenanthrene-9-yl)-N′-(4-fluorophenyl)-3-hydroxypropanimidamide Hydrochloride (**TKK130**).* **TKK130** was synthesized according to the general procedure with the following modifications: trimethylaluminum (2.0 equiv, 2 M in toluene) was used instead of 3.0 equiv. Purification via flash chromatography was not necessary. Instead, the crude product was directly converted into its corresponding hydrochloride salt by adding hydrogen chloride in anhydrous diethyl ether. The resulting precipitate was washed twice with acetonitrile and dried.

White solid, yield: 88%. Mp: 213.7 °C, $^1$H NMR (500 MHz, DMSO-$d_6$): δ 11.81 (s, 1H), 9.83 (s, 1H), 9.28 (s,1H), 9.02 (d, $J$ = 4.1 Hz, 1H), 8.82 (d, $J$ = 10.9 Hz, 1H), 8.70 (s, 1H), 8.41 (s, 1H),


https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5c01337
J. Med. Chem. XXXX, XXX, XXX−XXX

8.02 (d, $J$ = 7.8 Hz, 1H), 7.71 (t, $J$ = 9.3 Hz, 1H), 7.40 (d, $J$ = 6.6 Hz, 4H), 6.55 (s, 1H), 6.05 (d, $J$ = 8.5 Hz, 1H), 3.31−3.24(m, 1H), 3.04−2.96 (m, 1H). $^{13}$C NMR (126 MHz, DMSO-$d_6$): $\delta$ 165.41, 161.75 (d, $^1J_{CF}$ = 245.3 Hz), 161.20 (dd, $^1J_{CF}$ = 245.1,12.9 Hz), 159.29 (dd, $^1J_{CF}$ = 251.8, 13.9 Hz), 138.83, 132.23 (d, $^4J_{CF}$ = 4.7 Hz), 132.12 (d, $^3J_{CF}$ = 11.0 Hz), 131.06 (d, $^4J_{CF}$ = 2.3 Hz),129.27, 128.22 (d, $^3J_{CF}$ = 8.9 Hz), 127.82 (d, $^2J_{CF}$ = 32.1 Hz), 127.37,124.75 (d, $^1J_{CF}$ = 272.6 Hz), 123.93−123.79 (m), 122.46−122.27(m), 118.05 (d, $^3J_{CF}$ = 14.4 Hz), 117.91 (d, $^4J_{CF}$ = 5.1 Hz), 117.19 (d, $^2J_{CF}$ = 23.1 Hz), 105.73 (dd, $^2J_{CF}$ = 22.8, $4J_{CF}$ = 3.2 Hz), 103.59 (dd, $^2J_{CF}$ = 27.8, 24.7 Hz), 67.64, 41.49. HPLC (method 1): $t_R$ = 12.6 min, AUC = 98.1%.

*N-(4-Fluorophenyl)-3-hydroxy-3-(1,7-phenanthrolin-6-yl)-propanimidamide Hydrochloride* ***4a***. **4a** was synthesized according to the general procedure with the following modifications: trimethylaluminum (4.0 equiv, 2 M in toluene) was used instead of 3.0 equiv.

Off-white solid, yield: 34%. Mp: 176.5 °C, $^1$H NMR (300 MHz, MeOD): $\delta$ 10.01 (dd, $J$ = 8.5, 1.7 Hz, 1H), 9.35 (dd, $J$ = 5.0, 1.7 Hz, 1H), 9.25 (dd, $J$ = 4.9, 1.6 Hz, 1H), 8.97 (dd, $J$ = 8.2, 1.7 Hz, 1H), 8.71 (d, $J$ = 0.9 Hz, 1H), 8.26−8.05 (m, 1H), 7.49−7.38 (m, 3H), 7.34−7.27 (m, 2H), 6.27 (ddd, $J$ = 9.4, 4.0, 1.0 Hz, 1H), 3.51 (dd, $J$ = 14.0, 4.0 Hz, 1H), 3.21 (dd, $J$ = 14.0, 9.4 Hz, 1H). $^{13}$C NMR (75 MHz, MeOD): $\delta$ 166.96, 150.13, 149.80, 143.55, 141.81, 140.11, 131.68, 131.05, 129.44, 128.70, 126.41, 125.04, 118.50, 118.19, 69.27, 42.75. HPLC (method 1): $t_R$ = 6.9 min, AUC = 99.6%.

*3-(Benzo[h]quinolin-4-yl)-N-(4-fluorophenyl)-3-hydroxypropanimidamide Hydrochloride* ***4b***. **4b** was synthesized according to the general procedure with the following modifications: trimethylaluminum (4.0 equiv, 2 M in toluene) was used instead of 3.0 equiv.

Yellow solid, yield: 89%. Mp: 163.8 °C, $^1$H NMR (600 MHz, DMSO-$d_6$): $\delta$ 9.40−9.21 (m, 1H), 9.06 (d, $J$ = 4.6 Hz, 1H), 8.64 (d, $J$ = 9.1 Hz, 1H), 8.09−8.03 (m, 1H), 8.03−7.94 (m, 2H), 7.75 (pt, $J$ = 6.8, 3.5 Hz, 2H), 7.36 (p, $J$ = 8.3 Hz, 4H), 6.12 (dd, $J$ = 9.9, 4.2 Hz, 1H), 3.97−3.27 (m, 3H), 3.23 (t, $J$ = 6.8 Hz, 1H), 3.05 (t, $J$ = 12.1 Hz, 1H). $^{13}$C NMR (75 MHz, DMSO-$d_6$): $\delta$ 164.04, 149.61, 149.21, 145.69, 132.97, 131.24, 128.60, 128.03, 127.89−127.18 (m), 124.41, 122.96, 121.80, 119.34, 116.95 (d, $J$ = 22.9 Hz), 66.31, 41.24. HPLC (method 1): $t_R$ = 6.9 min, AUC = 96.4%.

*N-(4-Fluorophenyl)-3-hydroxy-3-(phenanthridin-6-yl)-propanimidamide Hydrochloride* ***4c***. **4c** was synthesized according to the general procedure.

Off-white solid, yield: 37%. Mp: 139.6 °C, $^1$H NMR (600 MHz, MeOD): $\delta$ 8.91 (d, $J$ = 8.3 Hz, 1H), 8.81 (d, $J$ = 8.0 Hz, 1H), 8.75 (d, $J$ = 8.3 Hz, 1H), 8.28 (d, $J$ = 8.0 Hz, 1H), 8.07 (t, $J$ = 7.6 Hz, 1H), 7.92 (t, $J$ = 7.6 Hz, 1H), 7.89−7.80 (m, 2H), 7.44−7.37 (m, 2H), 7.34−7.26 (m, 2H), 6.24 (dd, $J$ = 8.7, 4.3 Hz, 1H), 3.51 (dd, $J$ = 14.4, 4.4 Hz, 1H), 3.37−3.32 (m, 1H). $^{13}$C NMR (151 MHz, MeOD): $\delta$ 168.18, 135.15, 131.40, 130.47, 129.26 (d, $J$ = 4.3 Hz), 129.21, 129.15, 127.37, 125.87, 124.84, 124.16, 123.78, 118.33 (d, $J$ = 23.4 Hz), 69.58, 49.57, 40.79. HPLC (method 1): $t_R$ = 8.2 min, AUC = 98.3%.

*3-(8-Bromophenanthridin-6-yl)-N-(4-fluorophenyl)-3-hydroxypropanimidamide Hydrochloride* ***4d***. **4d** was synthesized according to the general procedure with the following modifications: trimethylaluminum (4.0 equiv, 2 M in toluene) was used instead of 3.0 equiv.

Off-white solid, yield: 43%. Mp: 174.4 °C, $^1$H NMR (600 MHz, MeOD): $\delta$ 9.09 (d, $J$ = 2.0 Hz, 1H), 8.99−8.89 (m, 1H), 8.49−8.40 (m, 1H), 8.32 (dd, $J$ = 9.0, 2.0 Hz, 1H), 8.05−7.93 (m, 1H), 7.49−7.41 (m, 3H), 7.35−7.25 (m, 3H), 6.32 (dd, $J$ = 9.2, 4.3 Hz, 1H), 3.53 (dd, $J$ = 14.4, 4.3 Hz, 1H), 3.35 (d, $J$ = 9.3 Hz, 1H). $^{13}$C NMR (75 MHz, MeOD): $\delta$ 168.47, 158.87, 143.78, 135.53, 133.65, 130.81, 130.61, 129.90, 129.37, 129.24, 129.12, 126.58, 126.15, 125.18, 123.60, 122.93, 118.47, 118.16, 47.91, 9.25. HPLC (method 1): $t_R$ = 10.9 min, AUC = 98.1%.

*3-(8-Chlorophenanthridin-6-yl)-N-(4-fluorophenyl)-3-hydroxypropanimidamide Hydrochloride* ***4e***. **4e** was synthesized according to the general procedure with the following modifications: Trimethylaluminum (4.0 equiv, 2 M in toluene) was used instead of 3.0 equiv.

Off-white solid, yield: 30%. Mp: 167.3 °C, $^1$H NMR (300 MHz, MeOD): $\delta$ 7.26 (d, $J$ = 8.9 Hz, 1H), 7.22−7.07 (m, 2H), 6.66−6.56 (m, 1H), 6.36 (dd, $J$ = 8.9, 2.2 Hz, 1H), 6.32−6.13 (m, 2H), 5.55 (t, $J$ = 8.7 Hz, 2H), 5.48 (d, $J$ = 5.6 Hz, 2H), 4.40 (dd, $J$ = 8.0, 4.9 Hz, 1H), 1.67 (dd, $J$ = 14.2, 5.0 Hz, 1H), 1.57 (dd, $J$ = 14.2, 8.0 Hz, 1H). $^{13}$C NMR (151 MHz, MeOD): $\delta$ 165.32, 159.74, 143.85, 134.80, 133.31, 132.71, 130.70, 130.44, 129.17, 127.37, 126.63, 126.18, 126.02, 125.07, 123.56, 117.74, 117.59, 70.40, 49.57, 27.97. HPLC (method 1): $t_R$ = 10.5 min, AUC = 96.6%.

*3-(3,8-Difluorophenanthridin-6-yl)-N-(4-fluorophenyl)-3-hydroxypropanimidamide Hydrochloride* ***4f***. **4f** was synthesized according to the general procedure with the following modifications: Trimethylaluminum (4.0 equiv, 2 M in toluene) was used instead of 3.0 equiv.

Off-white solid, yield: 4%. Mp: 170.4 °C $^1$H NMR (600 MHz, DMSO-$d_6$): $\delta$ 11.39 (s, 1H), 9.62 (s, 1H), 8.99 (dd, $J$ = 9.2, 5.4 Hz, 1H), 8.91 (dd, $J$ = 9.2, 5.9 Hz, 1H), 8.67 (s, 1H), 8.48 (dd, $J$ = 10.4, 2.7 Hz, 1H), 7.92 (td, $J$ = 8.7, 2.6 Hz, 1H), 7.84 (dd, $J$ = 9.7, 2.8 Hz, 1H), 7.72−7.64 (m, 2H), 7.42−7.37 (m, 3H), 6.56 (s, 1H), 5.98 (s, 1H), 1.72−1.40 (m, 2H). $^{13}$C NMR (151 MHz, DMSO-$d_6$): $\delta$ 175.55, 171.13 (d, $J$ = 2.0 Hz), 170.72, 170.19, 169.91 (d, $J$ = 3.5 Hz), 169.49, 152.61 (d, $J$ = 11.8 Hz), 141.06, 140.07, 139.21, 137.56 (d, $J$ = 9.0 Hz), 135.72 (d, $J$ = 8.2 Hz), 135.06 (d, $J$ = 9.5 Hz), 134.19 (d, $J$ = 8.9 Hz), 130.59−129.89 (m), 126.59, 126.47 (d, $J$ = 9.7 Hz), 123.21 (d, $J$ = 20.4 Hz), 120.98 (d, $J$ = 21.7 Hz), 78.32, 48.65 (d, $J$ = 21.0 Hz), 38.50. HPLC (method 1): $t_R$ = 10.4 min, AUC = 96.9%.

*3-(1,3-Difluoro-6-(trifluoromethyl)phenanthren-9-yl)-N-(3,4-difluorophenyl)-3-hydroxypropanimidamide Hydrochloride* ***7a***. **7a** was synthesized according to the general procedure with the following modification: purification via flash chromatography was not necessary. Instead, the crude product was directly converted into its corresponding hydrochloride salt by adding hydrogen chloride in anhydrous diethyl ether. The resulting precipitate was washed twice with acetonitrile and dried.

Yellow solid, yield: 85%. Mp: 197.4 °C, $^1$H NMR (300 MHz, MeOD): $\delta$ 9.06 (s, 1H), 8.71 (d, $J$ = 8.8 Hz, 1H), 8.48 (s, 1H), 8.46−8.36 (m, 1H), 8.02 (dd, $J$ = 8.8, 1.8 Hz, 1H), 7.47 (dt, $J$ = 10.2, 8.7 Hz, 1H), 7.36 (dddd, $J$ = 10.8, 7.1, 5.4, 2.8 Hz, 2H), 7.19 (ddt, $J$ = 8.4, 4.0, 2.0 Hz, 1H), 6.03 (dd, $J$ = 9.4, 3.7 Hz, 1H), 3.37−3.31 (m, 1H), 3.10 (dd, $J$ = 14.1, 9.4 Hz, 1H). $^{13}$C NMR (75 MHz, MeOD): $\delta$ 167.80, 138.42, 133.98−133.62 (m), 133.11, 131.76 (ddd, $J$ = 7.9, 5.1, 3.0 Hz), 130.98−130.49 (m), 130.32−130.08 (m), 129.76 (d, $J$ = 1.4 Hz), 127.56, 126.89, 125.07, 124.26, 122.95−122.67 (m), 120.20, 119.95, 119.48 (d, $J$ = 2.3 Hz), 119.30, 119.12, 117.09, 116.83, 105.70 (d, $J$ = 1.4 Hz), 105.38, 104.28, 103.94 (d, $J$ = 3.7 Hz), 103.59, 68.98, 42.40. HPLC (method 1): $t_R$ = 12.4 min, AUC = 98.5%.

*3-(1,3-Difluoro-6-(trifluoromethyl)phenanthren-9-yl)-3-hydroxy-N-(3,4,5-trifluorophenyl)propanimidamide Hydrochloride* ***7b***. **7b** was synthesized according to the general procedure with the following modification: purification via flash chromatography was not necessary. Instead, the crude product was directly converted into its corresponding hydrochloride salt by adding hydrogen chloride in anhydrous diethyl ether. The resulting precipitate was washed twice with acetonitrile and dried.

Off-white solid, yield: 85%. Mp: 203.4 °C, $^1$H NMR (600 MHz, MeOD): $\delta$ 9.06 (s, 1H), 8.70 (d, $J$ = 8.7 Hz, 1H), 8.47 (s, 1H), 8.42 (dd, $J$ = 10.7, 2.2 Hz, 1H), 8.02 (dd, $J$ = 8.7, 1.8 Hz, 1H), 7.37 (ddd, $J$ = 10.6, 8.7, 2.3 Hz, 1H), 7.24 (dd, $J$ = 7.8, 6.0 Hz, 2H), 6.02 (dd, $J$ = 9.5, 3.5 Hz, 1H), 3.33 (d, $J$ = 3.6 Hz, 1H), 3.09 (dd, $J$ = 14.1, 9.5 Hz, 1H). $^{13}$C NMR (151 MHz, MeOD): $\delta$ 168.08, 163.90, 163.81, 162.26, 162.17, 162.05, 161.96, 160.37, 160.28, 153.86, 152.23, 142.39, 142.29, 140.61, 138.34, 133.87−133.71 (m), 133.08, 131.13, 130.76, 130.41−130.29 (m), 130.11, 129.90, 129.68, 128.47 (d, $J$ = 3.4 Hz), 126.88, 126.66, 125.07, 124.86, 123.06, 122.85 (d, $J$ = 4.4 Hz), 119.43, 119.33, 119.08 (d, $J$ = 6.1 Hz), 112.88, 112.84, 112.75, 112.72, 105.66, 105.51, 104.12, 103.94 (d, $J$ = 3.7 Hz), 103.77, 68.94, 42.47. HPLC (Method 1): $t_R$ = 12.6 min, AUC = 98.0%.

*N-(4-Cyanophenyl)-3-(1,3-difluoro-6-(trifluoromethyl)-phenanthren-9-yl)-3-hydroxypropanimidamide Hydrochloride* ***7c***. **7c** was synthesized according to the general procedure. After


https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5c01337
J. Med. Chem. XXXX, XXX, XXX−XXX

purification by flash chromatography, the product was further purified by recrystallization from methanol.

White solid, yield: 10%. Mp: 217.1 °C, $^1$H NMR (600 MHz, MeOD): $\delta$ 9.12 (s, 1H), 8.69 (d, $J$ = 8.6 Hz, 1H), 8.52−8.45 (m, 2H), 8.03 (d, $J$ = 8.5 Hz, 1H), 7.93 (d, $J$ = 8.0 Hz, 2H), 7.52 (d, $J$ = 8.0 Hz, 2H), 7.41 (t, $J$ = 9.4 Hz, 1H), 6.01 (d, $J$ = 7.0 Hz, 1H), 3.35 (d, $J$ = 3.4 Hz, 1H), 3.13 (dd, $J$ = 13.9, 9.6 Hz, 1H). $^{13}$C NMR (151 MHz, MeOD): $\delta$ 167.40, 163.94 (d, $J$ = 13.6 Hz), 162.29 (d, $J$ = 13.1 Hz), 162.05 (d, $J$ = 13.6 Hz), 160.38 (d, $J$ = 13.6 Hz), 144.34, 139.73, 138.35, 135.50, 134.64, 134.21, 133.87, 133.14, 130.89, 130.18, 129.97, 127.42, 126.71, 125.01, 124.87, 122.99 (d, $J$ = 3.8 Hz), 120.98, 119.41 (d, $J$ = 15.3 Hz), 119.16 (d, $J$ = 6.0 Hz), 118.79, 115.00, 113.83, 105.66 (dd, $J$ = 23.2, 4.1 Hz), 104.02 (dd, $J$ = 28.6, 24.8 Hz), 69.13, 58.29−56.75 (m), 49.57, 42.67. HPLC (method 1): $t_R$ = 12.2 min, AUC = 98.6%.

*N-(4-Bromophenyl)-3-(1,3-difluoro-6-(trifluoromethyl)-phenanthren-9-yl)-3-hydroxypropanimidamide Hydrochloride* ***7d***. **7d** was synthesized according to the general procedure with the following modification: Purification via flash chromatography was not necessary. Instead, the crude product was directly converted into its corresponding hydrochloride salt by adding hydrogen chloride in anhydrous diethyl ether. The resulting precipitate was washed twice with acetonitrile and dried.

Off-white solid, yield: 77%. Mp: 241.1 °C, $^1$H NMR (300 MHz, DMSO-$d_6$): $\delta$ 11.95 (s, 1H), 9.91 (s, 1H), 9.27 (s, 1H), 9.03 (d, $J$ = 8.8 Hz, 1H), 8.85−8.79 (m, 2H), 8.39 (s, 1H), 8.00 (dd, $J$ = 8.9, 1.8 Hz, 1H), 7.77−7.71 (m, 2H), 7.61−7.56 (m, 1H), 7.34−7.29 (m, 2H), 7.24−7.20 (m, 1H), 6.03 (dd, $J$ = 10.5, 3.6 Hz, 1H), 3.33−3.22 (m, 1H), 2.97 (dd, $J$ = 13.6, 10.3 Hz, 1H). $^{13}$C NMR (151 MHz, MeOD): $\delta$ 167.26, 163.85 (d, $J$ = 13.1 Hz), 162.12 (dd, $J$ = 27.8, 13.1 Hz), 160.35 (d, $J$ = 13.6 Hz), 138.41, 134.64, 134.48, 134.40, 134.09, 133.82 (dd, $J$ = 10.4, 4.9 Hz), 133.15, 131.57, 130.85−130.72 (m), 130.32, 130.10, 129.88 (d, $J$ = 3.3 Hz), 129.67, 128.60, 126.90, 126.67, 126.04, 125.03, 124.87, 123.83, 123.64, 122.87, 119.41 (dd, $J$ = 15.3, 2.2 Hz), 119.16, 105.57 (d, $J$ = 27.8 Hz), 104.23−103.65 (m), 69.05, 49.57, 42.45. HPLC (method 1): $t_R$ = 12.7 min, AUC = 97.0%.

*3-(1,3-Difluoro-6-(trifluoromethyl)phenanthren-9-yl)-N-(3-fluorophenyl)-3-hydroxypropanimidamide Hydrochloride* ***7e***. **7e** was synthesized according to the general procedure with the following modification: Purification via flash chromatography was not necessary. Instead, the crude product was directly converted into its corresponding hydrochloride salt by adding hydrogen chloride in anhydrous diethyl ether. The resulting precipitate was washed twice with acetonitrile and dried.

Off-white solid, yield: 57%. Mp: 206.5 °C, $^1$H NMR (300 MHz, DMSO-$d_6$): $\delta$ 11.99 (s, 1H), 9.95 (s, 1H), 9.28 (s, 1H), 9.02 (d, $J$ = 8.7 Hz, 1H), 8.93−8.79 (m, 2H), 8.40 (s, 1H), 8.02 (d, $J$ = 8.7 Hz, 1H), 7.75−7.53 (m, 2H), 7.34−7.16 (m, 3H), 6.85 (dd, $J$ = 11.5, 6.8 Hz, 1H), 6.04 (dd, $J$ = 10.1, 3.6 Hz, 1H), 3.27 (dd, $J$ = 13.6, 3.6 Hz, 1H), 3.06−2.92 (m, 1H). $^{13}$C NMR (151 MHz, MeOD): $\delta$ 167.28, 165.53, 165.28, 163.90 (d, $J$ = 3.3 Hz), 163.83, 163.63, 162.23 (d, $J$ = 13.1 Hz), 162.03 (d, $J$ = 13.1 Hz), 160.35 (d, $J$ = 13.6 Hz), 138.36, 136.74 (d, $J$ = 9.8 Hz), 134.35 (d, $J$ = 9.2 Hz), 133.83 (dd, $J$ = 10.4, 4.9 Hz), 133.14, 133.05, 130.86−130.74 (m), 130.01 (q, $J$ = 32.4 Hz), 126.88, 126.66, 125.05, 124.86, 122.89 (q, $J$ = 4.0 Hz), 122.64 (d, $J$ = 3.4 Hz), 119.92 (d, $J$ = 3.3 Hz), 119.40 (d, $J$ = 13.6 Hz), 119.16 (d, $J$ = 6.0 Hz), 117.29, 117.15, 116.70 (d, $J$ = 21.3 Hz), 114.25, 114.08, 111.59 (d, $J$ = 25.6 Hz), 105.59 (dd, $J$ = 23.2, 4.1 Hz), 103.96 (dd, $J$ = 28.6, 24.8 Hz), 69.06, 49.57, 42.51. HPLC (method 1): $t_R$ = 12.5 min, AUC = 98.6%.

*3-(1,3-Difluoro-6-(trifluoromethyl)phenanthren-9-yl)-3-hydroxy-N-(2-iodophenyl)propanimidamide Hydrochloride* ***7f***. **7f** was synthesized according to the general procedure with the following modification: Purification via flash chromatography was not necessary. Instead, the crude product was directly converted into its corresponding hydrochloride salt by adding hydrogen chloride in anhydrous diethyl ether. The resulting precipitate was washed twice with acetonitrile and dried.

Brown solid, yield: 46%. Mp: 273.3 °C, $^1$H NMR (600 MHz, MeOD): $\delta$ 9.08 (s, 1H), 8.71 (d, $J$ = 7.2 Hz, 1H), 8.51 (s, 1H), 8.43 (d, $J$ = 10.5 Hz, 1H), 8.04 (t, $J$ = 8.7 Hz, 2H), 7.56 (s, 1H), 7.38 (s, 2H), 7.26 (d, $J$ = 7.0 Hz, 1H), 6.07 (s, 1H), 3.34 (d, $J$ = 11.5 Hz, 1H), 3.19 (s, 1H). $^{13}$C NMR (151 MHz, MeOD): $\delta$ 167.50, 163.81 (d, $J$ = 13.1 Hz), 162.09 (dd, $J$ = 24.8, 13.4 Hz), 160.33 (d, $J$ = 13.1 Hz), 141.84 (d, $J$ = 4.5 Hz), 138.28, 137.67, 133.82 (dd, $J$ = 10.1, 5.2 Hz), 133.14, 132.54, 131.54, 130.89−130.74 (m), 129.95 (q, $J$ = 32.4 Hz), 129.42, 128.42, 126.86, 126.62, 125.05, 124.82, 123.02, 122.84 (d, $J$ = 3.5 Hz), 119.43 (d, $J$ = 13.6 Hz), 119.31 (d, $J$ = 5.4 Hz), 105.52 (dd, $J$ = 23.2, 4.1 Hz), 103.91 (t, $J$ = 25.9 Hz), 97.61, 69.06, 58.30, 41.88. HPLC (method 1): $t_R$ = 13.0 min, AUC = 100.0%.

*N-(4-Bromo-3-methoxyphenyl)-3-(1,3-difluoro-6-(trifluoromethyl)phenanthren-9-yl)-3-hydroxypropanimidamide Hydrochloride* ***7g***. **7g** was synthesized according to the general procedure.

White solid, yield: 7%. Mp: 250.4 °C, $^1$H NMR (600 MHz, MeOD): $\delta$ 9.03 (s, 1H), 8.71 (d, $J$ = 7.9 Hz, 1H), 8.47 (s, 1H), 8.39 (d, $J$ = 10.5 Hz, 1H), 8.02 (d, $J$ = 7.4 Hz, 1H), 7.68 (d, $J$ = 6.9 Hz, 1H), 7.36 (t, $J$ = 9.3 Hz, 1H), 6.97 (s, 1H), 6.82 (d, $J$ = 8.0 Hz, 1H), 6.05 (d, $J$ = 8.0 Hz, 1H), 3.94−3.88 (m, 3H), 3.33 (d, $J$ = 13.0 Hz, 1H), 3.13 (t, $J$ = 11.0 Hz, 1H). $^{13}$C NMR (151 MHz, MeOD) $\delta$ 167.50, 163.81 (d, $J$ = 13.1 Hz), 162.09 (dd, $J$ = 24.8, 13.4 Hz), 160.33 (d, $J$ = 13.1 Hz), 141.84 (d, $J$ = 4.5 Hz), 138.28, 137.67, 133.82 (dd, $J$ = 10.1, 5.2 Hz), 133.14, 132.54, 131.54, 130.89−130.74 (m), 129.95 (q, $J$ = 32.4 Hz), 129.42, 128.42, 126.86, 126.62, 125.05, 124.82, 123.02, 122.84 (d, $J$ = 3.5 Hz), 119.43 (d, $J$ = 13.6 Hz), 119.31 (d, $J$ = 5.4 Hz), 105.52 (dd, $J$ = 23.2, 4.1 Hz), 103.91 (t, $J$ = 25.9 Hz), 97.61, 69.06, 58.30, 41.88. HPLC (method 1): $t_R$ = 13.3 min, AUC = 97.4%.

*N-(4-Bromo-3-fluorophenyl)-3-(1,3-difluoro-6-(trifluoromethyl)-phenanthren-9-yl)-3-hydroxypropanimidamide Hydrochloride* ***7h***. **7h** was synthesized according to the general procedure with the following modification: purification via flash chromatography was not necessary. Instead, the crude product was directly converted into its corresponding hydrochloride salt by adding hydrogen chloride in anhydrous diethyl ether. The resulting precipitate was washed twice with acetonitrile and dried.

Off-white solid, yield: 85%. Mp: 207.1 °C, $^1$H NMR (600 MHz, MeOD): $\delta$ 8.98 (s, 1H), 8.62 (d, $J$ = 8.7 Hz, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.33 (d, $J$ = 10.6 Hz, 1H), 7.93 (d, $J$ = 8.6 Hz, 1H), 7.73 (t, $J$ = 8.0 Hz, 1H), 7.28 (t, $J$ = 9.3 Hz, 1H), 7.19 (d, $J$ = 8.8 Hz, 1H), 7.05 (t, $J$ = 10.0 Hz, 1H), 5.96−5.91 (m, 1H), 3.25 (d, $J$ = 3.2 Hz, 1H), 3.02 (dd, $J$ = 14.0, 9.6 Hz, 1H). $^{13}$C NMR (151 MHz, MeOD): $\delta$ 167.52, 163.85 (d, $J$ = 13.1 Hz), 162.11 (dd, $J$ = 29.7, 13.4 Hz), 161.76, 161.48, 160.34 (d, $J$ = 13.6 Hz), 160.11, 159.83, 138.36, 136.41, 136.18, 136.11, 136.05, 133.80 (dd, $J$ = 10.4, 4.9 Hz), 133.11, 130.85−130.68 (m), 130.00 (q, $J$ = 32.4 Hz), 126.89, 128.52−122.99 (m), 125.04, 124.13 (d, $J$ = 3.7 Hz), 122.84 (d, $J$ = 4.4 Hz), 121.06, 119.39 (dd, $J$ = 15.3, 2.2 Hz), 119.12 (d, $J$ = 5.3 Hz), 115.58, 115.42, 112.51 (d, $J$ = 25.6 Hz), 110.59, 110.45, 105.56 (dd, $J$ = 23.4, 4.4 Hz), 103.94 (dd, $J$ = 28.4, 24.5 Hz), 69.00, 49.57, 42.51. HPLC (method 1): $t_R$ = 13.2 min, AUC = 96.6%.

*3-(1,3-Difluoro-6-(trifluoromethyl)phenanthren-9-yl)-N-(4-fluoro-2,6-dimethylphenyl)-3-hydroxypropanimidamide Hydrochloride* ***7i***. **7i** was synthesized according to the general procedure with the following modifications: purification by flash chromatography and washing with acetonitrile were not necessary. Instead, the crude product was recrystallized from methanol.

White solid, yield: 38%. Mp: 217.4 °C, $^1$H NMR (300 MHz, MeOD): $\delta$ 9.08 (s, 1H), 8.74 (d, $J$ = 8.8 Hz, 1H), 8.51 (s, 1H), 8.44 (d, $J$ = 10.7 Hz, 1H), 8.02 (dd, $J$ = 8.8, 1.8 Hz, 1H), 7.44−7.31 (m, 1H), 7.00 (d, $J$ = 9.1 Hz, 2H), 6.01 (dd, $J$ = 9.8, 3.7 Hz, 1H), 3.47−3.30 (m, 1H), 3.14 (dd, $J$ = 14.1, 9.9 Hz, 1H), 2.26 (d, $J$ = 3.4 Hz, 6H). $^{13}$C NMR (151 MHz, MeOD): $\delta$ 167.69, 164.89, 163.86 (d, $J$ = 13.1 Hz), 163.25, 162.13 (dd, $J$ = 26.4, 13.4 Hz), 160.37 (d, $J$ = 13.1 Hz), 142.35, 139.97 (d, $J$ = 9.4 Hz), 139.79 (d, $J$ = 9.4 Hz), 138.61, 133.86 (dd, $J$ = 10.1, 5.2 Hz), 133.17, 130.90−130.79 (m), 130.00 (q, $J$ = 32.7 Hz), 128.50−128.38 (m), 127.19, 126.94, 126.68, 125.04 (q, $J$ = 3.5 Hz), 124.88, 123.08, 122.86 (q, $J$ = 4.4 Hz), 119.90, 119.52, 119.41 (d, $J$ = 2.7 Hz), 119.25 (d, $J$ = 6.0 Hz), 118.13, 116.98, 116.80 (d, $J$ = 3.2 Hz), 116.65 (d, $J$ = 3.2 Hz), 105.63 (d, $J$ = 4.2 Hz), 105.48



https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5c01337
J. Med. Chem. XXXX, XXX, XXX−XXX

(d, $J$ = 4.3 Hz), 103.93 (dd, $J$ = 28.6, 24.8 Hz), 69.33, 58.33, 49.57, 41.89, 18.36, 18.01, 17.94, 0.78. HPLC (method 1): $t_R$ = 13.3 min, AUC = 96.1%.

*3-(1,3-Difluoro-6-(trifluoromethyl)phenanthren-9-yl)-N-(2-fluoro-6-methylphenyl)-3-hydroxypropanimidamide Hydrochloride* ***7j***. **7j** was synthesized according to the general procedure with the following modification: purification via flash chromatography was not necessary. Instead, the crude product was directly converted into its corresponding hydrochloride salt by adding hydrogen chloride in anhydrous diethyl ether. The resulting precipitate was washed twice with acetonitrile and dried.

White solid, yield: 14%. Mp: 196.7 °C, $^1$H NMR (600 MHz, MeOD): $\delta$ 9.11 (s, 1H), 8.70 (d, $J$ = 8.7 Hz, 1H), 8.52 (s, 1H), 8.47 (d, $J$ = 10.6 Hz, 1H), 8.04 (d, $J$ = 8.7 Hz, 1H), 7.45–7.37 (m, 2H), 7.23 (d, $J$ = 7.7 Hz, 1H), 7.16 (t, $J$ = 9.0 Hz, 1H), 6.00 (s, 1H), 3.39 (s, 1H), 3.18 (d, $J$ = 9.6 Hz, 1H), 2.30 (s, 3H). $^{13}$C NMR (151 MHz, MeOD): $\delta$ 167.91, 162.18 (d, $J$ = 14.3 Hz), 159.92, 158.26, 139.47, 138.28, 133.18, 132.38, 132.14 (d, $J$ = 8.9 Hz), 128.11 (d, $J$ = 3.3 Hz), 126.72 (d, $J$ = 12.6 Hz), 125.03, 122.92, 119.63–119.16 (m), 115.37 (d, $J$ = 19.6 Hz), 105.72–105.44 (m), 103.96 (dd, $J$ = 28.3, 24.5 Hz), 69.31, 49.57, 17.35. HPLC (method 1): $t_R$ = 12.7 min, AUC = 98.6%.

*3-(1,3-Difluoro-6-(trifluoromethyl)phenanthren-9-yl)-N-(3-fluoro-2-methylphenyl)-3-hydroxypropanimidamide Hydrochloride* ***7k***. **7k** was synthesized according to the general procedure with the following modifications: trimethylaluminum (4.0 equiv, 2 M in toluene) was used instead of 3.0 equiv.

Hydrogen chloride in anhydrous dioxane was used instead of hydrogen chloride in anhydrous diethyl ether.

White solid, yield: 3%. Mp: 207.5 °C, $^1$H NMR (300 MHz, MeOD): $\delta$ 9.12 (s, 1H), 8.72 (d, $J$ = 8.8 Hz, 1H), 8.50 (d, $J$ = 15.3 Hz, 2H), 8.09–7.99 (m, 1H), 7.48–7.32 (m, 2H), 7.24 (t, $J$ = 8.8 Hz, 1H), 7.10 (d, $J$ = 7.9 Hz, 1H), 6.01 (dd, $J$ = 9.5, 3.8 Hz, 1H), 3.45–3.34 (m, 1H), 3.21–3.07 (m, 1H), 2.22 (d, $J$ = 2.1 Hz, 3H). $^{13}$C NMR (151 MHz, MeOD): $\delta$ 166.33, 162.79, 162.51 (d, $J$ = 13.6 Hz), 161.16, 160.92, 160.67 (d, $J$ = 10.4 Hz), 158.98 (d, $J$ = 13.6 Hz), 142.34 (dd, $J$ = 43.9, 21.8 Hz), 137.15–137.01 (m), 133.89 (d, $J$ = 6.8 Hz), 132.58–132.38 (m), 131.77, 129.49 (t, $J$ = 4.0 Hz), 128.76, 128.54, 128.28, 125.33 (d, $J$ = 14.9 Hz), 123.64, 123.47, 123.19 (d, $J$ = 18.7 Hz), 122.44 (d, $J$ = 0.8 Hz), 121.57 (d, $J$ = 4.1 Hz), 118.10 (d, $J$ = 1.4 Hz), 118.00 (d, $J$ = 1.4 Hz), 117.81 (d, $J$ = 5.2 Hz), 116.04 (d, $J$ = 22.6 Hz), 104.44–104.04 (m), 102.59 (dd, $J$ = 28.6, 24.2 Hz), 67.83, 48.17, 40.75. HPLC (method 1): $t_R$ = 14.1 min, AUC = 95.0%.

*3-(1,3-Difluoro-6-(trifluoromethyl)phenanthren-9-yl)-N-(4′-fluoro-[1,1′-biphenyl]-4 yl)-3-hydroxypropanimidamide Hydrochloride* ***7l***. **7l** was synthesized according to the general procedure with the following modification: Purification via flash chromatography was not necessary. Instead, the crude product was directly converted into its corresponding hydrochloride salt by adding hydrogen chloride in anhydrous diethyl ether. The resulting precipitate was washed twice with acetonitrile and dried.

White solid, yield: 64%. Mp: 217,5 °C, $^1$H NMR (300 MHz, DMSO-$d_6$): $\delta$ 11.89 (s, 1H), 9.85 (s, 1H), 9.28 (s, 1H), 9.03 (d, $J$ = 8.8 Hz, 1H), 8.84 (d, $J$ = 11.3 Hz, 2H), 8.41 (s, 1H), 8.03 (dd, $J$ = 8.8, 1.8 Hz, 1H), 7.88–7.67 (m, 6H), 7.47–7.26 (m, 4H), 6.05 (dd, $J$ = 10.4, 3.7 Hz, 1H), 3.31–3.23 (m, 1H), 3.01 (dd, $J$ = 13.6, 10.1 Hz, 1H). $^{13}$C NMR (151 MHz, DMSO-$d_6$): $\delta$ 164.66, 162.96, 161.34, 158.15, 138.88, 138.33, 135.44, 135.42, 133.63, 131.71, 129.02, 128.80, 128.75, 128.15, 127.67, 127.45, 126.58, 125.75, 125.29, 123.68, 123.49, 122.30, 117.71, 117.60, 116.03, 115.89, 105.66, 103.54 (d, $J$ = 24.9 Hz), 67.26, 41.48, 40.06. HPLC (method 1): $t_R$ = 14.0 min, AUC = 96.3%.

*3-(1,3-Difluoro-6-(trifluoromethyl)phenanthren-9-yl)-N-(4-(4,4-difluoropiperidin-1-yl)phenyl)-3-hydroxypropanimidamide Hydrochloride* ***7m***. **7m** was synthesized according to the general procedure with the following modification: the oily residue was purified by reverse phase chromatography [water/acetonitrile]. The resulting precipitate was washed twice with acetonitrile and dried.

White solid, yield: 13%. Mp: 190.8 °C, $^1$H NMR (300 MHz, MeOD): $\delta$ 9.10 (s, 1H), 8.71 (d, $J$ = 8.7 Hz, 1H), 8.47 (d, $J$ = 14.1 Hz, 2H), 8.03 (dd, $J$ = 8.8, 1.8 Hz, 1H), 7.48–7.22 (m, 5H), 6.02 (dd, $J$ = 9.2, 3.8 Hz, 1H), 3.55 (q, $J$ = 5.6 Hz, 4H), 3.34 (s, 0H), 3.28 (d, $J$ = 3.9 Hz, 1H), 3.11 (dd, $J$ = 14.1, 9.1 Hz, 1H), 2.21 (tt, $J$ = 13.5, 5.8 Hz, 4H). $^{13}$C NMR (151 MHz, DMSO-$d_6$): $\delta$ 167.05, 163.86 (d, $J$ = 13.2 Hz), 162.30–161.95 (m), 160.40, 150.93, 138.39, 134.00–133.70 (m), 133.18, 130.81 (t, $J$ = 3.5 Hz), 130.10, 129.89, 127.68, 127.29, 126.86, 126.67, 125.03 (d, $J$ = 2.1 Hz), 124.87, 122.89 (d, $J$ = 3.9 Hz), 124.44–118.01 (m), 119.42 (d, $J$ = 15.4 Hz), 119.21–118.98 (m), 105.59 (dd, $J$ = 23.4, 3.6 Hz), 103.96 (dd, $J$ = 28.4, 24.8 Hz), 69.06, 47.93, 42.19, 34.19 (t, $J$ = 23.4 Hz). HPLC (method 1): $t_R$ = 13.7 min, AUC = 96.4%.

*3-(1,3-Difluoro-6-(trifluoromethyl)phenanthren-9-yl)-N-(5-(4-fluorophenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl)-3-hydroxypropanimidamide Hydrochloride* ***7n***. **7n** was synthesized according to the general procedure with the following modification: the oily residue was purified by reverse phase chromatography [water/acetonitrile]. The resulting precipitate was washed twice with acetonitrile and dried.

White solid, yield: 13%. Mp: 188.8 °C, $^1$H NMR (300 MHz, DMSO-$d_6$): $\delta$ 9.34 (s, 2H), 9.27 (s, 1H), 8.90 (s, 1H), 8.82 (d, $J$ = 11.2 Hz, 1H), 8.63 (d, $J$ = 8.8 Hz, 1H), 8.32 (s, 1H), 8.11 (d, $J$ = 8.7 Hz, 1H), 8.06–7.95 (m, 2H), 7.77–7.64 (m, 1H), 7.43 (t, $J$ = 8.9 Hz, 2H), 5.93 (dd, $J$ = 9.4, 3.4 Hz, 1H), 4.98 (s, 8H), 3.03 (dd, $J$ = 14.2, 3.5 Hz, 1H), 2.85 (dd, $J$ = 14.1, 9.4 Hz, 1H). $^{13}$C NMR (151 MHz, DMSO-$d_6$): $\delta$ 166.46, 166.21, 164.45, 162.80, 161.53 (d, $J$ = 13.6 Hz), 159.90 (d, $J$ = 13.6 Hz), 159.68 (d, $J$ = 14.2 Hz), 158.09, 158.01 (d, $J$ = 14.3 Hz), 138.90, 131.88, 131.68 (dd, $J$ = 10.5, 5.1 Hz), 128.98–128.85 (m), 128.35 (d, $J$ = 8.7 Hz), 127.46, 127.25, 127.07, 125.79, 125.26, 123.80 (d, $J$ = 2.7 Hz), 123.45, 122.25 (d, $J$ = 3.8 Hz), 121.65, 120.80 (d, $J$ = 3.3 Hz), 117.71, 117.61, 116.89 (d, $J$ = 6.0 Hz), 116.56, 116.41, 105.40 (dd, $J$ = 23.0, 3.9 Hz), 103.25 (dd, $J$ = 28.6, 24.3 Hz), 67.69, 44.54, 40.05. HPLC (method 1): $t_R$ = 16.0 min, AUC = 100.0%.

*3-(1,3-Difluoro-6-(trifluoromethyl)phenanthren-9-yl)-N-(5-(4-fluorophenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl)-3-hydroxypropanimidamide Hydrochloride* ***7o***. **7o** was synthesized according to the general procedure with the following modification: purification via flash chromatography was not necessary. Instead, the crude product was directly converted into its corresponding hydrochloride salt by adding hydrogen chloride in anhydrous diethyl ether. The resulting precipitate was washed twice with acetonitrile and dried.

Brown solid, yield: 39%. Mp: 248.2 °C, $^1$H NMR (300 MHz, DMSO-$d_6$): $\delta$ 12.03 (s, 1H), 10.02 (s, 1H), 9.27 (s, 1H), 9.08–8.95 (m, 2H), 8.83 (d, $J$ = 11.0 Hz, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.27 (d, $J$ = 2.4 Hz, 1H), 8.02 (t, $J$ = 7.6 Hz, 2H), 7.84–7.65 (m, 1H), 7.52–7.37 (m, 1H), 6.54 (s, 1H), 6.06 (dd, $J$ = 10.4, 3.3 Hz, 1H), 3.29 (dd, $J$ = 13.6, 3.3 Hz, 1H), 2.97 (dd, $J$ = 13.5, 10.3 Hz, 1H). $^{13}$C NMR (151 MHz, DMSO-$d_6$): $\delta$ 166.44, 166.15, 162.76, 161.66 (d, $J$ = 13.1 Hz), 161.19, 159.87 (dd, $J$ = 49.0, 13.6 Hz), 158.04 (d, $J$ = 14.2 Hz), 145.23 (d, $J$ = 16.3 Hz), 140.31 (d, $J$ = 8.7 Hz), 138.31, 131.82 (dd, $J$ = 10.6, 5.7 Hz), 131.61, 129.67 (d, $J$ = 4.4 Hz), 128.93, 127.46 (q, $J$ = 32.2 Hz), 127.05, 126.79, 125.24, 123.55, 123.44, 122.15 (d, $J$ = 3.8 Hz), 121.63, 117.62 (d, $J$ = 14.7 Hz), 117.43 (d, $J$ = 6.5 Hz), 111.04 (d, $J$ = 39.8 Hz), 105.47 (dd, $J$ = 23.2, 4.1 Hz), 103.34 (dd, $J$ = 28.9, 24.5 Hz), 67.07, 41.35, 41.06. HPLC (method 1): $t_R$ = 11.7 min, AUC = 98.1%.

*N-(1H-Benzo[d]imidazole-2-yl)-3-(1,3-difluoro-6-(trifluoromethyl)phenanthren-9-yl)-3-hydroxypropanimidamide Hydrochloride* ***7v***. **7f** (1.0 equiv) was dissolved in water (1.5 mL/mmol). Copper(I) oxide (5 mol %) and *N*,*N*′-dimethylethylenediamine (10 mol %) were added, followed by potassium carbonate (2.0 equiv). The reaction mixture was then heated in a preheated oil bath at 100 °C for 30 h. After cooling to room temperature, the reaction was quenched with water (3 mL/mmol) and extracted twice with ethyl acetate (5 mL/mmol). The combined organic phases were dried over anhydrous sodium sulfate, filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography (cyclohexane/ethyl acetate). The purified product was then treated with hydrogen chloride in anhydrous diethyl ether and stirred for 5 min.

Yellow solid, yield: 53%. Mp: 308.4 °C, $^1$H NMR (600 MHz, MeOD): $\delta$ 9.11 (s, 1H), 8.62 (d, $J$ = 8.6 Hz, 1H), 8.45 (d, $J$ = 10.6


https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5c01337
J. Med. Chem. XXXX, XXX, XXX−XXX

Hz, 1H), 8.32 (s, 1H), 8.05 (d, $J$ = 8.6 Hz, 1H), 7.74 (d, $J$ = 3.0 Hz, 1H), 7.58 (dd, $J$ = 5.9, 2.8 Hz, 2H), 7.34 (t, $J$ = 9.3 Hz, 1H), 6.10–6.05 (m, 1H), 3.84 (d, $J$ = 15.0 Hz, 1H), 3.61 (dd, $J$ = 15.0, 8.1 Hz, 1H). $^{13}$C NMR (151 MHz, MeOD): $\delta$ 163.86 (d, $J$ = 13.1 Hz), 162.09 (dd, $J$ = 39.5, 13.4 Hz), 160.28 (d, $J$ = 13.6 Hz), 152.23, 138.12, 133.82, 133.06, 132.45, 130.88, 130.17, 129.95, 127.37, 126.66, 126.36, 125.13 (d, $J$ = 3.3 Hz), 124.86, 123.04 (d, $J$ = 4.4 Hz), 119.32 (d, $J$ = 16.9 Hz), 118.72 (d, $J$ = 6.5 Hz), 114.70, 105.58 (dd, $J$ = 23.4, 4.4 Hz), 103.93 (dd, $J$ = 28.6, 24.8 Hz), 68.70, 49.57, 36.63. HPLC (method 1): $t_R$ = 12.2 min, AUC = 96.2%.

*3-(1,3-Difluoro-6-(trifluoromethyl)phenanthren-9-yl)-N-(4-fluorobenzyl)-3-hydroxypropanimidamide Hydrochloride* ***7p***. **7p** was synthesized according to the general procedure with the following modifications: trimethylaluminum (2.0 equiv, 2 M in toluene) was used instead of 3.0 equiv.

Purification via flash chromatography was not necessary. Instead, the crude product was directly converted into its corresponding hydrochloride salt by adding hydrogen chloride in anhydrous diethyl ether. The resulting precipitate was washed twice with acetonitrile and dried.

White solid, yield: 26%. Mp: 203.2 °C, $^1$H NMR (300 MHz, MeOD): $\delta$ 9.10 (s, 1H), 8.64 (d, $J$ = 8.8 Hz, 1H), 8.47 (d, $J$ = 10.7 Hz, 1H), 8.41 (s, 1H), 8.01 (dd, $J$ = 8.7, 1.8 Hz, 1H), 7.40 (ddd, $J$ = 10.8, 8.9, 2.3 Hz, 1H), 7.36–7.26 (m, 2H), 7.11–6.98 (m, 2H), 5.92 (dd, $J$ = 9.0, 4.0 Hz, 1H), 4.49 (d, $J$ = 2.6 Hz, 2H), 3.21 (dd, $J$ = 14.2, 4.0 Hz, 1H), 3.04 (dd, $J$ = 14.2, 9.0 Hz, 1H). $^{13}$C NMR (75 MHz, MeOD): $\delta$ 166.62, 162.38, 138.22, 133.14, 131.71, 130.82 (d, $J$ = 8.4 Hz), 126.80, 124.98, 122.93, 119.89–118.86 (m), 116.80, 116.51, 106.26–105.16 (m), 104.56–103.30 (m), 69.09, 57.48, 46.39, 42.19. HPLC (method 1): $t_R$ = 12.6 min, AUC = 100.0%.

*3-(1,3-Difluoro-6-(trifluoromethyl)phenanthren-9-yl)-3-hydroxy-N-neopentylpropanimidamide Hydrochloride* ***7q***. **7q** was synthesized according to the general procedure with the following modification: purification via flash chromatography was not necessary. Instead, the crude product was directly converted into its corresponding hydrochloride salt by adding hydrogen chloride in anhydrous diethyl ether. The resulting precipitate was washed twice with acetonitrile and dried.

White solid, yield: 39%. Mp: 213.7 °C, $^1$H NMR (300 MHz, MeOD): $\delta$ 9.50 (d, $J$ = 5.8 Hz, 2H), 9.25 (s, 1H), 8.92 (d, $J$ = 8.6 Hz, 2H), 8.81 (dd, $J$ = 11.3, 2.3 Hz, 1H), 8.34 (s, 1H), 8.01 (dd, $J$ = 8.8, 1.8 Hz, 1H), 7.70 (ddd, $J$ = 11.0, 9.0, 2.2 Hz, 1H), 6.34 (d, $J$ = 4.2 Hz, 1H), 5.93–5.83 (m, 1H), 3.13 (td, $J$ = 9.9, 5.6 Hz, 3H), 2.94 (dd, $J$ = 13.8, 9.9 Hz, 1H), 0.91 (s, 9H). $^{13}$C NMR (151 MHz, MeOD): $\delta$ 165.10, 161.77, 160.22, 159.90, 158.23, 158.14, 138.30, 131.92, 131.85, 129.08, 127.71, 127.49, 126.75, 125.39, 123.76, 123.59, 122.23, 117.78, 117.68, 105.61, 105.45, 103.63, 103.46, 103.27, 67.38, 52.65, 40.99, 40.06, 32.70, 26.87. HPLC (method 1): $t_R$ = 14.7 min, AUC = 100.0%.

*3-(1,3-Difluoro-6-(trifluoromethyl)phenanthren-9-yl)-N-(3,3-difluorocyclobutyl)-3-hydroxypropanimidamide Hydrochloride* ***7r***. **7r** was synthesized according to the general procedure.

Off-white solid, yield: 13%. Mp: 177.5 °C, $^1$H NMR (600 MHz, DMSO-$d_6$): $\delta$ 10.48–10.44 (m, 1H), 9.70 (s, 1H), 9.27 (d, $J$ = 1.9 Hz, 1H), 8.98 (s, 1H), 8.95 (d, $J$ = 8.7 Hz, 1H), 8.82 (dd, $J$ = 11.3, 2.4 Hz, 1H), 8.33 (s, 1H), 8.01 (dd, $J$ = 8.8, 1.8 Hz, 1H), 7.71 (ddd, $J$ = 10.9, 8.9, 2.3 Hz, 1H), 6.39 (d, $J$ = 4.5 Hz, 1H), 5.90 (dt, $J$ = 10.8, 4.2 Hz, 1H), 4.11 (p, $J$ = 6.8 Hz, 1H), 3.21–3.10 (m, 1H), 3.08 (dd, $J$ = 13.9, 3.8 Hz, 1H), 2.90–2.80 (m, 2H), 2.77 (dd, $J$ = 13.8, 10.3 Hz, 1H). $^{13}$C NMR (151 MHz, DMSO-$d_6$): $\delta$ 164.56, 161.73, 161.63, 160.10, 160.01, 159.78, 159.71–159.63 (m), 158.09 (d, $J$ = 3.9 Hz), 158.01, 138.39, 131.88, 131.85, 131.82, 131.64, 128.94, 127.58, 127.37, 126.78, 125.28, 123.60, 123.47, 122.18, 120.60, 118.82, 117.67, 117.56, 117.41, 116.95, 105.57, 105.43, 103.53, 103.36, 103.16 (q, $J$ = 6.5 Hz), 67.04, 41.47, 41.31, 41.16, 41.03, 40.06, 36.45, 36.40, 36.33, 36.28. HPLC (method 1): $t_R$ = 8.2 min, AUC = 98.3%.

*3-(1,3-Difluoro-6-(trifluoromethyl)phenanthren-9-yl)-N-(3,3-difluorocyclobutyl)-3-hydroxypropanimidamide Hydrochloride* ***7s***. **7s** was synthesized according to the general procedure.

White solid, yield: 15%. Mp: 145.5 °C, $^1$H NMR (300 MHz, DMSO-$d_6$): $\delta$ 10.31 (s, 1H), 9.66 (s, 1H), 9.28 (s, 1H), 8.94–8.77 (m, 2H), 8.31 (s, 1H), 8.16–7.98 (m, 2H), 7.83–7.64 (m, 1H), 6.33 (d, $J$ = 4.2 Hz, 1H), 5.93–5.74 (m, 1H), 3.09–2.95 (m, 1H), 2.82–2.70 (m, 1H), 2.57 (s, 1H), 2.20 (s, 6H). $^{13}$C NMR (75 MHz, MeOD): $\delta$ 166.16, 138.27, 133.88, 133.15, 130.74, 130.17, 129.74, 126.84, 124.93, 123.96, 122.86, 119.49, 119.19, 105.68, 105.43, 104.28, 103.90, 103.57, 68.94, 52.73, 49.15, 42.42, 25.72. HPLC (method 1): $t_R$ = 12.3 min, AUC = 98.7%.

**General Procedure for the Synthesis of 3-Hydroxypropanamidines (7t, 7u).** To a suspension of imidomethyl ester hydrochloride **6** (1.0 equiv) in anhyd. DCM (10 mL), the respective amine (1.0 equiv) was added under ice cooling. The reaction mixture was stirred for 12 h at RT, initially forming a clear solution from which a white solid precipitated over time. This precipitate was filtered off and recrystallized from methanol/diethyl ether. Purification was performed using reverse-phase chromatography (water/acetonitrile +0.1% formic acid). The product was dissolved in 1,4-dioxane and HCl in 1,4-dioxane (0.5 mL) was added under ice cooling. The reaction mixture was stirred for 0.5 h and the solvent was removed under reduced pressure.[49]

*N,N-Dibutyl-3-(1,3-difluoro-6-(trifluoromethyl)phenanthren-9-yl)-3-hydroxypropanimidamide Hydrochloric Acid* ***7t***. Off-white solid, yield: 13%. Mp: 177.9 °C, $^1$H NMR (600 MHz, MeOD): $\delta$ 9.10 (s, 1H), 8.66 (d, $J$ = 8.5 Hz, 1H), 8.46 (d, $J$ = 10.6 Hz, 1H), 8.41 (s, 1H), 8.04 (d, $J$ = 8.4 Hz, 1H), 7.40 (t, $J$ = 9.3 Hz, 1H), 5.96 (s, 1H), 3.48–3.40 (m, 1H), 3.37 (dd, $J$ = 17.0, 7.6 Hz, 2H), 3.25 (d, $J$ = 15.1 Hz, 3H), 1.51 (d, $J$ = 5.6 Hz, 1H), 1.36–1.29 (m, 4H), 1.22 (q, $J$ = 7.2 Hz, 2H), 1.15 (t, $J$ = 7.1 Hz, 1H), 0.93 (t, $J$ = 7.2 Hz, 3H), 0.86 (t, $J$ = 7.2 Hz, 3H). $^{13}$C NMR (151 MHz, MeOD): $\delta$ 163.96, 162.54, 162.45, 160.90, 160.81, 160.64, 160.55, 158.97, 158.88, 136.64, 132.44, 132.41, 132.38, 132.34, 131.76, 131.02, 129.42, 129.40, 129.37, 129.20, 129.01, 128.79, 128.58, 128.46, 128.36, 127.02, 125.28, 125.22, 123.79, 123.42, 121.66, 121.63, 121.61, 121.58, 118.00, 117.93, 117.90, 104.32, 104.29, 104.16, 104.14, 102.82, 102.65, 102.63, 102.46, 68.01, 51.29, 49.15, 38.08, 29.64, 27.77, 19.35, 19.27, 12.75, 12.45. HPLC (method 1): $t_R$ = 14.9 min, AUC = 95.3%.

*1-(1,3-Difluoro-6-(trifluoromethyl)phenanthren-9-yl)-3-(4,4-difluoropiperidin-1-yl)-3-iminopropan-1-ol Hydrochloric Acid* ***7u***. **7u** was synthesized according to the general procedure.

Off-white solid, yield: 13%. Mp: 210.9 °C, $^1$H NMR (600 MHz, MeOD): $\delta$ 9.12–9.00 (m, 1H), 8.47–8.40 (m, 2H), 7.99 (s, 1H), 7.76–7.59 (m, 1H), 7.36 (d, $J$ = 8.7 Hz, 1H), 6.06–5.83 (m, 1H), 4.19 (d, $J$ = 5.6 Hz, 1H), 3.74 (d, $J$ = 8.9 Hz, 1H), 3.31 (s, 2H), 1.36 (s, 2H), 1.29 (s, 4H). $^{13}$C NMR (151 MHz, MeOD): $\delta$ 139.00, 133.59, 132.41, 129.88, 128.18, 126.63, 124.87, 122.79, 118.39, 69.53, 68.48, 49.57, 38.43, 34.82, 33.31, 32.42, 27.56, 23.68, 20.98, 14.72, 14.40. HPLC (method 1): $t_R$ = 12.4 min, AUC = 100.0%.

**Parasite Culture.** Parasites were kept in complete culture medium (RPMI 1640 medium [Sigma], 2 mM L-glutamine [Gibco], 12 mL of 1 M HEPES [Gibco], 50 $\mu$g/mL gentamicin [Gibco], and 0.5% [wt/vol] AlbuMax II) at 37 °C in 5% $CO_2$/5% $O_2$ at 2.5% hematocrit. The medium was changed every other day and the parasites were diluted regularly with fresh erythrocytes.[13] For *P. knowlesi* cultures (kindly provided by Robert Moon of LSHTM, London, UK under a MTA by the Francis Crick Institute) the medium was additionally supplemented with 10% human AB serum.

**In Vitro *P. falciparum* Viability Assay.** Compounds **TKK130**, **LUM**, **CQ**, **TKK93**, **4a–f** and **7a–v** were assayed against asexual blood stages of *P. falciparum* (3D7, Dd2 and clinical isolates) using the histidine-rich protein 2 (HRP2) enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).[50,51] Briefly, 96-well plates were precoated with the tested compounds in a 3-fold dilution before ring-stage parasites were added to the complete culture medium at a hematocrit of 1.5% and parasitemia of 0.05%. After 3 days of incubation at 37 °C, 5% CO2, and 5% oxygen, plates were frozen until analyzed by HRP2-ELISA. All compounds were evaluated in duplicate in at least three independent experiments. The $IC_{50}$ was determined by nonlinear regression analysis of log concentration–response curves using the drc-package v0.9.0 of R v2.6.1.[52]



https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5c01337
J. Med. Chem. XXXX, XXX, XXX−XXX

The antiplasmodial activity against *P. knowlesi* was evaluated with Sybr Green as previously described.[53] Briefly, the compounds were distributed in a 3-fold serial dilution in 96-well plates. Synchronized ring-stage parasites were diluted to a parasitemia of 0.5% with O Rh+ erythrocytes and subsequently seeded at a hematocrit of 2% and complete culture medium without human AB serum but double (20%) AlbuMax II solution in a total volume of 225 μL per well. The growth inhibition of *P. knowlesi* was measured with SYBR Green-I (ThermoFisher) using CLARIOstar (BMG Labtech) (490 nm excitation filter).

**NF54 and Drug-Resistant Mutant Strains.** In vitro activity against erythrocytic stages of *P. falciparum* using the chloroquine-sensitive NF54 strain, and drug-resistant mutant strains were determined a [$^3$H]-hypoxanthine incorporation assay. Test compounds were dissolved in DMSO at 10 mg/mL and added to parasite cultures incubated in RPMI 1640 medium without hypoxanthine, supplemented with HEPES (5.94 g/L), NaHCO3 (2.1 g/L), neomycin (100 U/mL), and Albumax (5 g/L). Cultures were maintained at 2.5% hematocrit (0.3% parasitemia) using A+ human red blood cells. Serial drug dilutions of six 2-fold dilution steps were prepared. The 96-well plates were incubated in a humidified atmosphere at 37 °C; 4% CO2, 3% O2, 93% N2. After 48 h, 0.05 mL of [$^3$H]-hypoxanthine (=0.5 μCi) was added to each well. The plates were incubated for another 24 h under the same conditions. Plates were harvested with a Betaplate cell harvester (Wallac, Zurich, Switzerland). The red blood cells were transferred onto glass fiber filter and washed with distilled water. The dried filters were inserted into a plastic foil with 10 mL of scintillation fluid and counted in a Betaplate liquid scintillation counter. $IC_{50}$ values were determined from sigmoidal inhibition curves by linear regression using Microsoft Excel. Chloroquine (Sigma C6628) was used as a control.

**Sample Collection and Ex Vivo Assay.** *P. falciparum* isolates were collected from participants aged 2 years or older during January−August 2024. Asymptomatic and symptomatic individuals were screened for *P. falciparum* infection using a rapid diagnostic test (RDT); those with positive RDT results had a Giemsa-stained thick blood smear was prepared to quantify the parasitemia. The study protocol and all related documents were approved by the Comité d'Ethique de Centre de Recherche Médicales de Lambaréné, Gabon (CEI-012/2023).

Individuals with *P. falciparum* monoinfection ≥1000 parasites/μL determined by thick blood smear and willing to participate were enrolled in the study. Informed consent was signed by adult participants and parents or guardians of children and adolescents under 18 years of age. Adolescents between 12 and 18 years signed an additional assent. Patients reporting use of antimalarial drugs in the previous 30 days were excluded.

Venous blood was collected in citrate vacutainer tubes and processed at the same day as collection. The tubes were centrifuged at 2000 rpm for 10 min at room temperature, plasma, and buffy coat were removed, and the erythrocyte pellet was washed three times with RPMI 1640 media (Thermo Fisher Scientific). Ex vivo growth inhibition assay was performed as described above for the laboratory *P. falciparum* strains.

**Cytotoxicity Assay.** Compound cytotoxicity against HepG2 cells was assessed by neutral red assay as described previously.[54] HepG2 cells (obtained from ATCC) were maintained in DMEM medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% of inactivated fetal bovine serum (Sigma-Aldrich), 200 mM L-glutamine (Gibco), 12 mL of 1 M HEPES buffer (Gibco), and 50 μg/mL penicillin/streptomycin solution (Gibco). The cells were detached from the bottle when they reached a semiconfluent layer using Trypsin (Gibco). Next, 300,000 cells were seeded in supplemented medium as described above to 96-well plates. After 24 h, a 2-fold serial dilution of the respective drug diluted in supplemented DMEM medium was added to the cells. After 24 h, the drug-containing medium was replaced by a supplemented medium with 1.5% Neutral Red, and the cells were incubated for an additional 3 h at 37 °C. Cells were then washed with phosphate-buffered saline (pH 7.2) and 100 μL of freshly prepared lysis buffer (50% methanol, 49% distilled water, and 1% acetic acid) were added to the plates. The cells were then shaken for 10 min and the absorption was measured at a wavelength of 540 nm using CLARIOstar (BMG Labtech).

**In Vivo Antimalarial Efficacy.** In vivo efficacy on P. berghei was determined as previously described.[55,56] Female NMRI mice (Charles River Laboratories) were infected with a GFP-expressing P. berghei ANKA strain (donated by A.P. Waters and C.J. Janse, Leiden University, The Netherlands), and parasitemia was determined using standard flow cytometry techniques. The detection limit was 0.1%, i.e., One parasite in 1000 erythrocytes. Activity was calculated as the difference between the mean parasitemia for the control and treated groups ($n$ = 3, each) expressed in % relative to the control group. Two (TKK130) was suspended (50 mg/kg dose) or dissolved (30, 10, and 3 mg/kg) in 70/30 Tween 80/ethanol, diluted 10-fold with water, and administered orally as four consecutive daily doses (4, 24, 48, and 72 h after infection). All animal experiments adhered to local and national regulations of laboratory animal welfare in Switzerland (awarded permission no. 1731 and 2303). Protocols are regularly reviewed and revised following approval by the local authority (Veterinäramt Basel Stadt).

**Parasite Reduction Ratio Assay.** The parasite reduction ratio assay was performed as previously described.[57] Shortly, ring-stage parasites (strain 3D7) were set up at 0.5% parasitemia and 2% hematocrit and treated daily with compounds for 5 consecutive days. The concentrations used herein were based on the $IC_{50}$ as previously determined in 72 h-growth inhibition assays (10-fold higher). After 24 h of each drug incubation, an aliquot of the treated parasites was transferred to a new plate containing drug-free medium and the parasites were allowed to grow for 28 days in order to detect recrudescent parasites. The speed of action of **4d**, **4e**, **7a**, **7b**, and **7d** was assessed in comparison to the antimalarial drugs artesunate, chloroquine, and atovaquone, which were used as fast-, medium-, and slow-acting control drugs, respectively. The in vitro PRR is calculated as the decrease in viable parasites over the time frame of 48 h, representing one parasite life cycle. This is a direct measurement of the killing rate for the investigated compound. We evaluated parasite growth by an ELISA of the histidine rich protein 2 (HRP2) measurement. Uninfected erythrocytes at 2% hematocrit (96 technical replicates of three different erythrocyte cultures, treated the same way as cultures with parasites) served to determine background optical density (OD) values for the measurement of HPR2. Parasite numbers were derived from the number of wells declared as positive by HRP2 ELISA. The number of viable parasites after each treatment time point was extrapolated using the formula: $P_{viable} = X_{n-1}$ as described in detail in the original publication. In the equation Pviable represents the number of viable parasites, X is the dilution factor used for serial dilution (we used a 3-fold dilution), and n is the number of wells in which viable parasites could be detected.

**General Procedure for Pharmacokinetic Evaluation Assays of 7a and 7d.** For separation and detection, an LC−MS/MS system consisting of an Agilent 1200 series HPLC (Agilent, Waldbronn, Germany) with a binary pump coupled to a TSQ Quantum Ultra triple quadrupole mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts) with an ESI interface was used. Sample handling was performed by a CTC HTS Pal system (CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland). Chromatographic separation was achieved using a Luna 3u C18 100 × 2.00 mm HPLC column with guard column AJ0-4286 C18 4 × 2.00 mm (Phenomenex Inc., Torrance, California, USA) under gradient conditions (mobile phases: 0.1% formic acid in water and 0.1% formic acid in methanol). The flow rate was set to 400 μL/min.

The mass-to-charge ratios of 481.130 to 154.970 $m/z$ (collision energy 33 V) for **7a** and 523.040 to 310.050 $m/z$ (collision energy 31 V) for **7d** were monitored by multiple reaction monitoring with a dwell time of 75 ms and positive ionization mode. In the ESI interface, the following settings were employed: spray voltage 4500 V, vaporizer temperature 380 °C, aux gas pressure 5, sheath gas pressure 60, ion sweep gas pressure 1, tube lens 153 V (**7a**) and 127 V (**7d**), and a capillary temperature of 240 °C.



https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5c01337
J. Med. Chem. XXXX, XXX, XXX−XXX

*Plasma Stability.* To determine the ex vivo stability of **7a** and **7d** in human plasma, fresh whole blood was collected in 3K-EDTA collection tubes (SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Germany) and plasma was obtained by centrifugation at 2000 rpm for 10 min. The plasma was warmed to 37 °C, and the compound solution was added to achieve final concentrations of 2.5 and 50 ng/mL, respectively. A control was prepared in 2.5 and 50 ng/mL in 4% BSA (w/V) in water, in addition to the plasma samples. Each approach was applied in triplicate. All samples were incubated at 37 °C and shaken at 400 rpm. Samples of 100 μL were obtained at 0, 30, 60, 120, 240, 360, and 1440 min. The samples were immediately precipitated with 300 μL of ice-cold acetonitrile, which contained a structurally related internal standard. They were then vortexed and shaken for 30 min at 1000 rpm. Subsequently, the samples were centrifuged for 10 min at a speed of 14,000 rpm. The supernatant was evaporated under a gentle stream of nitrogen at a temperature of 37 °C and the residues were covered and stored in a refrigerator at 4 °C. Following the final sampling period, all residues were reconstituted and analyzed. The recoveries were calculated according to eq 1 and the elimination half-life according to eq 2.

$$\text{recovery [\%]} = \frac{\text{area ratio of time points}}{\text{area ratio of 0 h time point}} \times 100 \quad (1)$$

$$t_{1/2}[h] = \frac{\ln(2)}{k_e} \quad (2)$$

$t_{1/2}$ = Elimination half-life, $k_e$ = elimination rate constant (negative slope from ln recovery versus time in h) [$h^{-1}$]

*Blood-to-Plasma Ratio.* The K(B/P)s of **7a** and **7d** were calculated to determine the ratio of the distribution between the blood and the plasma fraction. Fresh whole blood was spiked with the compound at concentrations of 2.5 and 50 ng/mL. Following a 30 min incubation period at 37 °C, the whole blood was centrifugated at 2000 rpm for 10 min, thereby separating the plasma and RBC fractions. To obtain reference plasma and RBC samples, separate fresh fractions were spiked with the respective concentration of **7a** or **7d**. RBC fractions were vortexed and shaken at 99 rpm for 10 min to achieve lysis of the red blood cells. Each fraction was purified according to the following procedure: 100 μL of plasma or RBC samples (37 °C) were precipitated with 300 μL of ice-cold acetonitrile (containing 5 ng/mL internal standard), immediately vortexed and shaken for 30 min at 1000 rpm. The samples were centrifuged at 14,000 rpm for 10 min. For each sample, the supernatant was transferred to a 96-well plate, evaporated to dryness at 37 °C under a gentle nitrogen stream, and the residues were reconstituted. All samples were analyzed in triplicate. The hematocrit was determined volumetrically. The reference carvedilol was determined at 25 ng/mL using carvedilol-d5 as the internal standard. The K(B/P) was calculated using eq 3. Carvedilol served as assay reference and the observed K(B/P) was comparable to ratios reported in the literature [0.61 ± 0.04 and 0.61 ± 0.02 (mean ± SD), respectively], which demonstrated the validity of the assay.[58−60]

$$\text{K(B/P)} = \frac{\frac{\text{area ratio RBC fraction}}{\text{area ratio RBC reference}}}{\frac{\text{area ratio plasma fraction}}{\text{area ratio plasma reference}}} \times H + (1 - H) \quad (3)$$

$H$ = Hematocrit RBC = Red blood cell fraction

*Microsomal Stability.* Microsomal stability was determined using HLMs and the cosolvent method.[61] 905 μL potassium phosphate buffer 0.1 M pH 7.4 and 25 μL of 20 mg/mL from 150 donors pooled HLMs (Corning, New York, USA) were mixed gently. A 100 μM working solution of **7a** or **7d** in acetonitrile/dimethyl sulfoxide 80/20 (v/v) was added and the mixture was gently swirled. A total of 47 μL of the mixture was transferred into three reaction tubes per time point. To initiate the reaction, a freshly prepared mixture of 125 μL NADPH Regenerating System Solution A and 25 μL NADPH Regenerating System Solution B (Corning, New York, USA) was added, and the tubes were incubated at 37 °C while shaking at 450 rpm. The final concentrations of the analytes were 1 μM. At designated time points (0, 15, 30, 45, and 60 min), the reaction was terminated by the addition of 150 μL of ice-cold acetonitrile (containing 100 ng/mL internal standard) to each preparation. The reaction tubes were then vortexed and placed on ice. The samples were centrifuged at 14,000 rpm for a period of 10 min, after which the supernatant was diluted. A negative control (containing all components except cofactors) and a blank (containing all components except the analytes) were included as controls. Samples were analyzed in triplicate. Propranolol was applied as reference control in the microsomal stability assay and demonstrated the validity.[61,62]

*Microsomal Binding.* To determine the fractions of **7a** and **7d** that were freely available for metabolism in HLMs, the nonspecific binding to microsomes was quantified through equilibrium dialysis. The procedure is similar to the determination of plasma protein binding in the classical approach (see below). However, the donor medium consisted of 0.5 mg/mL HLMs in potassium phosphate buffer 0.1 M and was spiked with 1 μM **7a** or **7d** to simulate the conditions of the microsomal stability assay. Samples were obtained from both chambers after 24 h. The donor samples were diluted with 4% BSA in potassium phosphate buffer 0.1 M (w/V), and 100 μL were precipitated with 300 μL of ice-cold acetonitrile (containing 5 ng/mL internal standard), immediately vortexed, and then shaken at 1000 rpm for 30 min. The samples were centrifuged at 14,000 rpm for 10 min. The supernatant was transferred to a 96-well plate, evaporated to dryness at 37 °C under a gentle stream of nitrogen, and the residue was reconstituted. Methanol containing 12.5 ng/mL of the internal standard was added to the acceptor side to dissolve the compounds, resulting in a 40% methanolic solution. Quantification was carried out using calibration curves prepared in the respective medium. The microsomal binding was analyzed in triplicate and calculated by eqs 4 and 5.

$$f_{b,mic} = \frac{(D_{Te} - D_F) \times \frac{V_e}{V_i}}{\left[(D_{Te} - D_F) \times \frac{V_e}{V_i}\right] + D_F} \quad (4)$$

$f_{b,mic}$ = Fraction bound in HLMs, $D_{Te}$ = total donor concentration at equilibrium, $D_F$ = free concentration of the acceptor, $V_e$ = equilibrium donor volume, $V_i$ = initial donor volume

$$f_{u,mic} = (1 - f_{b,mic}) \quad (5)$$

$f_{u,mic}$ = Fraction unbound in HLMs

**Plasma Protein Binding.** *Standard Equilibrium Dialysis Assay.* The equilibrium dialysis method was employed to determine the plasma protein binding of **7a** and **7d**. A regenerated cellulose dialysis membrane (limit 6 kDa, Reichelt Chemietechnik GmbH + Co, Heidelberg, Germany), which had been previously soaked in 20% ethanol in water, was clamped in a 96-well Teflon plate, thereby creating two chambers in each well. The donor chamber was spiked with 100 ng/mL **7a** or **7d** in plasma, while the acceptor chamber was filled with 0.9% saline. The covered dialysis plate was incubated at 37 °C. Following a 24 h incubation period, samples were obtained from both chambers. 100 μL of plasma was precipitated with 300 μL of ice-cold acetonitrile (containing 5 ng/mL internal standard), immediately vortexed, and shaken for 30 min at 1000 rpm. The samples were centrifuged at 14,000 rpm for 10 min. For each sample, the supernatant was transferred to a 96-well plate, evaporated to dryness at 37 °C under a gentle nitrogen stream, and the residue was then reconstituted. Methanol (containing the internal standard) was added to the acceptor side to facilitate the dissolution of the analytes, resulting in a 40% methanolic solution. Quantification was conducted using individual calibration curves in the respective medium. The analysis of plasma protein binding was conducted in triplicate. Itraconazole was used as control drug to confirm validity of the assay.

*Dilution Method.* To determine the exact unbound fraction of **7a** and **7d**, the dilution method was applied as a modification of the standard equilibrium dialysis method.[63] Instead of plasma, a 1:10 or 1:20 dilution of plasma in 0.9% saline was used as the donor. The


https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5c01337
J. Med. Chem. XXXX, XXX, XXX−XXX

diluted plasma (spiked at 100 ng/mL **7a** or **7d**) was incubated with 0.9% saline as acceptor for 24 h at 37 °C. Sample preparation was carried out as for the classical approach. Calibration curves from 1:10 and 1:20 diluted plasma were used to determine the donor concentrations. A calibration curve of 60/40 0.9% saline/methanol (v/v) was used to determine the corresponding concentrations on the acceptor side. Plasma protein binding was analyzed in triplicate and calculated by eqs 6–8. As reference, the plasma protein binding of itraconazole (donor: 400 ng/mL) was determined using itraconazole-d4 as internal standard.

$$\text{Diluted}f_{u,d(p)} = \frac{\text{acceptor concentration}}{\text{donor concentration}} \quad (6)$$

$\text{Diluted}f_{u,d(p)}$ = free fraction from dilution method

$$f_{u,p} = \frac{\frac{1}{D}}{\left[\left(\frac{1}{f_{u,d(p)}}\right) - 1\right] + \frac{1}{D}} \quad (7)$$

$f_{u,p}$ = Fraction unbound in plasma, $D$ = dilution level

$$f_{b,p}[\%] = (1 - f_{u,p}) \times 100 \quad (8)$$

$f_{b,p}$ = Fraction bound in plasma

*Snapshot Pharmacokinetics in P. berghei Mice (Dried Blood Spots).* Single oral doses of **7d** were administered at doses of 50 mg/kg to two mice infected with *P. berghei*. The mice were sampled at 1, 4, and 24 h after receiving **7d**, and the dried blood spots on filter paper were transported at room temperature for bioanalysis. The dried blood spots were punched out with a fixed diameter of 5.5 mm and extracted for 30 min at 2000 rpm with 600 μL of acetonitrile/water (80/20, v/v) containing 5 ng/mL of internal standard. A volume of 300 μL of the supernatant was evaporated to dryness under a gentle nitrogen stream at 37 °C, after which the residue was solubilized in 100 μL of acetonitrile/water (40/60, v/v). Prior to LC–MS/MS analysis, samples were diluted 1:20. Additionally, a new whole blood calibration curve, including two quality control (QC) samples at three different levels (high: 600 ng/mL; mid: 400 ng/mL; low: 50 ng/mL), was prepared on the day of analysis using human whole blood. Twenty-five μL of each calibration and QC level were spotted and allowed to dry on filter paper. Subsequently, a 2 h drying process was conducted on all calibration and QC samples, which were then treated like the unknown samples. The final calibration range was 12.5 ng/mL to 800 ng/mL. In addition to the three sampling times at 1, 4, and 24 h, a separate 0 h value was obtained from control dried blood spots (*P. berghei* mice, $n = 5$). The concentrations for the unknown samples were analyzed using PK-Sim Version 11, Update 2 to determine $AUC_{0-t}$.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

, The Supporting Information is available free of charge at https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jmedchem.5c01337.

Experimental procedures for the synthesis of all final compounds (PDF), analytical data including chemical stability data, HPLC purity analysis and $^{1}H$ and $^{13}C$ NMR spectra (PDF) and biological evaluation including in vitro parasite reduction (PRR), mode of action studies, and in vivo antiplasmodial activity (PDF) (PDF)

Molecular formula strings (CSV) (CSV)

## ■ AUTHOR INFORMATION


### Corresponding Authors

**Jana Held** − *German Center for Infection Research, 72074 Tübingen, Germany; Centre de Recherches Médicales de Lambaréné, B.P. 242 Lambaréné, Gabon; Institute of Tropical Medicine, Eberhard Karls University Tuebingen, 72074 Tuebingen, Germany;* orcid.org/0000-0002-7970-1429; Phone: (+49)7071 29-85569; Email: Jana.held@uni-tuebingen.de

**Bjoern B. Burckhardt** − *Individualized Pharmacotherapy, Institute of Pharmaceutical and Medicinal Chemistry, University of Muenster, 48149 Muenster, Germany;* orcid.org/0000-0002-1782-9937; Phone: (+49) 251-83-33324; Email: burckhardt@uni-muenster.de

**Thomas Kurz** − *Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Institute of Pharmaceutical and Medicinal Chemistry, Heinrich Heine University Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany;* orcid.org/0000-0002-9474-4224; Phone: (+49) 21181-14984; Email: Thomas.kurz@hhu.de

### Authors

**Saskia Klein** − *Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Institute of Pharmaceutical and Medicinal Chemistry, Heinrich Heine University Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany*

**Alena Moritz** − *Individualized Pharmacotherapy, Institute of Pharmaceutical and Medicinal Chemistry, University of Muenster, 48149 Muenster, Germany*

**Lais Pessanha de Carvalho** − *Institute of Tropical Medicine, Eberhard Karls University Tuebingen, 72074 Tuebingen, Germany; Department of Microbiology and Immunology and Center for Malaria Therapeutics and Antimalarial Resistance, Division of Infectious Diseases, Department of Medicine, Columbia University Irving Medical Center, New York, New York 10032, United States*

**Tanja C. Knaab** − *Department of Pharmacy, Ludwig Maximilians University München, 81377 München, Germany*

**Beate Lungerich** − *Individualized Pharmacotherapy, Institute of Pharmaceutical and Medicinal Chemistry, University of Muenster, 48149 Muenster, Germany*

**Lukas Meyer** − *Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Institute of Pharmaceutical and Medicinal Chemistry, Heinrich Heine University Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany*

**Jona Sandström** − *Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Institute of Pharmaceutical and Medicinal Chemistry, Heinrich Heine University Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany*

**Jessica L. Thibaud** − *Department of Chemistry and Polymer Science, Stellenbosch University, Matieland 7602, South Africa*

**Katherine A. de Villiers** − *Department of Chemistry and Polymer Science, Stellenbosch University, Matieland 7602, South Africa;* orcid.org/0000-0002-2932-395X

**David A. Fidock** − *Department of Microbiology and Immunology and Center for Malaria Therapeutics and Antimalarial Resistance, Division of Infectious Diseases, Department of Medicine, Columbia University Irving Medical Center, New York, New York 10032, United States*

**Sergio Wittlin** − *Swiss Tropical and Public Health Institute, Allschwil CH-4123, Switzerland; University of Basel, Basel CH-4003, Switzerland;* orcid.org/0000-0002-0811-0912

**Matthias Rottmann** − *Swiss Tropical and Public Health Institute, Allschwil CH-4123, Switzerland; University of Basel, Basel CH-4003, Switzerland*

Complete contact information is available at: https://pubs.acs.org/10.1021/acs.jmedchem.5c01337

### Author Contributions

[††]S.K., A.M., and L.P.d.C. contributed equally to this work. The manuscript was written with contributions from all authors. All authors gave approval to submit the final version of the manuscript.

### Notes

All animal experiments performed in the manuscript were conducted in compliance with institutional guidelines.
The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

J.H., T.K., and B.B.B. gratefully acknowledge funding of the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research-Foundation)—461708005. S.W. and M.R. gratefully acknowledge funding support from the Medicines for Malaria Venture (MMV). D.A.F. would like to acknowledge funding support from the NIH (R01 AI185559). The authors cordially thank Petra Stahlke for the experimental assistance.

## ■ ABBREVIATIONS

ART, artemisinin; ATO, Atovaquone; BSA, bovine serum albumin; **CQ**, chloroquine; $CDCl_3$, chloroform-*d*, deuterated chloroform; CYC, cycloguanil; DMSO-$d_6$, deuterated dimethyl sulfoxide; d, doublet; dd, doublet of doublets; **Hf**, halofantrine;; HepG2, hepatocellular carcinoma G2; hERG, human ether-a-go-go-related gene; HLMs, human liver microsomes; HPLC, high pressure liquid chromatography; HRMS, high-resolution mass spectrometry; K(B/P), blood-to-plasma ratio; **LUM**, lumefantrine; mp, melting point; MS, mass spectrometry; MFQ, Mefloquine; MSD, mean survival time in days; PK, pharmacokinetic(s); PPQ, piperaquine; PYR, pyrimethamine; q, quartet; QC, quality control; RBC, red blood cell; RT, room temperature; s, singulet; SAR, structure activity relationship; SI, selectivity index; SUL, sulfadoxin; t, triplet; WHO, World Health Organization

## ■ REFERENCES

(1) Smith, R. C.; Vega-Rodríguez, J.; Jacobs-Lorena, M. The Plasmodium Bottleneck: Malaria Parasite Losses in the Mosquito Vector. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2014**, *109* (5), 644−661.
(2) World Health Organization. *World Malaria Report 2024: Addressing Inequity in the Global Malaria Response, Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO*; World Health Organization: Geneva, 2024.
(3) World Health Organization *Child Mortality (under 5 Years)*; World Health Organization: Geneva, 2021. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/levels-and-trends-in-child-under-5-mortality-in-2020 (accessed Apr 04, 2025).
(4) University of Oxford *New Phase 3 Trial Data Confirm Uniquely High Efficacy and Good Safety Profile of R21/Matrix-M Malaria Vaccine*; University of Oxford, 2024. https://www.ox.ac.uk/news/2024-02-01-new-phase-3-trial-data-confirm-uniquely-high-efficacy-and-good-safety-profile (accessed Apr 11, 2025).
(5) Datoo, M. S.; Dicko, A.; Tinto, H.; Ouédraogo, J. B.; Hamaluba, M.; Olotu, A.; Beaumont, E.; Ramos Lopez, F.; Natama, H. M.; Weston, S.; Chemba, M.; Compaore, Y. D.; Issiaka, D.; Salou, D.; Some, A. M.; Omenda, S.; Lawrie, A.; Bejon, P.; Rao, H.; Chandramohan, D.; Roberts, R.; Bharati, S.; Stockdale, L.; Gairola, S.; Greenwood, B. M.; Ewer, K. J.; Bradley, J.; Kulkarni, P. S.; Shaligram, U.; Hill, A. V. S.; et al. Safety and efficacy of malaria vaccine candidate R21/Matrix-M in African children: a multicentre, double-blind, randomised, phase 3 trial. *Lancet* **2024**, *403*, 533−544.
(6) Aderinto, N.; Olatunji, G.; Kokori, E.; Sikirullahi, S.; Aboje, J. E.; Ojabo, R. E. A Perspective on Oxford's R21/Matrix-M™ Malaria Vaccine and the Future of Global Eradication Efforts. *Malar. J.* **2024**, 23 (1), 16.
(7) Ward, K. E.; Fidock, D. A.; Bridgford, J. L. Plasmodium Falciparum Resistance to Artemisinin-Based Combination Therapies. *Curr. Opin. Microbiol.* **2022**, *69*, 102193.
(8) Shegokar, R.; Pathak, Y. *Malarial Drug Delivery Systems: Advances in Treatment of Infectious Diseases*; Springer Nature, 2023; .
(9) Siqueira-Neto, J. L.; Wicht, K. J.; Chibale, K.; Burrows, J. N.; Fidock, D. A.; Winzeler, E. A. Antimalarial Drug Discovery: Progress and Approaches. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2023**, *22* (10), 807−826.
(10) Bagratee, T.; Prawlall, R.; Ndlovu, T.; Sibisi, S.; Ndadane, S.; Shaik, B. B.; Palkar, M. B.; Gampa, R.; Karpoormath, R. Exploring the Recent Pioneering Developments of Small Molecules in Antimalarial Drug Armamentarium: A Chemistry Prospective Appraisal. *Chem. Biodiversity* **2024**, *21*, 202400460.
(11) European Medicines Agency Pyramax—Opinion on Medicine for Use Outside the EU, 2022. https://www.ema.europa.eu/en/opinion-medicine-use-outside-EU/human/pyramax (accessed April 22, 2025).
(12) Knaab, T. C.; Held, J.; Burckhardt, B. B.; Rubiano, K.; Okombo, J.; Yeo, T.; Mok, S.; Uhlemann, A. C.; Lungerich, B.; Fischli, C.; Pessanha De Carvalho, L.; Mordmüller, B.; Wittlin, S.; Fidock, D. A.; Kurz, T. 3-Hydroxy-Propanamidines, a New Class of Orally Active Antimalarials Targeting Plasmodium Falciparum. *J. Med. Chem.* **2021**, *64* (6), 3035−3047.
(13) Knaab, T. C.; Moritz, A.; Pessanha de Carvalho, L.; Klein, S.; Lungerich, B.; Lohse, K.; Kruse, L.; Mombo-Ngoma, G.; Orta, L.; Thibaud, J. L.; De Villiers, K. A.; Fidock, D. A.; Burckhardt, B. B.; Held, J.; Wittlin, S.; Kurz, T. TKK130 Is a 3-Hydroxy-Propanamidine (HPA) with Potent Antimalarial In Vivo Activity and a High Barrier to Resistance. *J. Med. Chem.* **2025**, *68* (1), 95−107.
(14) O'Murchu, C. Ozonolysis of Quinolines: A Versatile Synthesis of Polyfunctional Pyridines. *Synthesis* **1989**, *1989* (11), 880−882.
(15) Knaab, T. C. Synthese Und Antiplasmodiale Evaluation Neuer Arylaminoalkohol Analoga. Ph.D. Thesis, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2018.
(16) Xu, Y.; Yu, C.; Zhang, X.; Fan, X. Selective Synthesis of Dihydrophenanthridine and Phenanthridine Derivatives from the Cascade Reactions of o -Arylanilines with Alkynoates through C−H/N−H/C−C Bond Cleavage. *J. Org. Chem.* **2021**, *86* (8), 5805−5819.
(17) Shi, G.; Chen, D.; Jiang, H.; Zhang, Y.; Zhang, Y. Synthesis of Fluorenes Starting from 2-Iodobiphenyls and CH 2 Br 2 through Palladium-Catalyzed Dual C−C Bond Formation. *Org. Lett.* **2016**, *18* (12), 2958−2961.
(18) Fan, Y. C.; Du, G. F.; Sun, W. F.; Kang, W.; He, L. N. Heterocyclic Carbene-Catalyzed Cyanomethylation of Aldehydes with TMSAN. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53* (17), 2231−2233.
(19) Prasad, B.; Jamroskovic, J.; Bhowmik, S.; Kumar, R.; Romell, T.; Sabouri, N.; Chorell, E. Flexible Versus Rigid G-Quadruplex DNA Ligands: Synthesis of Two Series of Bis-indole Derivatives and Comparison of Their Interactions with G-Quadruplex DNA. *Chem.—A Eur. J.* **2018**, *24* (31), 7926−7938.
(20) Bjørsvik, H.-R.; Elumalai, V. Synthesis of the Carbazole Scaffold Directly from 2-Aminobiphenyl by Means of Tandem C−H Activation and C−N Bond Formation. *Eur. J. Org. Chem.* **2016**, *2016*, 5474−5479.
(21) Krongauz, E. S.; Rusanov, A. L.; Renard, T. L. Polyphosphoric Acid in Cyclisation and Polycyclisation Reactions. *Russ. Chem. Rev.* **1970**, *39* (9), 747−765.
(22) Tagawa, Y.; Yamashita, K.; Higuchi, Y.; Goto, Y. Improved oxidation of active methyl group of N-heteroaromatic compounds by selenium dioxide in the presence of tert-butyl hydroperoxide. *Heterocycles* **2003**, *60* (4), 953−957.
(23) Waitkins, G. R.; Clark, C. W. Selenium dioxide: Preparation, properties, and use as oxidizing agent. *Chem. Rev.* **1945**, *36* (62), 235−289.
(24) Leven, M. Synthese Und Antimikrobielle Eigenschaften von N-Aminooxyalkylsubstituierten 8-Aminochinolinen Und 3-Hydroxypropanhydrazonamiden. Ph.D. Thesis, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2013.


https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5c01337
J. Med. Chem. XXXX, XXX, XXX−XXX

(25) Leven, M.; Knaab, T. C.; Held, J.; Duffy, S.; Meister, S.; Fischli, C.; Meitzner, D.; Lehmann, U.; Lungerich, B.; Kuna, K.; Stahlke, P.; Delves, M. J.; Buchholz, M.; Winzeler, E. A.; Avery, V. M.; Mordmüller, B.; Wittlin, S.; Kurz, T. 3-Hydroxy- N ′-Arylidenepropanehydrazonamides with Halo-Substituted Phenanthrene Scaffolds Cure P. Berghei Infected Mice When Administered Perorally. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (14), 6036−6044.
(26) Peng, J.; Ye, M.; Zong, C.; Hu, F.; Feng, L.; Wang, X.; Wang, Y.; Chen, C. Copper-Catalyzed Intramolecular C−N Bond Formation: A Straightforward Synthesis of Benzimidazole Derivatives in Water. *J. Org. Chem.* **2011**, *76* (2), 716−719.
(27) Tse, E. G.; Korsik, M.; Todd, M. H. The Past, Present and Future of Anti-Malarial Medicines. *Malar. J.* **2019**, *18* (1), 93.
(28) Ashton, T. D.; Devine, S. M.; Möhrle, J. J.; Laleu, B.; Burrows, J. N.; Charman, S. A.; Creek, D. J.; Sleebs, B. E. The Development Process for Discovery and Clinical Advancement of Modern Antimalarials. *J. Med. Chem.* **2019**, *62* (23), 10526−10562.
(29) Baragaña, B.; Hallyburton, I.; Lee, M. C. S.; Norcross, N. R.; Grimaldi, R.; Otto, T. D.; Proto, W. R.; Blagborough, A. M.; Meister, S.; Wirjanata, G.; Ruecker, A.; Upton, L. M.; Abraham, T. S.; Almeida, M. J.; Pradhan, A.; Porzelle, A.; Martínez, M. S.; Bolscher, J. M.; Woodland, A.; Luksch, T.; Norval, S.; Zuccotto, F.; Thomas, J.; Simeons, F.; Stojanovski, L.; Osuna-Cabello, M.; Brock, P. M.; Churcher, T. S.; Sala, K. A.; Zakutansky, S. E.; Jiménez-Díaz, M. B.; Sanz, L. M.; Riley, J.; Basak, R.; Campbell, M.; Avery, V. M.; Sauerwein, R. W.; Dechering, K. J.; Noviyanti, R.; Campo, B.; Frearson, J. A.; Angulo-Barturen, I.; Ferrer-Bazaga, S.; Gamo, F. J.; Wyatt, P. G.; Leroy, D.; Siegl, P.; Delves, M. J.; Kyle, D. E.; Wittlin, S.; Marfurt, J.; Price, R. N.; Sinden, R. E.; Winzeler, E. A.; Charman, S. A.; Bebrevska, L.; Gray, D. W.; Campbell, S.; Fairlamb, A. H.; Willis, P. A.; Rayner, J. C.; Fidock, D. A.; Read, K. D.; Gilbert, I. H. A Novel Multiple-Stage Antimalarial Agent That Inhibits Protein Synthesis. *Nature* **2015**, *522* (7556), 315−320.
(30) Meister, S.; Plouffe, D. M.; Kuhen, K. L.; Bonamy, G. M. C.; Wu, T.; Barnes, S. W.; Bopp, S. E.; Borboa, R.; Bright, a T.; Che, J.; Cohen, S.; Dharia, N. V.; Gagaring, K.; Gettayacamin, M.; Gordon, P.; Groessl, T.; Kato, N.; Lee, M. C. S.; Mcnamara, C. W.; Fidock, D. a.; et al. Imaging of *Plasmodium* Liver Stages to Drive Next-Generation Antimalarial Drug Discovery. *Science* **2011**, *334* (6061), 1372−1377.
(31) Stickles, A. M.; de Almeida, M. J.; Morrisey, J. M.; Sheridan, K. A.; Forquer, I. P.; Nilsen, A.; Winter, R. W.; Burrows, J. N.; Fidock, D. A.; Vaidya, A. B.; Riscoe, M. K. Subtle Changes in Endochin-Like Quinolone Structure Alter the Site of Inhibition within the Cytochrome Bc 1 Complex of Plasmodium Falciparum. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59* (4), 1977−1982.
(32) Jiménez-Díaz, M. B.; Ebert, D.; Salinas, Y.; Pradhan, A.; Lehane, A. M.; Myrand-Lapierre, M.-E.; O'Loughlin, K. G.; Shackleford, D. M.; Justino de Almeida, M.; Carrillo, A. K.; Clark, J. A.; Dennis, A. S. M.; Diep, J.; Deng, X.; Duffy, S.; Endsley, A. N.; Fedewa, G.; Guiguemde, W. A.; Gómez, M. G.; Holbrook, G.; Horst, J.; Kim, C. C.; Liu, J.; Lee, M. C. S.; Matheny, A.; Martínez, M. S.; Miller, G.; Rodríguez-Alejandre, A.; Sanz, L.; Sigal, M.; Spillman, N. J.; Stein, P. D.; Wang, Z.; Zhu, F.; Waterson, D.; Knapp, S.; Shelat, A.; Avery, V. M.; Fidock, D. A.; Gamo, F.-J.; Charman, S. A.; Mirsalis, J. C.; Ma, H.; Ferrer, S.; Kirk, K.; Angulo-Barturen, I.; Kyle, D. E.; DeRisi, J. L.; Floyd, D. M.; Guy, R. K. (+)-SJ733, a Clinical Candidate for Malaria That Acts through ATP4 to Induce Rapid Host-Mediated Clearance of Plasmodium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2014**, *111* (50), No. E5455.
(33) Sandlin, R. D.; Fong, K. Y.; Wicht, K. J.; Carrell, H. M.; Egan, T. J.; Wright, D. W. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance Identification of b -Hematin Inhibitors in a High-Throughput Screening Effort Reveals Scaffolds with in Vitro Antimalarial Activity. *Int. J. Parasitol.: Drugs Drug Resist.* **2014**, *4* (3), 316−325.
(34) Carter, M.; Phelan, V.; Sandlin, R.; Bachmann, B.; Wright, D. W. Lipophilic Mediated Assays for *β*-Hematin Inhibitors. *Comb. Chem. High Throughput Screening* **2010**, *13* (3), 285−292.
(35) Amod, L.; Mohunlal, R.; Teixeira, N.; Egan, T. J.; Wicht, K. J. Identifying Inhibitors of *β*-Haematin Formation with Activity against Chloroquine-Resistant Plasmodium Falciparum Malaria Parasites via Virtual Screening Approaches. *Sci. Rep.* **2023**, *13* (1), 2648.
(36) Olivier, T.; Loots, L.; Kok, M.; De Villiers, M.; Reader, J.; Birkholtz, L.; Arnott, G. E.; De Villiers, K. A. Adsorption to the Surface of Hemozoin Crystals: Structure-Based Design and Synthesis of Amino-Phenoxazine *β*-Hematin Inhibitors. *ChemMedChem* **2022**, *17*, No. e202200139.
(37) Pagola, S.; Stephens, P. W.; Bohle, D. S.; Kosar, A. D.; Madsen, S. K. The Structure of Malaria Pigment *β*-Haematin. *Nature* **2000**, *404* (6775), 307−310.
(38) Nissink, J. W. M. Simple Size-Independent Measure of Ligand Efficiency. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49* (6), 1617−1622.
(39) Charman, S. A.; Andreu, A.; Barker, H.; Blundell, S.; Campbell, A.; Campbell, M.; Chen, G.; Chiu, F. C. K.; Crighton, E.; Katneni, K.; Morizzi, J.; Patil, R.; Pham, T.; Ryan, E.; Saunders, J.; Shackleford, D. M.; White, K. L.; Almond, L.; Dickins, M.; Smith, D. A.; Moehrle, J. J.; Burrows, J. N.; Abla, N. An in Vitro Toolbox to Accelerate Anti-Malarial Drug Discovery and Development. *Malar. J.* **2020**, *19* (1), 1.
(40) Ascenzi, P.; Fanali, G.; Fasano, M.; Pallottini, V.; Trezza, V. Clinical Relevance of Drug Binding to Plasma Proteins. *J. Mol. Struct.* **2014**, *1077*, 4−13.
(41) Food and Drug Administration *Center for Drug Evaluation and Research. Application Number 22-268, Coartem (artemether/lumefantrine) Tablets for Treatment of Uncomplicated Plasmodium falciparum Malaria*, 2008. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2009/022268s000_sumr.pdf (accessed Apr 16, 2025).
(42) Govender, K.; Gibhard, L.; Du Plessis, L.; Wiesner, L. Development and validation of a LC-MS/MS method for the quantitation of lumefantrine in mouse whole blood and plasma. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2015**, *985*, 6−13.
(43) Food and Drug Administration *Coartem (Artemether/Lumefantrine)—Label*, 2009. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/022268lbl.pdf (accessed Apr 16, 2025).
(44) Novartis Pharma *Fachinformation Riamet 20 mg/120 mg Tabletten*, 2023. https://www.fachinfo.de/fi/pdf/007356/riamet-20-120-mg-tabletten (accessed Apr 16, 2025).
(45) Tie, H.; Walker, B. D.; Singleton, C. B.; Valenzuela, S. M.; Bursill, J. A.; Wyse, K. R.; Breit, S. N.; Campbell, T. J. Inhibition of HERG Potassium Channels by the Antimalarial Agent Halofantrine. *Br. J. Pharmacol.* **2000**, *130* (8), 1967−1975.
(46) Traebert, M.; Dumotier, B.; Meister, L.; Hoffmann, P.; Dominguez-Estevez, M.; Suter, W. Inhibition of HERG K+ Currents by Antimalarial Drugs in Stably Transfected HEK293 Cells. *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, *484* (1), 41−48.
(47) Abdullahi, S. T.; Soyinka, J. O.; Olagunju, A.; Bolarinwa, R. A.; Olarewaju, O. J.; Bakare-Odunola, M. T.; Winterberg, M.; Tarning, J.; Owen, A.; Khoo, S. CYP2B6*6 Genotype Specific Differences in Artemether-Lumefantrine Disposition in Healthy Volunteers. *J. Clin. Pharmacol.* **2020**, *60* (3), 351−360.
(48) Lefèvre, G.; Carpenter, P.; Souppart, C.; Schmidli, H.; McClean, M.; Stypinski, D. Pharmacokinetics and Electrocardiographic Pharmacodynamics of Artemether-Lumefantrine (Riamet®) with Concomitant Administration of Ketoconazole in Healthy Subjects. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2002**, *54* (5), 485−492.
(49) Bristol-Myers Squibb Co Aryl Amines and Uses Thereof. WO 2004083174 A2, 2004.
(50) Noedl, H.; Bronnert, J.; Yingyuen, K.; Attlmayr, B.; Kollaritsch, H.; Fukuda, M. Simple Histidine-Rich Protein 2 Double-Site Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Use in Malaria Drug Sensitivity Testing. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49* (8), 3575−3577.
(51) de Carvalho, L. P.; Sandri, T. L.; José Tenório de Melo, E.; Fendel, R.; Kremsner, P. G.; Mordmüller, B.; Held, J. Ivermectin Impairs the Development of Sexual and Asexual Stages of Plasmodium Falciparum In Vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2019**, *63* (8), No. e00085.


https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5c01337
J. Med. Chem. XXXX, XXX, XXX−XXX

(52) R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, 2022.
(53) de Carvalho, L. P.; Groeger-Otero, S.; Kreidenweiss, A.; Kremsner, P. G.; Mordmüller, B.; Held, J. Boromycin Has Rapid-Onset Antibiotic Activity Against Asexual and Sexual Blood Stages of Plasmodium Falciparum. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2022**, *11*, 802294.
(54) Prabst, K.; Engelhardt, H.; Ringgeler, S.; Hubner, H.; Ates, G.; Vanhaeke, T.; Rogiers, V.; Rodrigues, R.; Chan, L. L.-Y.; McCulley, K. J.; Kessel, S. L.; Ivanov, D. P.; Grabowska, A. M.; Garnett, M. C.; Suganuma, N.; Molefe, N. I.; Inoue, N. Chapters 1−4, 8: Cell Viability Assays. In *Assay guidance manual*; National Library of Medicine, 2017; Vol. *1601*.
(55) Fidock, D. A.; Rosenthal, P. J.; Croft, S. L.; Brun, R.; Nwaka, S. Antimalarial Drug Discovery: Efficacy Models for Compound Screening. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2004**, *3* (6), 509−520.
(56) Charman, S. A.; Arbe-Barnes, S.; Bathurst, I. C.; Brun, R.; Campbell, M.; Charman, W. N.; Chiu, F. C. K.; Chollet, J.; Craft, J. C.; Creek, D. J.; Dong, Y.; Matile, H.; Maurer, M.; Morizzi, J.; Nguyen, T.; Papastogiannidis, P.; Scheurer, C.; Shackleford, D. M.; Sriraghavan, K.; Stingelin, L.; Tang, Y.; Urwyler, H.; Wang, X.; White, K. L.; Wittlin, S.; Zhou, L.; Vennerstrom, J. L. Synthetic Ozonide Drug Candidate OZ439 Offers New Hope for a Single-Dose Cure of Uncomplicated Malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2011**, *108* (11), 4400−4405.
(57) de Carvalho, L. P.; Niepoth, E.; Mavraj-Husejni, A.; Kreidenweiss, A.; Herrmann, J.; Müller, R.; Knaab, T.; Burckhardt, B. B.; Kurz, T.; Held, J. Quantification of Plasmodium Falciparum HRP-2 as an Alternative Method to [3H]Hypoxanthine Incorporation to Measure the Parasite Reduction Ratio in Vitro. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2023**, *62* (3), 106894.
(58) Fujimaki, M.; Murakoshi, Y.; Hakusui, H. Assay and Disposition of Carvedilol Enantiomers in Humans and Monkeys: Evidence of Stereoselective Presystemic Metabolism. *J. Pharm. Sci.* **1990**, *79* (7), 568−572.
(59) Uchimura, T.; Kato, M.; Saito, T.; Kinoshita, H. Prediction of Human Blood-to-plasma Drug Concentration Ratio. *Biopharm. Drug Dispos.* **2010**, *31* (5−6), 286−297.
(60) Gangnus, T.; Burckhardt, B. B. Low-volume LC−MS/MS Method for the Pharmacokinetic Investigation of Carvedilol, Enalapril and Their Metabolites in Whole Blood and Plasma: Application to a Paediatric Clinical Trial. *Drug Test. Anal.* **2021**, *13* (3), 694−708.
(61) Di, L.; Kerns, E. H.; Li, S. Q.; Petusky, S. L. High Throughput Microsomal Stability Assay for Insoluble Compounds. *Int. J. Pharm.* **2006**, *317* (1), 54−60.
(62) Riley, R. J.; McGinnity, D. F.; Austin, R. P. A unified model for predicting human hepatic, metabolic clearance from in vitro intrinsic clearance data in hepatocytes and microsomes. *Drug Metab. Dispos.* **2005**, *33* (9), 1304−1311.
(63) Ryu, S.; Tess, D.; Di, L. Addressing the Accuracy of Plasma Protein Binding Measurement for Highly Bound Compounds Using the Dilution Method. *AAPS J.* **2023**, *25* (1), 7.






https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5c01337
J. Med. Chem. XXXX, XXX, XXX−XXX

# Supporting Information

# Structure-Activity Relationships of 3-Hydroxypropanamidines (HPAs) with Potent *in vivo* Antimalarial Activity

*Saskia Klein*[×¶], *Alena Moritz*[‡¶], *Lais Pessanha de Carvalho*[⊥†¶], *Tanja C. Knaab*[§∇], *Beate Lungerich*[×], *Lukas Meyer*[×], *Jona Sandström*[×], *Jessica L. Thibaud*[∥], *Katherine A. de Villiers*[∥], *David A. Fidock*[†], *Sergio Wittlin*[#°], *Matthias Rottmann*[#°], *Jana Held*[ab⊥*], *Bjoern B. Burckhardt*[‡*], *and Thomas Kurz*[×*].

[×]Heinrich Heine University Düsseldorf, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Institute of Pharmaceutical and Medicinal Chemistry, 40225 Düsseldorf, Germany

[‡]Individualized Pharmacotherapy, Institute of Pharmaceutical and Medicinal Chemistry, University of Muenster, 48149 Muenster, Germany

[⊥]Institute of Tropical Medicine, Eberhard Karls University Tuebingen, 72074 Tuebingen, Germany

[†]Department of Microbiology and Immunology and Center for Malaria Therapeutics and Antimalarial Resistance, Division of Infectious Diseases, Department of Medicine, Columbia University Irving Medical Center, New York, New York 10032, United States

[II]Department of Chemistry and Polymer Science, Stellenbosch University,

Matieland 7602, South Africa

[∞] Swiss Tropical and Public Health Institute,

Allschwil CH-4123, Switzerland

[†]University of Basel,

Basel CH-4003, Switzerland

a) German Center for Infection Research (DZIF), Partner Site Tübingen,

72074 Tübingen, Germany

b) Centre de Recherches Médicales de Lambaréné,

B.P 242, Lambaréné, Gabon.

¶S.K., A.M., and L.P.d.C. contributed equally to this work.

*Corresponding authors, Email: Thomas.kurz@hhu.de, burckhardt@uni-muenster.de,

Jana.held@uni-tuebingen.de

[#]Name changed from Tanja C. Knaab to Tanja C. Mahnecke.

**CONTENT OF SI**

1. Procedures for the synthesis of compounds **2a-f** and **3a-f**
2. Determination of the chemical stability of **7a** and **7d**
3. HPLC purity testing of final compounds **4a-f** and **7a-v**
4. $^{1}H$- and $^{13}C$-Spectra of final compounds **4a-f** and **7a-v**
5. *In vitro* parasite reduction ratio (PRR)
6. Initial mechanism of action studies
7. *In vivo* antiplasmodial activity

1. **Procedures for the synthesis of compounds 2a-f and 3a-f**

**General Procedure SI1 for the Synthesis of Aldehydes (2a, c-f).**[1,2]

Under nitrogen atmosphere, the respective compound (**1a, c-f**, 1.0 equiv) was dissolved in 1,4-dioxane (7.6 mL/mmol) at room temperature (RT) and selenium dioxide (1.8 equiv) was added. The reaction mixture was stirred at 110 °C for 6 h. After filtration over Celite®, the solvent was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in ethyl acetate (50 mL) and washed with sat. sodium chloride solution (3x 30 mL). The organic phase was dried over anhydrous $Na_2SO_4$, filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude product was then purified by flash chromatography (cyclohexane/ethyl acetate).[1]

1,7-Phenanthroline-6-carbaldehyde **2a**

**2a** was synthesized according to the general procedure SI1, with the exception that the reaction mixture was stirred at 110 °C for 4 h.[3]

Off-white solid, yield: 87%. mp: 175.8 °C, $^1$H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 11.44 (s, 1H), 9.56 (d, $J$ = 8.3 Hz, 1H), 9.14 – 9.07 (m, 2H), 8.56 (s, 1H), 8.37 (d, $J$ = 8.0 Hz, 1H), 7.71 (dd, $J$ = 8.2, 4.3 Hz, 1H), 7.63 (dd, $J$ = 7.9, 4.3 Hz, 1H). HPLC (Method 1): $t_R$ = 5.1 min, AUC = 100.0 %.

Benzo[h]quinoline-4-carbaldehyde **2b**

**2b** was synthesized according to literature procedures.[4,5,6]

Yellow solid, yield: 70 %. mp: 35 °C, 1H-NMR (600 MHz, DMSO-d6) δ 10.67 (s, 1H), 9.33 (d, $J$ = 4.4 Hz, 1H), 9.25-9.22 (m, 1H), 8.87 (d, $J$ = 9.2 Hz, 1H), 8.17-8.14 (m, 2H), 7.85-7.79 (m, 3H). HPLC (Method 1): $t_R$ = 9.5 min, AUC = 92.7 %.

Phenanthridine-6-carbaldehyde **2c**

**2c** was synthesized according to the general procedure SI1, with the exception that water (1 mL/mmol) was added at the beginning of the reaction and the mixture was stirred at 110 °C for 5 h.[2] Yellow solid, yield: 63%. mp: 137.9 °C, $^{1}$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 10.42 (s, 1H), 9.42 (ddd, *J* = 8.3, 1.4, 0.7 Hz, 1H), 8.78 – 8.50 (m, 2H), 8.46 – 8.24 (m, 1H), 7.91 (ddd, *J* = 8.4, 7.1, 1.4 Hz, 1H), 7.87 – 7.81 (m, 2H), 7.80 – 7.75 (m, 1H). HPLC (Method 1): $t_R$ = 7.7 min, AUC = 100.0 %.

8-Bromophenanthridine-6-carbaldehyde **2d**

**2d** was synthesized according to the general procedure SI1, with the exception that water (1 mL/mmol) was added at the start of the reaction, resulting in a dioxane/water solvent system. White solid, yield: 61%. mp: 151.6 °C, $^{1}$H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 10.35 (s, 1H), 9.59 (s, 1H), 8.55 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.50 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 8.32 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.97 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.84 (p, *J* = 7.0 Hz, 2H). $^{13}$C NMR (151 MHz, $CDCl_3$): δ 195.32, 149.06, 143.41, 134.64, 132.22, 131.64, 130.54, 129.75, 129.54, 125.26, 124.68, 123.79, 123.44, 122.24. HPLC (Method 1): $t_R$ = 16.3 min, AUC = 99.8 %.

8-Chlorophenanthridine-6-carbaldehyde **2e**

**2e** was synthesized according to the general procedure SI1, with the exception that the reaction mixture was stirred at 110 °C for 20 h.

Yellow solid, yield: 72%. mp: 148.7 °C, $^{1}$H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 10.35 (s, 1H), 9.42 (s, 1H), 8.58 – 8.51 (m, 2H), 8.31 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.86 – 7.80 (m, 3H). $^{13}$C NMR (151 MHz, CDCl3): δ 195.34, 149.14, 143.41, 135.21, 131.97, 131.90, 131.60, 130.52, 129.66, 126.33, 125.20, 124.34, 123.68, 122.27. HPLC (Method 1): $t_R$ = 15.3 min, AUC = 99.9 %.

3,8-Difluorophenanthridine-6-carbaldehyde **2f**

**2f** was synthesized according to the general procedure SI1, with the exception that water (1.7 mL/mmol) and tert-butyl hydroperoxide (10 mol%) were added at the start of the reaction.[4] Yellow solid, yield: 72%. mp: 172.0 °C, $^{1}$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 10.36 (s, 1H), 9.13 (dd, *J* = 10.3, 2.7 Hz, 1H), 8.59 (ddd, *J* = 14.9, 9.2, 5.4 Hz, 2H), 7.98 (dd, *J* = 9.2, 2.7 Hz, 1H), 7.64 (dddd, *J* = 22.5, 9.1, 7.9, 2.7 Hz, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 195.27, 150.43, 130.36, 124.68 – 123.87 (m), 121.25 (d, *J* = 24.6 Hz), 119.74 (d, *J* = 24.2 Hz), 115.74 (d, *J* = 20.6 Hz), 111.94 (d, *J* = 23.7 Hz). HPLC (Method 1): $t_R$ = 14.7 min, AUC = 95.3 %.

**General Procedure SI2 for the Synthesis of 3-Hydroxypropanenitriles (3a-e).**

In a two-necked flask n-butyllithium (1.3 equiv., 1.6 M in n-hexane) was diluted in anhydrous THF (5 mL/mmol) at -78 °C under inert gas atmosphere. Subsequently anhydrous acetonitrile (1.3 equiv.) dissolved in anhyd. THF (1 mL/mmol) was added dropwise over a period of 5 minutes to the solution. The reaction mixture was stirred at -78 °C for one hour forming a white suspension. Next, the corresponding aldehyde **2a-f** (1.0 equiv.), dissolved in anhydrous THF (1 mL/mmol), was slowly added to the suspension. After warming to RT while stirring for 30 minutes the resulting solution was poured into an ice-water mixture containing 10 % HCl. The organic phase was separated and the aqueous phase was extracted with diethylether (5 x 50 mL). The combined organic phases were washed with a saturated sodium chloride solution (3 x 50 mL), dried over anhydrous $Na_2SO_4$, filtered, and concentrated under reduced pressure. Purification of the remaining residue by flash chromatography on silica gel using cyclohexane/AcOEt (0 to 100%) yielded **3a-e**.

3-Hydroxy-3-(1,7-phenanthrolin-6-yl)propanenitrile **3a**

**3a** was synthesized according to the general procedure SI2.

White solid, yield: 72%. mp: 206.6 °C, $^1$H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 9.71 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 9.06 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H), 8.99 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H), 8.31 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.75 (dd, *J* = 8.2, 4.4 Hz, 1H), 7.66 (dd, *J* = 7.9, 4.4 Hz, 1H), 5.57 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H), 3.26 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H). $^{13}$C NMR (151 MHz, $CDCl_3$): δ 150.04, 149.69, 147.44, 136.94, 134.62, 127.89, 125.75, 123.29, 122.58, 117.74, 115.27, 71.81, 27.53. HPLC (Method 1): $t_R$ = 6.6 min, AUC = 100.0 %.

3-(Benzo[h]quinolin-4-yl)-3-hydroxypropanenitrile **3b**

**3b** was synthesized according to the general procedure SI2.

White solid, yield: 65%. mp: 119 °C, $^1$H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 9.30–9.24 (m, 1H), 8.94 (d, *J* = 4.7 Hz, 1H), 7.90 (dd, *J* = 7.5, 1.7 Hz, 1H), 7.81 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.77–7.71 (m, 2H), 7.70–7.65 (m, 2H), 5.76 (dd, *J* = 7.8, 4.2 Hz, 1H), 2.96 (dd, *J* = 16.9, 4.2 Hz, 1H), 2.83 (dd, *J* = 17.0, 7.8 Hz, 1H). $^{13}$C NMR (151 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 148.87, 146.51, 145.72, 133.01, 131.64, 128.80, 128.70, 127.85, 127.71, 124.77, 122.38, 118.91, 118.09, 116.82, 66.07, 27.13. HPLC (Method 1): $t_R$ = 6.9 min, AUC = 98.1 %.

3-Hydroxy-3-(phenanthridin-6-yl)propanenitrile **3c**

**3c** was synthesized according to the general procedure SI2.

White solid, yield: 76%. mp: 159.7 °C, $^1$H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 8.73 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.61 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.21 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.06 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.93 (dt, *J* = 16.7, 8.0 Hz, 1H), 7.79 (q, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.74 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 5.85 – 5.80 (m, 1H), 3.16 (dd, *J* = 16.8, 4.0 Hz, 1H), 2.89 (dd, *J* = 16.8, 6.3 Hz, 1H). $^{13}$C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ 156.82, 141.98, 133.86, 131.61, 129.93, 129.46, 128.06 (d, *J* = 10.9 Hz), 125.96, 124.57, 124.31, 123.41, 122.66, 122.34, 116.94, 65.69, 63.96. HPLC (Method 1): $t_R$ = 8.5 min, AUC = 95.8 %.

3-(8-Bromophenanthridin-6-yl)-3-hydroxypropanenitrile **3d**

**3a** was synthesized according to the general procedure SI2.

Yellow solid, yield: 40%. mp: 161.7 °C, $^{1}$H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 8.56 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 8.53 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.19 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.16 (s, 1H), 7.99 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.80 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.74 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 5.73 (t, *J* = 4.8 Hz, 1H), 5.59 (s, 1H), 3.17 (dd, *J* = 16.8, 4.1 Hz, 1H), 2.91 (dd, *J* = 16.8, 6.0 Hz, 1H). $^{13}$C NMR (151 MHz, $CDCl_3$): δ 155.67, 141.93, 134.79, 132.46, 130.12, 129.85, 128.46, 126.90, 125.15, 124.01 (d, *J* = 3.6 Hz), 122.23, 122.14, 116.71, 65.67, 27.63. HPLC (Method 1): $t_R$ = 12.4 min, AUC = 99.6 %.

3-(8-Chlorophenanthridin-6-yl)-3-hydroxypropanenitrile **3e**

**3e** was synthesized according to the general procedure SI2.

Off-white solid, yield: 34%. mp: 157.1°C, $^{1}$H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 8.64 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 8.53 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.20 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.86 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.80 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.74 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 5.73 (s, 1H), 5.60 (s, 1H), 3.17 (dd, *J* = 16.8, 4.3 Hz, 1H), 2.91 (dd, *J* = 16.8, 6.0 Hz, 1H). $^{13}$C NMR (151 MHz, $CDCl_3$): δ 155.77, 141.96, 134.20, 132.17, 132.15, 130.11, 129.77, 128.46, 125.10, 123.98, 123.72, 123.65, 122.19, 116.70, 65.69, 27.61. HPLC (Method 1): $t_R$ = 12.7 min, AUC = 95.2 %.

3-(3,8-Difluorophenanthridin-6-yl)-3-hydroxypropanenitrile **3f**

Procedure for the synthesis **3f:** Under an argon atmosphere, the aldehyde **2f** (1.0 equiv.) was dissolved in *N,N'*-dimethylformamide (5 mL/mmol) at RT. The reaction was cooled to 0 °C before 1,3-Bi(2,6-diisopropylphenyl)imidazol-2-ylidene (5 mol%) was added dropwise. The temperature was then allowed to rise to RT, and the reaction mixture was stirred for 30 hours. After this period, HCl (5 equiv., 3 M in

methanol) was added, and the reaction was stirred for an additional 30 minutes. The organic phase was separated and the aqueous phase was extracted with AcOEt (3 x 50 mL). The combined organic phases were washed with a saturated sodium chloride solution (3 x 50 mL), dried over anhydrous $Na_2SO_4$, filtered, and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography on silica gel using cyclohexane/AcOEt (0 to 100%) yielded **3f**.[7]

Yellow solid, yield: 56%. mp: 167.1 °C, $^1$H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 8.65 (dd, $J$ = 8.9, 5.1 Hz, 1H), 8.55 – 8.48 (m, 1H), 7.87 (d, $J$ = 9.2 Hz, 1H), 7.70 (t, $J$ = 7.0 Hz, 2H), 7.50 (t, $J$ = 8.5 Hz, 1H), 5.72 (t, $J$ = 5.0 Hz, 1H), 3.23 – 3.10 (m, 1H), 2.94 (dd, $J$ = 16.8, 5.6 Hz, 1H). $^{13}$C NMR (151 MHz, $CDCl_3$): δ 163.76, 162.34, 162.10, 160.68, 157.61 (d, $J$ = 4.4 Hz), 142.85 (d, $J$ = 11.4 Hz), 130.40, 125.86 (d, $J$ = 8.5 Hz), 124.15 (d, $J$ = 9.5 Hz), 123.46 (d, $J$ = 7.6 Hz), 121.55, 121.39, 120.92, 117.80, 117.64, 116.54, 114.65, 114.51, 109.50, 109.36, 65.90, 27.40. HPLC (Method 1): $t_R$ = 11.7 min, AUC = 100.0 %.

## 2. Determination of the chemical stability of 7a and 7d

**7a** or **7d** were solubilized in a solution consisting of Tween20/ethanol (7/3 v/v) and diluted with phosphate buffer, pH 7.4 to get a final concentration of 1 mg/mL. Stability was monitored at RT over 24 h via HPLC (Method 1).

The stability of **7a** and **7d** in an aqueous solution (phosphate buffer, pH 7.4) was determined at RT to guarantee sufficient chemical stability during *in vitro* and *in vivo* studies. Over a 24-hour period, **7a** retained 89% of its initial concentration ($n$ = 3), while **7d** maintained 81% ($n$ = 3), indicating moderate stability under these conditions. Although both compounds exhibited partial degradation, their stability remained sufficient for short-term biological experiments (see SI for details).

**3. HPLC purity testing of final compounds 4a-f and 7a-v**

***Instrument***: Knauer HPLC system in combination with a Knauer UV Detector K-2600. *Column*: Vertex Plus (150 x 4 mm with pre column, Eurosphere II 100-5 C18). *Mobile phase* 1: linear gradient (90-0%) of water with 0.1% trifluoroacetic acid. *Mobile phase* 2: linear gradient (10-100%) of acetonitrile with 0.1% of trifluoroacetic acid. *Run time*: 20 min, followed by an isocratic elution with 100% acetonitrile for 10 min. *Flow rate*: 1 mL/min. *Detection*: 254 nm. HPLC: $t_R$ = 12.6 min, AUC = 98.1%, Purity is > 95 %. LC-(ESI)MS: Instrument: UHR-QTOF maXis 4G (Bruker Daltonics), Source Type: ESI, Ion Polarity: Positive, Set Nebulizer: 2.0 Bar, Set Capillary: 4000 V, Set Dry Heater: 225 °C, Set Dry Gas; 9.0 l/min, Scan begin: 50 m/z, Scan end: 1500 m/z.

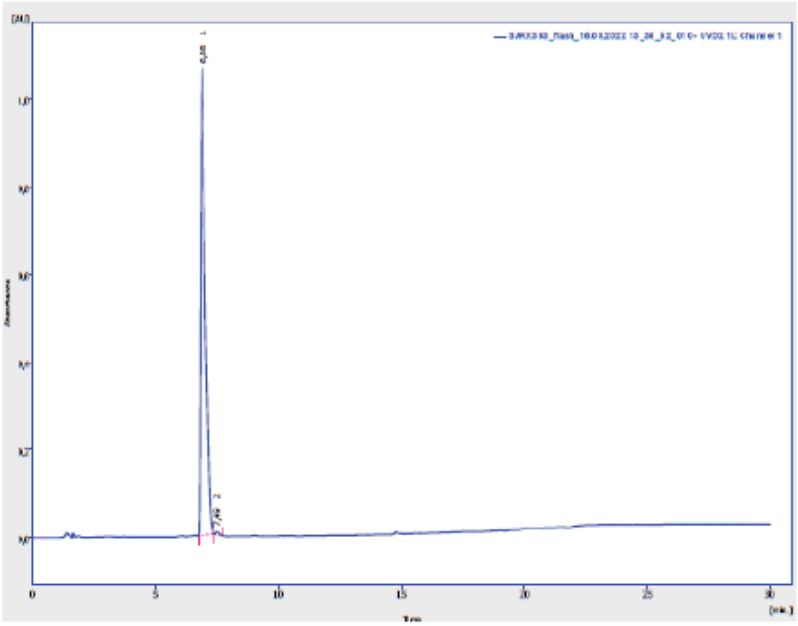



Figure S1. HPLC chromatogram of the purity analysis of **4a**.

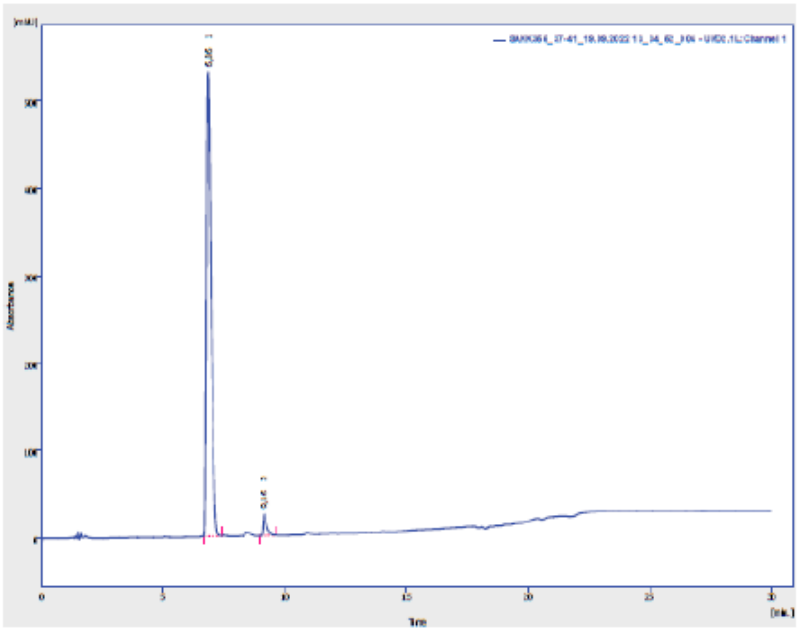


Figure S2. HPLC chromatogram of the purity analysis of **4b**.

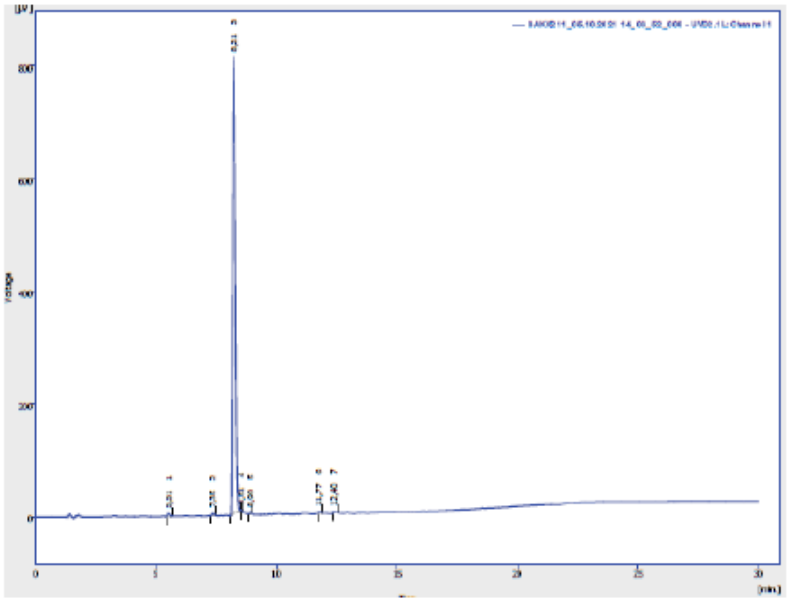


Figure S3. HPLC chromatogram of the purity analysis of **4c**.

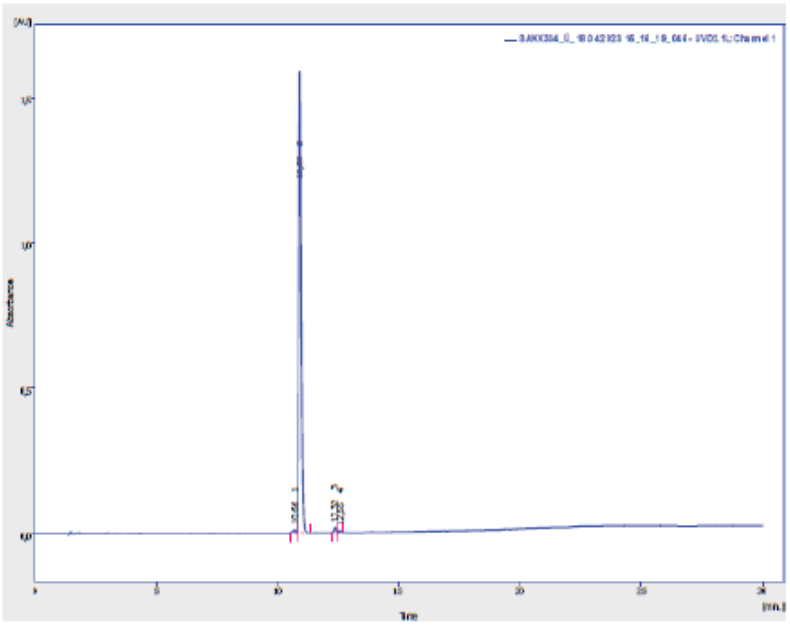


Figure S4. HPLC chromatogram of the purity analysis of **4d**.

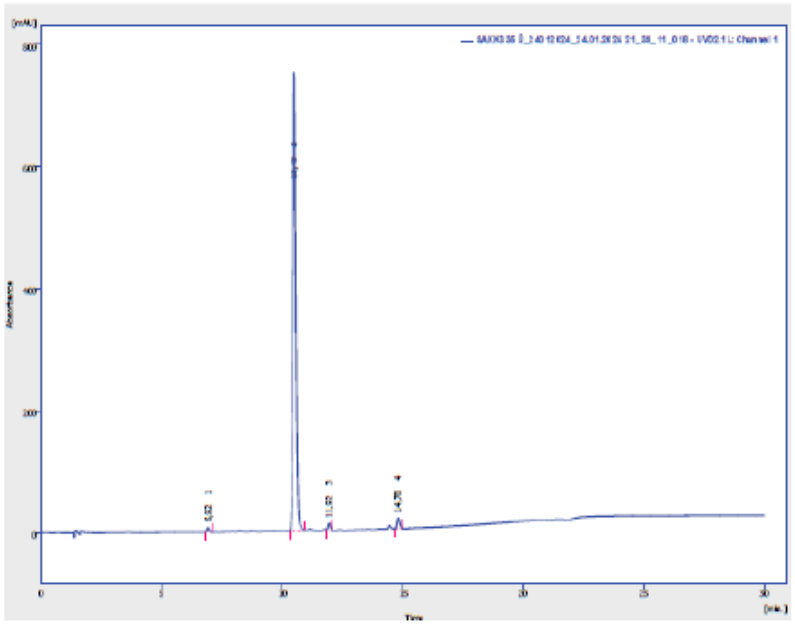


Figure S5. HPLC chromatogram of the purity analysis of **4e**.

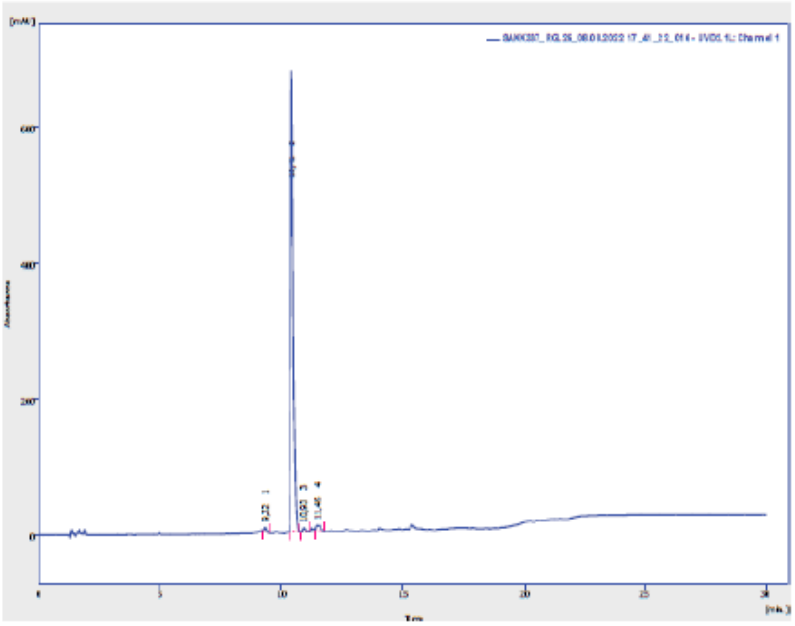


Figure S6. HPLC chromatogram of the purity analysis of **4f**.

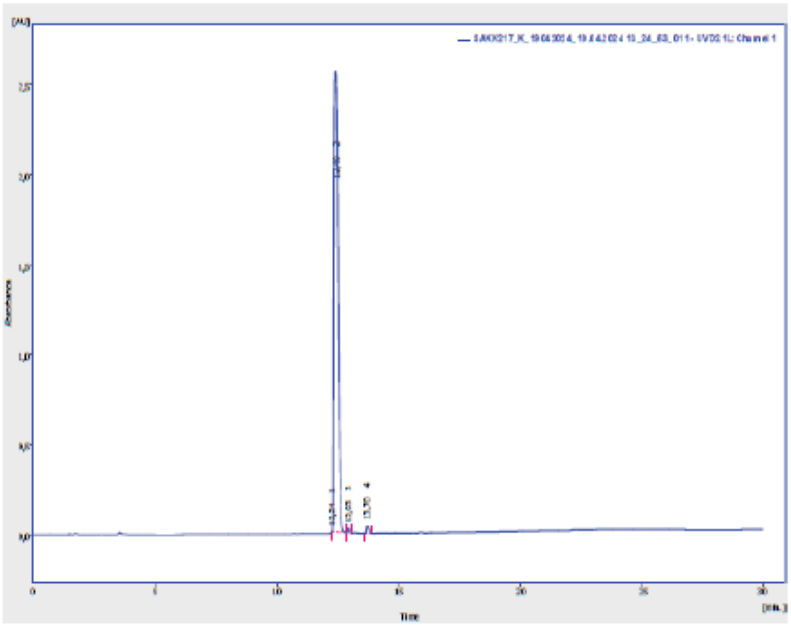


Figure S7. HPLC chromatogram of the purity analysis of **7a**.

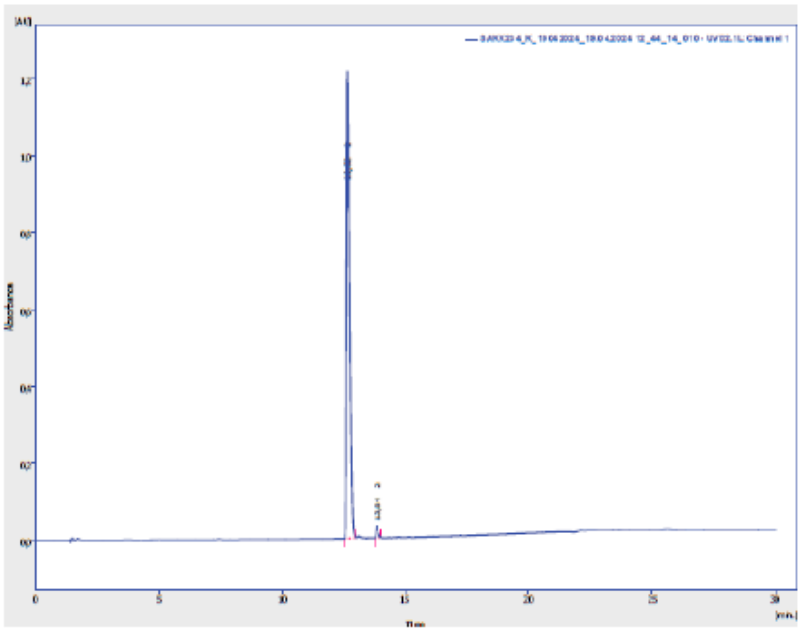


Figure S8. HPLC chromatogram of the purity analysis of **7b**.

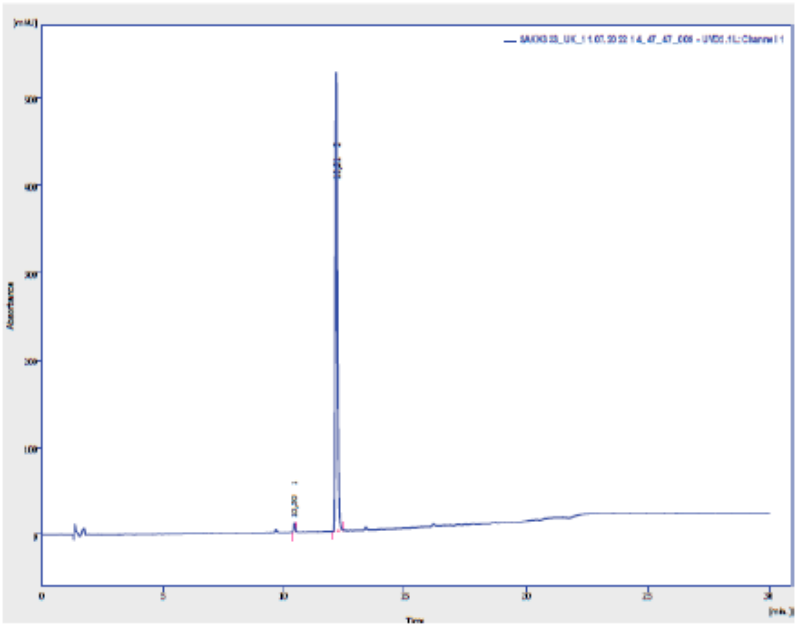


Figure S9. HPLC chromatogram of the purity analysis of **7c**.

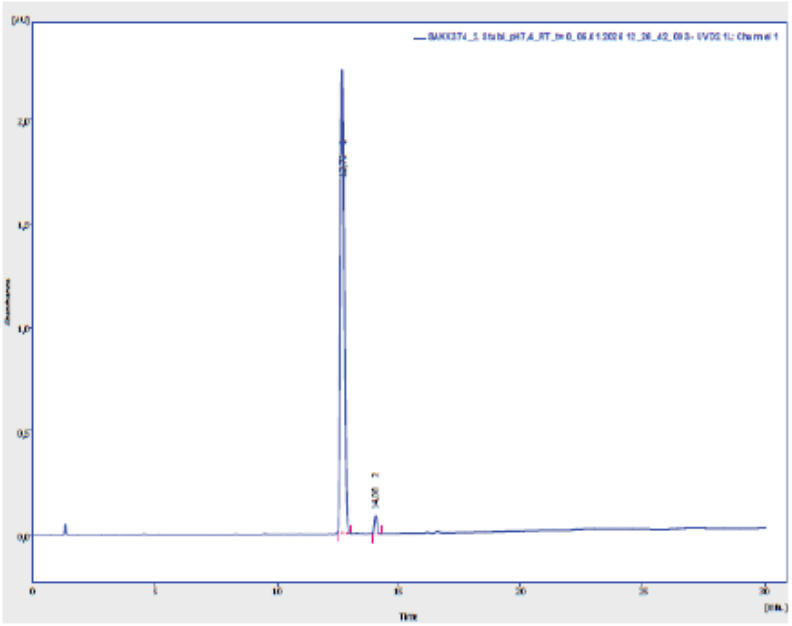


Figure S10. HPLC chromatogram of the purity analysis of **7d**.

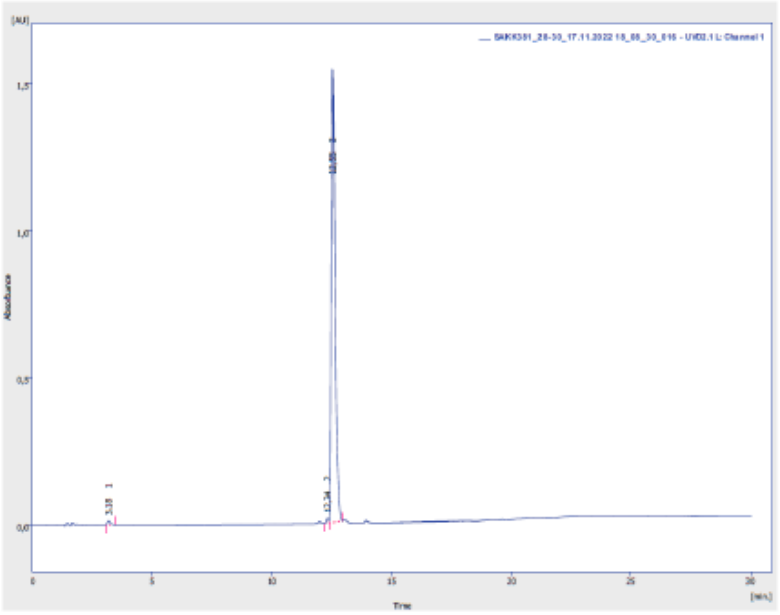


Figure S11. HPLC chromatogram of the purity analysis of **7e**.

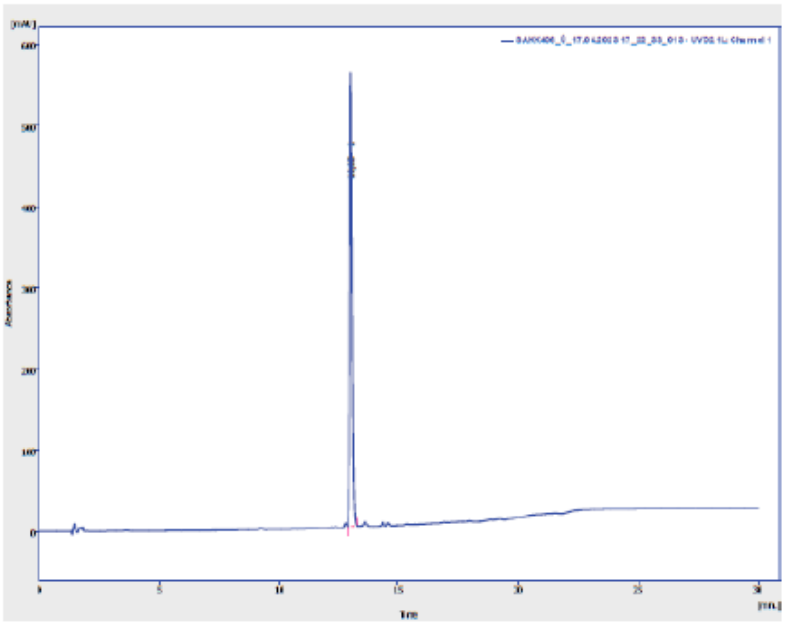


Figure S12. HPLC chromatogram of the purity analysis of **7f**.

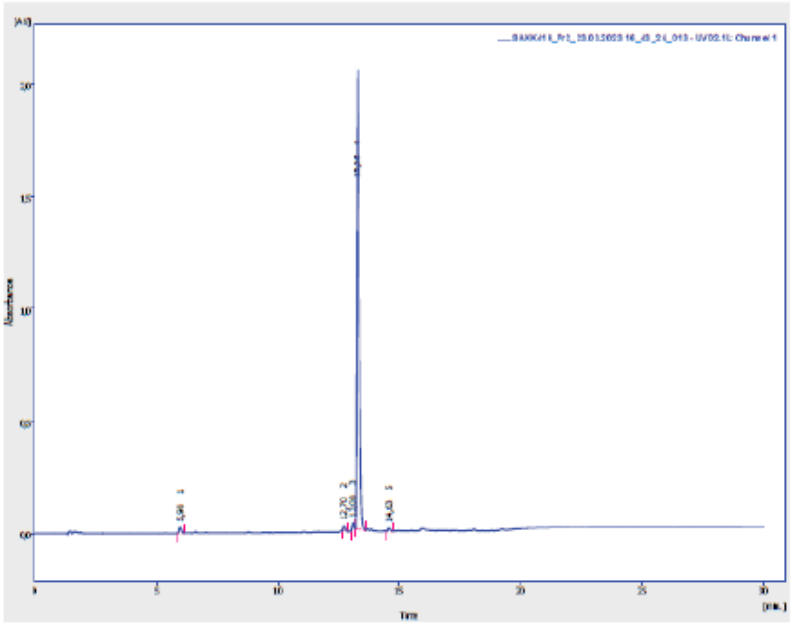


Figure S13. HPLC chromatogram of the purity analysis of **7g**.

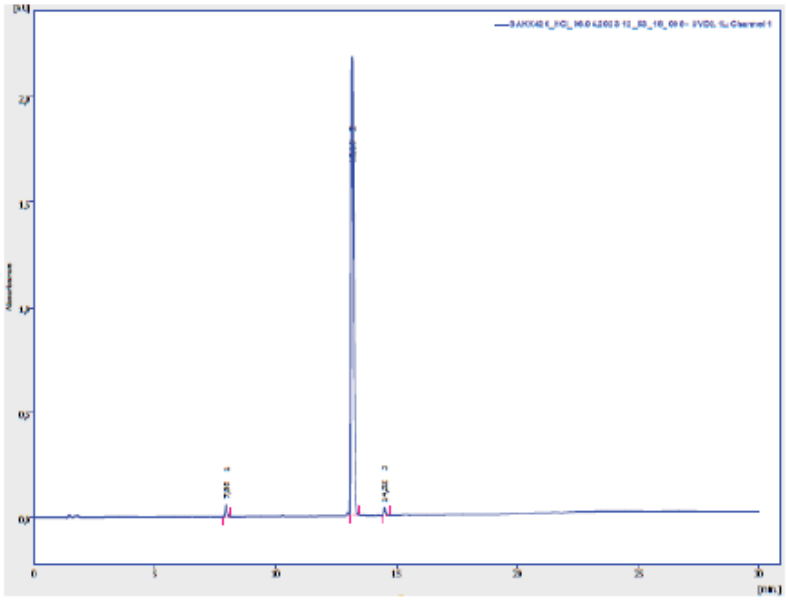


Figure S14. HPLC chromatogram of the purity analysis of **7h**.

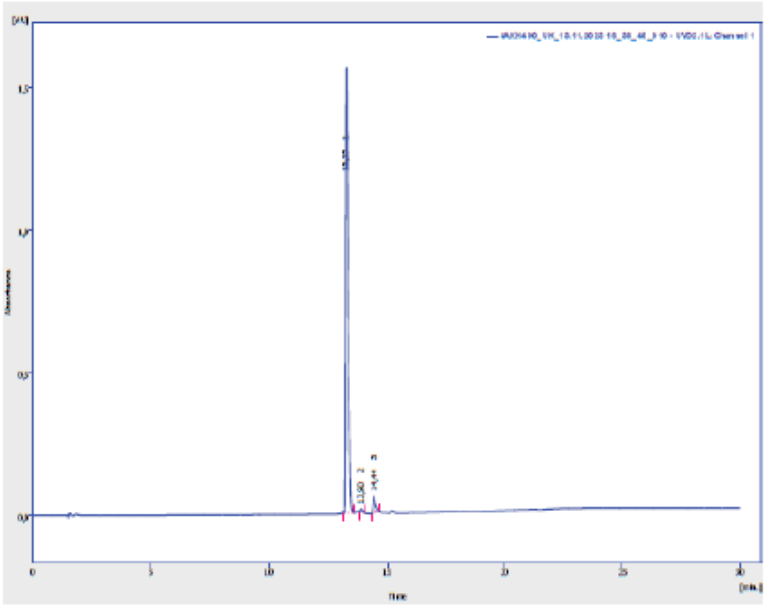


Figure S15. HPLC chromatogram of the purity analysis of **7i**.

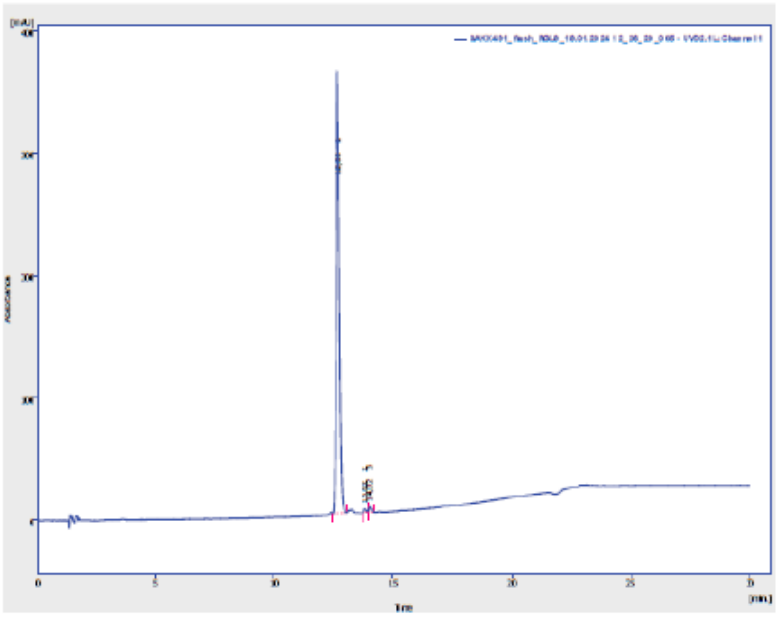


Figure S16. HPLC chromatogram of the purity analysis of **7j**.

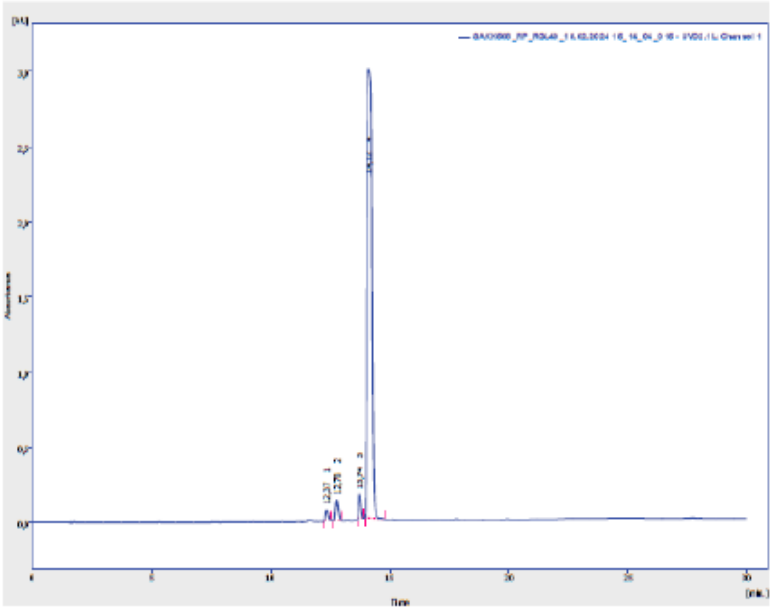


Figure S17. HPLC chromatogram of the purity analysis of **7k**.

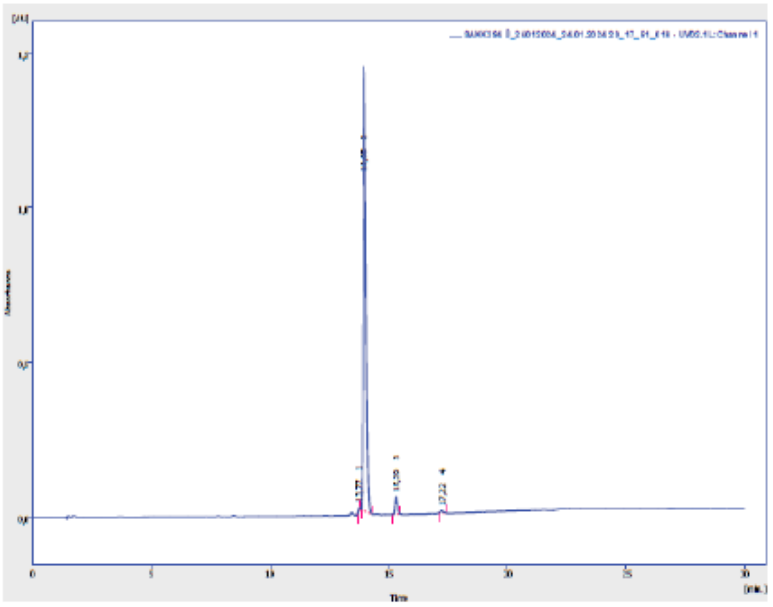


Figure S18. HPLC chromatogram of the purity analysis of **7l**.

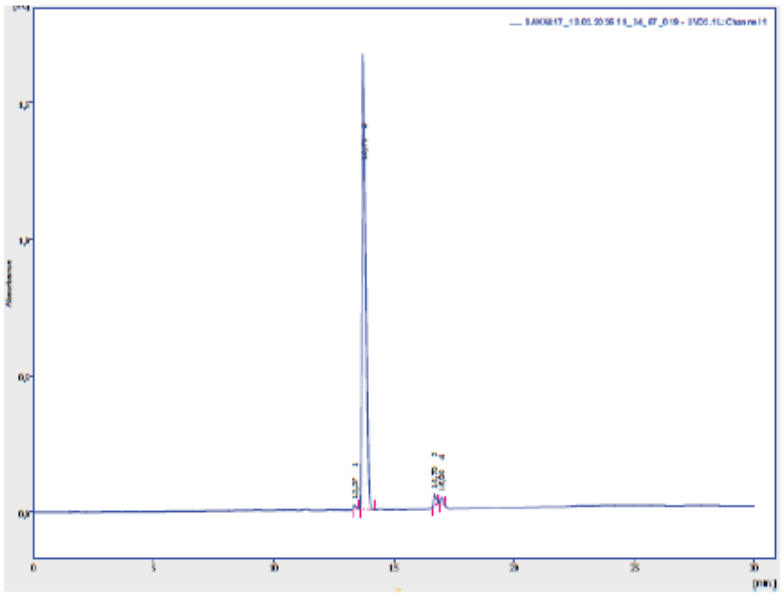


Figure S19. HPLC chromatogram of the purity analysis of **7m**.

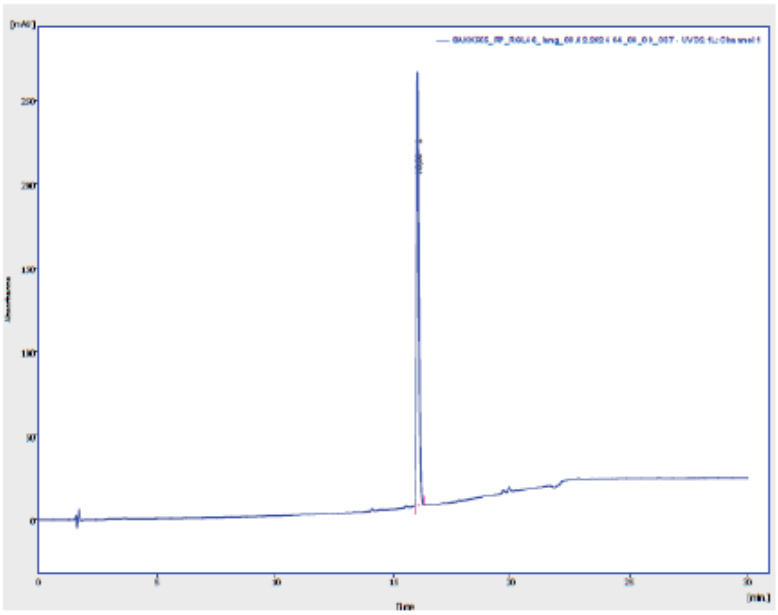


Figure S20. HPLC chromatogram of the purity analysis of **7n**.

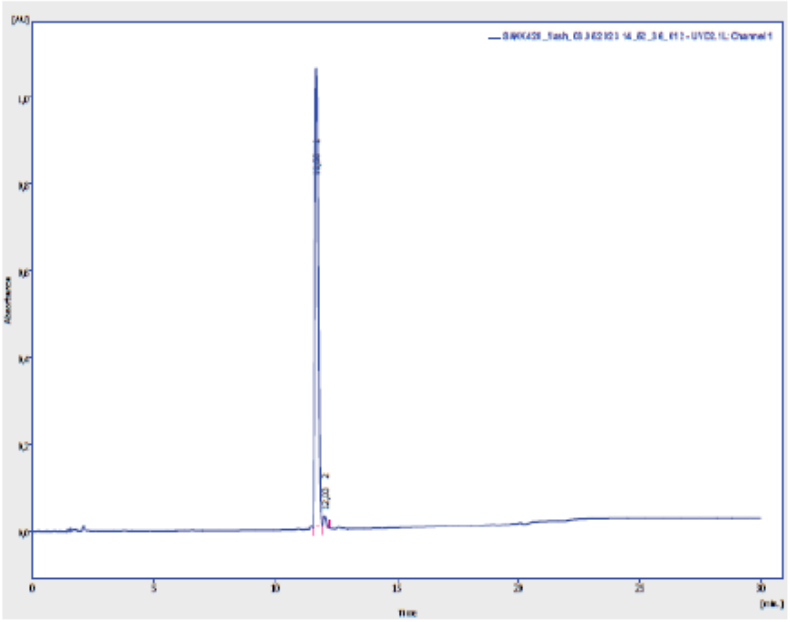


Figure S21. HPLC chromatogram of the purity analysis of **7o**.

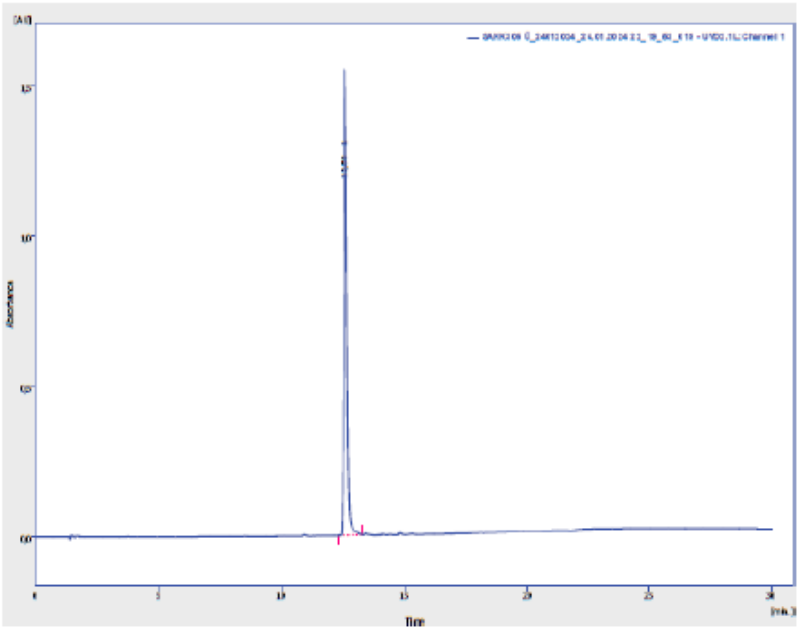


Figure S22. HPLC chromatogram of the purity analysis of **7p**.

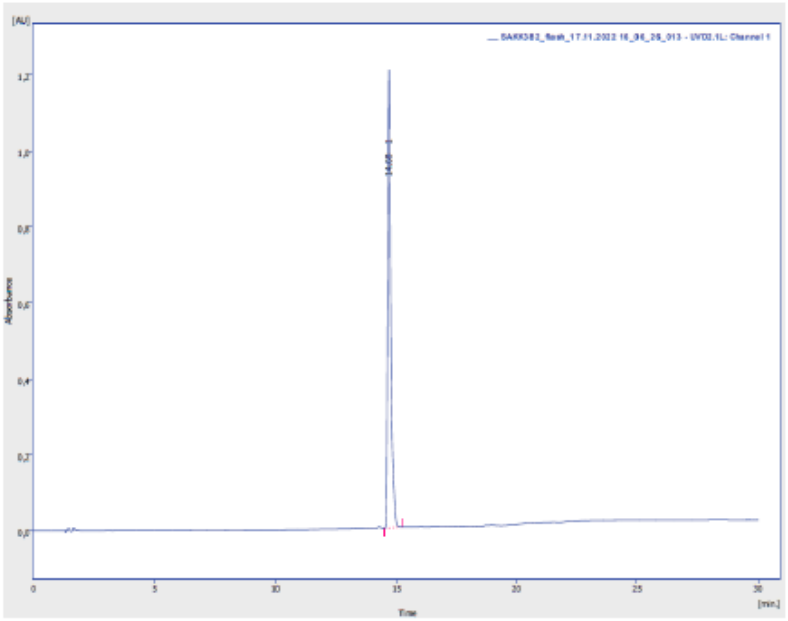


Figure S23. HPLC chromatogram of the purity analysis of **7q**.

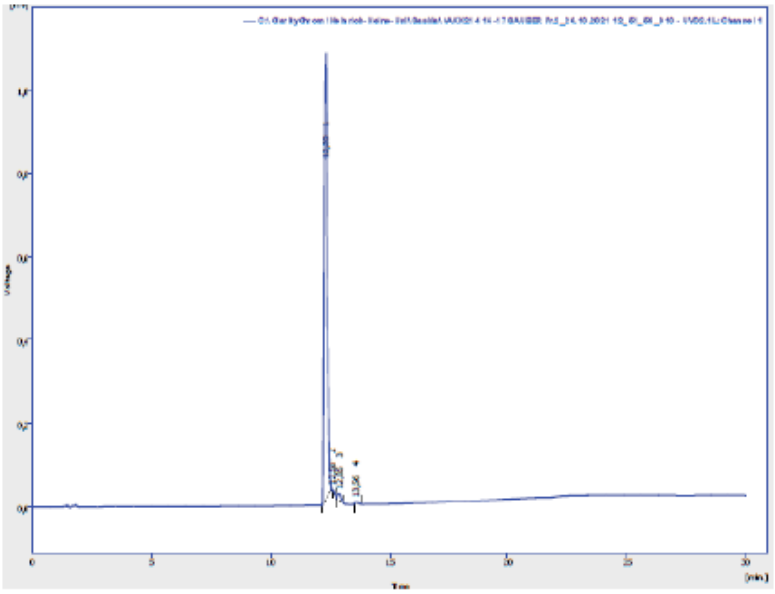


Figure S24. HPLC chromatogram of the purity analysis of **7r**.

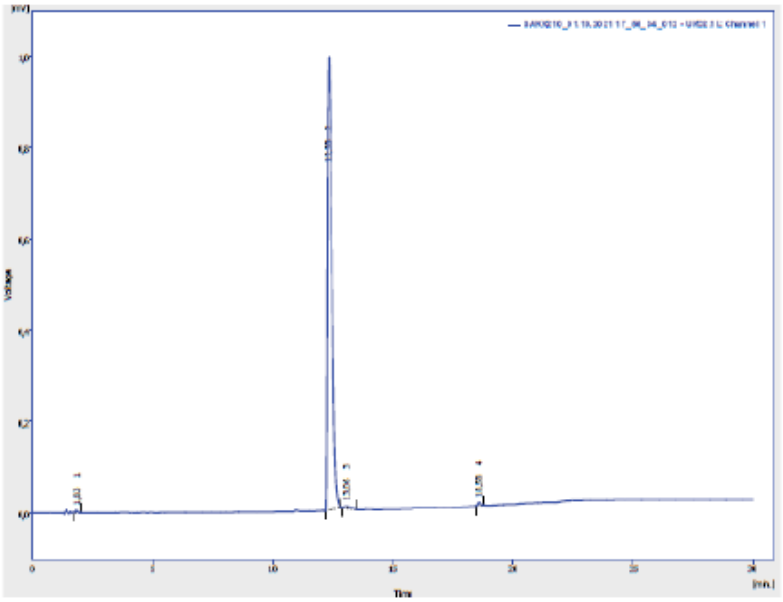


Figure S25. HPLC chromatogram of the purity analysis of 7s.

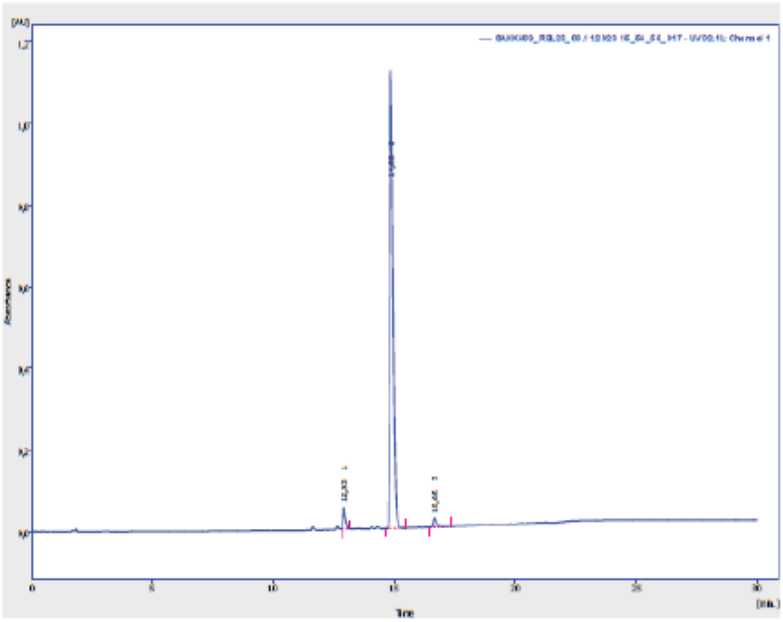


Figure S26. HPLC chromatogram of the purity analysis of 7t.

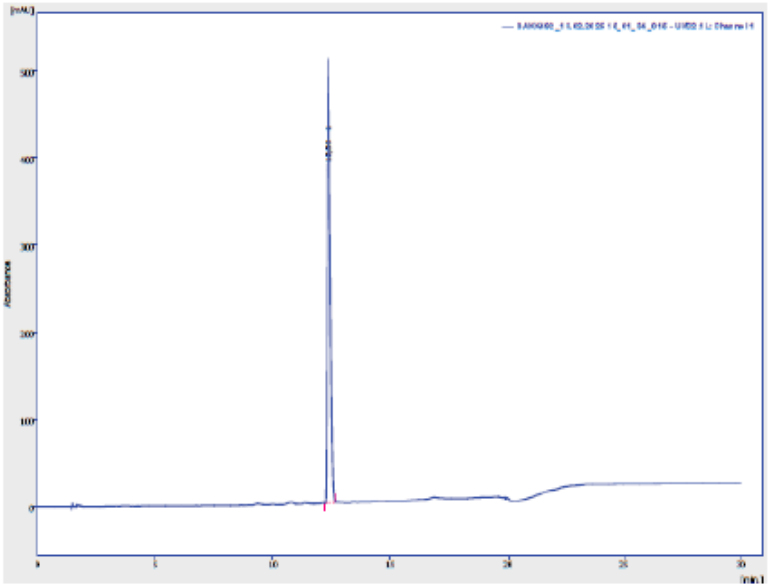


Figure S27. HPLC chromatogram of the purity analysis of **7u**.

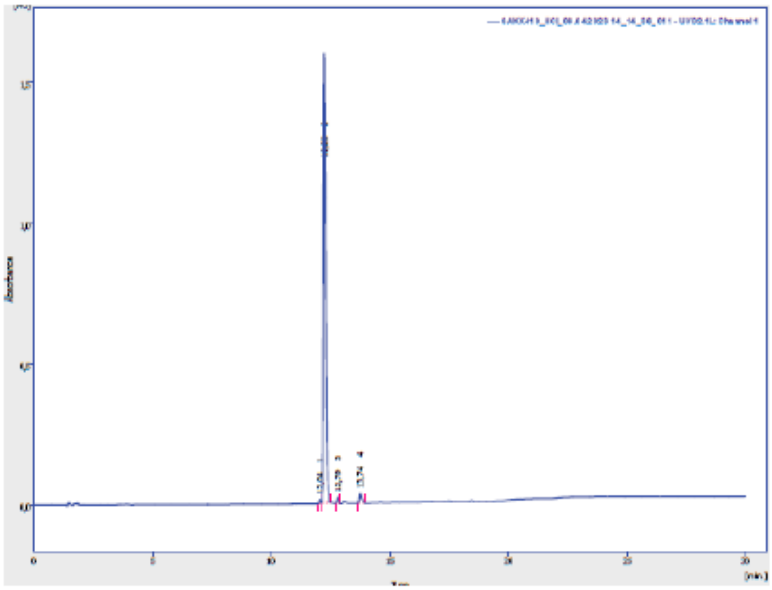
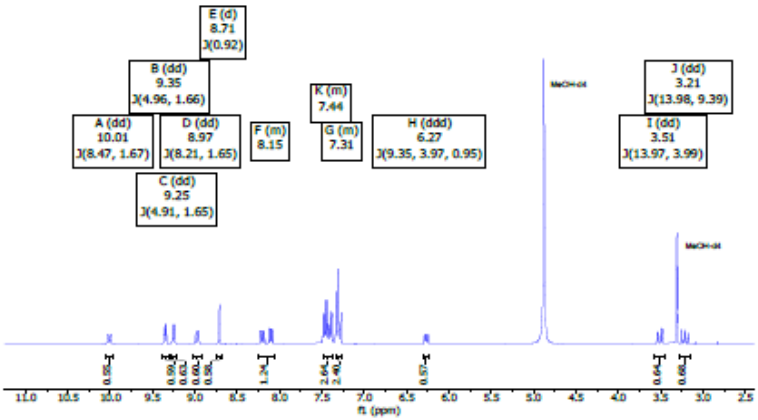


Figure S28. HPLC chromatogram of the purity analysis of **7v**.

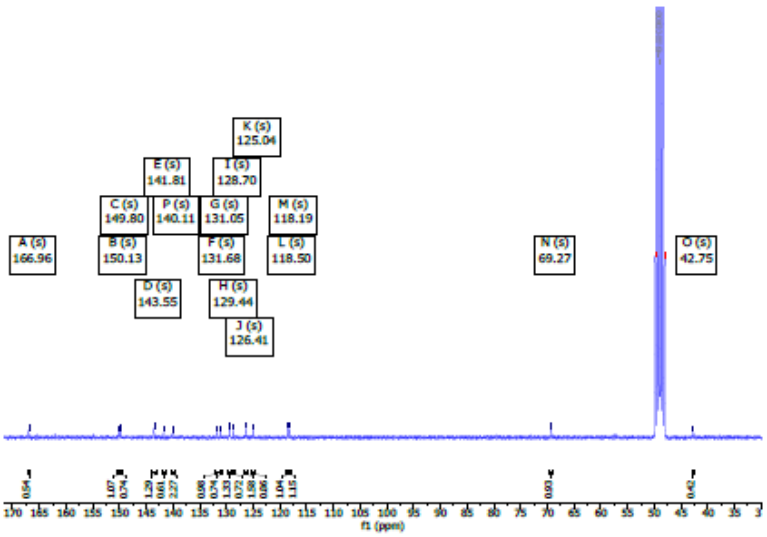
## 4. $^{1}$H- and $^{13}$C-Spectra of final compounds 4a-f and 7a-v

$^{1}$H- and $^{13}$C-NMR spectra of *N*-(4-fluorophenyl)-3-hydroxy-3-(1,7-phenanthrolin-6-yl)propanimidamide hydrochloride **4a**

$^{1}$H NMR (300 MHz, MeOD)

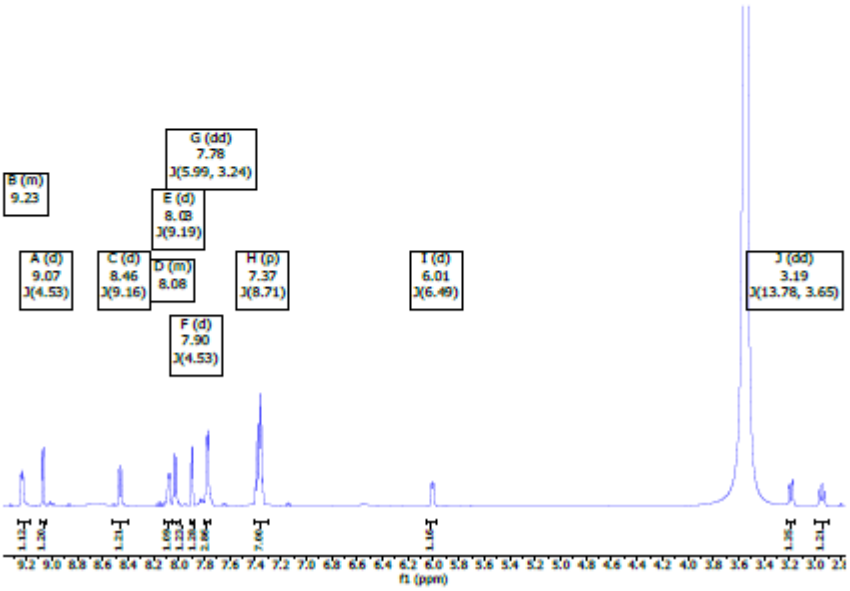



$^{13}$C NMR (75 MHz, MeOD)

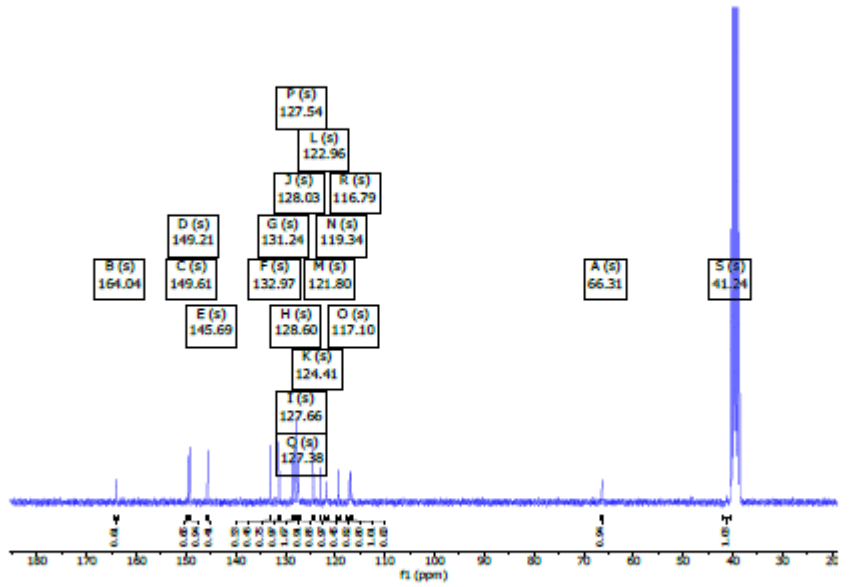


$^{1}$H- and $^{13}$C-NMR spectra of 3-(benzo[h]quinolin-4-yl)-*N*-(4-fluorophenyl)-3-hydroxypropanimidamide hydrochloride **4b**

$^{1}$H NMR (600 MHz, DMSO-*d6*)



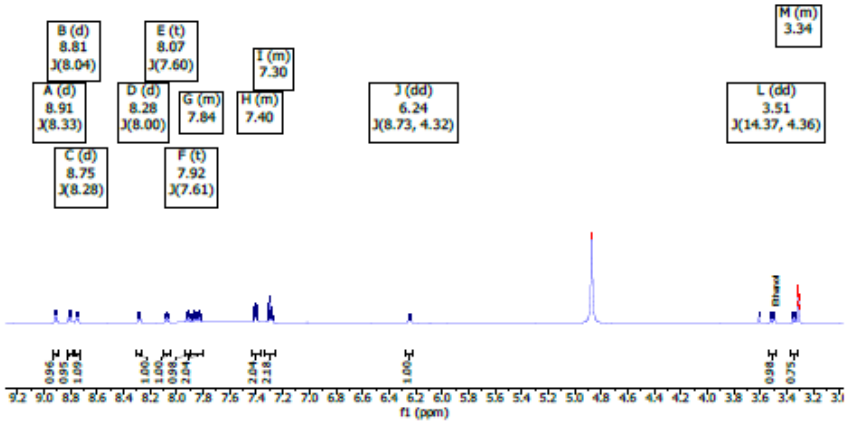

$^{13}$C NMR (75 MHz, DMSO-*d6*)



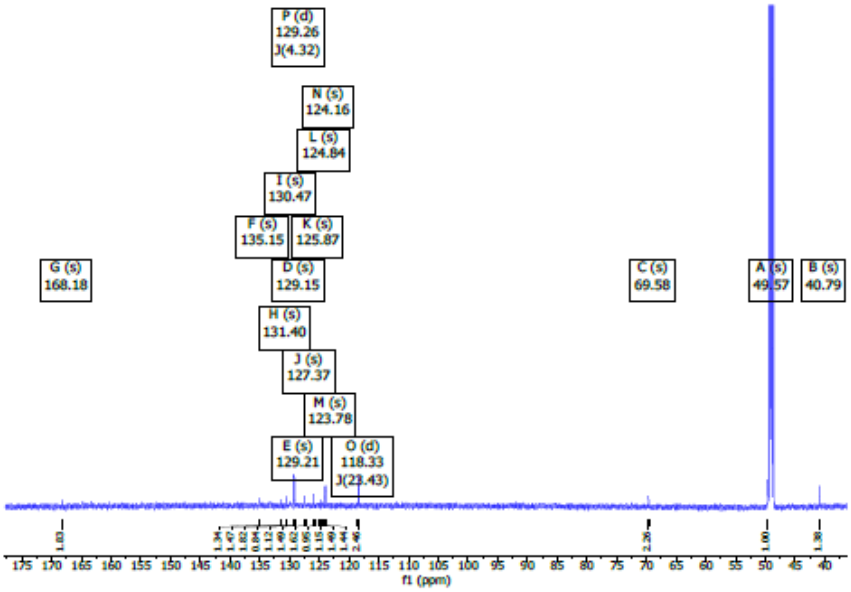

S25

$^{1}$H- and $^{13}$C-NMR spectra of *N*-(4-fluorophenyl)-3-hydroxy-3-(phenanthridin-6-yl)propanimidamide hydrochloride **4c**

$^{1}$H NMR (600 MHz, MeOD)

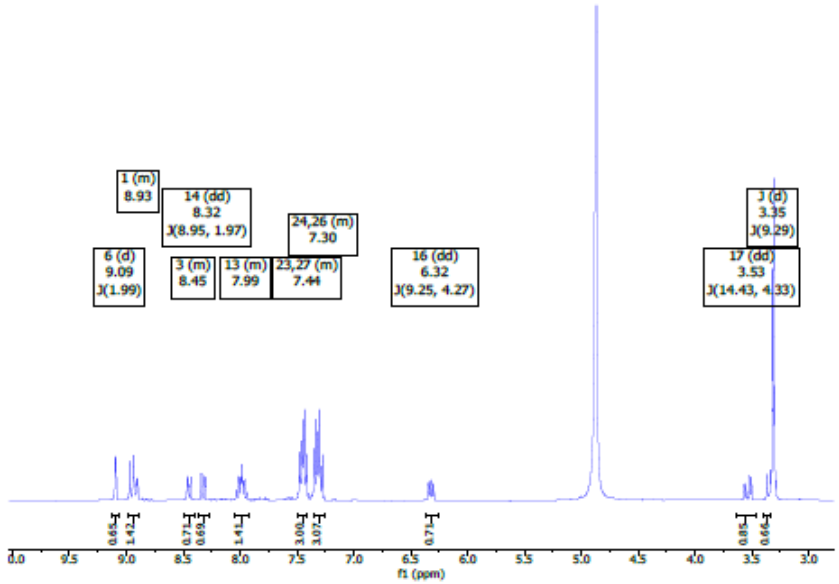



$^{13}$C NMR (151 MHz, MeOD)

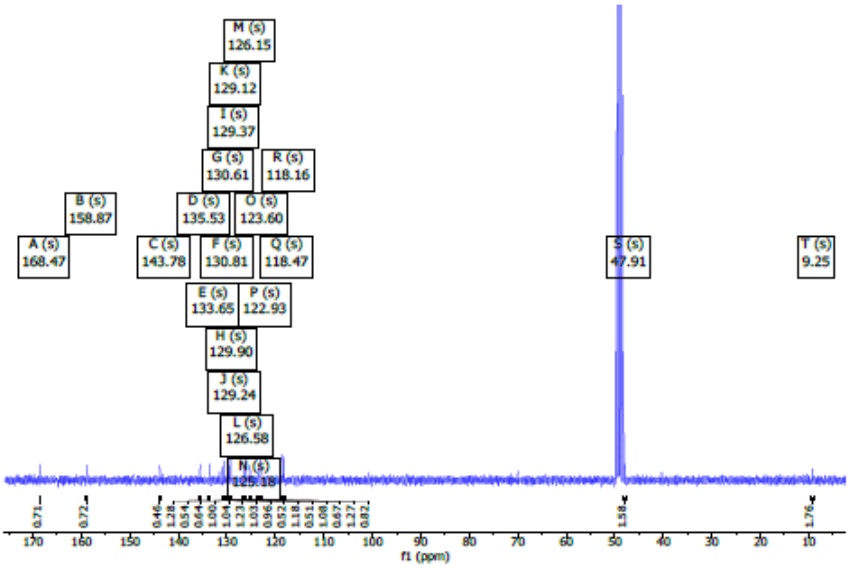


$^{1}$H- and $^{13}$C-NMR spectra of 3-(8-bromophenanthridin-6-yl)-*N*-(4-fluorophenyl)-3-hydroxypropanimidamide hydrochloride **4d**

$^{1}$H NMR (600 MHz, MeOD)

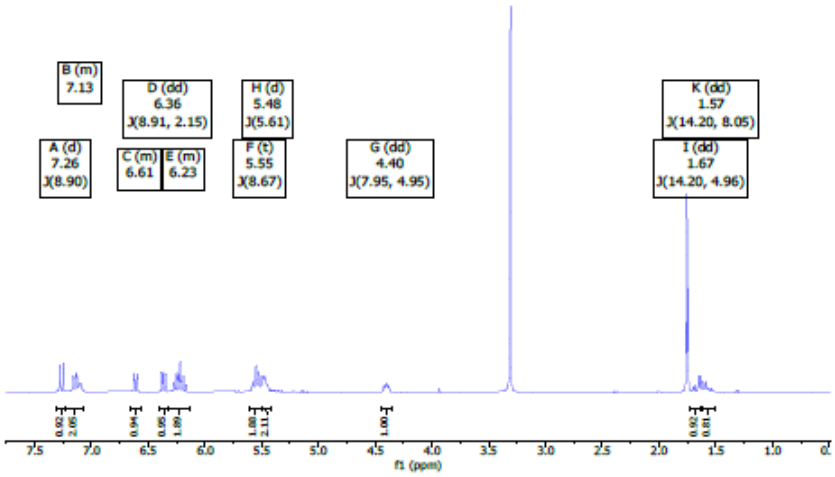



$^{13}$C NMR (75 MHz, MeOD)

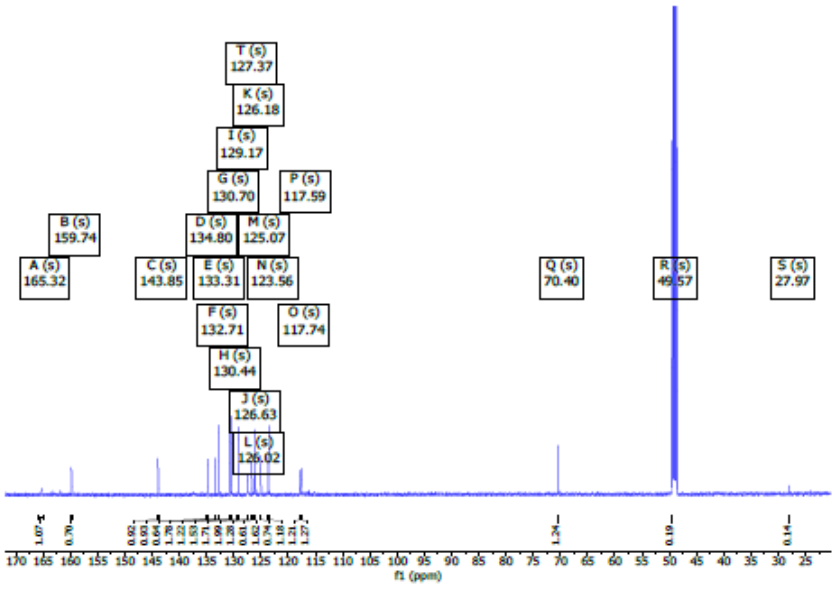


$^{1}$H- and $^{13}$C-NMR spectra of 3-(8-chlorophenanthridin-6-yl)-*N*-(4-fluorophenyl)-3-hydroxypropanimidamide hydrochloride **4e**

$^{1}$H NMR (300 MHz, MeOD)

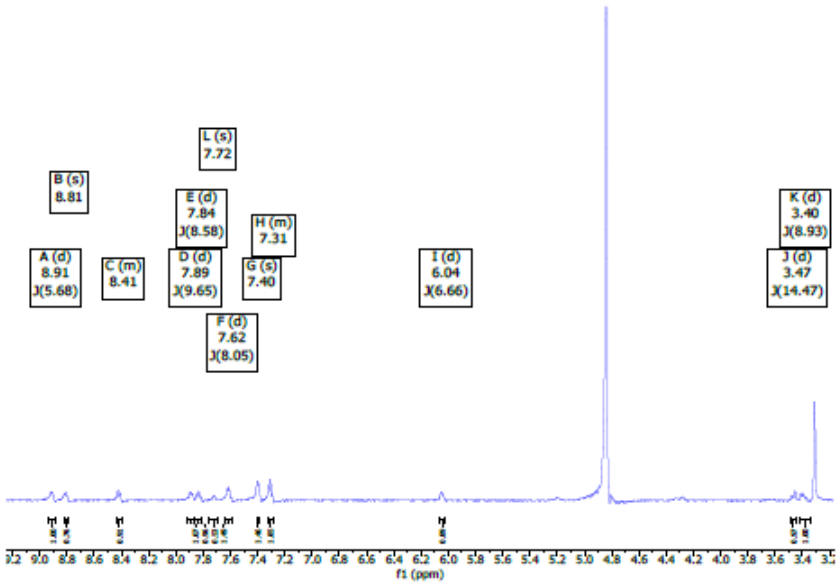



$^{13}$C NMR (151 MHz, MeOD)

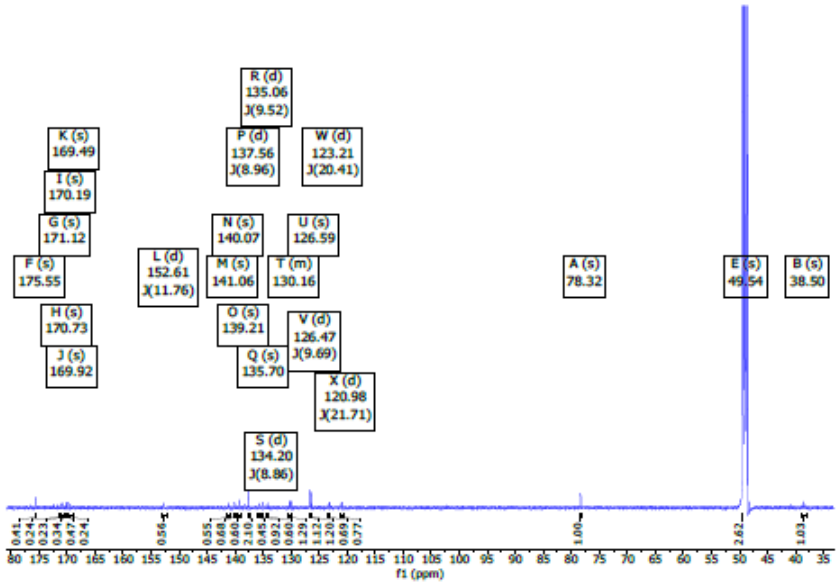


$^{1}$H- and $^{13}$C-NMR spectra of 3-(3,8-difluorophenanthridin-6-yl)-*N*-(4-fluorophenyl)-3-hydroxypropanimidamide hydrochloride **4f**

$^{1}$H NMR (600 MHz, DMSO-*d6*)

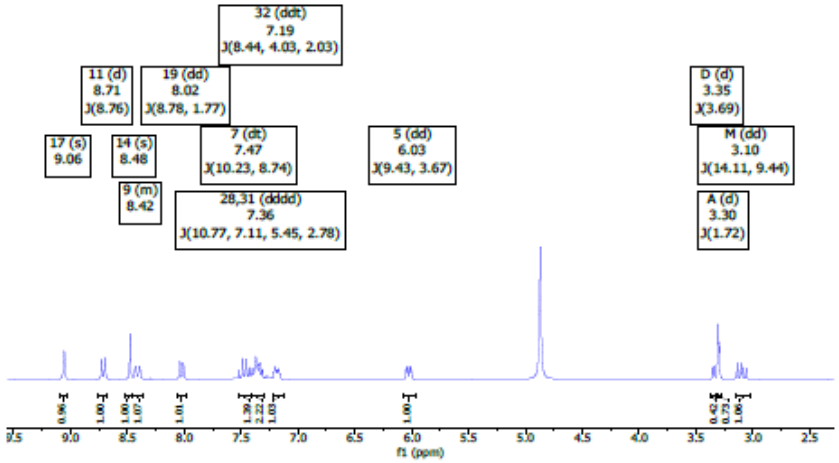



$^{13}$C NMR (151 MHz, DMSO-*d6*)

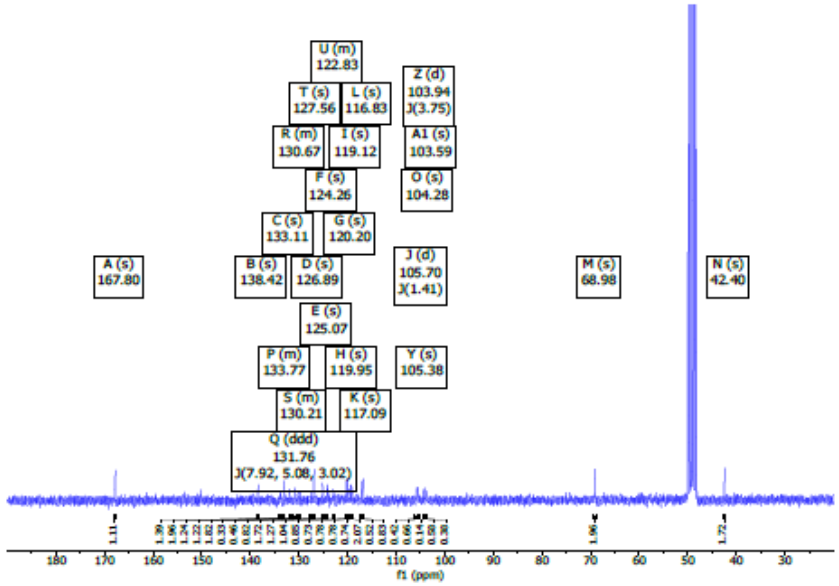


$^{1}$H- and $^{13}$C-NMR spectra of 3-(1,3-difluoro-6-(trifluoromethyl)phenanthren-9-yl)-*N*-(3,4-difluorophenyl)-3-hydroxypropanimidamide hydrochloride **7a**

$^{1}$H NMR (300 MHz, MeOD)

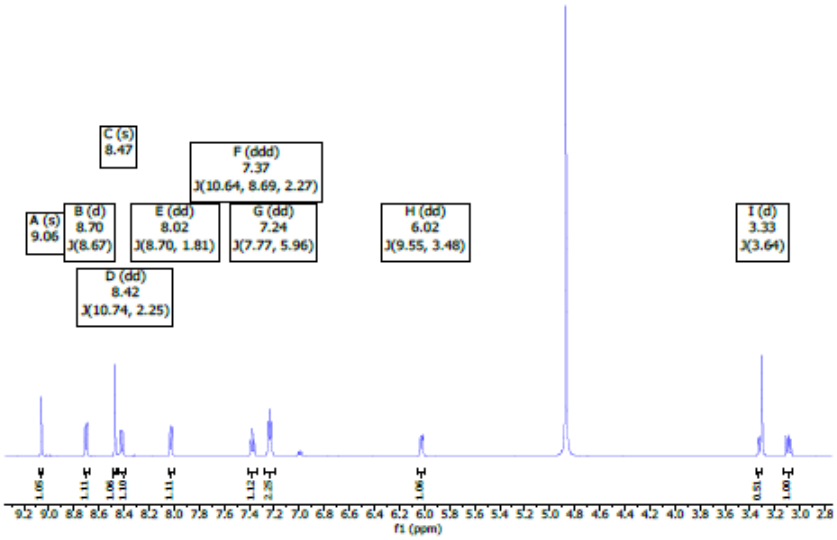



$^{13}$C NMR (75 MHz, MeOD)

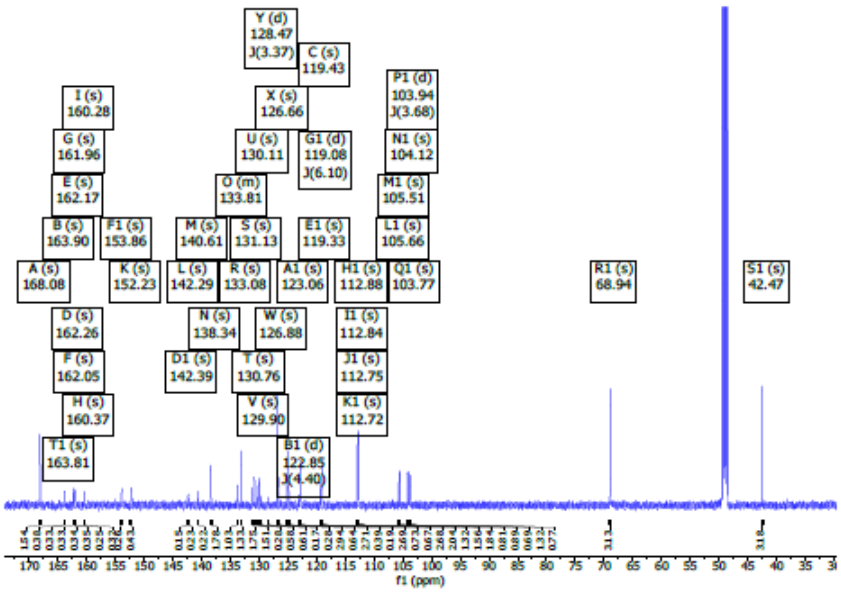


$^{1}$H- and $^{13}$C-NMR spectra of 3-(1,3-difluoro-6-(trifluoromethyl)phenanthren-9-yl)-3-hydroxy-*N*-(3,4,5-trifluorophenyl)propanimidamide hydrochloride **7b**

$^{1}$H NMR (600 MHz, MeOD)

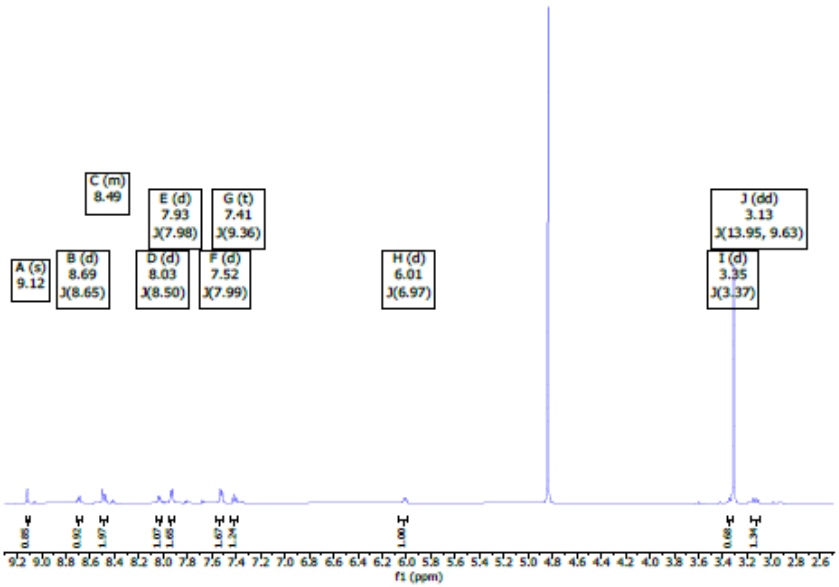



$^{13}$C NMR (151 MHz, MeOD)

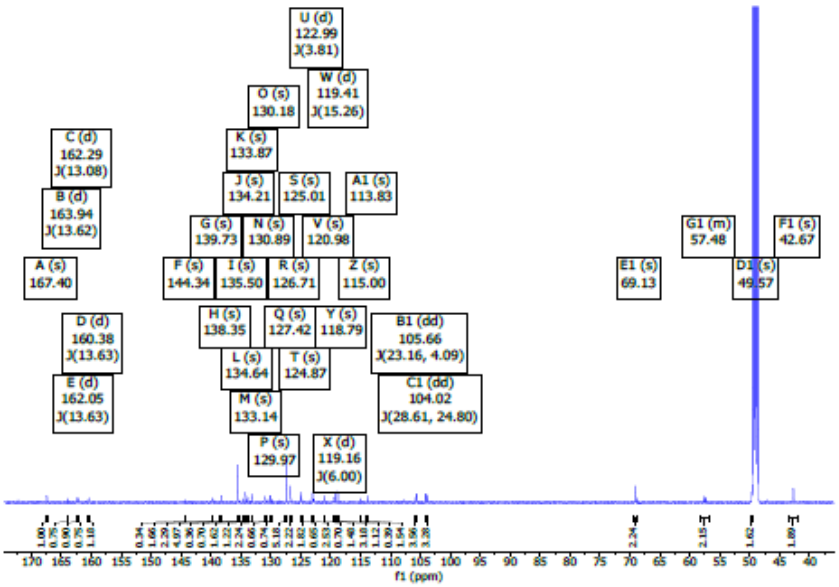


$^{1}$H- and $^{13}$C-NMR spectra of *N*-(4-cyanophenyl)-3-(1,3-difluoro-6-(trifluoromethyl)phenanthren-9-yl)-3-hydroxypropanimidamide hydrochloride **7c**

$^{1}$H NMR (600 MHz, MeOD)

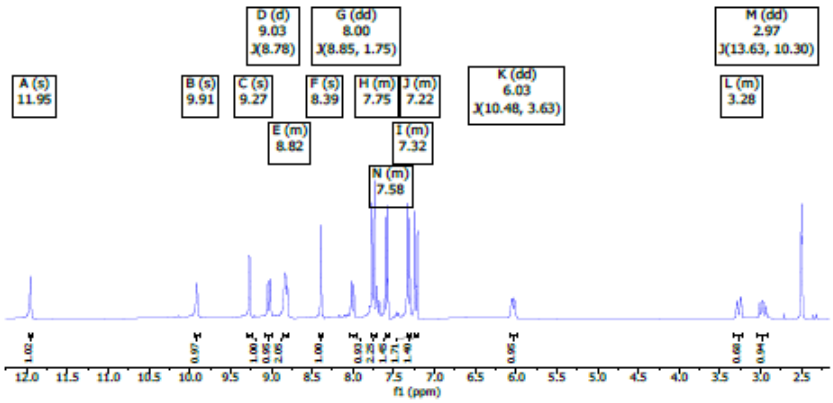



$^{1}$H NMR (151 MHz, MeOD)

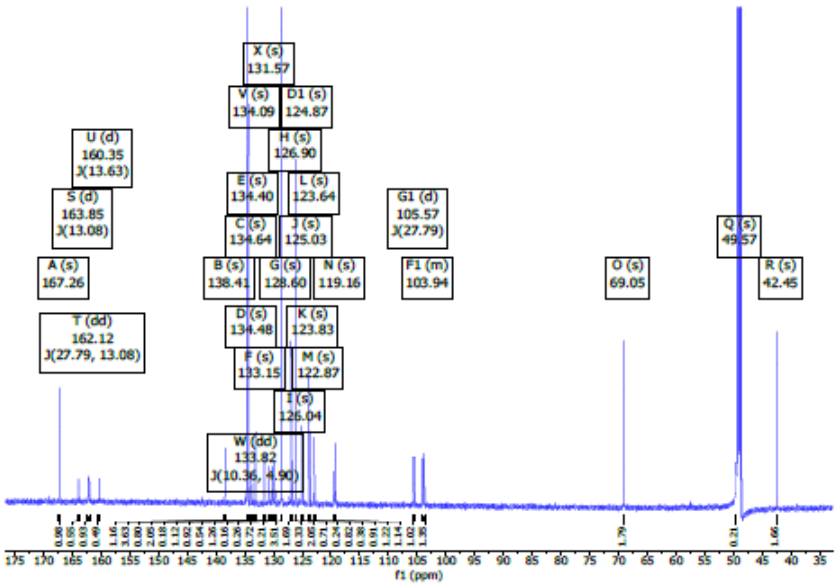


$^{1}$H- and $^{13}$C-NMR spectra of *N*-(4-bromophenyl)-3-(1,3-difluoro-6-(trifluoromethyl)phenanthren-9-yl)-3-hydroxypropanimidamide hydrochloride **7d**

$^{1}$H NMR (300 MHz, DMSO-*d6*)

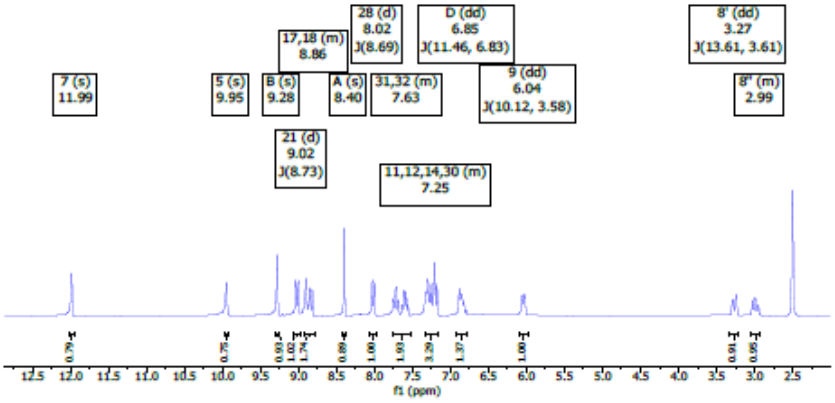



$^{13}$C NMR (151 MHz, MeOD)

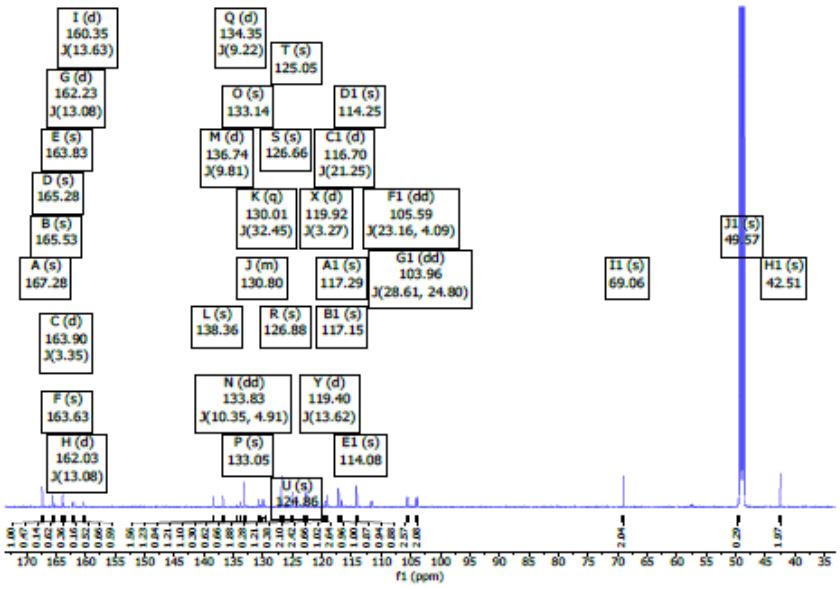


$^{1}$H- and $^{13}$C-NMR spectra of 3-(1,3-difluoro-6-(trifluoromethyl)phenanthren-9-yl)-*N*-(3-fluorophenyl)-3-hydroxypropanimidamide hydrochloride **7e**

$^{1}$H NMR (300 MHz, DMSO-*d6*)

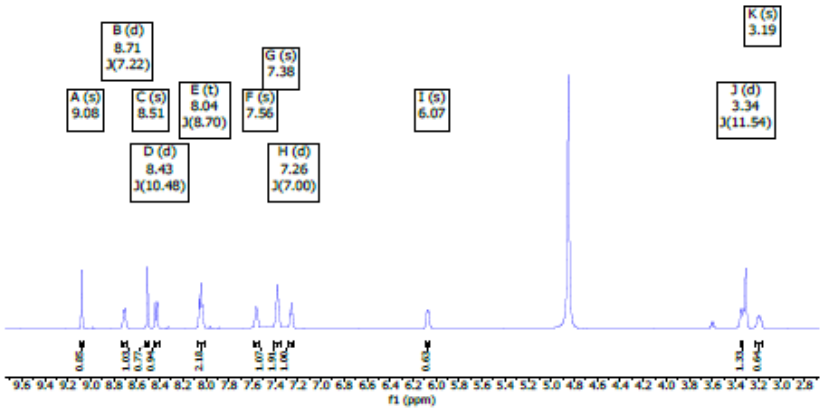



$^{1}$H NMR (151 MHz, MeOD)

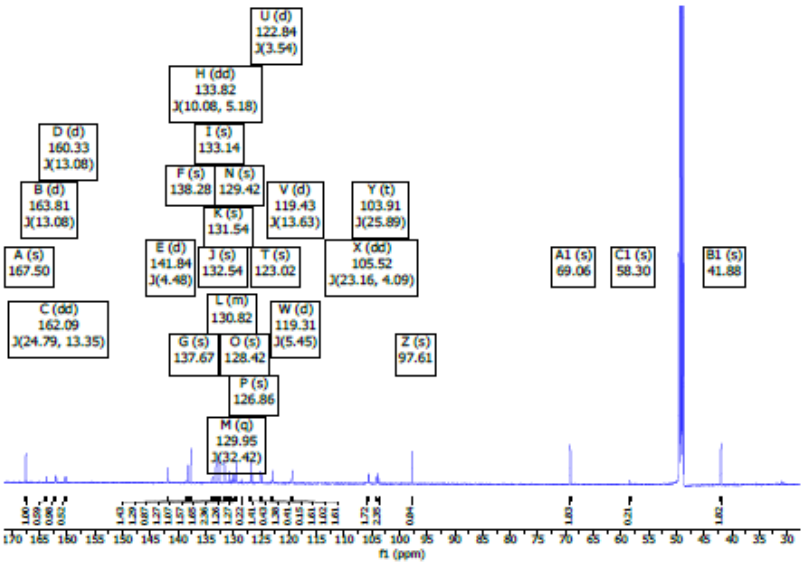


$^{1}$H- and $^{13}$C-NMR spectra of 3-(1,3-difluoro-6-(trifluoromethyl)phenanthren-9-yl)-3-hydroxy-*N*-(2-iodophenyl)propanimidamide hydrochloride **7f**

$^{1}$H NMR (600 MHz, MeOD)



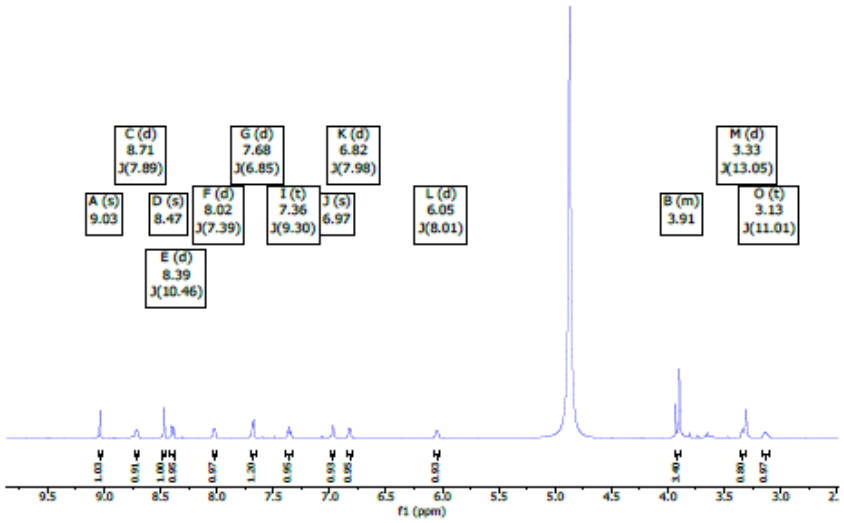

$^{13}$C NMR (151 MHz, MeOD)



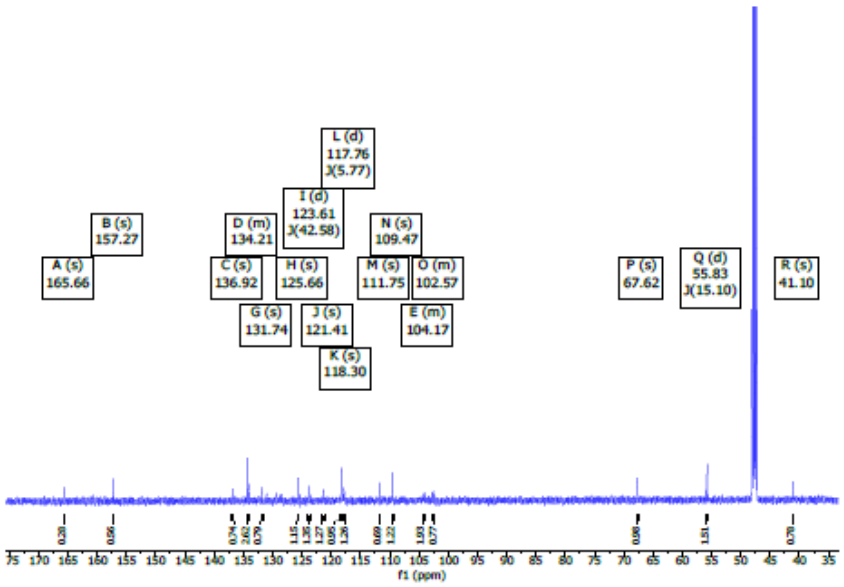

S35

$^{1}$H- and $^{13}$C-NMR spectra of *N*-(4-bromo-3-methoxyphenyl)-3-(1,3-difluoro-6-(trifluoromethyl)phenanthren-9-yl)-3-hydroxypropanimidamide hydrochloride **7g**

$^{1}$H NMR (600 MHz, MeOD)

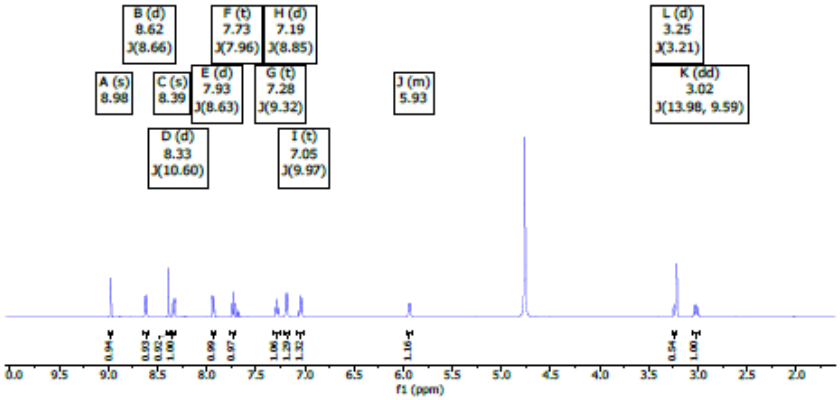



$^{13}$C NMR (151 MHz, MeOD)

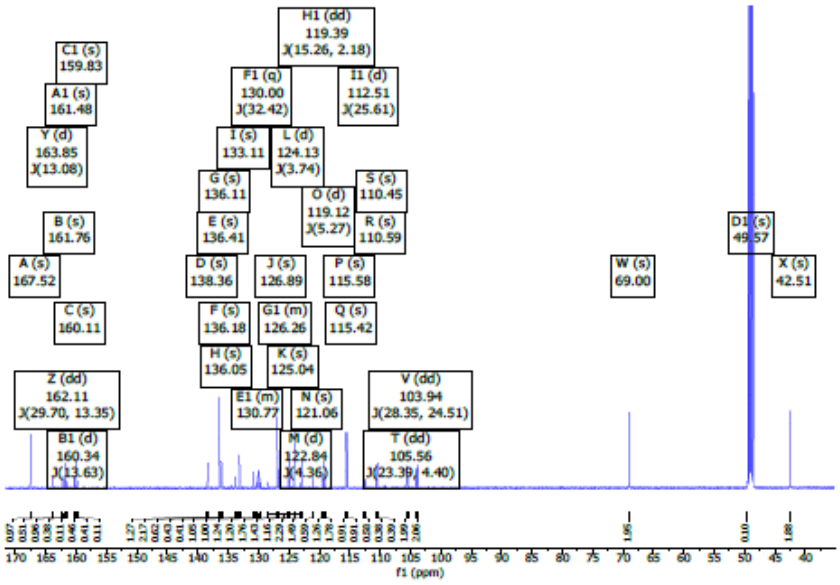


$^{1}$H- and $^{13}$C-NMR spectra of *N*-(4-bromo-3-fluorophenyl)-3-(1,3-difluoro-6-(trifluoromethyl)phenanthren-9-yl)-3-hydroxypropanimidamide hydrochloride **7h**

$^{1}$H NMR (600 MHz, MeOD)

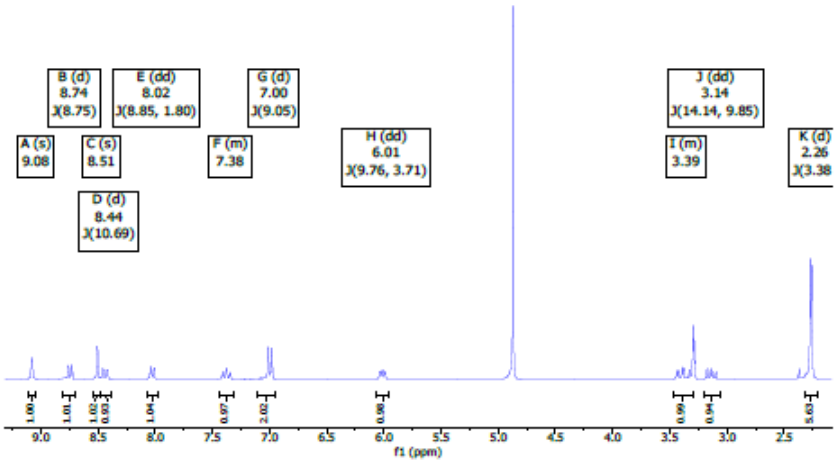



$^{13}$C NMR (151 MHz, MeOD)

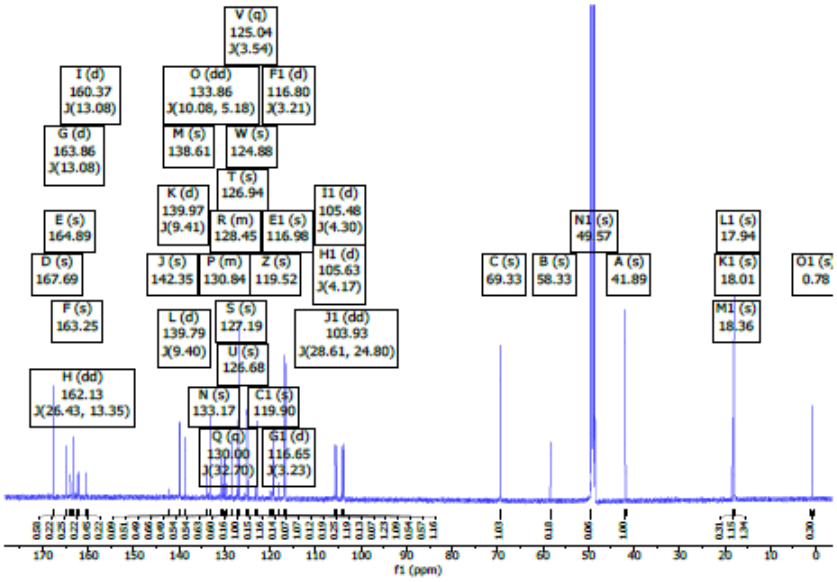


$^{1}$H- and $^{13}$C-NMR spectra of 3-(1,3-difluoro-6-(trifluoromethyl)phenanthren-9-yl)-*N*-(4-fluoro-2,6-dimethylphenyl)-3-hydroxypropanimidamide hydrochloride **7i**

$^{1}$H NMR (300 MHz, MeOD)

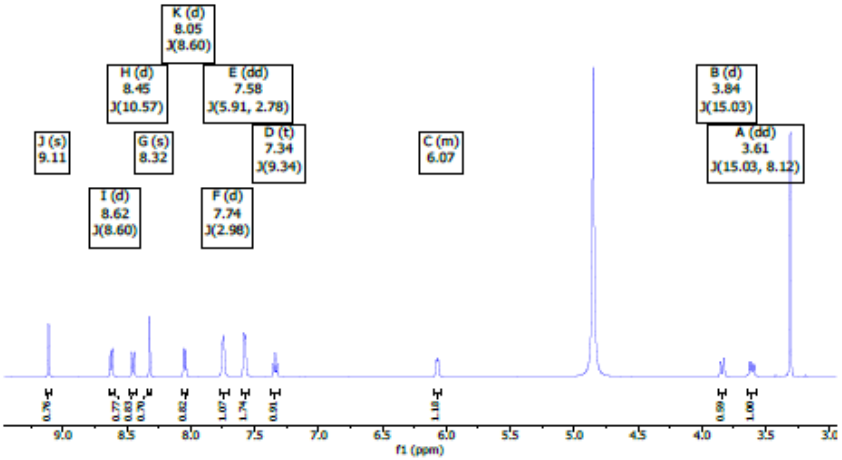



$^{13}$C NMR (151 MHz, MeOD)

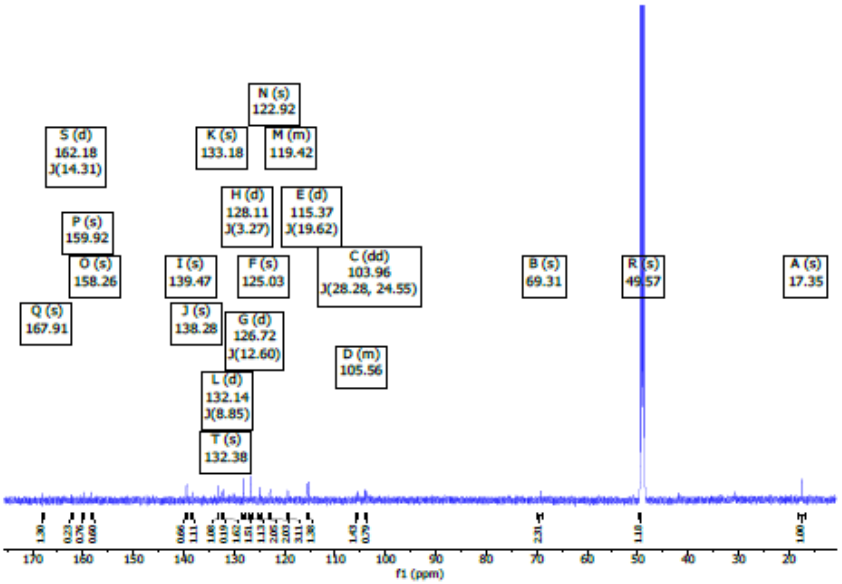


$^{1}$H- and $^{13}$C-NMR spectra of 3-(1,3-difluoro-6-(trifluoromethyl)phenanthren-9-yl)-*N*-(2-fluoro-6-methylphenyl)-3-hydroxypropanimidamide hydrochloride **7j**

$^{1}$H NMR (600 MHz, MeOD)

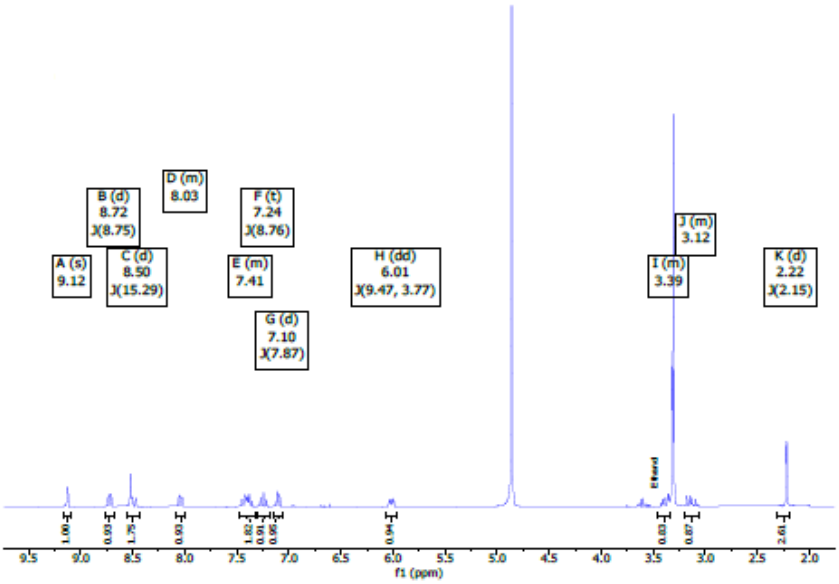



$^{13}$C NMR (151 MHz, MeOD)

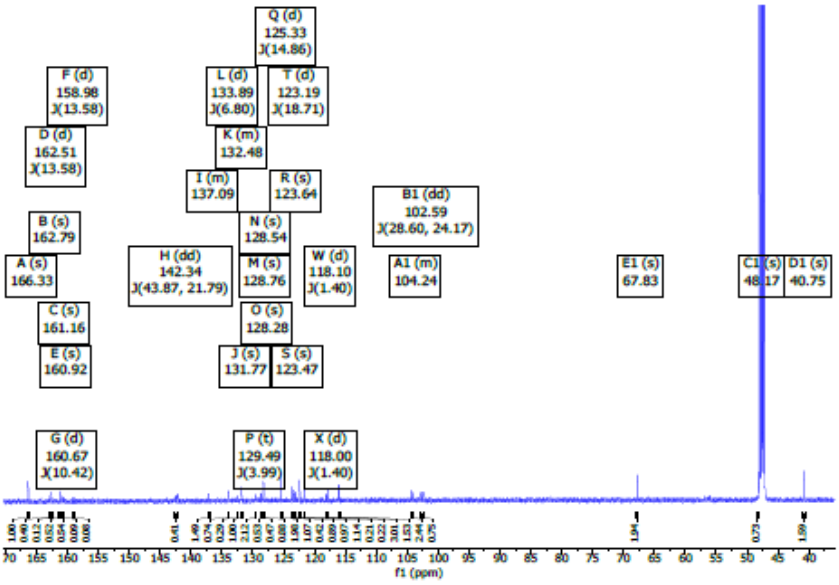


$^{1}$H- and $^{13}$C-NMR spectra of 3-(1,3-difluoro-6-(trifluoromethyl)phenanthren-9-yl)-*N*-(3-fluoro-2-methylphenyl)-3-hydroxypropanimidamide hydrochloride **7k**

$^{1}$H NMR (300 MHz, MeOD)

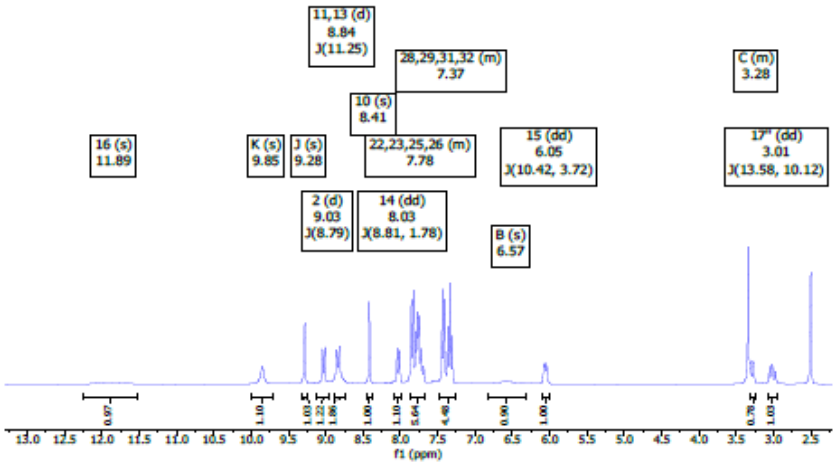



$^{13}$C NMR (151 MHz, MeOD)

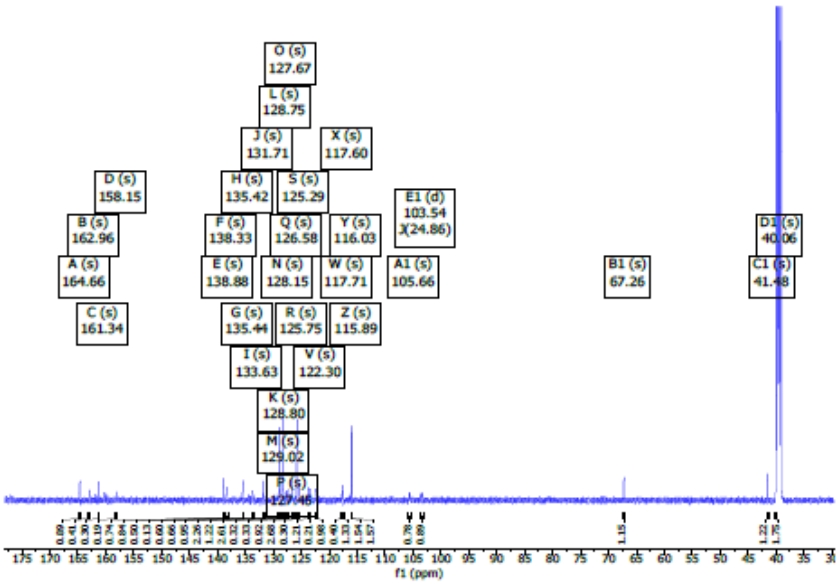


$^{1}$H- and $^{13}$C-NMR spectra of 3-(1,3-difluoro-6-(trifluoromethyl)phenanthren-9-yl)-*N*-(4'-fluoro-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-3-hydroxypropanimidamide hydrochloride **7l**

$^{1}$H NMR (300 MHz, DMSO-*d6*)

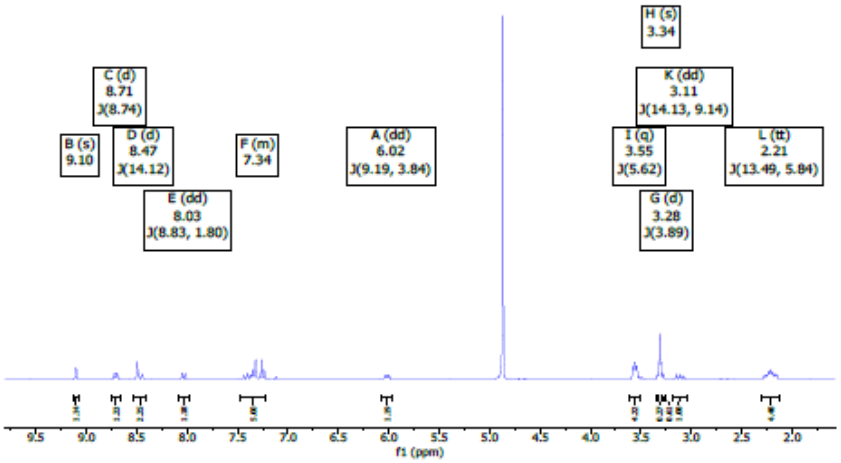



$^{13}$C NMR (151 MHz, DMSO-*d6*)

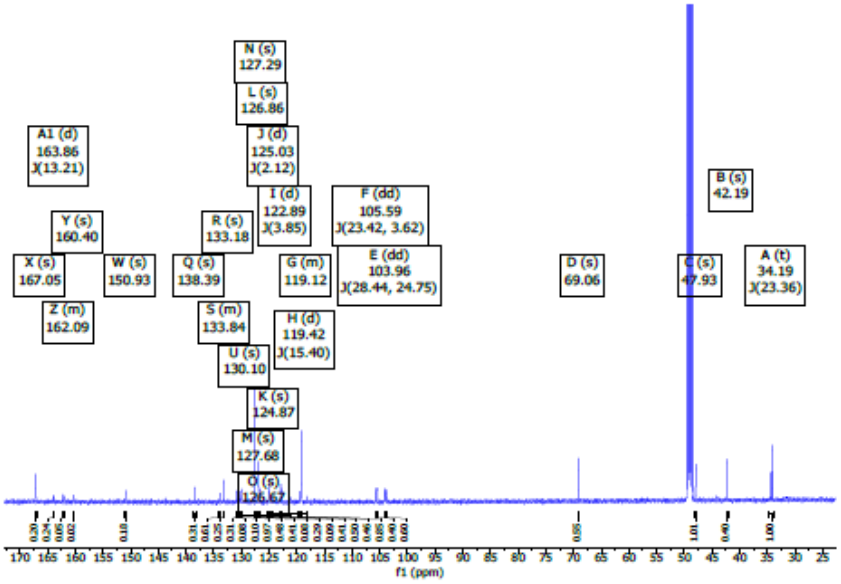


$^{1}$H- and $^{13}$C-NMR spectra of 3-(1,3-difluoro-6-(trifluoromethyl)phenanthren-9-yl)-*N*-(4-(4,4-difluoropiperidin-1-yl)phenyl)-3-hydroxypropanimidamide hydrochloride **7m**

$^{1}$H NMR (300 MHz, MeOD)

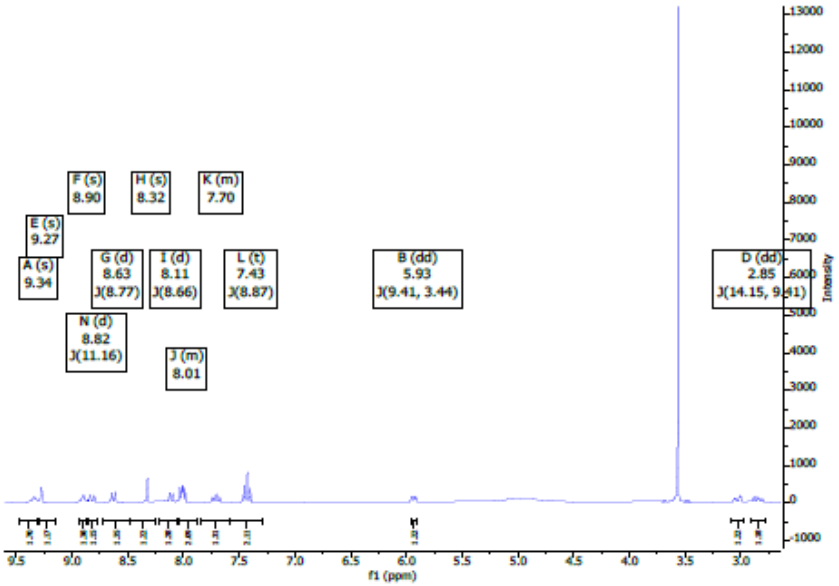



$^{13}$C NMR (151 MHz, DMSO-*d6*)

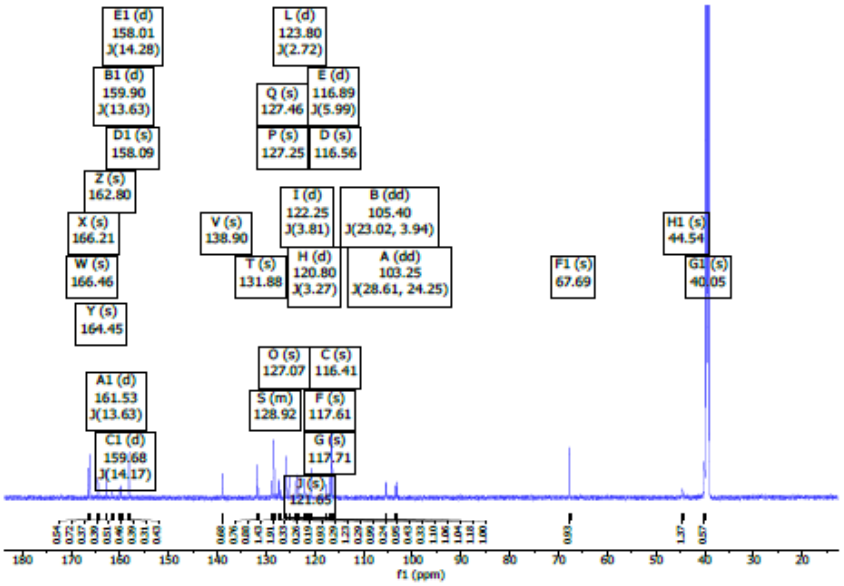


$^{1}$H- and $^{13}$C-NMR spectra of 3-(1,3-difluoro-6-(trifluoromethyl)phenanthren-9-yl)-*N*-(5-(4-fluorophenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl)-3-hydroxypropanimidamide hydrochloride **7n**

$^{1}$H NMR (300 MHz, DMSO-*d6*)

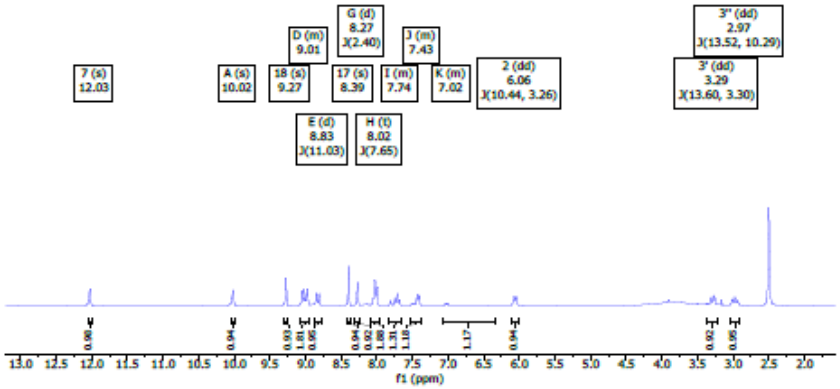



$^{13}$C NMR (151 MHz, DMSO-*d6*)

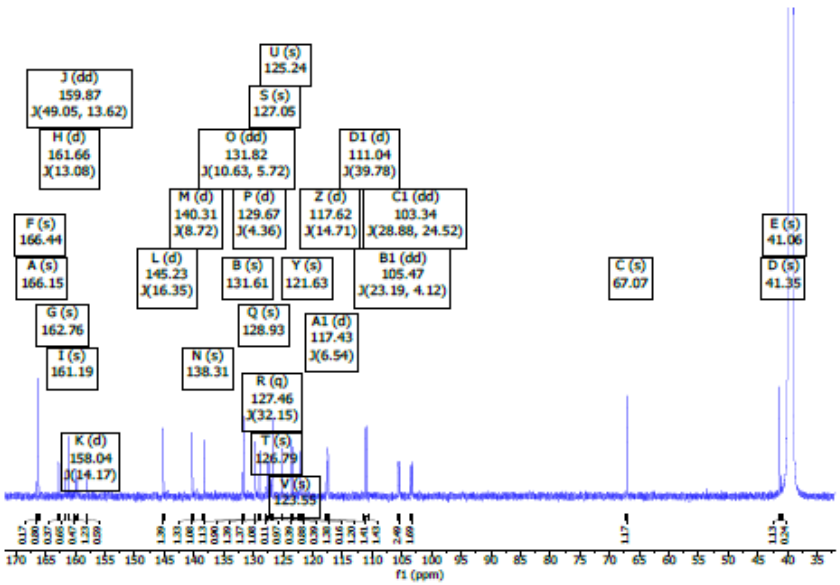


$^{1}$H- and $^{13}$C-NMR spectra of 3-(1,3-difluoro-6-(trifluoromethyl)phenanthren-9-yl)-*N*-(5-(4-fluorophenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl)-3-hydroxypropanimidamide hydrochloride **7o**

$^{1}$H NMR (300 MHz, DMSO-*d6*)

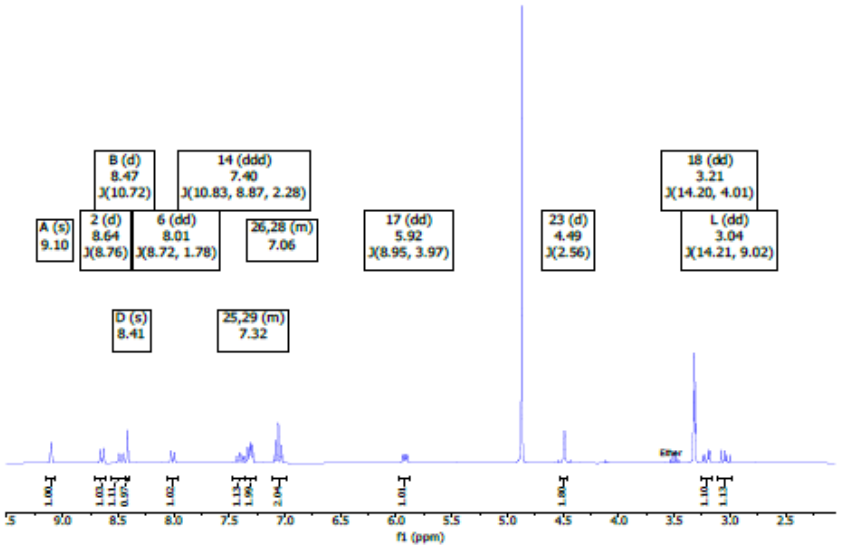



$^{13}$C NMR (151 MHz, DMSO-*d6*)

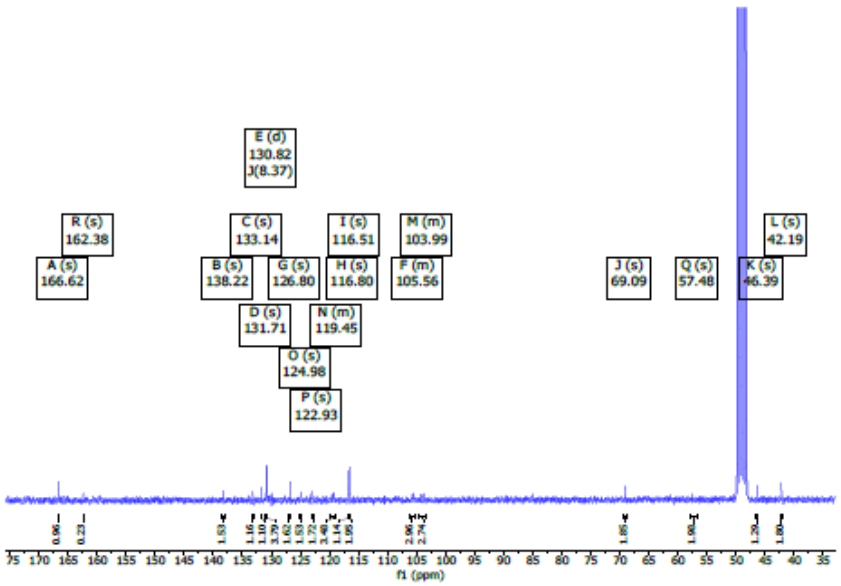


$^{1}$H- and $^{13}$C-NMR spectra of 3-(1,3-difluoro-6-(trifluoromethyl)phenanthren-9-yl)-*N*-(4-fluorobenzyl)-3-hydroxypropanimidamide hydrochloride **7p**

$^{1}$H NMR (300 MHz, MeOD)

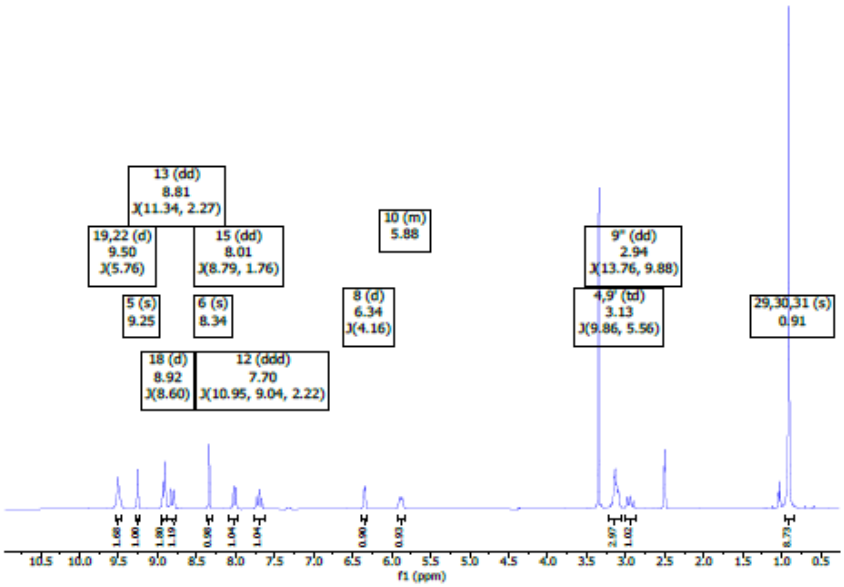



$^{13}$C NMR (75 MHz, MeOD)

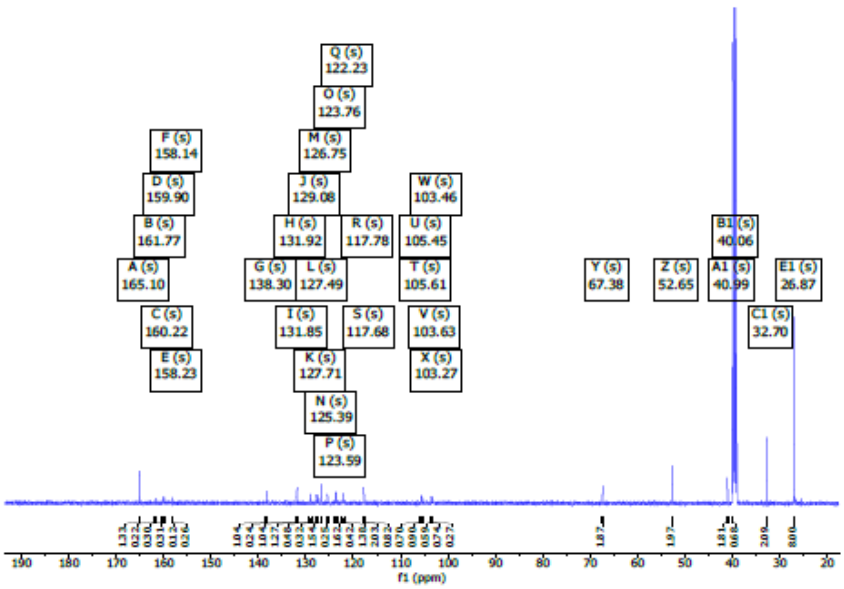


$^{1}$H- and $^{13}$C-NMR spectra of 3-(1,3-difluoro-6-(trifluoromethyl)phenanthren-9-yl)-3-hydroxy-*N*-neopentylpropanimidamide hydrochloride **7q**

$^{1}$H NMR (300 MHz, MeOD)

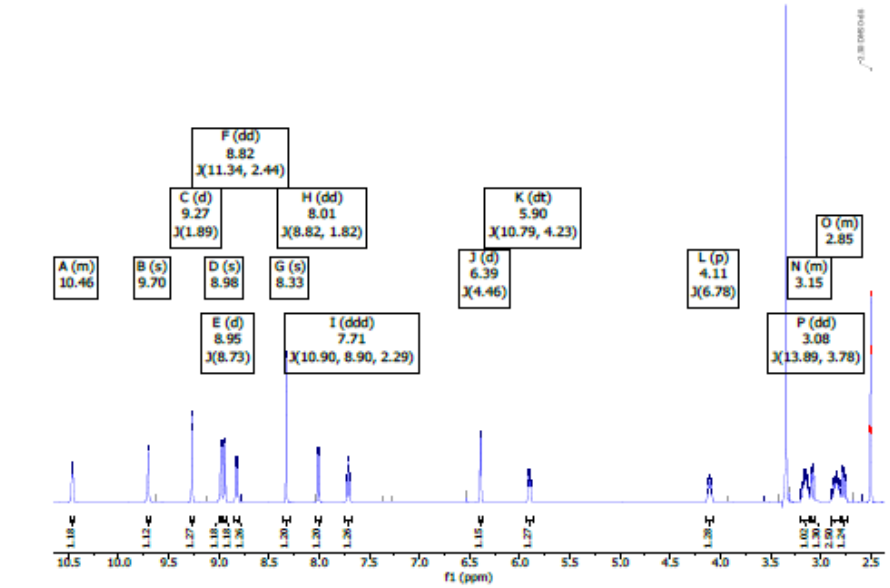



$^{13}$C NMR (151 MHz, MeOD)

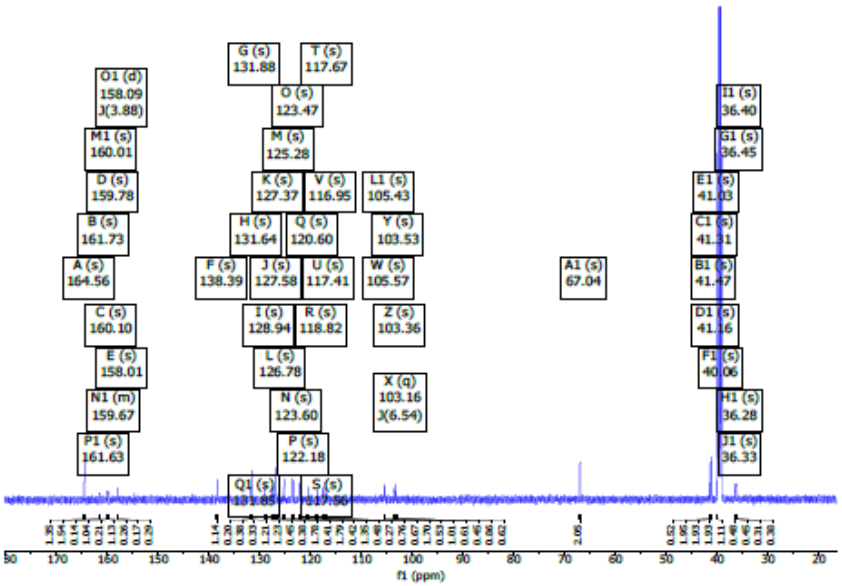


$^{1}$H- and $^{13}$C-NMR spectra of 3-(1,3-difluoro-6-(trifluoromethyl)phenanthren-9-yl)-*N*-(3,3-difluorocyclobutyl)-3-hydroxypropanimidamide hydrochloride **7r**

$^{1}$H NMR (600 MHz, DMSO-*d6*)

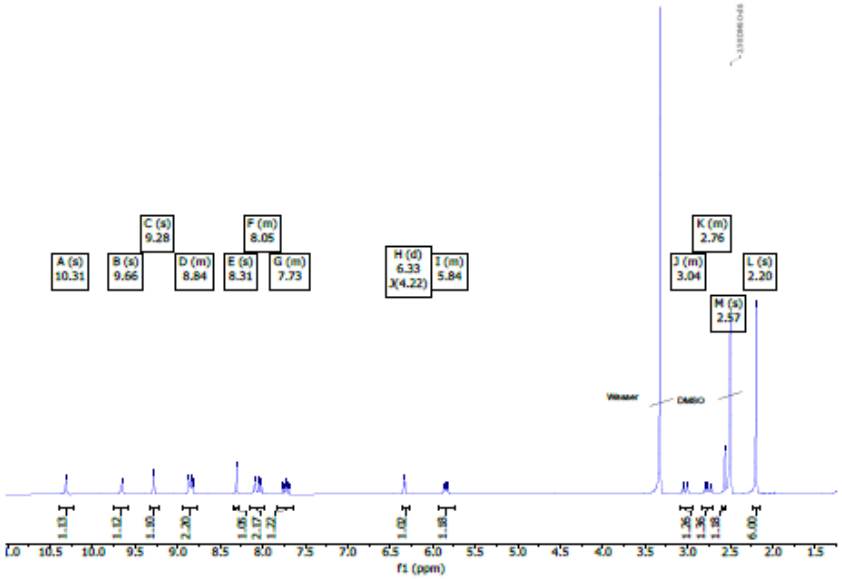



$^{13}$C NMR (151 MHz, DMSO-*d6*)

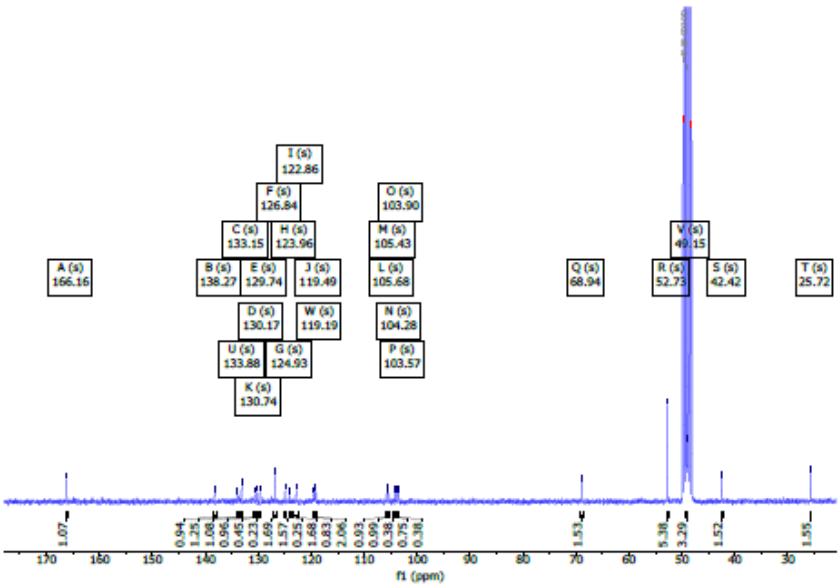


$^{1}$H- and $^{13}$C-NMR spectra of 3-(1,3-difluoro-6-(trifluoromethyl)phenanthren-9-yl)-*N*-(3,3-difluorocyclobutyl)-3-hydroxypropanimidamide hydrochloride 7s

$^{1}$H NMR (300 MHz, DMSO-*d6*)

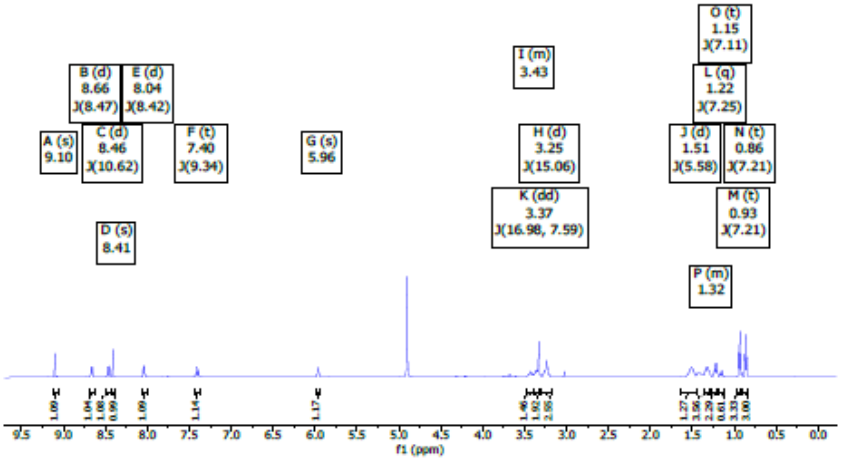



$^{13}$C NMR (75 MHz, MeOD)

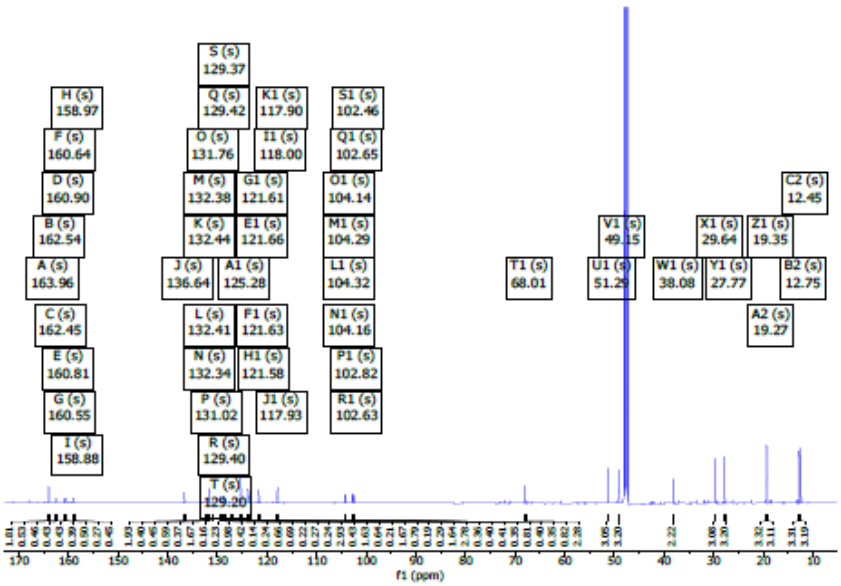


$^{1}$H- and $^{13}$C-NMR spectra of *N,N*-dibutyl-3-(1,3-difluoro-6-(trifluoromethyl)phenanthren-9-yl)-3-hydroxypropanimidamide hydrochloric acid **7t**

$^{1}$H NMR (600 MHz, MeOD)

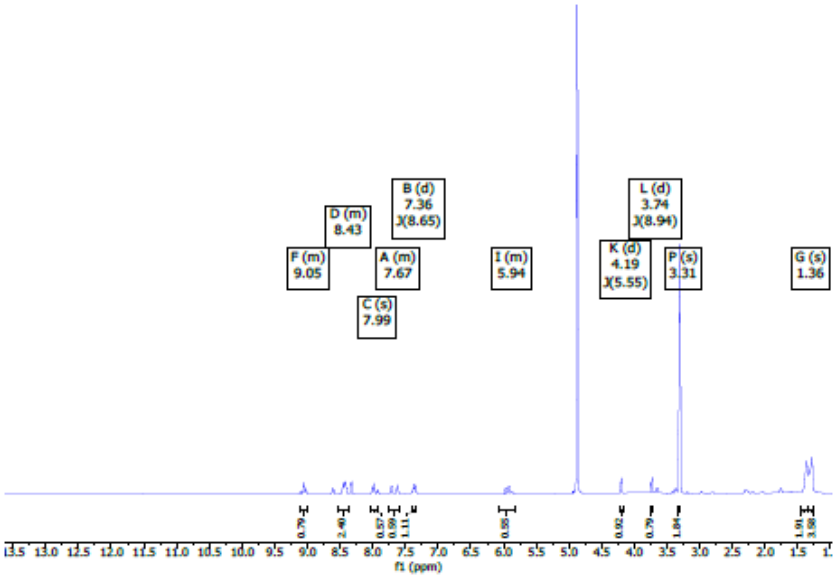



$^{13}$C NMR (151 MHz, MeOD)

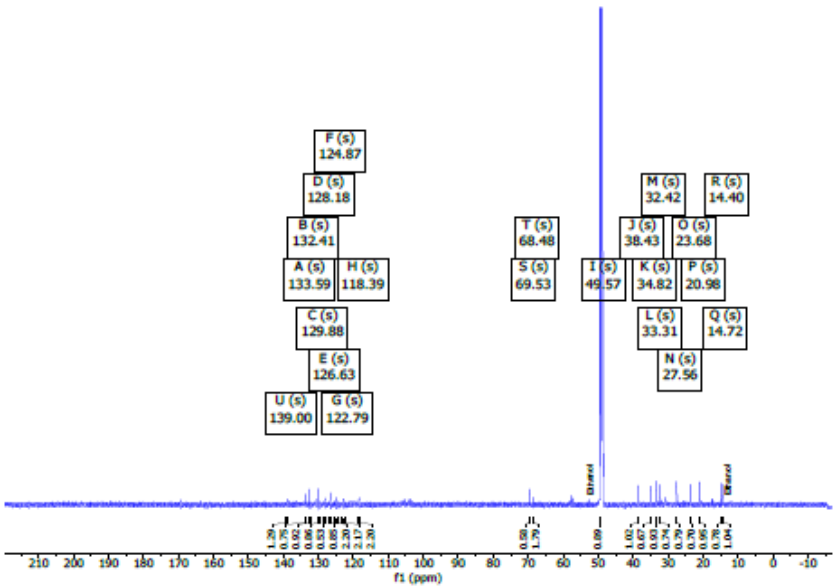


$^{1}$H- and $^{13}$C-NMR spectra of 1-(1,3-difluoro-6-(trifluoromethyl)phenanthren-9-yl)-3-(4,4-difluoropiperidin-1-yl)-3-iminopropan-1-ol hydrochloric acid **7u**

$^{1}$H NMR (600 MHz, MeOD)

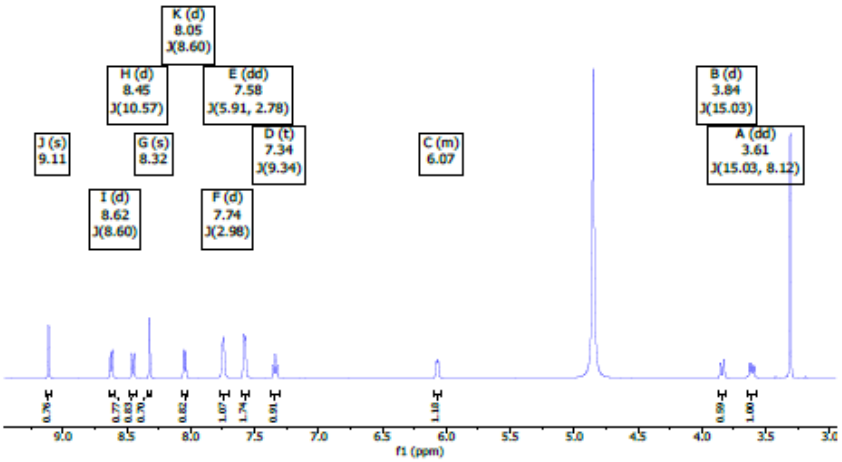



$^{13}$C NMR (151 MHz, MeOD)

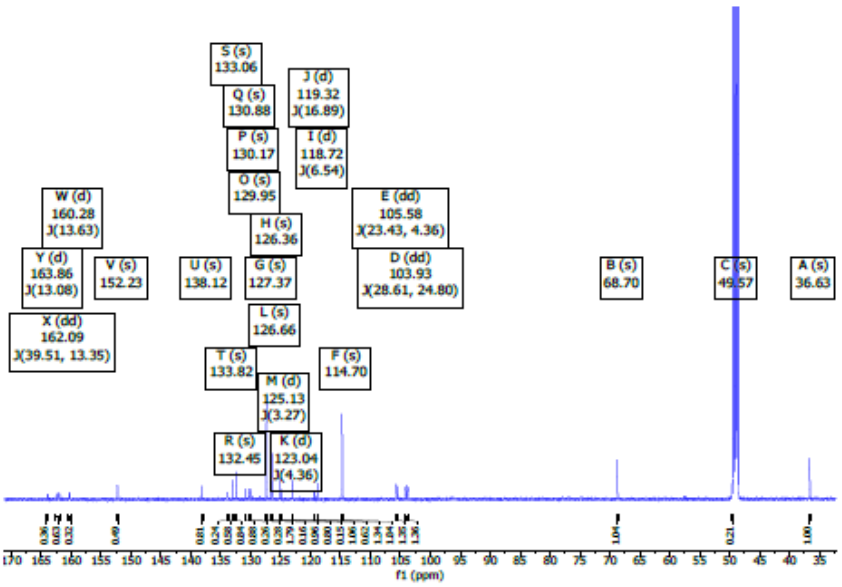


$^{1}$H- and $^{13}$C-NMR spectra of *N*-(1H-benzo[d]imidazol-2-yl)-3-(1,3-difluoro-6-(trifluoromethyl)phenanthren-9-yl)-3-hydroxypropanimidamide hydrochloride **7v**

$^{1}$H NMR (600 MHz, MeOD)




$^{13}$C NMR (151 MHz, MeOD)



**5. Determination of the *in vitro* parasite reduction ratio (PRR) of 4d, 4e and 7b**

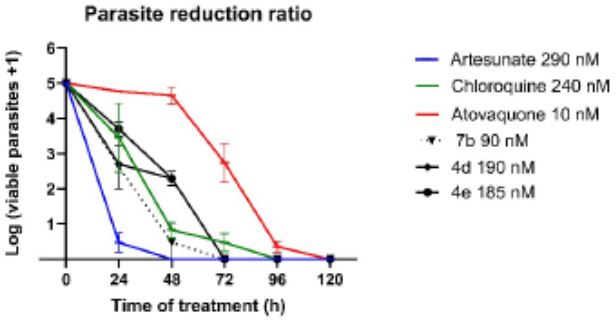



Figure S29. Parasite killing time course profiles in response to the newly synthesized compounds (**4d, 4e, 7b**), and comparator antimalarial drugs. Parasites were treated with the compounds at their respective 10-fold $IC_{50}$ for different lengths of time and allowed to recover in drug-free medium for 28 days. Subsequently, parasite growth was measured by HRP-2 ELISA. Error bars are the SEM of at least three independent experiments in duplicate. The assay protocol is described in detail in the main manuscript.

**6. Initial mechanism of action studies with 4d and 4e**

Table S1. Detergent-mediated NP-40 assay to determine inhibition of β-hematin formation

| Compound | $IC_{50}$ (μM)[a] | Docking score[b] (kcal/mol) |
|---|---|---|
| **TKK130**[c] | 9.4 ± 0.3 | -12.1 |
| **4d** | 25.6 ± 1.4 | -9.8 |
| **4e** | 27.4 ± 0.5 | -8.2 |
| **CQ** | 21.0 ± 0.4 | -8.2 |
| **Hf** | 13.4 ± 0.4 | -10.4 |

[a]Values show the mean ± standard deviation (SD) of one independent experiment conducted in

technical triplicate. [b]Value is from the top-scoring of five repeat docking poses. [c]Previously published by *Knaab et al.*[8]

The assay protocol is described in detail in the main manuscript.

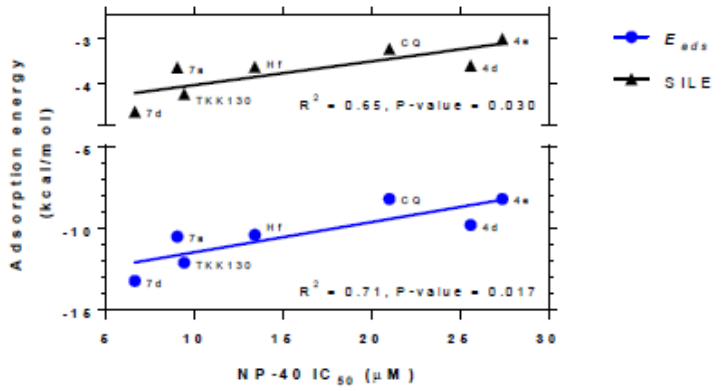



Figure S30. Linear correlations between $\beta$-hematin inhibition activity ($IC_{50}$) and both docking ($E_{ads}$) and SILE scores.

**7. *In vivo* antiplasmodial evaluation of 4d, e and 7b, e, h, j, l in the *Plasmodium berghei* mouse model**

Table S2 *In vivo* evaluation.

| Compound | Oral Dose[a] | Activity [%][b] | MSD [d][c] | Cured[d] |
|---|---|---|---|---|
| **CQ** | 4x30 | 99.9 | 21 | 0/10 |
| **AS**[e] | 4x30 | 99 | 9 | 0/10 |
| **LUM**[f] | 4x30 | 99.8 | > 30 | 3/3 |
| **TKK130**[g] | 4x50 | 99.8 | > 30 | 3/3 |
| **TKK130**[g] | 4x30 | 99.9 | > 30 | 3/3 |
| **TKK130**[g] | 4x10 | 99.9 | 28 | 1/3 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **TKK130**[g] | 4x3 | 99.9 | 20 | 0/3 |
| **4d** | 4x50 | 95 | 7 | 0/3 |
| **4e** | 4x50 | 87 | 7 | 0/3 |
| **7b**[g] | 4x50 | 99.6 | 26 | 2/3 |
| **7e** | 4x50 | 99.7 | 15 | 0/3 |
| **7h** | 4x50 | 99.8 | 19 | 0/3 |
| **7j** | 4x50 | 99.9 | 20 | 1/3 |
| **7l** | 4x50 | 99 | 10 | 0/3 |
| **Control** | | 0 | 4 | - |

[a]Standard four-day Peters test using daily oral doses of indicated compound (mg/kg body weight). Experimental groups (n = 3 mice) were treated four times (at 4, 24, 48 and 72 h) post-infection. [b]Blood for parasitemia determination by FACS analysis was collected on day 4 (96 h after infection). Activity was calculated as the difference between the mean parasitemia for the control and treated groups expressed relative to the control group. [c]Mean survival time in days (MSD). Control mice and other mice for which the antimalarial activity was < 40% were euthanized on day 4 post-infection. The survival of the animals was monitored by microscopy for up to 30 days. A compound was considered curative (>30), if the animal survived to day 30 post-infection with no detectable parasites (detection limit of 1 parasite in 10,000 erythrocytes). [d]Number of parasite-free mice on day 30. [e]Artemisinin (AS). [f]Lumefantrine (LUM). [g]Previously published by *Knaab et al.*[8]

**Author Information**

**Corresponding authors**

Thomas Kurz – Heinrich Heine University Düsseldorf, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Institute of Pharmaceutical and Medicinal Chemistry, 40225 Düsseldorf, Germany; Phone: (+49) 21181-14984; Email: Thomas.kurz@hhu.de

Bjoern B. Burckhardt – Individualized Pharmacotherapy, Institute of Pharmaceutical and Medicinal Chemistry, University of Muenster, 48149 Muenster, Germany; Phone: (+49) 251-83-33324; Email: burckhardt@uni-muenster.de

Jana Held – Institute of Tropical Medicine, Eberhard Karls University Tuebingen, 72074 Tuebingen, Germany; German Center for Infection Research, Partner Site Tuebingen, 72074 Tuebingen, Germany; Centre de Recherches Medicales de Lambaréné, Lambaréné, B.P 242 Lambaréné, Gabon; Phone: (+49)7071 29-85569; Email: Jana.held@uni-tuebingen.de

**REFERENCES8**

(1) Bao, H.; Zhou, B.; Jin, H.; Liu, Y. Copper-Catalyzed Three-Component Reaction of: N-Heteroaryl Aldehydes, Nitriles, and Water. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17* (20), 5021–5028. https://doi.org/10.1039/c9ob00599d.

(2) Xu, Y.; Yu, C.; Zhang, X.; Fan, X. Selective Synthesis of Dihydrophenanthridine and Phenanthridine Derivatives from the Cascade Reactions of o -Arylanilines with Alkynoates through C–H/N–H/C–C Bond Cleavage. *J. Org. Chem.* **2021**, *86* (8), 5805–5819. https://doi.org/10.1021/acs.joc.1c00256.

(3) Konjuchow, N. No Title. *Zh. Obs. Khim.* **1962**, *32*, 2703–2745.

(4) Knaab, T. C. Synthese Und Antiplasmodiale Evaluation Neuer Arylaminoalkohol Analoga. Ph.D. Thesis, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2018.

(5) Tagawa, Y.; Yamashita, K.; Higuchi, Y.; Goto, Y. Improved Oxidation of Active Methyl Group of N-Heteroaromatic Compounds by Selenium Dioxide in the Presence of Tert-Butyl Hydroperoxide. *Heterocycles* **2003**, *60* (4), 953–957. https://doi.org/10.3987/com-02-9702.

(6) Achremowicz, L. A New Approach to the Oxidation of Methylquinolines with Selenium Dioxide. *Synth. Commun.* **1996**, *26* (9), 1681–1684.

https://doi.org/10.1080/00397919608002606.

(7) Fan, Y.-C.; Du, G.-F.; Sun, W.-F.; Kang, W.; He, L. N-Heterocyclic Carbene-Catalyzed Cyanomethylation of Aldehydes with TMSAN. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53* (17), 2231–2233. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2012.02.080.

(8) Knaab, T. C.; Moritz, A.; Pessanha de Carvalho, L.; Klein, S.; Lungerich, B.; Lohse, K.; Kruse, L.; Mombo-Ngoma, G.; Orta, L.; Thibaud, J. L.; de Villiers, K. A.; Fidock, D. A.; Burckhardt, B. B.; Held, J.; Wittlin, S.; Kurz, T. TKK130 Is a 3-Hydroxy-Propanamidine (HPA) with Potent Antimalarial In Vivo Activity and a High Barrier to Resistance. *J. Med. Chem.* **2025**, *68* (1), 95–107. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.4c01465.

## 3.2 Synthese des Lumefantrin-basierten 3-Hydroxypropanamidins **LVIII**

### 3.2.1 Retrosynthese des Lumefantrin-basierten 3-Hydroxypropanamidins **LVIII**

Zunächst sollte ein 3-HPA **LVIII** mit einem Lumefantringrundkörper in Region A dargestellt werden *(Abbildung 24)*.

Da für die Synthese der angestrebten Lumefantrin-basierten 3-HPAs bislang keine etablierte Syntheseroute beschrieben ist, wurde zunächst eine retrosynthetische Analyse zur Planung der Synthesestrategie durchgeführt.

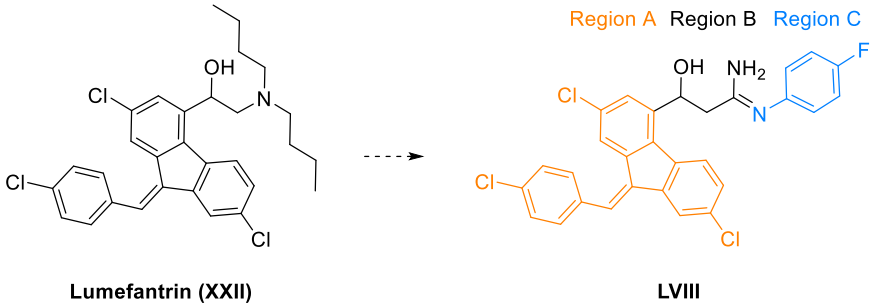
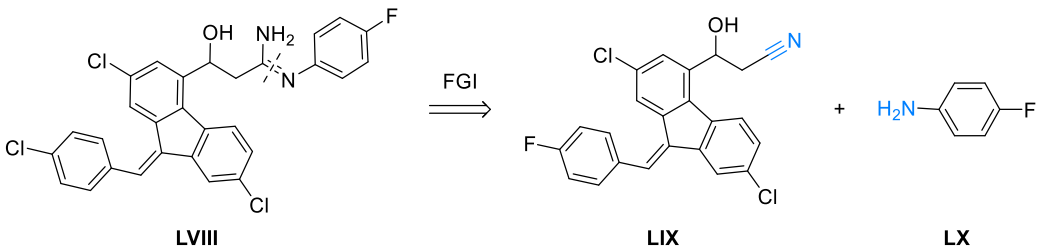


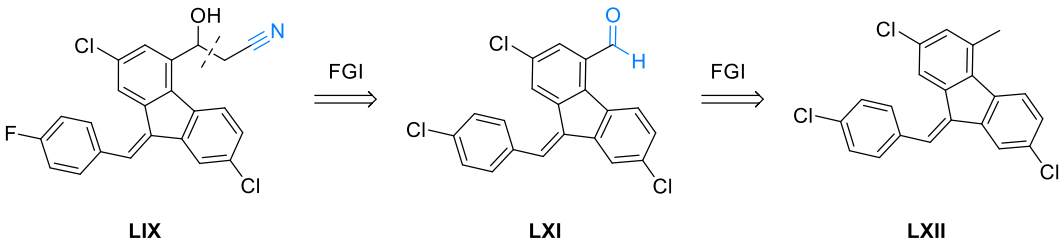

*Abbildung 24: Die Zielstruktur **LVIII**, ein auf Lumefantrin (**XXII**) als Grundkörper basierendes 3-Hydroxypropanamidin.*

Retrosynthetisch lässt sich das 3-HPA **LVIII** über eine funktionelle Gruppeninterkonversion (FGI) auf das Nitril **LIX** als Vorläufer für die Einführung der Amidinfunktionalität zurückführen *(Schema 16)*.



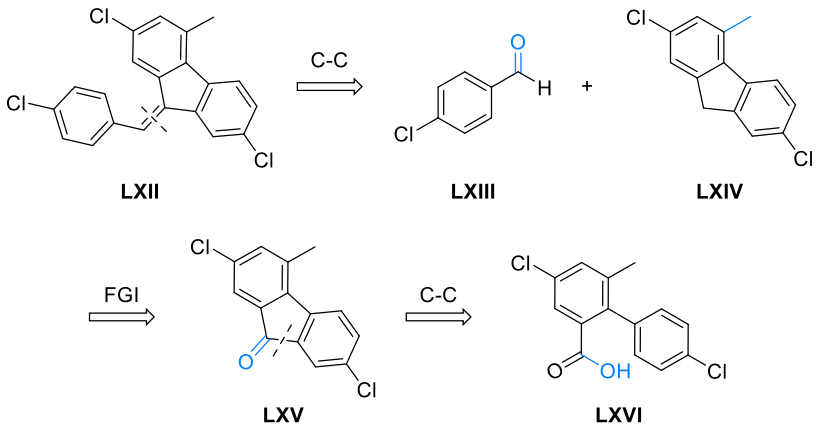

*Schema 16: Retrosynthetische Analyse des 3-HPAs **LVIII**.*

Das Nitril **LIX** ergibt sich formal aus einer weiteren FGI aus dem Aldehyd **LXI**. Auch das Aldehyd **LXI** kann im Rahmen einer FGI aus dem Methyl-funktionalisierten Lumefantrinbaustein **LXII** erschlossen werden (*Schema 17*).



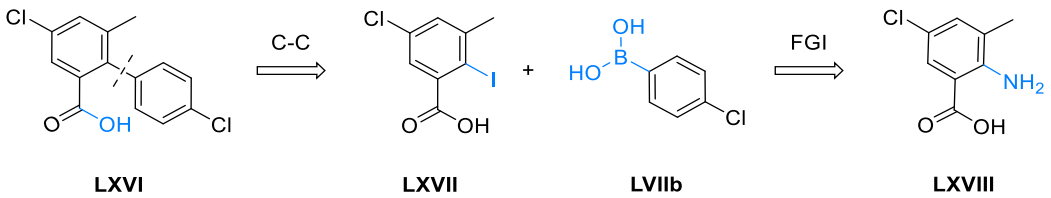

*Schema 17: Retrosynthetische Analyse des Nitrils **LIX** über den entsprechenden Aldehyd **LXI**.*

Die zentrale Dissektion erfolgt entlang der neugebildeten C-C-Bindung im Lumefantrin-Baustein **LXII**, wodurch er sich retrosynthetisch in das Aldehyd **LXIII** und das Fluoren **LXIV** zerlegen lässt. Das Fluoren **LXIV** kann seinerseits über eine FGI aus dem entsprechenden Fluorenon **LXV** abgeleitet werden. Dieses lässt sich wiederum über einen C-C-Bindungsbruch auf das Biphenyl-Intermediat **LXVI** zurückführen *(Schema 18).*




*Schema 18: Retrosynthetische Analyse zum Aufbau des Lumefantrin-Bausteins* ***LXII****.*

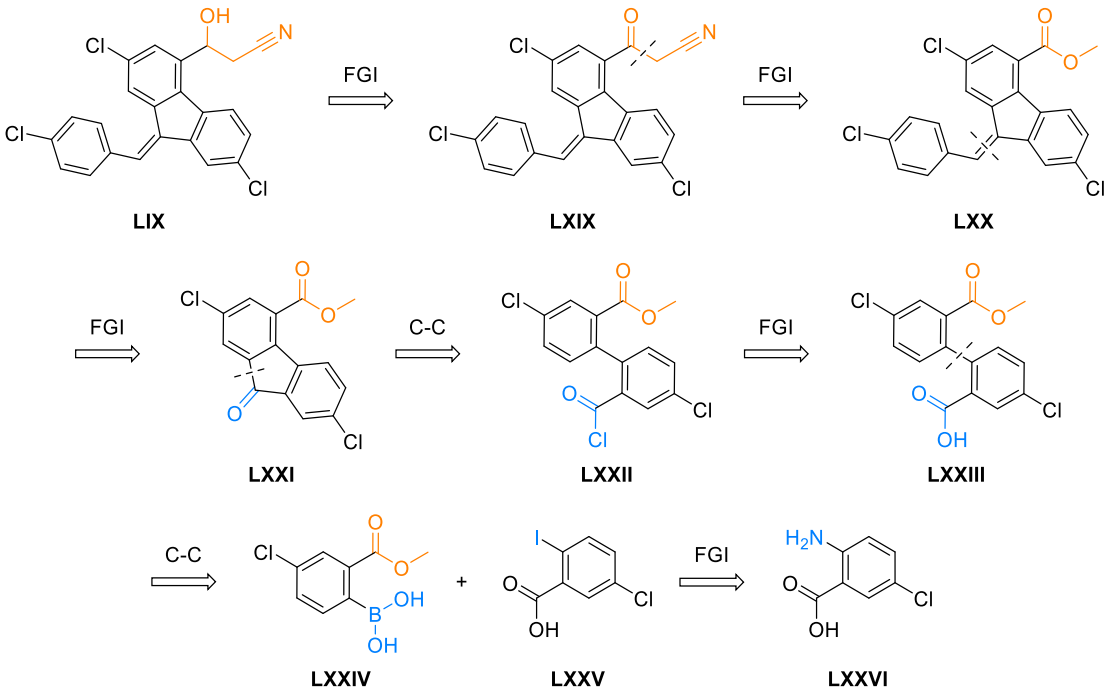
Das Biphenyl **LXVI** kann retrosynthetisch auf die Boronsäure **LVIIb** und die Iodmethylbenzoesäure **LXVII** zurückgeführt werden, die durch einen C-C-Bindungsbruch als mögliche Synthesebausteine identifiziert werden können. Eine FGI ermöglicht den Zugang zum entscheidenden Iodmethylbenzoesäure-Derivat **LXVII** ausgehend von der Anthranilsäure **LXVIII** (*Schema 19*).




*Schema 19: Retrosynthetische Analyse zur initialen Synthesestrategie zum Aufbau des Biphenyls* ***LXVI****.*

Ein alternativer retrosynthetischer Zugang zum Lumefantrin-basierten 3-Hydroxypropanamidin-Grundkörper **LIX** erschließt sich aus dem frühzeitigen Funktionalisieren des Biarylsystems. Aufgebaut wird der Grundkörper über stärker vorfunktionalisierte Zwischenstufen.

Das *β*-Hydroxynitril **LIX** wird hier ausgehend vom Ester **LXX** in zwei aufeinanderfolgenden FGIs erschlossen. Die Einführung der Fluorenon-Struktur erfolgt dabei ebenfalls über eine nachfolgende FGI. Die weitere Dissektion erfolgt über einen strategischen C-C-Bindungsbruch zu der Boronsäure **LXXIV** und dem Iodobenzoesäure-Derivat **LXXV**, die als geeignete Kupplungspartner fungieren *(Schema* 20*).*



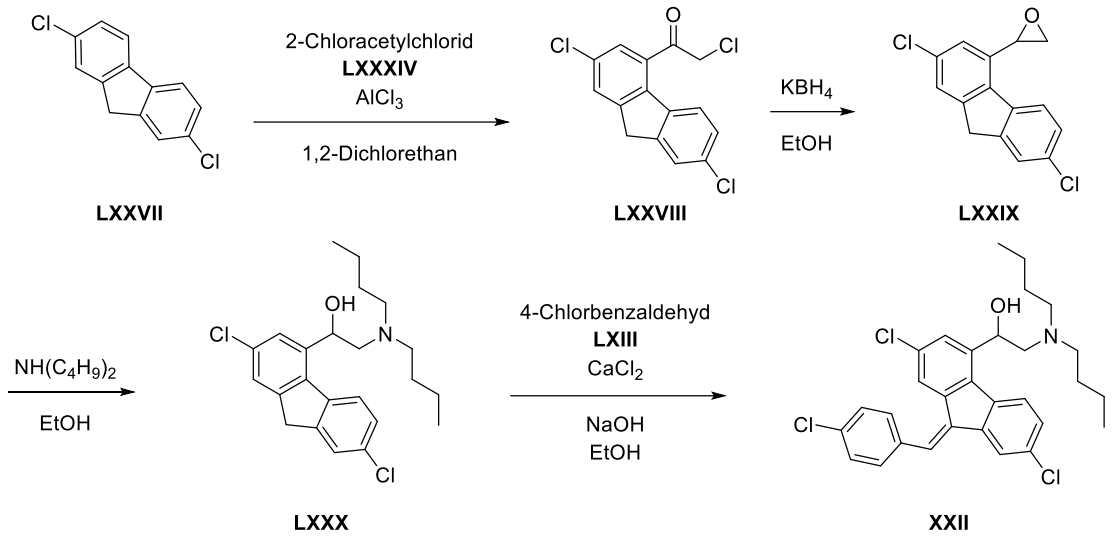

*Schema 20: Alternative retrosynthetische Analyse eines mehrschrittigen Aufbaus des Lumefantrin-Bausteins* ***LIX****.*

Diese Syntheseroute ermöglicht gegenüber der ersten Syntheseroute einen Zugang zu gezielten Variationen am Substitutionsmuster des Aromaten, da in späteren Syntheseschritten Benzoesäurederivate anderen Funktionalisierungsstrategien zugänglich sind als entsprechende Methylsubstituenten. Sie bietet damit eine ergänzende Strategie zur frühen Ringschlussvariante.

### 3.2.2 Literaturübersicht zur Darstellung von Lumefantrin **XXII**

Erstmals wurde Lumefantrin innerhalb des Projekts „Project 523“, das 1967 initiiert wurde, synthetisiert.[172]

Daraufhin wurde dieser klassische Syntheseweg in diversen Vorschriften zitiert. Er führt in einer Friedel-Crafts-Acetylierung ausgehend vom 2,7-Dichlorfluoren **LXXVII** mit 2-Chloracetylchlorid **LXXXIV** zum in 4-Position acetylierten Fluoren **LXXVIII**. In einer anschließenden Reduktion, beispielsweise mit $KBH_4$, lässt sich das Oxiran **LXXIX** synthetisieren. Unter basischen Bedingungen wird die Dibutylaminoethanol-Seitenkette eingeführt, indem das Oxiran geöffnet wird. Die bei dieser Epoxidöffnung gebildeten stereogenen Zentren werden in diesem Syntheseweg nicht gezielt kontrolliert. *Knoevenagel*-ähnliche Reaktion des Fluorens **LXXX** mit 4-Chlorbenzaldehyd **LXIII** führt die Chlorbenzyliden-Funktionalität ein, sodass Lumefantrin **XXII** entsteht (*Schema 21*).[202]

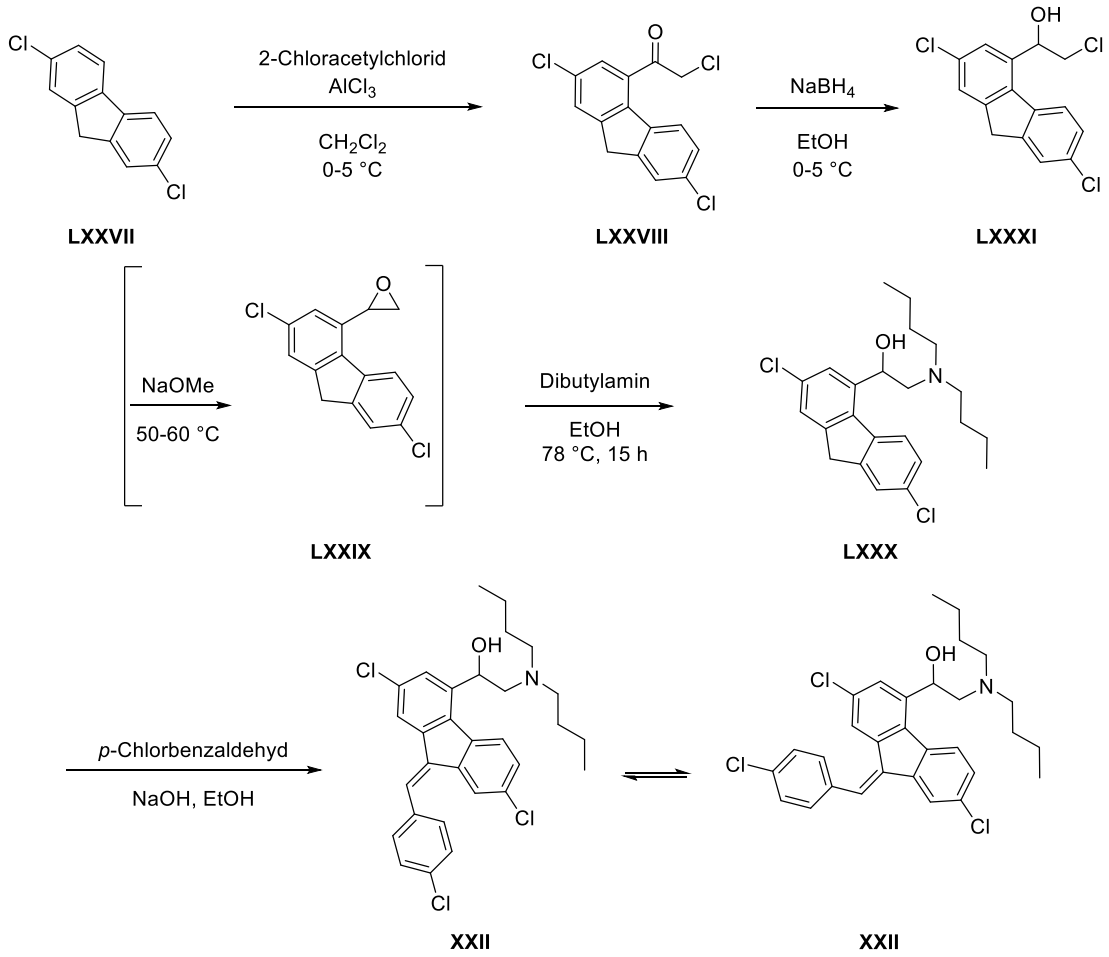



*Schema 21: Synthese des Lumefantrins **XXII** nach Liu et al.*[202]

Um die Isolation des instabilen Epoxids **LXXIX** zu umgehen, entwickelten *Beutler* et al. bei *Novartis* im Jahr 2007 eine Ein-Topf-Synthesesequenz, in der die Hydroxyverbindung **LXXXI** direkt zu dem Aminoalkohol **LXXX** umgesetzt wurde.

Dabei wurde das Chloracetyl-Intermediat **LXXVIII** mit $NaBH_4$ zur Hydroxyverbindung **LXXXI** reduziert. Unter basischen Bedingungen wurde daraufhin das Epoxid **LXXIX** gebildet und sofort mit Dibutylamin zu **LXXX** umgesetzt. Dies führte zu einer Reduktion des Arbeitsaufwandes.

Da sich die Syntheseroute nach *Beutler* et al. auf die Optimierung selektierter Prozessschritte fokussiert und nicht für alle Reaktionen vollständige Reaktionsbedingungen darstellt, wurden in *Schema 22* nur die in der Publikation explizit angegebenen Reaktionsbedingungen aufgeführt.[203]




*Schema 22: Synthese des Lumefantrins **XXII** nach Beutler et al.*[203]

Zudem wurde die *Knoevenagel*-Reaktion hinsichtlich Base, Temperatur, Zeit und Lösungsmittel untersucht. Dies sollte das Entstehen von *E*- und *Z*-Isomeren verhindern, konnte jedoch keine selektive Synthese des *Z*-Isomers erzielen. Es konnte auf diesem Weg lediglich ein thermodynamisches Gleichgewicht zwischen *E*- und *Z*-Isomer hergestellt werden. Da das *Z*-Isomer unter den gewählten Kristallisationsbedingungen eine geringere Löslichkeit aufweist, konnte es mit 2-Propanol oder Hexan aufgereinigt werden.[203]

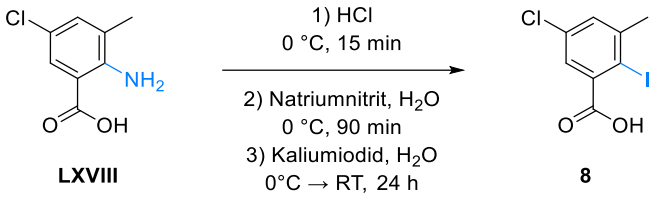
### 3.2.3 Synthese und Diskussion des Lumefantrin-basierten 3-Hydroxypropanamidins

Basierend auf der retrosynthetischen Analyse wurde die Synthese des Zielbausteins gemäß den im Nachfolgenden dargestellten Reaktionssequenzen, angelehnt an *Liu* et al. und *Beutler* et al., umgesetzt.[202,203]

Zunächst wurde in einer klassischen *Sandmeyer*-Synthese das aromatische Amin der Anthranilsäure **LXVIII** durch einen Iod-Substituenten ersetzt, sodass Verbindung **8** entstand. Die Sandmeyer-Synthese wurde erstmals 1884 durch *Traugott Sandmeyer* beschrieben.[204]

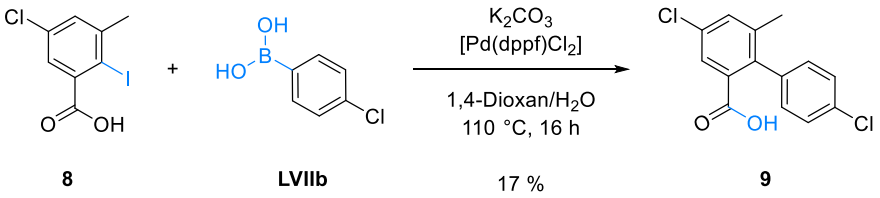
Die praktische Umsetzung dieser Reaktion ausgehend von 5-Chlor-2-aminobenzoesäure **LXXII** zur Synthese der 5-Chlor-2-Iodbenzoesäure **8** erfolgte angelehnt an eine Vorschrift nach *Guilbault* et al.[205] Nach einer Diazotierung mit Natriumnitrit

wurde das Diazoniumsalz mit Kaliumiodid zur gewünschten 5-Chlor-2-Iodbenzoesäure **8** umgesetzt (*Schema 23*).[205]




*Schema 23: Synthese der 5-Chlor-2-Iodbenzoesäure **8** nach Guilbault et al.*[205]

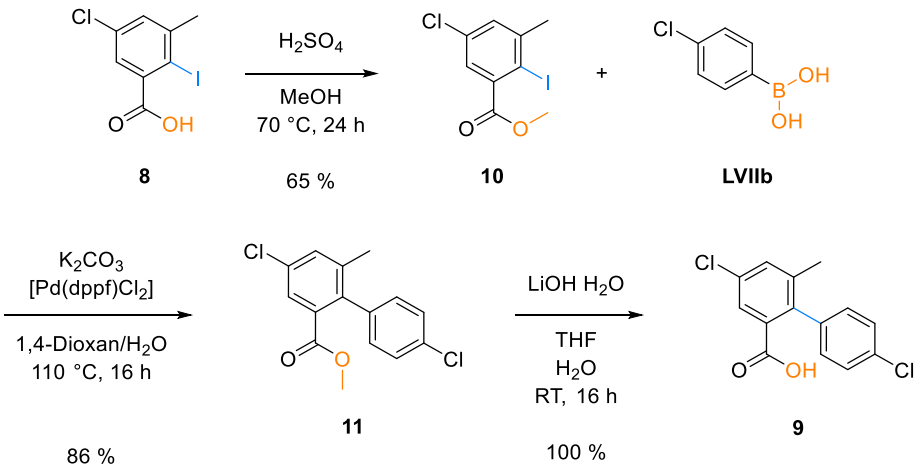
Im zweiten Schritt wurde die 5-Chlor-2-Iodbenzoesäure **8** in einer Suzuki-Miyaura-Kupplung mit einem boronsäurefunktionalisierten Arylbaustein **LVIIb** zum Biaryl **9** umgesetzt *(Schema 24)*.[206]




*Schema 24: Suzuki-Miyaura-Kupplung zur Darstellung des Biaryls **9**.*

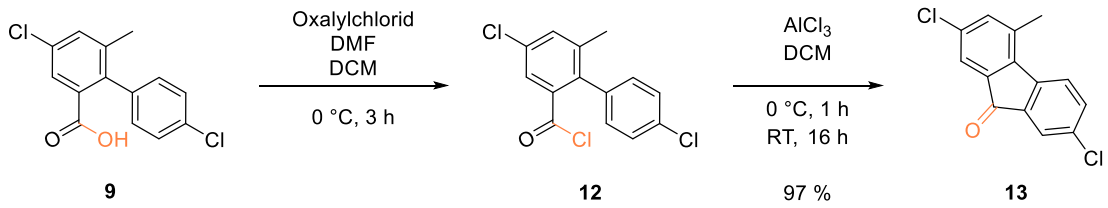
Die Suzuki-Miyaura-Kupplung der Boronsäure **LVIIb** und der Benzoesäure **8** führte nur zu einer sehr geringen Ausbeute (17 %). Die niedrige Ausbeute könnte darauf zurückzuführen sein, dass die freie Carbonsäure unter den basischen Reaktionsbedingungen als Carboxylat vorliegt, das an das Palladiumzentralatom koordinieren und so den Katalysezyklus hemmen kann. Die Koordination von Carboxylaten an Palladium-Komplexe wird in der Literatur, beispielsweise durch *Dutta* et al., vermehrt beschrieben.[207]

Um diese Koordination zu umgehen, wurde die Carboxylgruppe der Verbindung **8** vor der Kreuzkupplung zum Methylester **10** verestert. Die anschließende Suzuki-Miyaura-Kupplung führte zu einer deutlich verbesserten Ausbeute von 86 %. Nach der Suzuki-Miyaura-Kupplung konnte der Ester der Verbindung **11** unter milden Bedingungen wieder quantitativ (100 %) gespalten werden. Dadurch entstand die Biphenylcarbonsäure **9**. Diese zweistufige Variante stellt somit eine deutlich vorteilhaftere Syntheseroute dar als die direkte Kupplung aus der freien Carbonsäure *(Schema 25)*.



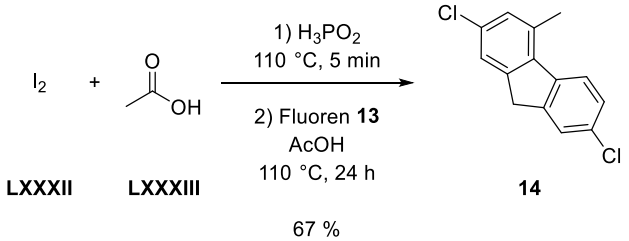

*Schema 25: Aufbau der Biphenylcarbonsäure **9**.*

Durch die Reaktion der Benzoesäure **9** mit Oxalylchlorid wurde das Benzoylchlorid **12** dargestellt, bevor es ohne Aufarbeitung direkt im Anschluss wieder eingesetzt wurde.[208] Bei dieser Reaktion wird unter säurekatalytischen Bedingungen durch Einsatz von Oxalylchlorid die Carbonsäure **9** aktiviert. In einer intramolekularen Friedel-Crafts-Acylierung des Benzoylchlorids **12** konnte das entsprechende Fluorenon-Derivat **13** erhalten werden. Die Cyclisierung zu **13** erfolgt, angelehnt an eine Vorschrift nach *Çetinkaya* et al., durch einen elektrophilen Angriff des Aromaten an das Säurechlorid *(Schema 26)*.[209] Dabei koordiniert $AlCl_3$ an den Carbonylsauerstoff und verringert so die Elektronendichte am Carbonylkohlenstoff. Die Bindung wird stark polarisiert, wodurch die intramolekulare elektrophile aromatische Substitution erleichtert wird.



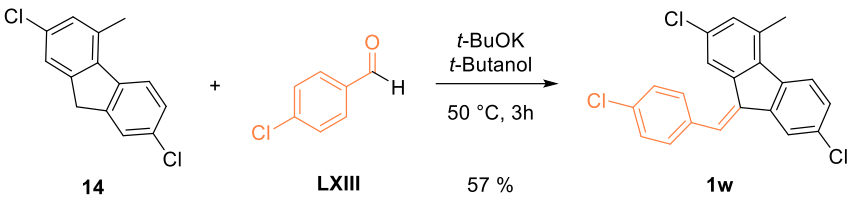

*Schema 26: Aufbau des Fluorenon **13**.*

Das Keton **13** wurde anschließend in Anlehnung an *Hicks* et al. zu der Verbindung **14** mit einer Methylenkohlenstoffbrücke reduziert. Hierbei wurde Hypophosphorsäure als mildes Reduktionsmittel eingesetzt (*Schema 27*).[210]




*Schema 27: Reduktion des Fluorenon **13** zum Fluoren **14**.*

In einer *Knoevenagel*-ähnlichen, basenkatalysierten Kondensation nach *Yang* et al. konnte das chlorierte Benzylidenfluoren-Derivat **1w** in einer moderaten Ausbeute von 57 % dargestellt werden (*Schema 28*).[211]




*Schema 28: Funktionalisierung des Fluorens **14** zur Darstellung des Bausteins **1w**.*

Die Bildung eines E/Z-Isomerengemischs an der neu gebildeten Doppelbindung führte zu Signalaufspaltungen und Überlagerungen in den NMR-Spektren.

Im $^{1}$H-NMR-Spektrum zeigen sich im aromatischen Bereich ($\delta$ 7.1 - 7.8 ppm) zehn Signale (1), die in vielen, teilweise überlappenden Multipletts erscheinen. Die Fragmentierung der Signale ist auf eine Überlagerung mehrerer Protonen der E/Z-Isomere zurückzuführen. Wird die Gesamtzahl der aromatischen Protonen (10 H) integriert und addiert, entspricht sie der berechneten Zahl und bestätigt die Bildung des Zielprodukts *(Abbildung 25)*. Im aliphatischen Bereich weisen zwei Singuletts ($\delta$ 2.6 ppm) (2) auf das Vorliegen der Methylgruppe im Baustein **1w** hin. Die Aufspaltung in zwei Singuletts ist auf das E/Z-Isomerengemisch zurückzuführen, wobei jedes Isomer ein separates Signal liefert. Die Integrale der beiden Signale (1.85 H und 1.15 H) entsprechen einem Isomerenverhältnis von 62:38. Eine eindeutige Zuordnung der Signale zu den jeweiligen *E*- bzw. *Z*-Isomeren war auf Grundlage der vorliegenden Daten nicht möglich.

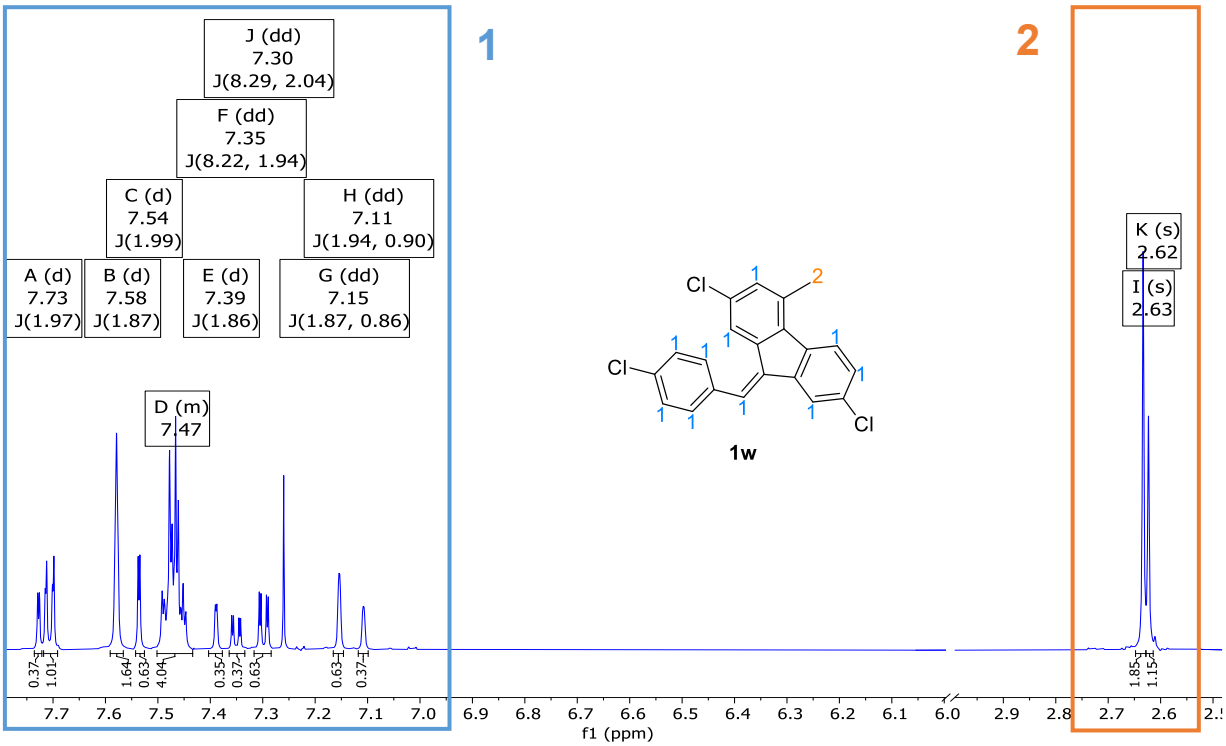
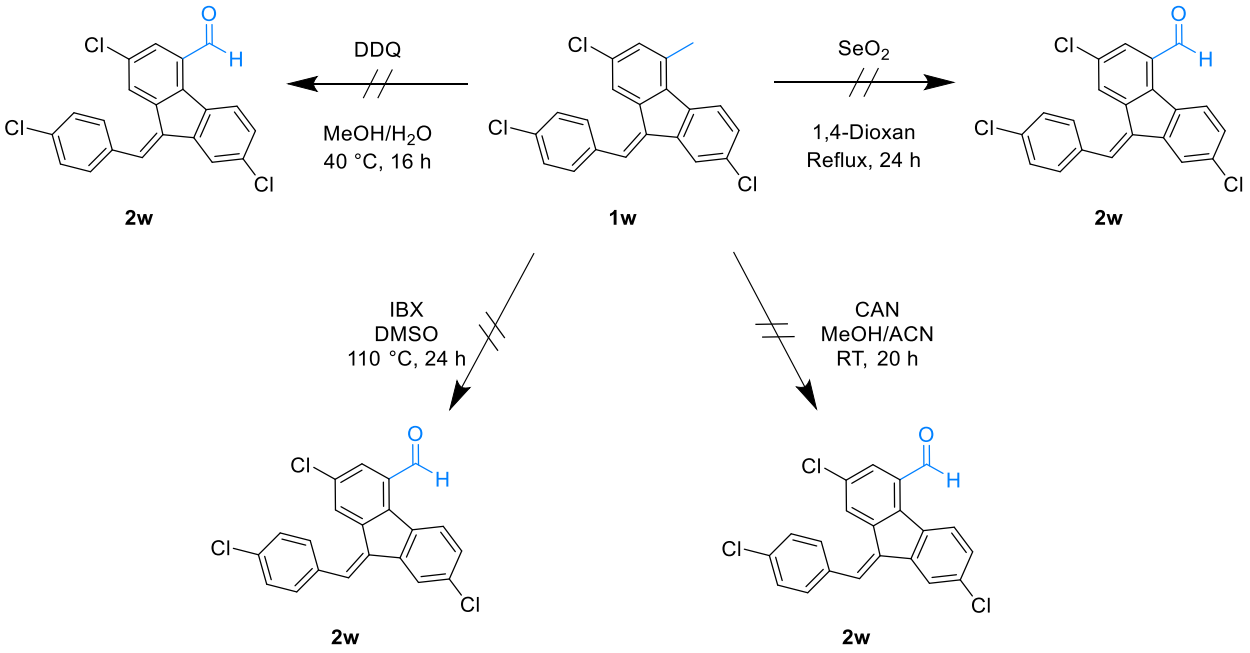



*Abbildung 25: NMR-Spektrum der Verbindung **1w**.*

Eine gezielte Trennung der Isomere wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt, da die Isomerentrennung nicht Gegenstand der Untersuchungen war. Dieses Vorgehen erscheint vertretbar, da für strukturell verwandte Wirkstoffe wie Lumefantrin auf eine isolative Trennung der *E/Z*-Isomere nicht selten verzichtet wird. Häufig weisen beide Isomeren vergleichbare physikochemische Eigenschaften auf und die biologische Aktivität wird nicht wesentlich beeinflusst.[203]

Für die daraufhin geplante Oxidation der Methylfunktionalität des Fluorens **1w** zum Aldehyd **2w** wurde eine Reihe literaturbekannter oxidativer Bedingungen getestet. Die Oxidation mit Selen(IV)-oxid zeigte keinen Umsatz, sodass das Fluoren **1w** zurückisoliert wurde.

Als alternatives Oxidationsreagenz wurde DDQ eingesetzt. Unter den getesteten Bedingungen konnte jedoch kein Umsatz von **1w** mittels HPLC-Chromatographie detektiert werden, woraufhin das Edukt unverändert wiedergewonnen wurde (*Schema 29*).




*Schema 29: Verschiedene Oxidationsversuche zur Darstellung des Aldehyds **2w** ausgehend von **1w**.*

Der Einsatz von IBX als Oxidationsmittel zeigte bei den getesteten Bedingungen keine Reaktion zum Aldehyd **2w**. Stattdessen bildete sich hier das entsprechende Fluorenon **13** (*Abbildung 26*).[212]

Auch der Gebrauch von Cer(IV)-ammoniumnitrat führte in kürzester Zeit zum Entstehen des Fluorenons **13**. Die Vermutung, dass bei dieser Reaktion das Fluorenon **13** gebildet wird, wird gestützt durch die Verlaufskontrolle der Reaktion mittels HPLC-Chromatographie. Bereits nach zwei Stunden Reaktionszeit lagen neben 77 % des nicht umgesetzten Fluorens **1w** 14 % des Fluorenons **13** vor. Nach weiteren 20 h Reaktionszeit wurden 26 % Fluorenon **13** (**blau**) sowie

60 % Edukt **1w** (**orange**) mithilfe der HPLC-Chromatographie nachgewiesen, woraufhin die Reaktion abgebrochen wurde *(Abbildung 26)*.[213]

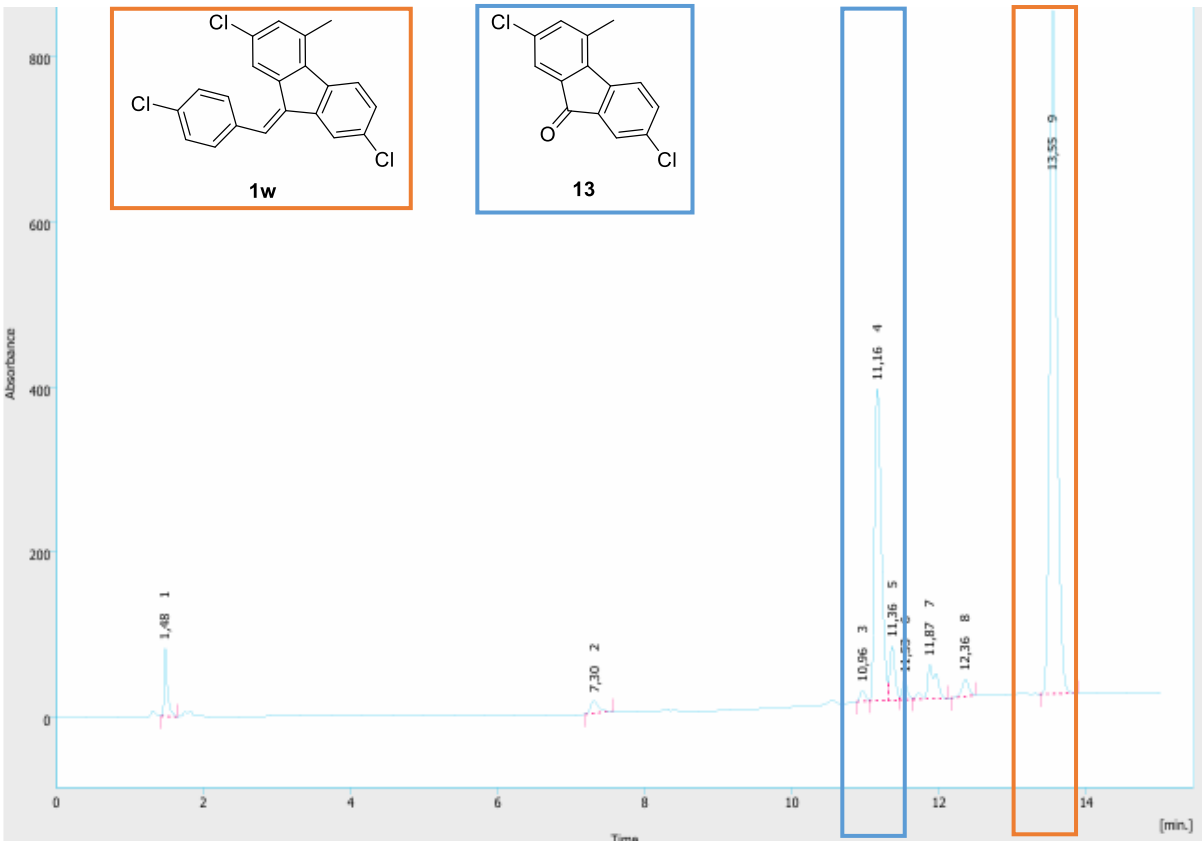
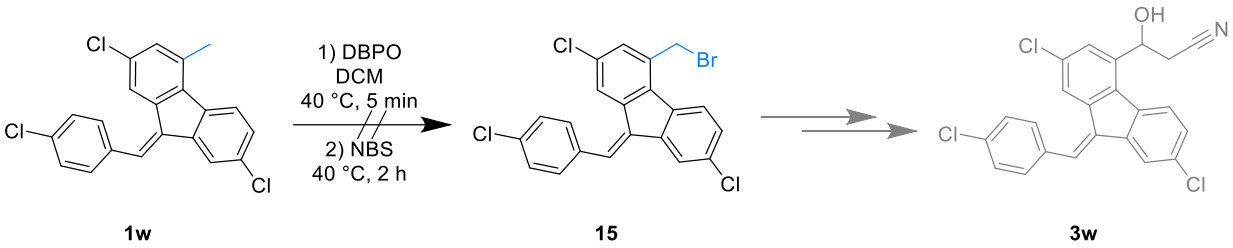



*Abbildung 26: HPLC-Chromatogramm des Oxidationsversuchs der Methylgruppe von **1w** mit Ammoniumcernitrat. **Blau** = Fluorenon, **orangefarben** = Fluoren (Edukt).*

Insgesamt deutet das Screening zum Umsatz von **1w** darauf hin, dass das konjugierte System unter den getesteten Bedingungen oxidationsempfindlich ist und die 9-Fluorenonbildung als konkurrierender Pfad zur Oxidation der Methylgruppe bevorzugt stattfindet.
Auch wenn die Bildung des 9-Fluorenons aus dem Fluoren unter oxidativen Bedingungen in der Literatur nicht beschrieben ist, so wurde diese generelle Reaktivität durchaus beobachtet. *Amaya* et al. beschreiben, dass sich aus 9-Benzyliden-9*H*-Fluoren-Derivaten unter oxidativen Bedingungen Fluorenone bilden können.[214]

Da eine direkte Oxidation des Methyls **1w** zum Aldehyd **2w** unter den getesteten Bedingungen nicht erfolgreich implementiert werden konnte, wurde eine alternative Strategie zur Funktionalisierung erprobt. Hierbei sollte über eine benzylische Bromierung vom Methyl **1w** zu Verbindung **15** eine anschließende nukleophile Substitution erleichtert werden *(Schema 30)*.[215] Es konnte kein Umsatz detektiert werden und das Fluoren **1w** wurde unverändert zurückgewonnen. Die geplante Folgesequenz konnte nicht durchgeführt werden.

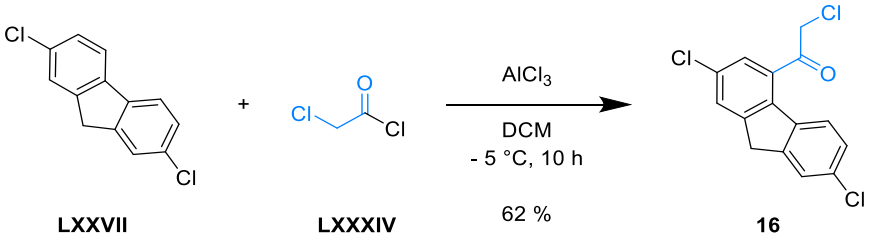



**1w** **15** **3w**

*Schema 30: Alternative Synthesestrategie zur Darstellung von **3w**.*

Um bei der Synthese des Lumefantrinbausteins die beobachtete oxidative Empfindlichkeit des Benzylidenfluorens **1w** zu umgehen, wurde die Syntheseroute umgestellt. Bei der angepassten Synthesestrategie wurde zunächst eine alternative Funktionalisierungsstelle am Fluorenbaustein **LXXVII** betrachtet. Anschließend sollte eine Einführung des 4-Chlorbenzaldehyd-Fragments erfolgen.

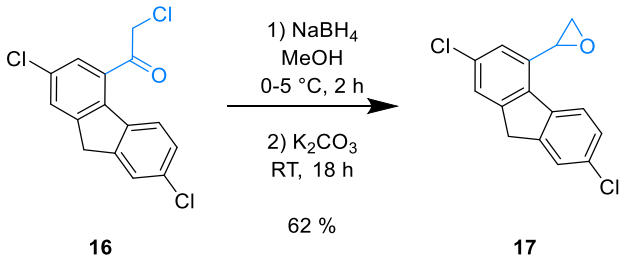
Dazu gelang zunächst eine Friedel-Crafts-Acetylierung unter Einsatz des 2-Chloracetylchlorid **LXXXIV** am Fluoren **LXXVII** in guten Ausbeuten *(Schema 31).*




**LXXVII** **LXXXIV** **16**

*Schema 31: Acetylierung zur Darstellung von Fluoren **16**.*

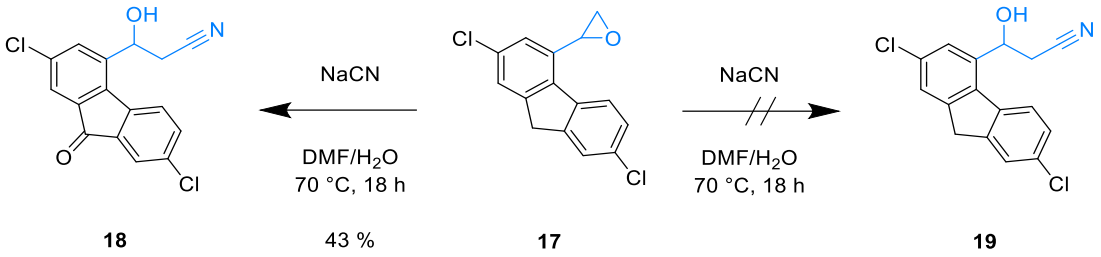
Eine Reduktion der Carbonylfunktion der Verbindung **16** durch Einsatz von Natriumborhydrid und die anschließende intramolekulare Cyclisierung führte in guten Ausbeuten zum entsprechenden Oxiran **17** *(Schema 32)*.




**16** **17**

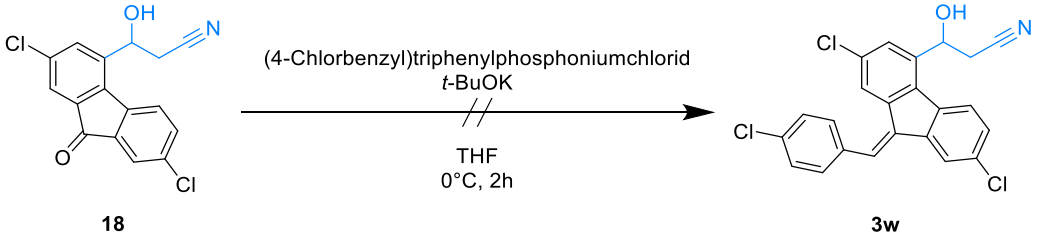
*Schema 32: Cyclisierung nach einer Vorschrift von AFRAXIS INC.*[216]

Die geplante nukleophile Ringöffnung des Oxirans **17** durch Natriumcyanid führte nicht wie geplant zu Produkt **19**. Als Hauptprodukt konnte erneut das entsprechende Fluorenon **18** identifiziert werden *(Schema 33).*



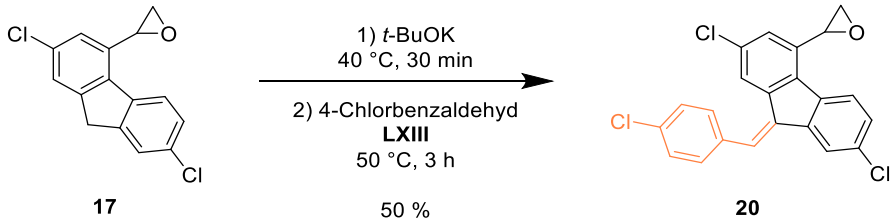

*Schema 33: Nukleophile Ringöffnung unter Einsatz von Natriumcyanid nach Wyeth LLC zur Darstellung des Nitrils **18**.*[217]

Anstatt das entstandene Fluorenon **18** als Nebenprodukt zu verwerfen, wurde getestet, ob es als Zwischenprodukt zur weiteren Funktionalisierung eingesetzt werden kann. Somit sollte in einer *Wittig*-Reaktion mithilfe von (4-Chlorbenzyl)triphenylphosphoniumchlorid das entsprechende Benzylidenfluoren **3w** synthetisiert werden.[218] Es wurde bei der Reaktion nicht selektiv das gewünschte Produkt, sondern ein komplexes Produktgemisch gebildet, das eine Isolation des Benzylidenfluorens **3w** nicht möglich machte (*Schema 34*).



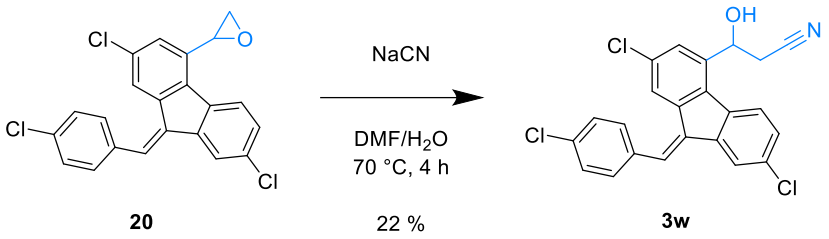

*Schema 34: Kondensation von Nitril **18** mit (4-Chlorbenzyl)triphenylphosphoniumchlorid.*[218]

Das Einführen der Benzylidenfunktionalität ausgehend vom Epoxid **17** lag in der baseninduzierten Umsetzung mit 4-Chlorbenzaldehyd **LXIII** nach *Yang* et al. Die moderate Ausbeute (50 %) von **20** lässt sich durch mögliche Nebenreaktionen infolge der begrenzten Stabilität der Benzylidenstruktur gegenüber Basen erklären. Durch die Deprotonierung des Fluorens mit *t*-BuOK als Base entsteht ein resonanzstabilisiertes Carbanion, das wiederum das Aldehyd nukleophil am Carbonylkohlenstoff angreift *(Schema 35)*.[211]



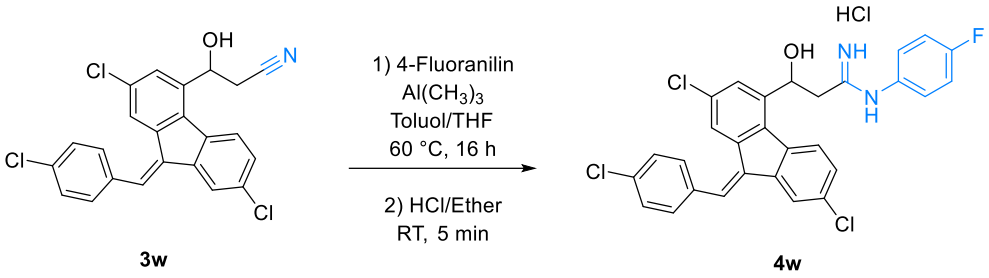

*Schema 35: Kondensation des Fluorens **17** mit 4-Chlorbenzaldehyd zum Oxiran **20**.*[211]

Anschließend konnte das Epoxid **20** mit Natriumcyanid in einer nukleophilen Addition nach einer Vorschrift von *PFIZER INC.* geöffnet werden, sodass das entsprechende *β*-Hydroxynitril **3w** entstand (*Schema 36*).[219]




*Schema 36: Epoxidöffnung von **20** mit Natriumcyanid zum Nitril **3w**.*[219]

Die Umsetzung des Nitrils **3w** erfolgte mit 4-Fluoranilin in Gegenwart von Trimethylaluminium analog zu den zuvor synthetisierten 3-HPAs **4** (*Schema 37*).




*Schema 37: Umsetzung des Nitrils **3w** analog zu der zuvor implementierten Route zum 3-HPA **4w**.*

Der Reaktionsverlauf wurde mithilfe von HPLC-Chromatographie überprüft, wobei schon nach 5 h Reaktionszeit das Entstehen des 3-HPAs **4w** beobachtet wurde. Nach 16 h wurde die Reaktion abgebrochen, da kein weiterer Umsatz beobachtet werden konnte. Durch LC-MS-Chromatographie konnte das Vorliegen des E/Z-Isomergemischs im Verhältnis 62 % zu 38 % nachgewiesen werden *(Abbildung 27)*.

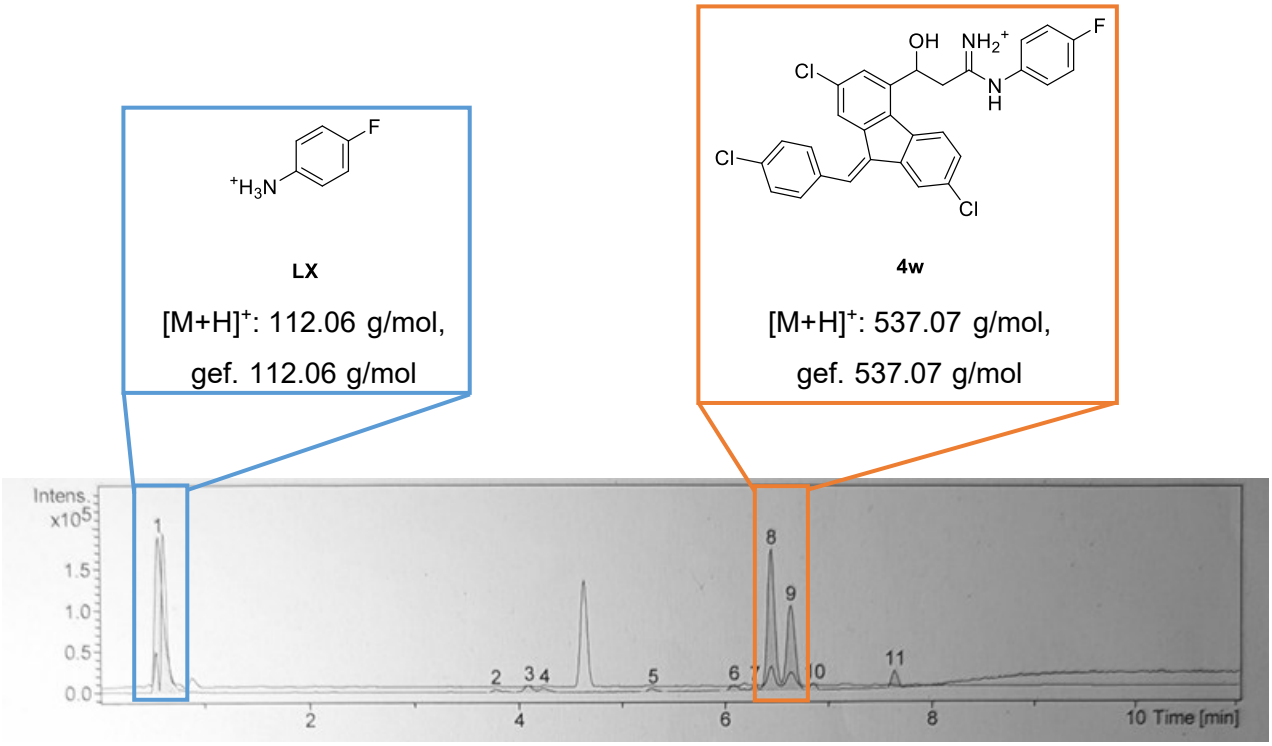



*Abbildung 27: LC-MS-Chromatogramm des Reaktionsansatzes zur Darstellung des 3-HPAs **4w**.*

Im Verlauf der Synthesesequenz konnten mehrere Schlüsselintermediate erfolgreich isoliert werden. Eine zentrale Herausforderung stellte während der Synthese die ausgeprägte oxidative Empfindlichkeit des Benzylidenfluoren-Systems dar. Verschiedene Reaktionsbedingungen zur Oxidation der Methylgruppe von **1w** zum Aldehyd **2w** führten zur Bildung des stabileren 9*H*-Fluoren-9-on **13** als Nebenprodukt oder zeigten keinen Umsatz des Edukts **1w**, sodass die ursprünglich geplante Synthesesequenz über das Aldehyd **2w** zum Nitril **3w** nicht weitergeführt werden konnte.

Zur Umgehung der Synthesesequenz wurde eine alternative Synthesestrategie entwickelt, bei der das Nitril **3w** nicht über das Aldehyd **2w**, sondern über das Epoxid **20** erfolgreich dargestellt werden konnte.

Die abschließende Umsetzung des Nitrils **3w** zum 3-HPA **4w** wurde analog zu den zuvor von *Knaab* et al. beschriebenen Bedingungen unter Einsatz von Trimethylaluminium und 4-Fluoranilin **LX** durchgeführt.[184] Die Bildung des Zielprodukts konnte eindeutig mittels LC-MS-Chromatographie nachgewiesen werden. Trotz der erfolgreichen Umsetzung im Reaktionsansatz erwies sich die Isolation des Produkts als schwierig. Selbst nach Umkristallisation aus Acetonitril und chromatographischer Trennung lag die Reinheit des E/Z-Isomerengemischs bei maximal 57 %, sodass eine vollständige strukturelle Charakterisierung mittels NMR-Spektroskopie nicht möglich war *(Abbildung 28)*.

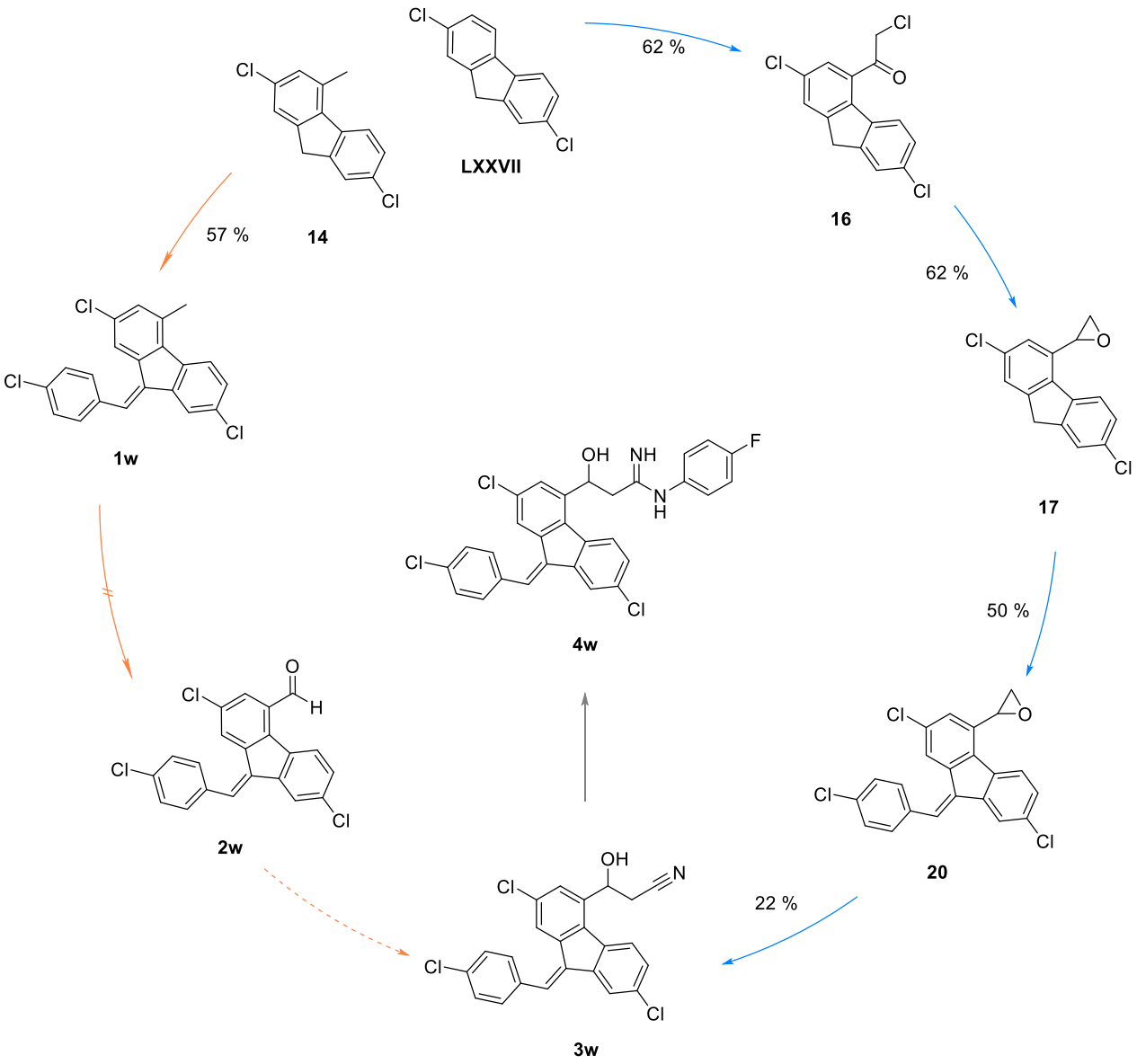



*Abbildung 28: Darstellung der zunächst geplanten Syntheseroute (orangefarben) und der letztendlich durchgeführten Syntheseroute (blau). Das 3-HPA **4w** wurde dabei nicht in ausreichender Reinheit isoliert.*

Insgesamt konnte somit ein synthetischer Zugang zum angestrebten 3-HPA **4w** aufgezeigt werden. Die prinzipielle Zugänglichkeit des Zielprodukts über den gewählten Syntheseweg ist gegeben, bedarf jedoch weiterer Optimierung. Insbesondere die Verbesserung der Synthesesequenz hinsichtlich der Minimierung konkurrierender Reaktionspfade und der Entwicklung geeigneter Methoden zur Aufreinigung sowie Trennung der E/Z-Isomere stellen zentrale Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen dar.

## 3.3 Synthese des Pyronaridin-basierten 3-Hydroxypropanamidins

### 3.3.1 Retrosynthese des Pyronaridin-basierten 3-Hydroxypropanamidins

Ein weiteres 3-HPA **LXXXV** sollte auf einem Pyronaridin-Gerüst in Region A basieren *(Abbildung 29).*

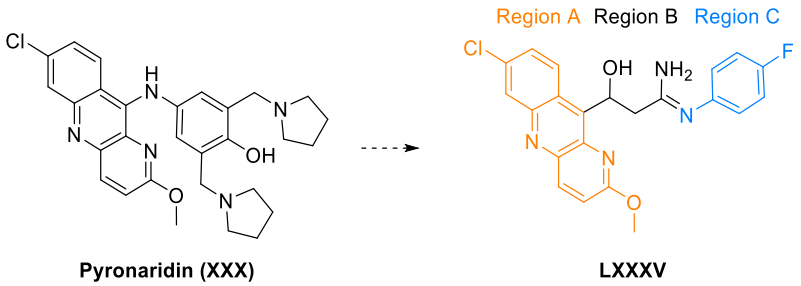
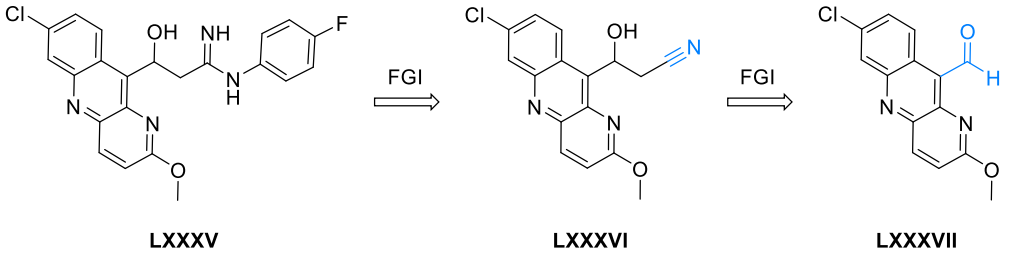


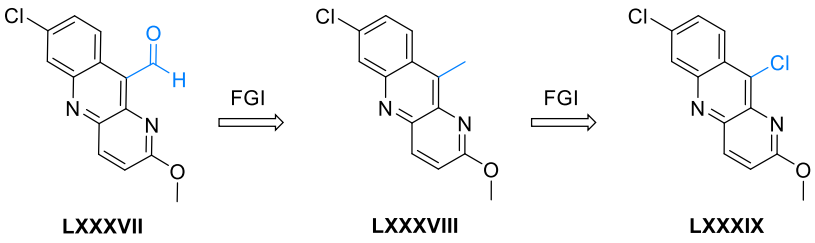

*Abbildung 29: Die Zielstruktur **LXXXV**, ein auf Pyronaridin **XXX** als Grundkörper basierendes 3-Hydroxypropanamidin.*

Retrosynthetisch lässt sich die Zielverbindung **LXXXV** durch eine FGI ausgehend vom Nitril **LXXXVI** darstellen. Das Nitril **LXXXVI** ergibt sich durch eine FGI aus dem Aldehyd **LXXXVII** *(Schema 38).*



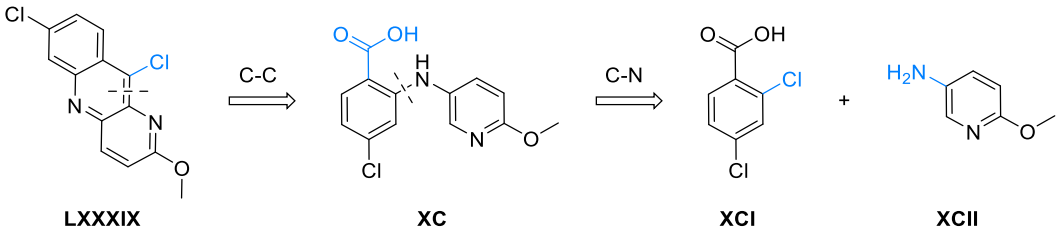

*Schema 38: Retrosynthetische Analyse des 3-HPAs **LXXXV** ausgehend vom entsprechenden Aldehyd **LXXXVII**.*

Der Aldehyd **LXXXVII** lässt sich über eine FGI aus dem entsprechenden Methylderivat **LXXXVIII** gewinnen. Das Methylderivat **LXXXVIII** wiederum kann auf das chlorierte Pyronaridin **LXXXIX** zurückgeführt werden *(Schema 39).*




*Schema 39: Retrosynthetische Analyse des Aufbaus des Aldehyds **LXXXVII**.*

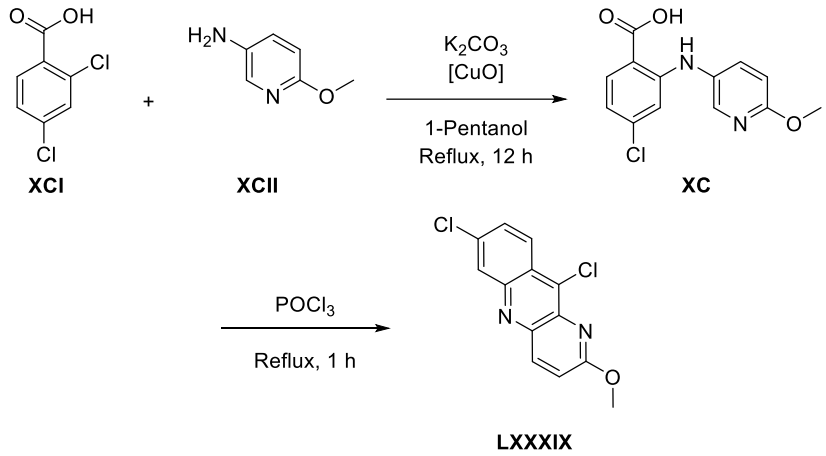
Die weitere Vereinfachung erfolgt über einen C-C-Bindungsbruch, sodass **LXXXIX** auf die Methoxypyridinaminobenzoesäure **XC** zurückgeführt werden kann. Über einen C-N-Bindungsbruch wird die Carbonsäure **XCI** und das Anilin **XCII** als mögliches Startmaterial identifiziert *(Schema 40).*




*Schema 40: Retrosynthetische Analyse des Aufbaus des Pyronaridin-Bausteins **LXXXIX**.*

## 3.3.2 Literaturübersicht zur Darstellung von Pyronaridin

Klassischerweise wird Pyronaridin im industriellen Maßstab nach *Zheng* et al. dargestellt. Erstmalig 1979 wird die mehrstufige Synthese ausgehend von 2,4-Dichlorbenzoesäure **XCI** und 6-Methoxypyridin-3-amin **XCII** in einer *Ullmann*-Kupplung mit einem anschließenden Ringschluss durch Phosphoroxychlorid zur Methoxypyridinaminobenzoesäure **XC** beschrieben (*Schema 41*).[220]




*Schema 41: Synthese des Pyronaridinbausteins **LXXXIX** nach Zheng et al.*[220]

Ein Nebenprodukt der Synthese ist das dreifach chlorierte Nebenprodukt 2,7,10-Trichlorbenzo[*b*][1,5]naphthyridin **XCIII** *(Abbildung 30)*.

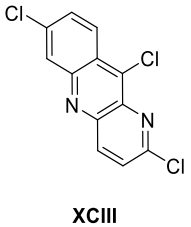


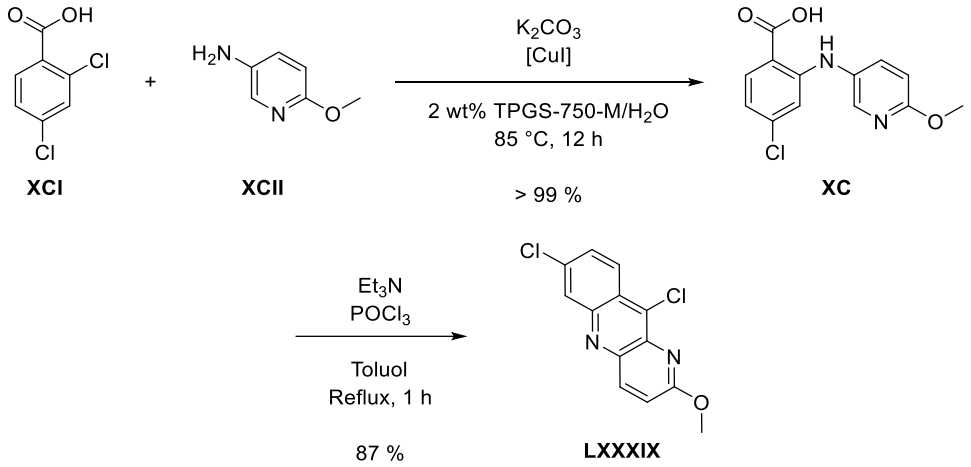

*Abbildung 30: 2,7,10-Trichlorbenzo[b]-1,5-naphthyridin **XCIII** als Nebenprodukt des Ringschlusses mit $POCl_3$.*

Durch die strukturelle Ähnlichkeit mit 7,10-Dichlor-2-methoxybenzo[*b*]-1,5-naphthyridin **LXXXIX** lässt sich das 2,7,10-Trichlor-Analogon **XCIII** schwer isolieren.[220]

*Li* et al. beschreiben für die *Ullmann*-Kupplung nach *Zheng* et al. eine Ausbeute von ca. 63 %.[221] Zur Erhöhung der Ausbeute wurde die *Ullmann*-Kupplung nach *Zheng* et al. im Jahr 2014 von *Lee* et al. angepasst, wobei verschiedene Kupferkatalysatoren getestet wurden. Es zeigte sich, dass ein Einsatz von Kupferiodid statt Kupfer(II)-oxid zu einer Steigerung der Ausbeute auf 75 % führte.[222]

Auch für den zweiten Schritt konnte eine um 30 % höhere Ausbeute erzielt werden, indem dem Phosphoroxychlorid das Lösungsmittel Ethylendichlorid (EDC) zugegeben wurde. Dabei bildet sich weniger von dem 2,7,10-Trichlor-Analogon **XCIII** als unerwünschtes Nebenprodukt, sodass zudem die Aufarbeitung erleichtert wird und 73 % des 7,10-Dichlor-2-methoxybenzo[*b*]-1,5-naphthyridin **LXXXIX** isoliert werden konnten.[222]

*Lipshutz* et al. entwickelten 2022 ein lösemittelarmes Verfahren, das den Einsatz von TPGS-750-M, einem wasserlöslichen Tensid, vorsieht.[223] In wässriger Lösung bildet TPGS-750-M kugelförmige Mizellen um lipophile organische Moleküle. Dies ermöglicht metallkatalysierte Kreuzkupplungen, wie beispielsweise die *Ullmann*-Reaktion, mit Wasser als Lösungsmittel (*Schema 42*).[224]




*Schema 42: Synthese des Pyronaridinbausteins **LXXXIX** nach Lipshutz et al.*[224]

## 3.3.3 Synthese und Diskussion des Pyronaridin-basierten 3-Hydroxypropanamidins

Im Rahmen der Syntheseplanung wurde zunächst eine auf der Literatur beruhende Synthese des Naphthyridins in Betracht gezogen. Da der entsprechende Heterozyklus **LXXXIX** jedoch kommerziell verfügbar war, wurde auf die eigene Darstellung verzichtet.

Die Einführung der Methylgruppe erfolgte über eine *Suzuki-Miyaura*-Kreuzkupplung zunächst unter den in *Tabelle 2* unter Eintrag 1 gegebenen Bedingungen. Dabei wurde $Pd(dppf)Cl_2$ als Katalysator eingesetzt. Über den zuvor an anderer Stelle beschriebenen palladiumkatalysierten Mechanismus (*Schema 11*) zeigte sich ein geringer Umsatz zum methylierten Naphthyridin **1x** von 16 % (Umsatz gemessen mit HPLC-Chromatographie, bezogen auf das Rohprodukt vor der Aufarbeitung) bei einer Reaktionszeit von 16 h.

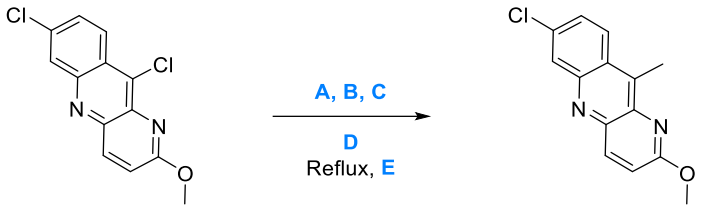
Daher wurden systematische Optimierungsversuche durchgeführt, bei denen schrittweise einzelne Reaktionsparameter variiert wurden und der Umsatz zum Rohprodukt mittels HPLC-Chromatographie überprüft wurde. Der teilweise geringe Umsatz zum methylierten Naphthyridin **1x** ist dabei überwiegend auf einen unvollständigen Umsatz des Edukts **LXXXIX** zurückzuführen. Es wurde keine ausgeprägte Bildung von Nebenprodukten beobachtet.

Aufgrund der schlechten Löslichkeit des Naphthyridins **LXXXIX** in Toluol wurde zunächst das Lösungsmittel auf ein THF/$H_2O$-Gemisch umgestellt. Zusätzlich erfolgte ein Wechsel der Base von Kaliumcarbonat zu Trikaliumphosphat. Bei einer Reaktionszeit von 16 h führte dies zu einem Eduktumsatz von 10 % (Eintrag 2). Eine Verlängerung der Reaktionszeit (Einträge 3-6) resultierte jedoch in einer kontinuierlichen Steigerung des Umsatzes zum Zielprodukt **1x** (bis auf 80 % nach 64 h).
Der Einsatz von Trimethylboroxin (TMB) statt Methylboronsäure (Eintrag 7) führte zu einem Umsatz von 45 % und somit zu einem stark gesteigerten Eduktumsatz verglichen mit den Standardbedingungen in Eintrag 1.
Ein Austausch des Katalysators zu Pd-PEPPSI-IPr unter Verwendung von 1,4-Dioxan als Lösungsmittel führte nach 16 h zu einem gegenüber den Standardbedingungen in Eintrag 1 gesteigerten Umsatz von 52 % (Eintrag 8).

Sowohl eine Verlängerung der Reaktionszeit (Einträge 3-6) als auch die Variation entweder des Boronsäurederivats (Eintrag 7) oder des Katalysators (Eintrag 8) führen zu einer verbesserten Bildung des Zielprodukts, ohne dass ein einzelner Parameter eindeutig als optimal identifiziert werden kann.

Für die weiteren Synthesen wurde aus ökonomischen Gründen das Reaktionssystem aus den Einträgen 2-6 gewählt. Zwar führten sowohl die Verwendung von TMB anstelle von Methylboronsäure (Eintrag 7) als auch der Einsatz von Pd-PEPPSI-IPr anstelle von $Pd(dppf)Cl_2$ (Eintrag 8) bei gleicher Reaktionszeit zu höheren Umsätzen, jedoch wurden die günstigeren Standardbedingungen aufgrund der geringeren Kosten der eingesetzten Reagenzien und Katalysatoren bevorzugt. Die damit verlängerte Reaktionszeit von bis zu 64 h wurde dabei in Kauf genommen, ist jedoch bezüglich der zeitlichen Effizienz als nachteilig einzustufen. Auch für die in Eintrag 7 und 8 beschriebenen Bedingungen ist davon auszugehen, dass eine Verlängerung der Reaktionszeit zu einer weiteren Steigerung des Produktanteils führen kann. Entsprechende Untersuchungen wurden jedoch aus zeitlichen Gründen nicht vorgenommen. (*Tabelle 2*).

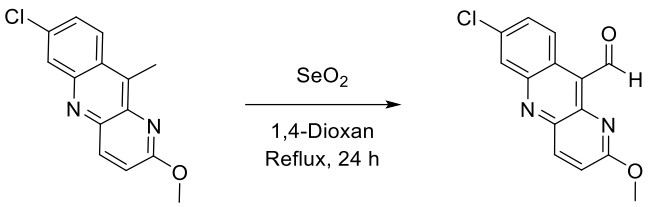
*Tabelle 2: Optimierungsversuche der Suzuki-Miyaura-Kupplung ausgehend von **LXXXIX** zur Darstellung von **1x**.*




**LXXXIX** **1x**

| Eintrag | Boronsäure **A** | Katalysator **B** | Base **C** | Lösungsmittel **D** | Zeit (h) **E** | Relativer Produktanteil (%) **1x** in der HPLC |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **1** | $MeB(OH)_2$ | $Pd(dppf)Cl_2$ | $K_2CO_3$ | Toluol | 16 | 16 |
| **2** | $MeB(OH)_2$ | $Pd(dppf)Cl_2$ | $K_3PO_4$ | $THF/H_2O$ | 16 | 10 |
| **3** | $MeB(OH)_2$ | $Pd(dppf)Cl_2$ | $K_3PO_4$ | $THF/H_2O$ | 20 | 38 |
| **4** | $MeB(OH)_2$ | $Pd(dppf)Cl_2$ | $K_3PO_4$ | $THF/H_2O$ | 26 | 46 |
| **5** | $MeB(OH)_2$ | $Pd(dppf)Cl_2$ | $K_3PO_4$ | $THF/H_2O$ | 40 | 64 |
| **6** | $MeB(OH)_2$ | $Pd(dppf)Cl_2$ | $K_3PO_4$ | $THF/H_2O$ | 64 | 80 |
| **7** | TMB | $Pd(dppf)Cl_2$ | $K_3PO_4$ | $THF/H_2O$ | 16 | 45 |
| **8** | $MeB(OH)_2$ | Pd-PEPPSI-IPr | $K_2CO_3$ | 1,4-Dioxan | 16 | 52 |

Die selektive Oxidation der Methylgruppe des Naphthyridins **1x** lief mit Selen(IV)-oxid in 24 h ab und führte zum entsprechenden Aldehyd **2x** *(Schema 43)*.[193] Im Verlauf der Methodenoptimierung wurden Ausbeuten zwischen 29 % und 94 % erzielt.

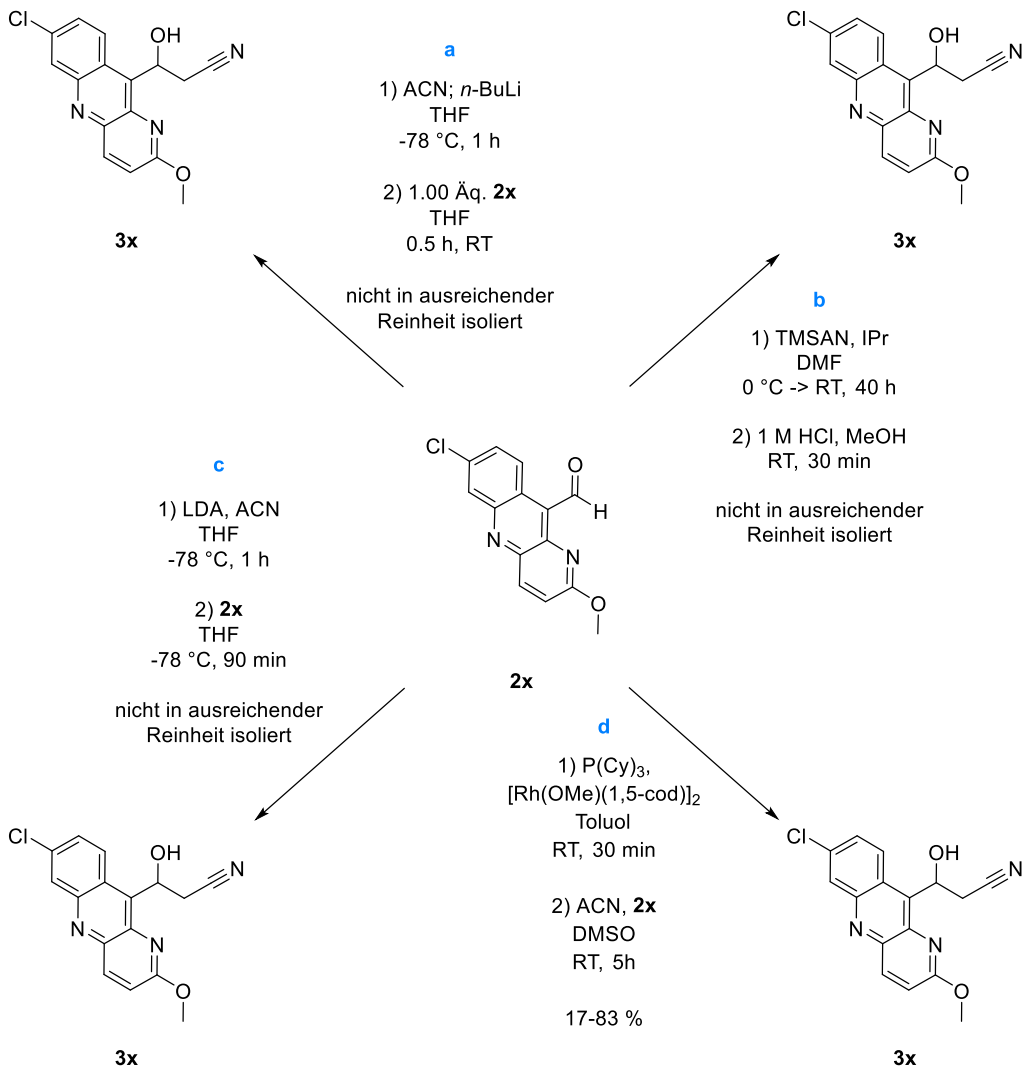



**1x** 29-94 % **2x**

*Schema 43: Oxidation mit Selen(IV)-oxid zu **2x**.*

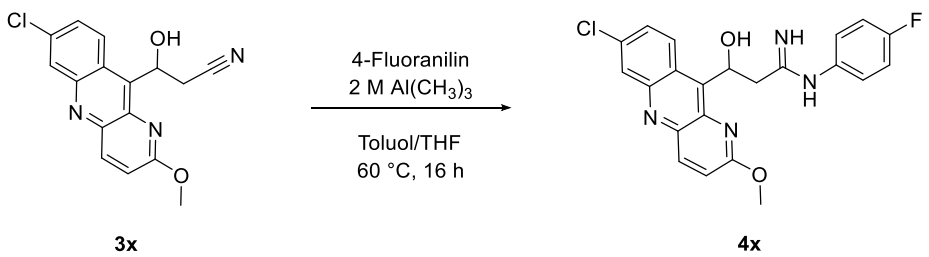
Zur Umsetzung des Aldehyds **2x** zum Nitril **3x** wurden verschiedene Reaktionsbedingungen erprobt. Die Umsetzung nach Standardbedingungen mit *n*-BuLi (**a**) beziehungsweise mit Lithiumdiisopropylamid (LDA, **c**) als Base führte zwar jeweils zur Bildung des gewünschten Nitrils **3x**, jedoch auch zur Entstehung eines komplexen Produktgemischs, sodass **3x** nicht in ausreichender Reinheit isoliert werden konnte.[184,225] Ein ähnliches Verhalten zeigte sich beim Einsetzen von Trimethylsilylacetonitril in einer Carben-katalysierten Reaktion (**b**) nach *Fan* et al.[200] Auch hier war eine zufriedenstellende Isolierung des Nitrils **3x** nicht möglich.

Schließlich gelang die Umwandlung zum Nitril **3x** unter Einsatz des Katalysators [Rh(OMe)(1,5-cod)] und unter Verwendung von Tricyclohexylphosphan als Ligand in katalytischen Mengen in Anlehnung an eine Vorschrift von *Goto et al.* (**d**).[226] Das Nitril **3x** konnte in mäßigen Ausbeuten isoliert werden *(Schema* 44*).*




*Schema 44: Rhodium-katalysierte Reaktion von Aldehyd **2x** zum Nitril **3x**.*

Nach *Knaab* et al. sollte das 3-HPA **4x** in einer Trimethylaluminium-vermittelten Synthese unter Einführung von 4-Fluoranilin synthetisiert werden.[184] Obwohl das Entstehen des Pyronaridin-Endprodukts **4x** analytisch bestätigt wurde, kann keine Ausbeute angegeben werden, da eine erfolgreiche Abtrennung von Nebenprodukten nicht möglich war *(Schema 45)*.

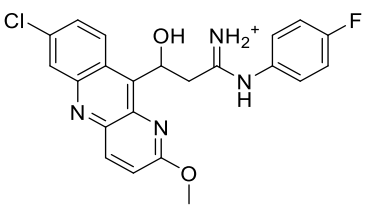



*Schema 45: Umsetzung des Nitrils **3x** mit 4-Fluoranilin zum 3-HPA **4x**.*

Die ersten fünf Schritte der Pyronaridinsynthese verliefen reproduzierbar und ergaben mäßige bis hervorragende Ausbeuten zwischen 42 und 94 %. Die Synthese des 3-HPAs **4x** im letzten

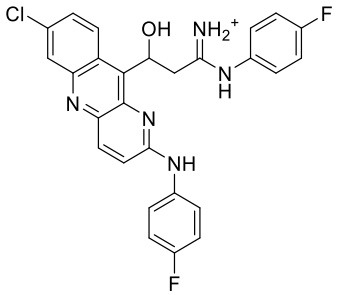
Schritt stellte den kritischen Punkt in der Synthese dar. Analytisch ist die Bildung des gewünschten Endprodukts **4x** aus massenspektrometrischer Sicht plausibel.

In der LC-MS-Analyse des zuvor via Säulenchromatographie aufgearbeiteten 3-HPAs **4x** wurde ein Signal bei 425.11 g/mol [M+H$^+$] gefunden, das sich dem gewünschten 3-HPA **4x** zuordnen lässt sowie eine Masse von 213.06 g/mol, die auf das zweifach protonierte **4x** [M+2H$^+$] zurückgeht. Zusätzlich wurde ein weiteres Signalpaar bei 504.14 (M+H$^+$) und 252.57 g/mol (M+2H$^+$) beobachtet, was auf die Bildung eines höhermolekularen Nebenprodukts **XCIV** hinweist. Die Massendifferenz im Vergleich zur Zielverbindung (+79 g/mol) deutet neben der Bildung des Amidins auf eine Addition von 4-Fluoranilin **LX** an den Heterozyklus hin. Produkt- sowie Nebenproduktpeak weisen das für chlorierte Verbindungen typische Isotopenmuster auf. Der Einsatz von Trimethylaluminium als Lewis-Säure könnte eine Substitution am Heterozyklus begünstigt haben *(Abbildung 31).*




**4x**

[M+H]$^+$ ber.: 425.12 g/mol
[M+2H]$^{2+}$ ber.: 213.06 g/mol
gef. 213.06 g/mol, 425.11 g/mol




**XCIV**

[M+H]$^+$ ber.: 504.14 g/mol
[M+2H]$^{2+}$ ber.: 252.57 g/mol
gef. 252.57 g/mol, 504.14 g/mol

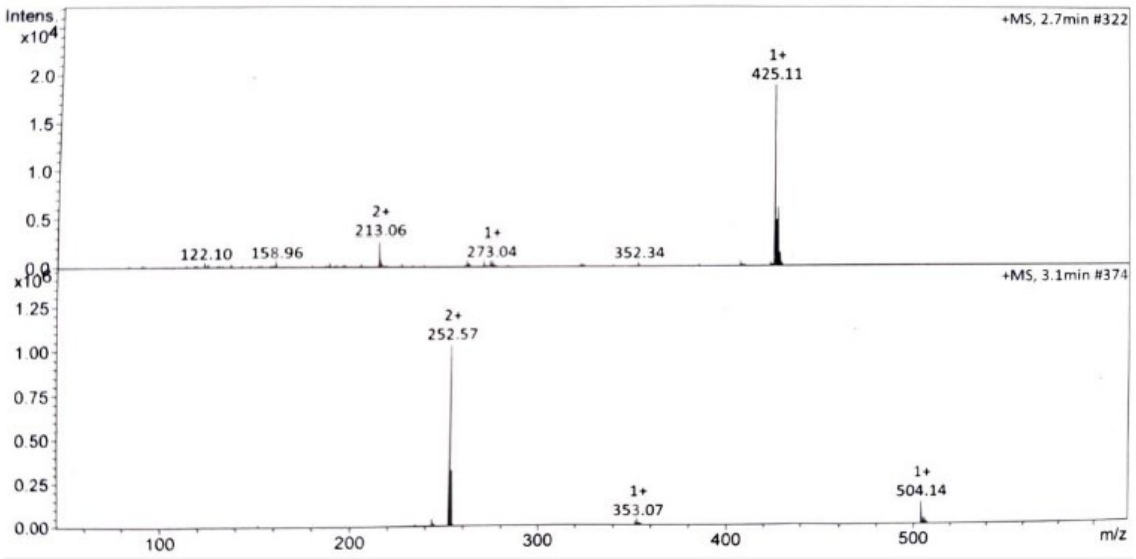


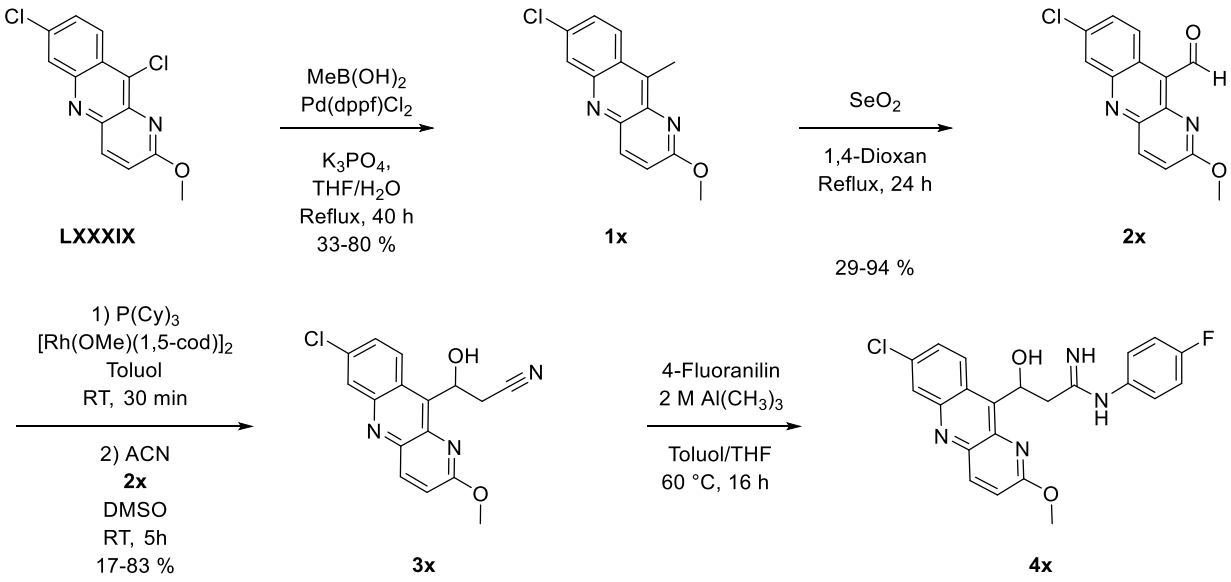

*Abbildung 31: Auswertung der LCMS des Pyronaridin-basierten 3-HPAs **4x**.*

Die weiterführende Analyse des isolierten Produktpeaks im Rahmen von $^1$H- und $^{13}$C-NMR-Spektroskopie zeigte, dass die Verbindung nicht vollständig von Nebenprodukten

getrennt werden konnte. Neben den erwarteten Signalen der Zielverbindung liegen weitere Signale vor, die auf Nebenprodukte hinweisen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Rahmen der Synthese des Pyronaridin-basierten 3-HPA **4x** initiale Optimierungsstrategien durchgeführt wurden, sodass eine reproduzierbare Synthesesequenz zur Darstellung des Nitrils **3x** etabliert werden konnte. Die Bildung des 3-HPA **4x** konnte analytisch im Rahmen einer LC-MS-Chromatographie nachgewiesen werden, jedoch stellte die Abtrennung der Zielverbindung vom strukturell ähnlichen, höhermolekularen Nebenprodukt **XCIV** eine wesentliche Herausforderung dar. Zur weiteren Klärung und Verbesserung der Aufreinigung wurden die Arbeiten im Rahmen der Masterarbeit von *Antonia Goerke* fortgeführt. Es wurden verschiedene chromatographische Methoden, wie beispielsweise Normalphasenchromatographien mit Kieselsäure sowie AlOx als Säulenmaterial sowie eine Umkehrphasenchromatographie und unterschiedliche Lösungsmittelzusammensetzungen getestet. Trotz dieser Optimierungsversuche gelang keine zufriedenstellende Trennung der Zielverbindung von dem höhermolekularen Nebenprodukt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde somit ein prinzipiell möglicher Syntheseweg zum 3-HPA **4x** etabliert. Die effiziente Isolierung des 3-HPA wird dagegen zukünftigen Arbeiten vorbehalten sein *(Schema 46).*




*Schema 46: Zusammenfassung der initial optimierten Synthesesequenz zur Darstellung des 3-HPAs **4x**.*

# 4 Zusammenfassung und Ausblick

Nach wie vor stellen Malaria-Infektionen trotz Präventions- und Behandlungsstrategien ein erhebliches, globales Gesundheitsrisiko dar. Sie führen jährlich bei über 600.000 Menschen zum Tod.[4] Eine zunehmende Resistenzentwicklung zeigt die Notwendigkeit neuer Wirkstoffklassen mit einer verbesserten Resistenzbarriere.[127]

Ziel dieser Arbeit war die strukturelle Weiterentwicklung der Leitstruktur **XXVII** durch gezielte Modifikation von zwei Bereichen, dem lipophilen Phenanthrengerüst in Region A sowie der Benzamidin-Struktur in Region C *(Abbildung 32)*. Durch diese strukturellen Veränderungen sollten Einflüsse von Heteroatomen, Polarität, Substitutionsmustern und den damit einhergehenden induktiven sowie mesomeren Effekten auf die antiplasmodiale Aktivität und die pharmakokinetischen Eigenschaften systematisch untersucht werden.

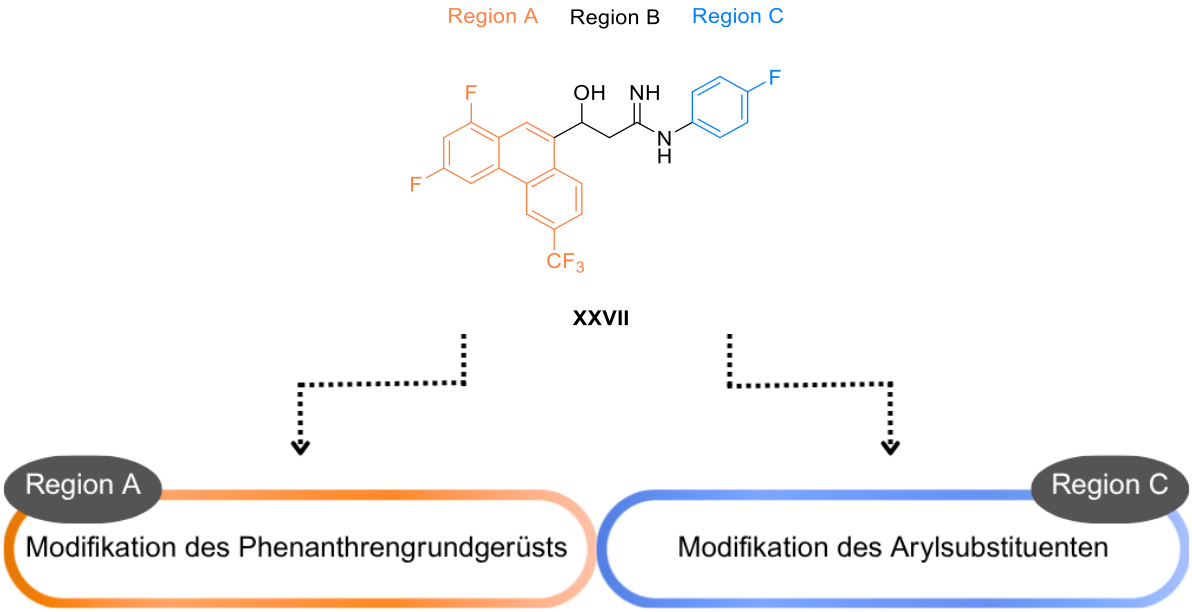



*Abbildung 32: Überblick über die in dieser Arbeit modifizierten Regionen.*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst fünf azabasierte 3-HPAs synthetisiert, bei denen das Phenanthrengerüst von **XXVII** durch tricyclische Heteroaromaten (Phenanthrolin- und Phenanthridin-Derivate) ersetzt wurde. Ziel dieser Modifikation war eine verringerte Lipophilie des Phenanthrengerüsts durch Einführung zusätzlicher Stickstoffatome. Die daraufhin erhöhte Polarität führte jedoch zu einer Abnahme der antiplasmodialen Aktivität. Dies verdeutlicht die zentrale Bedeutung des lipophilen Phenanthrensystems für die Wirksamkeit dieser Substanzklasse *(Abbildung 33)*.

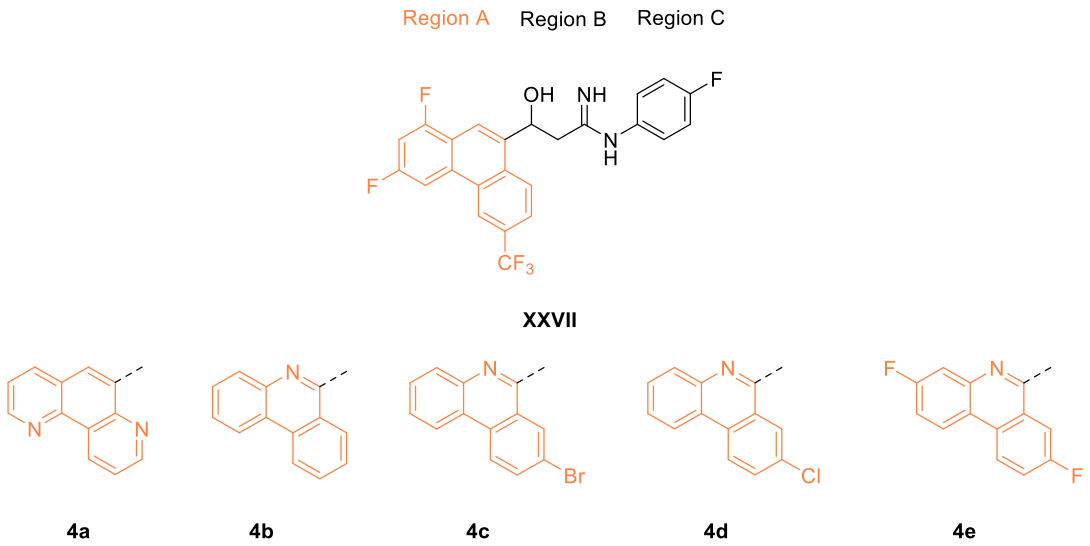
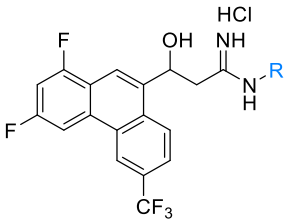



*Abbildung 33: Zusammenfassung der Variationen der Leitstruktur **XXVII** in Region A.*

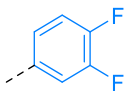
Darüber hinaus wurden 22 phenanthrenbasierte 3-HPAs mit strukturellen Variationen in Region C synthetisiert. Dabei wurden unterschiedliche Substitutionsgrade sowie Substitutionsmuster am Phenylring dargestellt und verschiedene Halogenierungsmuster eingeführt. Im Rahmen der Variation von Region C zeigen die Ergebnisse, dass besonders elektronenziehende Substituenten die antiplasmodiale Aktivität verbesserten. Der Austausch der Aromaten gegen aliphatische Substituenten hingegen führte zu einem Aktivitätsverlust *(Tabelle 3)*.

*Tabelle 3: Zusammenfassung der Variationen in Region C.*

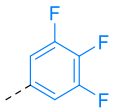
Region A Region B Region C



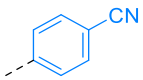

R =



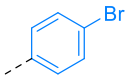
**7a**



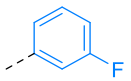
**7b**



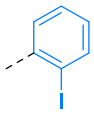
**7c**



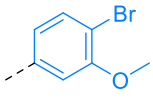
**7d**



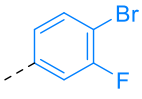
**7e**



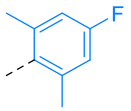
**7f**



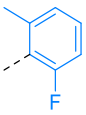
**7g**



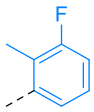
**7h**



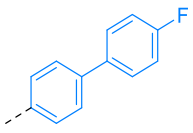
**7i**



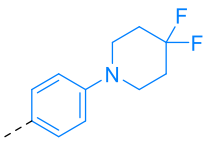
**7j**



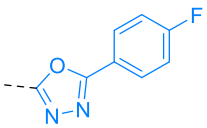
**7k**



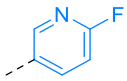
**7l**



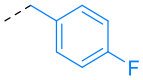
**7m**



**7n**



**7o**



**7p**



**7q**

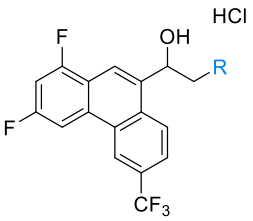


**7r**

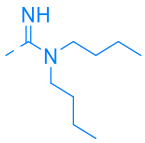


**7s**

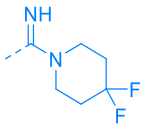
Region A Region B Region C



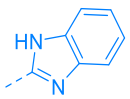

R =



**7t**



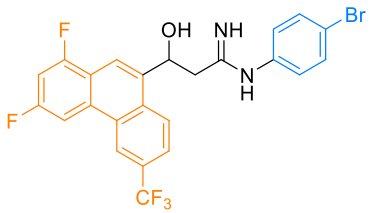
**7u**



**7v**

Mehrere Derivate, die im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert wurden, zeigten eine hohe *in vitro*-Aktivität im niedrigen nanomolaren Bereich. Einige Derivate zeigten zudem eine hohe antiplasmodiale Wirksamkeit im *in vivo*-Mausmodell. Besonders hervorzuheben ist die Verbindung **7d**, die im Rahmen dieser Arbeit als ein vielversprechender Vertreter der 3-HPA identifiziert werden konnte. Das 3-HPA **7d** zeigte sowohl gegen sensitive als auch multiresistente *P. falciparum*-Stämme eine hohe antiplasmodiale *in vitro*-Aktivität im

einstelligen nanomolaren Bereich (*Pf*3D7 $IC_{50}$±SD [nM]: 6.1 ± 2.6, *Pf*Dd2 $IC_{50}$±SD [nM]: 6.4 ± 4.2) sowie eine sehr gute Wirksamkeit im *in vivo*-Mausmodell (*P. berghei,* bei 30 mg/kg 99.6 % Aktivität, 30 MSD). Zudem demonstrierte **7d** eine geringe Zytotoxizität gegenüber HepG2-Zellen bei gleichzeitig hoher antiplasmodialer Aktivität (SI HEPG2/*Pf*3D7 = 1590) und eliminierte im *Parasite Reduction Ratio* (PRR)-Assay *P. falciparum* innerhalb von 72 h. Damit zeigte **7d** eine schnellere Parasitenelimination als Chloroquin und Atovaquon, jedoch eine geringere Eliminationsgeschwindigkeit als Artesunat und die Leitstruktur **XXVII** (*Abbildung* 34).[201]




**7d**

*Abbildung 34: Das im Hinblick auf die antiplasmodiale Aktivität und das Resistenzprofil vielversprechendste 3-HPA* ***7d****, das in dieser Arbeit synthetisiert wurde.*

Im Gegensatz dazu führte die Einführung von Stickstoffatomen in Region A zu einer Reduktion der *in vitro*-Aktivität. Das Phenanthridin-Derivat **4c** mit einer *in vitro*-Aktivität von $IC_{50}$ = 19.5 ± 0.6 nM (*Pf*3D7 $IC_{50}$±SD [nM]) stellt zwar eine der potentesten Verbindungen innerhalb der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Aza-basierten 3-HPAs dar, bleibt jedoch hinter den phenanthrenbasierten Derivaten. Der Trend des Aktivitätsverlusts mit steigender Polarität wird besonders deutlich beim Vergleich mit dem 3-HPA **7d**, das eine deutlich höhere Aktivität (*Pf*3D7 $IC_{50}$±SD [nM]: 6.1 ± 2.6) aufweist, während das Phenanthrolin-Derivat **4a** lediglich eine *in vitro*-Aktivität von $IC_{50}$ = 3195 ± 825 nM (*Pf*3D7 $IC_{50}$±SD [nM]) zeigt. Diese Ergebnisse verdeutlichen den starken Aktivitätsverlust mit steigender Polarität. Es ist deshalb zu vermuten, dass ein lipophiles, aromatisches System in Region A zentrale Bedeutung hat.

Darüber hinaus erfolgten im Rahmen dieser Arbeit Untersuchungen zum Wirkmechanismus durch die Arbeitsgruppe von *De Villiers.* Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass 3-HPAs die Bildung von *β*-Hämatin inhibieren und auf diese Weise in den Häm-Detoxifizierungsprozess des Parasiten eingreifen. Wird der Wirkmechanismus etablierter Wirkstoffe wie Lumefantrin betrachtet, ist diese These konsistent.

Wird **7d** mit der Leitstruktur **XXVII** verglichen, so zeigt **7d** eine vergleichbare antiplasmodiale Potenz bei geringerer Affinität im hERG-Ligandenbindungsassay und daher ein potenziell verbessertes Sicherheitsprofil.

Die Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung einer *p*-substituierten Benzamidin-Struktur für die antiplasmodiale Aktivität durch die vermutete Inhibition der *β*-Hämatin-Bildung.

Neben der Analyse von Struktur-Aktivitätsbeziehungen wurden zudem initiale Synthesestrategien zur Darstellung von Lumefantrin- sowie Pyronaridin-basierten 3-HPA-Derivaten durchgeführt. Auch wenn sich die Isolation der finalen Endprodukte in diesen beiden Projekten als der limitierende Faktor erwies, konnten wertvolle Einblicke in synthetische Limitationen, chemische Instabilitäten und konkurrierende Nebenreaktionen gewonnen werden.

Seit der Isolierung von Chinin durch *Pelletier* und *Caventou* im Jahr 1820 spielen Arylaminoalkohole eine große Rolle bei der Behandlung von Malaria.[10] Mit Lumefantrin stellt diese Wirkstoffklasse bis heute einen zentralen Bestandteil artemisininbasierter Kombinationstherapien dar.[4] Neben der fortschreitenden Ausbreitung resistenter *Plasmodium*-Stämme erschweren auch kardiotoxische Nebenwirkungen einzelner Vertreter der Arylaminoalkohole, insbesondere infolge einer Hemmung des hERG-Kaliumkanals und der daraus resultierenden QT-Verlängerung, die Entwicklung neuer Wirkstoffe dieser Substanzklasse. [127,170] Daraus ergibt sich weiterhin ein Bedarf an der weiteren strukturellen Optimierung dieser Wirkstoffklasse. Insgesamt liefern die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse hinsichtlich der Struktur-Aktivitätsbeziehungen sowie der synthetischen Herausforderungen dieser Wirkstoffklasse einen wichtigen Erkenntnisgewinn. Sie bilden die Grundlage für weiterführende Optimierungs- und Synthesestrategien zu Arylaminoalkoholen mit verbessertem Wirksamkeits- und Sicherheitsprofil.

# 5 Experimenteller Teil

## 5.1 Angaben zu allgemeinen Versuchsbedingungen und Analytik

Alle Lösungsmittel wurden in analytischer Qualität ohne weitere Trocknung eingesetzt. Alle kommerziell erhältlichen Chemikalien wurden von den Firmen Acros, Merck, Maybridge, Alfa Aesar, Grüssing, VWR, Appli Chem, Fluorochem, Macherey-Nagel, BLDpharm, TCI, abcr sowie Roth erworben und ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Bei der Durchführung der Dünnschichtchromatographie kamen kieselgelbeschichtete Aluminiumfolien (ALUGRAM® Xtra SIL G/UV254, MACHEREY-NAGEL) zum Einsatz. Bei der Durchführung der Umkehrphasen-Dünnschichtchromatographie kamen Aluminiumfolien (ALUGRAM® RP-18 W/$UV_{254}$, MACHEREY-NAGEL, Düren) zum Einsatz. Zur Detektion wurde entweder UV-Licht (λ = 254 nm) eingesetzt oder es wurde Kaliumpermanganat-Lösung zum Anfärben verwendet. Die Elution erfolgte mit Lösungsmittelgemischen aus *n*-Hexan, Cyclohexan, Ethylacetat, Dichlormethan und Methanol oder Acetonitril und Wasser unterschiedlicher Zusammensetzungen mit oder ohne Zusatz von Triethylamin, Essigsäure oder Ameisensäure. Die Lösungsmittelgemische sind jeweils angegeben.

Die Flash-Chromatographie wurde auf der *Büchi Pure C-810* und der *CombiFlash® 200 (Teledyne Isco)* mit vorgepackten *RediSep®* Normalphase (NP) oder *RediSep® Rf C-18* Umkehrphase (RP) Kartuschen (Teledyne Isco) durchgeführt. Im Fall der Normalphasenchromatographie wurden als Eluationsmittel Cyclohexan und Ethylacetat oder Dichlormethan und Methanol verwendet. Bei der Umkehrphasenchromatographie wurde Acetonitril (Fisher Scientific) und deionisiertes Wasser mit oder ohne Zusatz von 0,1% TFA verwendet. Zur Vorbereitung der Rohprodukte wurde Kieselgel M60 (mesh 230-240), Macherey-Nagel, Düren, verwendet.

$^{1}$H- und $^{13}$C-NMR-Spektren wurden auf *Avance DRX 500*, *AV III 600* oder *AV III 300* Geräten der Firma *Bruker* aufgenommen, wobei die chemische Verschiebung in ppm angegeben ist und immer das verwendete Lösungsmittel als Standard diente. Eingesetzt wurden Chloroform ($CDCl_3$, $\delta_H$ 7.26, $\delta_C$ 77.16), Methanol-$d_4$ ($CD_3OD$, $\delta_H$ 4.87, $\delta_C$ 49.00) und Dimethylsulfoxid (DMSO-$d_6$, $\delta_H$ 2.50, $\delta_C$ 39.52). Die Signalmultiplizitäten wurden mit s (Singulett), d (Dublett), t (Triplett), q (Quartett), dd (Dublett eines Dubletts), dt (Dublett eines Tripletts), qd (Quartett eines Dubletts) und m (Multiplett) abgekürzt.
Schmelzpunkte wurden mit dem Gerät „*Melting Point B-565*“ der Firma *Büchi* und der „*Melting Point apparatus SMP 10*“ der Firma *Stuart* bestimmt.

Massenspektren wurden in der Massenspektrometrischen Abteilung der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf aufgenommen. Gemessen wurden sie auf dem Gerät *Varian MAT 311 A*. Die Messung der hochaufgelösten Massenspektren erfolgte am *Bruker Daltonics UHR-QTOF maxis 4 G*. Angegeben sind alle Peaks > 10 % des Basispeaks, der Molekülpeak und eventuell charakteristische Fragmentpeaks mit einer Intensität < 10 %. HPLC-Messungen erfolgten mit einer *AzuraP* 6.1L Pumpe, einem *Optimas 800* Autosampler, einem K-2600 Photometer und einer Umkehrphasensäule (*Knauer*; Seriennummer: FK36). Die Probenvorbereitung erfolgte durch Lösen von 1 mg Analyten in 1 mL Acetonitril oder Methanol. Als mobile Phase A wurde Wasser für die Gradienten-HPLC mit (Methode 1) oder ohne (Methode 2) Zusatz von 0,1 % TFA und als mobile Phase B Acetonitril für die Gradienten HPLC mit oder ohne Zusatz von 0,1% TFA verwendet. Die Laufzeit betrug 30 min bei einer Flussrate von 1 mL/min. Die Analyten wurden bei 254 nm detektiert (*Tabelle 4*).

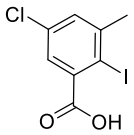
*Tabelle 4: Gradient-Verlaufstabelle für die Analyse mittels HPLC.*

| Zeitintervall [min.] | Mobile Phase A [%] | Mobile Phase B [%] |
|---|---|---|
| 0 - 0,5 | 90 | 10 |
| 0,5 - 20 | 90 → 0 | 10 → 100 |
| 20 - 30 | 0 | 100 |

Die synthetisierten Verbindungen wurden mindestens 24 h an einer HV-Linie mit einer HV-Pumpe (RV3; *Edwards*) getrocknet.

## 5.2 Synthese des Lumefantrinderivats **7w**

### 5.2.1 Synthese von 5-Chlor-2-iod-3-methylbenzoesäure **8**




**8**

$C_8H_6ClIO_2$

[295.9101 g/mol]

**8** wurde angelehnt an eine Vorschrift von *Guilbault* et al. hergestellt.[205]

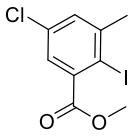
Unter Eisbadkühlung wurde 5-Chlor-3-methylanthranilsäure **LXVIII** (985 mg, 5.29 mmol, 1.00 Äq.) in HCl (37 %, 4.01 mL, 24.9 Äq.) suspendiert und für 15 min bei 0 °C gerührt. Natriumnitrit (476 mg, 6.89 mmol, 1.30 Äq.) wurde in Wasser (1.00 mL) gelöst und über 10 min zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde weitere 90 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde Kaliumiodid (4.39 g, 26.4 mmol, 5.00 Äq.) in Wasser (5.00 mL) gelöst und über 20 min zugetropft. Danach wurde weitere 24 h bei RT gerührt. Wasser wurde zugegeben (10 mL) und mit Ethylacetat (3 × 30 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit $Na_2S_2O_3$-Lösung (3 × 20 mL), gesättigter Natriumchlorid-Lösung (3 × 20 mL) und Wasser (3 × 20 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

**Ausbeute:** 91 % (1.43 g, 4.82 mmol), gelber Feststoff.

**HPLC:** 12.123 min.; 97 %.

**$^1$H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$):** $\delta$ 13.53 (s, 1H), 7.55 (dd, $J$ = 2.5, 0.8 Hz, 1H), 7.39 (dd, $J$ = 2.5, 0.7 Hz, 1H), 2.43 (s, 3H).

## 5.2.2 Synthese von Methyl-5-chlor-2-iod-3-methylester **10**




**10**

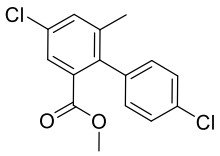
$C_9H_8ClIO_2$

[309.9258 g/mol]

5-Chlor-2-iod-3-methylbenzoesäure **8** (889 mg, 3.00 mmol. 1.00 Äq.) wurde in Methanol (9.00 mL, 222 mmol, 74.1 Äq.) gelöst. Die entstandene Lösung wurde mit drei Tropfen Schwefelsäure (98 %) versetzt und für 24 h bei 70 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Ethylacetat (10 mL) aufgenommen und mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (3 × 20 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

**Ausbeute:** 65 % (607 mg, 1.95 mmol), gelbes Öl.
**HPLC:** 15.460 min.; 98 %.
**$^1$H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$):** $\delta$ 7.38 (dq, $J$ = 2.5, 0.6 Hz, 1H), 7.32 (dq, $J$ = 2.5, 0.7 Hz, 1H), 3.93 (s, 3H), 2.49 (t, $J$ = 0.7 Hz, 3H).

## 5.2.3 Synthese von Methyl-4,4'-dichlor-6-methyl-[1,1'-biphenyl]-2-carboxylat **11**




**11**

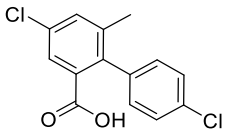
$C_{15}H_{12}Cl_2O_2$

[294.0214 g/mol]

**11** wurde angelehnt an eine Vorschrift von *Degli Innocenti* et al. hergestellt.[206]
Unter Argonatmosphäre wurden Methyl-5-chlor-2-iod-3-methylester **10** (233 mg, 0.75 mmol, 1.00 Äq.), 4-Chlorphenylboronsäure **LVIIb** (129 mg, 0.83 mmol, 1.1 Äq.) und Kaliumcarbonat (207 mg, 1.50 mmol, 2.00 Äq.) vorgelegt und in 1,4-Dioxan (1.50 mL) gelöst. In die entstandene Lösung wurde für 5 min Argon eingeleitet, ehe [1,1-Bis(diphenylphosphin)ferrocen]dichlorpalladium(II) (55.0 mg, 0.08 mmol, 10.0 mol%) zugegeben wurde. Das entstandene Reaktionsgemisch wurde für 16 h bei 110 °C gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch über Celite® filtriert und das Filtrat mit Ethylacetat (5 mL) gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und die säulenchromatographische Reinigung an Silicagel erfolgte mit einem Laufmittelgemisch aus Cyclohexan und Ethylacetat mittels Flashtechnik.

**Ausbeute:** 86 % (190 mg, 0.64 mmol), gelbes Öl.
**HPLC:** 17.335 min.; 95 %.
**$^1$H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$):** $\delta$ 7.71 (dd, $J$ = 2.3, 0.6 Hz, 1H), 7.42 - 7.39 (m, 2H), 7.39 - 7.36 (m, 1H), 7.10 - 7.04 (m, 2H), 3.60 (s, 3H), 2.06 (t, $J$ = 0.7 Hz, 3H).
**$^{13}$C-NMR (151 MHz, $CDCl_3$):** $\delta$ 167.20, 139.49, 139.44, 137.78, 133.38, 133.33, 133.13, 132.71, 130.07, 128.52, 127.36, 52.30, 20.79.
**MS-ESI ($ESI^+$)** ber.: $C_{15}H_{12}Cl_2O_2$ [M+H] 295.03 (100 %), 297.03 (64.4 %), 296.03 (16.3 %); gef.: 295.03, 296.03, 297.03.

## 5.2.4 Synthese von 4,4'-Dichlor-6-methyl-[1,1'-biphenyl]-2-carboxylsäure **9**




**9**

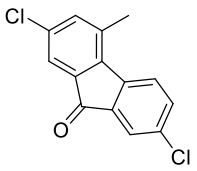
$C_{14}H_{10}Cl_2O_2$

[280.0058 g/mol]

Methyl-4,4'-dichlor-6-methyl-[1,1'-biphenyl]-2-carboxylat **11** (688 mg, 2.33 mmol, 1.00 Äq.), und Lithiumhydroxid-Monohydrat (293 mg, 6.99 mmol, 3.00 Äq.) wurden in THF (4.90 mL), Methanol (1.20 mL) und Wasser (1.20 mL) gelöst und 16 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand wurde in Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wurde mit HCl (1 M, 3 × 30 mL) gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt.

**Ausbeute:** 100 % (657 mg, 2.34 mmol), weißer Feststoff.
**HPLC:** 14.415 min.; 99 %.
**$^1$H-NMR (300 MHz, $CD_3OD$):** $\delta$ 9.22 (d, $J$ = 2.3 Hz, 1H), 9.03 (dd, $J$ = 2.3, 0.8 Hz, 1H), 8.99 - 8.91 (m, 2H), 8.71 - 8.64 (m, 2H), 3.63 (d, $J$ = 0.7 Hz, 3H).
**$^{13}$C-NMR (151 MHz, $CD_3OD$):** $\delta$ 169.98, 140.87, 140.45, 139.29, 135.25, 134.25, 134.14, 133.56, 131.56, 129.26, 127.82, 20.68.
**MS-ESI (ESI$^-$)** ber.: $C_{14}H_{10}Cl_2O_2$ [M-H] 279.00 (100 %), 281.00 (65.5 %), 280.00 (15.3 %); gef.: 279.05, 280.05, 281.05.

## 5.2.5 Synthese von 2,7-Dichlor-4-methyl-9*H*-fluoren-9-on **13**




**13**

$C_{14}H_8Cl_2O$

[261.9952 g/mol]

**12** wurde angelehnt an eine Vorschrift nach *Muthuppalaniappan* et al. hergestellt und ohne Aufreinigung wieder eingesetzt.[208] **13** wurde daraufhin angelehnt an eine Vorschrift nach *Çetinkaya* et al hergestell.[209]

Unter Stickstoffatmosphäre wurde 4,4'-Dichlor-6-methyl-[1,1'-biphenyl]-2-carboxylsäure **11** (500 mg, 1.78 mmol, 1.00 Äq.), in trockenem Dichlormethan (5.00 mL) gelöst und im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Oxalylchlorid (0.18 mL, 2.13 mmol, 1.20 Äq.) wurde zugegeben. Der Reaktionsfortschritt wurde engmaschig mittels DC-Kontrolle verfolgt. Nach drei Stunden zeigte die DC-Kontrolle einen vollständigen Umsatz. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das entstandene 4,4'-Dichlor-6-methyl-[1,1'-biphenyl]-2-carbonylchlorid **12** wurde ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt. Unter Stickstoffatmosphäre wurde zum entstandenen 4,4'-Dichlor-6-methyl-[1,1'-biphenyl]-2-carbonylchlorid **12** trockenes Dichlormethan (24.3 mL) zugegeben. Unter Eisbadkühlung wurde Aluminiumchlorid (422 mg, 3.17 mmol, 1.90 Äq.) über einen Zeitraum von 15 min zugegeben. Es wurde 1 h bei 0 °C gerührt, bevor weitere 16 h bei RT gerührt wurde. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von gesättigter Natriumcarbonat-Lösung (15 mL) abgebrochen. Es wurde 5 min bei RT gerührt. Anschließend wurde die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase mit Dichlormethan (1 x 20 mL) extrahiert. Die Trocknung der vereinten organischen Phasen erfolgte mithilfe von Natriumsulfat. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und die säulenchromatographische Reinigung an Silicagel erfolgte mit einem Laufmittelgemisch aus Cyclohexan und Ethylacetat mittels Flashtechnik.

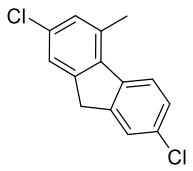
**Ausbeute:** 97 % (427 mg, 1.62 mmol), gelber Feststoff.

**HPLC:** 18.456 min.; 100 %.

**$^1$H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$):** $\delta$ 7.60 (d, $J$ = 2.0 Hz, 1H), 7.50 (d, $J$ = 8.0 Hz, 1H), 7.44 (dd, $J$ = 8.2, 1.9 Hz, 2H), 7.25 (dd, $J$ = 2.0, 0.8 Hz, 1H), 2.53 (s, 3H).

**$^{13}$C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$):** $\delta$ 191.59, 142.78, 139.92, 136.89, 135.91, 135.86, 135.27, 134.99, 134.96, 134.48, 125.01, 124.31, 122.61, 20.16.

## 5.2.6 Synthese von 2,7-Dichlor-4-methyl-9*H*-fluoren **14**




**14**

$C_{14}H_{10}Cl_2$

[248.0160 g/mol]

**14** wurde angelehnt an eine Vorschrift von *Hicks* et al. hergestellt.[210]

Unter Stickstoffatmosphäre wurde Iod (98.0 mg, 0.39 mmol, 33.0 mol%) in Essigsäure (4.82 mL) gelöst. Hypophosphorsäure (0.19 mL, 1.76 mmol, 1.52 Äq.) wurde zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde auf 120 °C erhitzt. 2,7-Dichlor-4-methyl-9*H*-fluoren-9-on **13** (305 mg, 1.16 mmol, 1.00 Äq.) wurde in Essigsäure (1.54 mL) gelöst und langsam zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde 24 h bei 120 °C gerührt, bevor Wasser (10 mL) zugegeben wurde. Die wässrige Phase wurde mit Cyclohexan (3 × 20 mL) extrahiert und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt.

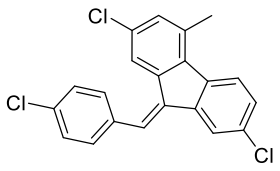
**Ausbeute:** 67 % (193 mg, 0.78 mmol), weißer Feststoff.

**HPLC:** 18.149 min.; 99 %.

**$^1$H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$):** $\delta$ 7.77 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.52 (dt, *J* = 2.3, 1.2 Hz, 1H), 7.40 - 7.34 (m, 2H), 7.16 (dq, *J* = 1.7, 0.8 Hz, 1H), 3.86 (s, 2H), 2.66 (s, 3H).

**$^{13}$C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$):** $\delta$ 145.28, 145.12, 145.08, 140.38, 137.60, 134.40, 132.38, 129.29, 127.23, 125.37, 123.80, 122.83, 36.94, 20.89.

## 5.2.7 Synthese von (*Z*)-2,7-dichlor-9-(4-chlorobenzyliden)-4-methyl-*9H*-fluoren **1w**




**1w**

$C_{21}H_{13}Cl_3$

[370.0083 g/mol]

**1w** wurde angelehnt an eine Vorschrift von *Yang* et al. hergestellt.[211]

2,7-Dichlor-4-methyl-9*H*-fluoren **14** (187 mg, 0.75 mmol, 1.00 Äq.) wurde in *tert*-Butanol (15.0 mL) gelöst. Kalium-*tert*-Butoxid (250 mg, 2.23 mmol, 3.00 Äq.) wurde zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde für 30 min bei 40 °C gerührt. 4-Chlorbenzaldehyd **LXIII** (313 mg, 2.23 mmol, 3.00 Äq.) wurde zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 3 h bei 50 °C gerührt, bevor mit Dichlormethan (3 × 30 mL) extrahiert wurde. Die vereinten organischen Phasen wurden mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung an Silicagel erfolgte mit einem Laufmittelgemisch aus Cyclohexan und Ethylacetat mittels Flashtechnik.

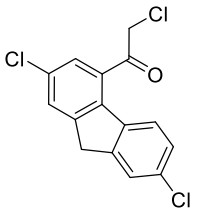
**Ausbeute:** 57 % (157 mg, 0.42 mmol), gelber Feststoff.

**HPLC:** 22.604 min.; 98 %.

**$^1$H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$):** $\delta$ 7.73 (d, $J$ = 2.0 Hz, 0.36H), 7.71 (dd, $J$ = 8.3, 1.7 Hz, 1.01H), 7.58 (d, $J$ = 1.9 Hz, 1.64H), 7.54 (d, $J$ = 2.0 Hz, 0.63H), 7.50 - 7.44 (m, 4.04H), 7.39 (d, $J$ = 1.9 Hz, 0.35H), 7.35 (dd, $J$ = 8.2, 1.9 Hz, 0.37H), 7.30 (dd, $J$ = 8.3, 2.0 Hz, 0.63H), 7.15 (dd, $J$ = 1.9, 0.9 Hz, 0.63H), 7.11 (dd, $J$ = 1.9, 0.9 Hz, 0.37H), 2.63 (s, 1.85H), 2.62 (s, 1.15H).

**$^{13}$C-NMR (151 MHz, $CDCl_3$):** $\delta$ 141.39, 141.28, 139.95, 138.16, 138.05, 137.71, 137.08, 135.37, 135.36, 134.89, 134.78, 134.76, 134.42, 134.30, 132.82, 132.75, 132.28, 132.24, 131.17, 130.80, 130.72, 130.70, 129.21, 129.19, 128.88, 128.54, 127.93, 127.83, 124.36, 123.81, 123.69, 122.02, 120.67, 118.35, 21.01, 20.86.

## 5.2.8 Synthese von 2-Chlor-1-(2,7-dichlor-*9H*-fluoren-4-yl)ethan-1-on **16**




**16**

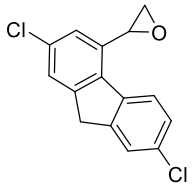
$C_{15}H_9Cl_3O$

[309.9719 g/mol]

2-Chloracetylchlorid **LXXXIV** (5.81 g, 51.5 mmol, 1.25 Äq.) und Aluminiumchlorid (8.37 g, 62.7 mmol, 1.25 Äq.) wurden in Dichlormethan (16.7 mL) gelöst. Das Reaktionsgemisch wurde auf -5 °C gekühlt. 2,7-Dichlorfluoren **LXXVII** (10.0 g, 41.3 mmol, 1.00 Äq.) wurde in Dichlormethan (43.5 mL) gelöst und zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 3 h bei -5 °C gerührt. Im Anschluss daran wurde wässrige HCl-Lösung (15 %, 100 mL) zugegeben. Anschließend wurde die organische Phase mit Wasser (2 x 50 mL) gewaschen. Die organischen Phasen wurden mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Es wurde Ethanol (60 mL) zugegeben und die Lösung wurde filtriert. Das Lösungsmittel wurde erneut unter vermindertem Druck entfernt.

**Ausbeute:** 62 % (8.10 g, 26.0 mmol), hellgelber Feststoff.
**HPLC:** 18.371 min.; 95 %.
**$^1$H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$):** $\delta$ 8.01 - 7.85 (m, 2H), 7.77 - 7.66 (m, 2H), 7.43 (dd, $J$ = 8.5, 2.2 Hz, 1H), 5.26 (s, 2H), 4.01 (s, 2H).

## 5.2.9 Synthese von 2-(2,7-Dichlor-*9H*-fluoren-4-yl)oxiran **17**




**17**

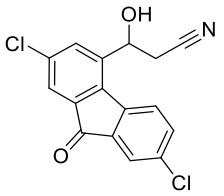
$C_{15}H_{10}Cl_2O$

[276.0109 g/mol]

**17** wurde angelehnt an eine Vorschrift von AFRAXIS INC hergestellt.[216]
2-Chlor-1-(2,7-dichlor-9H-fluoren-4-yl)ethan-1-on **16** (1.00 g, 3.21 mmol, 1.00 Äq.) wurde in Methanol (14.1 mL) gelöst. Das Reaktionsgemisch wurde auf 0 °C gekühlt, bevor portionsweise Natriumborhydrid (121 mg, 3.21 mmol, 1.00 Äq.) zugegeben wurde. Es wurde 16 h bei RT gerührt. Der Umsatz der Reaktion wurde mittels DC überprüft. Aufgrund eines unvollständigen Umsatzes wurde erneut Natriumborhydrid zugegeben (60.7 mg, 1.60 mmol, 0.5 Äq.). Es wurde weitere 2 h bei RT gerührt. Natriummethoxid-Lösung (0.5 mol/L, 6.42 mL, 3.21 mmol, 1.00 Äq.) wurde unter Eisbadkühlung bei 0 °C zugegeben. Es wurde erneut 18 h bei RT gerührt. Es wurde gesättigte Natriumchlorid-Lösung (15 mL) zugegeben und die wässrige Phase wurde mit Diethylether (2 x 30 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde mit Natriumsulfat getrocknet, bevor das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt wurde. Die säulenchromatographische Reinigung an Silicagel erfolgte mit einem Laufmittelgemisch aus Cyclohexan und Ethylacetat mittels Flashtechnik.

**Ausbeute:** 62 % (546 mg, 1.97 mmol), hellgelber Feststoff.
**HPLC:** 19.616 min.; 95 %.
**$^1$H-NMR (300 MHz, DMSO-$d_6$):** $\delta$ 8.01 - 7.85 (m, 2H), 7.77 - 7.66 (m, 2H), 7.43 (dd, $J$ = 8.5, 2.2 Hz, 1H), 5.26 (s, 2H), 4.01 (s, 2H).
**$^{13}$C-NMR (75 MHz, DMSO-$d_6$):** $\delta$ 145.87, 145.81, 138.41, 137.02, 134.39, 131.82, 131.73, 127.09, 125.37, 124.61, 124.37, 123.23, 50.01, 49.47, 36.62.

## 5.2.10 Synthese von 3-(2,7-Dichlor-9-oxo-*9H*-fluoren-4-yl)-3-hydroxypropannitril **18**




**18**

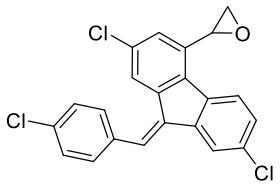
$C_{16}H_9Cl_2NO_2$

[317.0010 g/mol]

**18** wurde angelehnt an eine Vorschrift von Wyeth LLC hergestellt.[217]
2-(2,7-Dichlor-*9H*-fluoren-4-yl)oxiran **17** (150 mg, 0.54 mmol, 1.00 Äq.) und Natriumcyanid (132 mg, 2.69 mmol, 4.97 Äq.) wurden in DMF (6.96 mL) und Wasser (1.16 mL) gelöst. Das Reaktionsgemisch wurde für 18 h bei 70 °C gerührt. Es wurde Wasser (15 mL) zugegeben und die wässrige Phase wurde mit Dichlormethan (3 × 20 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde mit Wasser gewaschen (3 × 10 mL) und anschließend mit Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung an Silicagel erfolgte mit einem Laufmittelgemisch aus Cyclohexan und Ethylacetat mittels Flashtechnik.

**Ausbeute:** 43 % (72.8 mg, 0.23 mmol), hellgelber Feststoff.
**HPLC:** 13.722 min.; 96 %.
**$^1$H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$):** $\delta$ 7.88 - 7.78 (m, 2H), 7.76 - 7.65 (m, 2H), 7.63 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.46 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H), 5.48 (q, *J* = 5.3 Hz, 1H), 3.11 (dd, *J* = 16.8, 4.9 Hz, 1H), 2.97 (dd, *J* = 16.9, 6.4 Hz, 1H).
**$^{13}$C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*$_6$):** $\delta$ 190.21, 141.20, 140.96, 137.93, 135.70, 135.35, 135.00, 134.27, 132.45, 126.72, 124.17, 123.40, 118.06, 64.29, 25.61.
**LC-MS (ESI$^+$)** ber.: $C_{16}H_9Cl_2NO_2$ [M+H] 318.01; gef.: 318.01.

## 5.2.11 Synthese von (*Z*)-2-(2,7-Dichlor-9-(4-chlorobenzyliden)-9*H*-fluoren-4-yl)oxiran **20**




**20**

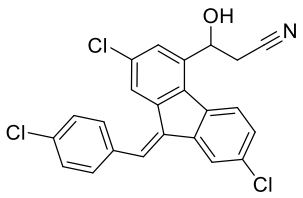
$C_{22}H_{13}Cl_3O$

[398.0032 g/mol]

**20** wurde angelehnt an eine Vorschrift von *Yang* et al. hergestellt.[211]
2-(2,7-Dichlor-*9H*-fluoren-4-yl)oxiran **17** (2.00 g, 6.86 mmol, 1.00 Äq.) wurde in *tert*-Butanol (138 mL) vorgelegt und Kalium-*t*-Butoxid (2.29 g, 20.4 mmol, 3.00 Äq.) wurde zugegeben. Es wurde 30 min bei 40 °C gerührt, bevor 4-Chlorbenzaldehyd **LXIII** (2.87 g, 20.4 mmol, 3.00 Äq.) zugegeben wurde. Anschließend wurde für 3 h bei 50 °C gerührt. Die Lösung wurde mit Dichlormethan (3 × 100 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde anschließend mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

**Ausbeute:** 50 % (1.36 g, 3.41 mmol), hellgelber Feststoff.
**HPLC:** 21,136 min.; 100 %.
**$^1$H-NMR (300 MHz, DMSO-$d_6$):** $\delta$ 8.21 - 8.08 (m, 2H), 7.95 (dd, $J$ = 8.3, 4.6 Hz, 1H), 7.62 (d, $J$ = 2.9 Hz, 4H), 7.48 (ddd, $J$ = 8.3, 7.4, 2.0 Hz, 1H), 7.43 - 7.31 (m, 1H), 7.27 (ddd, $J$ = 8.7, 1.9, 0.6 Hz, 1H), 4.54 - 4.47 (m, 1H), 3.38 - 3.33 (m, 1H), 2.86 (ddd, $J$ = 7.6, 5.6, 2.7 Hz, 1H).
**$^{13}$C-NMR (75 MHz, DMSO-$d_6$):** $\delta$ 141.36, 138.56, 138.14, 138.11, 136.81, 136.31, 134.97, 134.62, 134.09, 133.80, 133.49, 133.44, 133.00, 132.92, 130.68, 129.24, 129.09, 128.74, 128.61, 125.86, 125.50, 124.52, 123.78, 123.72, 120.90, 120.16, 50.63, 49.89.
Die Analytik wurde von *Beate Lungerich* (Arbeitsgruppe Kurz) durchgeführt.

5.2.12 Synthese von (*Z*)-3-(2,7-Dichlor-9-(4-chlorobenzylidene)-*9H*-fluoren-4-yl)-3-hydroxypropanenitril **3w**




**3w**

$C_{23}H_{14}Cl_3NO$

[425.0141 g/mol]

**3w** wurde angelehnt an eine Vorschrift von *PFIZER INC.* et al. hergestellt.[219]

Unter Argonatmosphäre wurden (*Z*)-2-(2,7-Dichlor-9-(4-chlorobenzyliden)-9*H*-fluoren-4-yl)oxiran **20** (300 mg, 0.75 mmol, 1.00 Äq.) und Natriumcyanid (147 mg, 3.00 mmol, 4.00 Äq.) in Wasser (1.61 mL) und DMF (9.65 mL) gelöst. Es wurde 4 h bei 70 °C gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser (0.50 mL) und HCl (0.50 mL) abgebrochen. Die Lösung wurde filtriert und mit Dichlormethan (3 × 20 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde mit Wasser (3 × 10 mL) gewaschen und anschließend mit Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung an RP-Silicagel erfolgte mit einem Laufmittelgemisch aus Wasser und Acetonitril mittels Flashtechnik.

**Ausbeute:** 22 % (85.0 mg, 0.20 mmol), hellgelber Feststoff.

**HPLC:** 17.258 min.; 95 %.

**$^1$H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$):** *δ* 7.99 - 7.84 (m, 2H), 7.58 - 7.46 (m, 3H), 7.37 - 7.27 (m, 3H), 6.84 (ddd, *J* = 42.5, 10.9, 2.0 Hz, 1H), 5.53 - 5.48 (m, 1H), 4.82 - 4.75 (m, 1H), 4.49 (dtd, *J* = 8.6, 4.8, 2.9 Hz, 1H), 3.31 (dtd, *J* = 5.6, 4.5, 3.1 Hz, 1H), 2.85 - 2.78 (m, 1H).

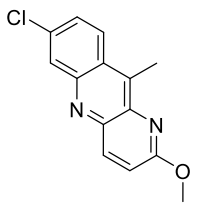
**$^{13}$C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*$_6$):** *δ* 145.64 (d, *J* = 7.1 Hz), 145.51 (d, *J* = 10.4 Hz), 144.48 (d, *J* = 10.0 Hz), 144.37 (d, *J* = 8.7 Hz), 138.44 (d, *J* = 3.8 Hz), 138.04 (d, *J* = 6.9 Hz), 137.13 (d, *J* = 22.6 Hz), 136.73 (d, *J* = 19.9 Hz), 134.72, 134.58 (d, *J* = 3.1 Hz), 133.21 (d, *J* = 5.0 Hz), 132.35 - 132.20 (m), 131.86 (t, *J* = 4.0 Hz), 131.78 - 131.63 (m), 129.99 - 129.75 (m), 128.80 (dd, *J* = 6.8, 3.0 Hz), 128.58 (dd, *J* = 13.6, 6.3 Hz), 125.43 - 125.12 (m), 124.88 (d, *J* = 17.9 Hz), 124.69 (t, *J* = 5.0 Hz), 124.61 - 124.34 (m), 118.54 (dd, *J* = 9.8, 5.4 Hz), 49.75 (d, *J* = 3.8 Hz), 49.60 - 49.34 (m), 49.20 (d, *J* = 3.2 Hz), 38.81 - 38.55 (m).

**MS-ESI (ESI$^+$)** ber.: $C_{23}H_{15}Cl_3NO^+$ [M+H] 426.02; gef.: 426.03 (M+H), 443.05 (M+$NH_4$), 489.16 (M+ACN+Na).

Die Analytik wurde von *Beate Lungerich* (Arbeitsgruppe Kurz) durchgeführt.

## 5.3 Synthese des Pyronaridinderivats **7x**

### 5.3.1 Synthese von 7-Chlor-2-methoxy-10-methylbenzo[*b*]-1,5-naphthyridin **1x**



**1x**

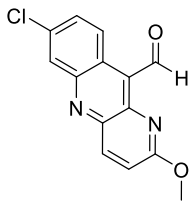
$C_{14}H_{11}ClN_2O$

[258.0560 g/mol]

Unter Argonatmosphäre wurden 7,10-Dichlor-2-methoxybenzo[*b*]-1,5-naphthyridin **LXXXIX** (1.00 g, 3.58 mmol, 1.00 Äq.), Methylboronsäure (644 mg, 10.8 mmol, 3.00 Äq.) und Kaliumphosphat (2.28 g, 10.8 mmol, 3.00 Äq.) vorgelegt und in THF (7.47 mL) sowie Wasser (0.13 mL) gelöst. Der Rundkolben wurde erneut mit Stickstoff gespült, ehe [1,1′-Bis(diphenylphosphin)ferrocen]dichlorpalladium(II) (262 mg, 0.36 mmol, 10 mol%) hinzugegeben wurde und die Lösung für 64 h bei 65 °C gerührt wurde. Daraufhin wurde die Lösung über Celite® filtriert und Ethylacetat wurde zum Filtrat hinzugegeben. Die Lösung wurde mit Wasser (1 x 20 mL) und gesättigter Natriumchlorid-Lösung (2 x 20 mL) gewaschen. Die Trocknung der organischen Phase erfolgte mithilfe von Natriumsulfat und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung an Silicagel erfolgte mit einem Laufmittelgemisch aus Cyclohexan und Ethylacetat mittels Flashtechnik.

**Ausbeute:** 80 % (851 mg, 3.29 mmol), weißer Feststoff.
**HPLC:** 10.359 min.; 97 %.
**Schmelzpunkt:** 170 °C.
**$^1$H-NMR ($CDCl_3$, 300 MHz):** $\delta$ 8.21 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 8.13 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 8.07 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.46 (dd, J = 9.2, 2.1 Hz, 1H), 7.19 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 4.13 (s, 3H), 3.06 (s, 3H).
**$^{13}$C-NMR ($CDCl_3$, 75 MHz):** $\delta$ 161.14, 146.57, 143.67, 141.33, 140.23, 137.13, 134.96, 128.52, 127.27, 126.31, 126.19, 119.59, 53.86, 12.33.
**HR-MS ($ESI^+$)** ber.: $C_{14}H_{12}ClN_2O$ [M+H] 259.0633; gef.: 259.0632.

## 5.3.2 Synthese von Methoxybenzo[*b*][1,5]naphthyridin-10-carbaldehyd **2x**



**2x**

$C_{14}H_9ClN_2O_2$

[272.0353 g/mol]

**2x** wurde angelehnt an eine Vorschrift von *Bao* et al. hergestellt.[193]

In einem sekurierten Schlenkrohr wurden unter Argonatmosphäre das Methylbenzo[*b*][1,5]naphthyridin **1x** (589 mg, 2.28 mmol,1.00 Äq.) und Selen(IV)-oxid (455 mg, 4.10 mmol, 1.80 Äq.) vorgelegt und in 1,4-Dioxan (36.5 mL) gelöst. Die Lösung wurde für 24 h bei 110 °C gerührt und anschließend filtriert. Nach einer zweiten Filtration über Celite® wurde das Filtrat mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (2 x 30 mL) und gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (1 x 30 mL) extrahiert. Die Trocknung der organischen Phase erfolgte mithilfe von Natriumsulfat. Schließlich wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und die säulenchromatographische Reinigung an Silicagel erfolgte mit einem Laufmittelgemisch aus Cyclohexan und Ethylacetat mittels Flashtechnik.

**Ausbeute:** 94 % (582 mg, 2.13 mmol), gelber Feststoff.

**HPLC:** 15.360 min.; 100 %.

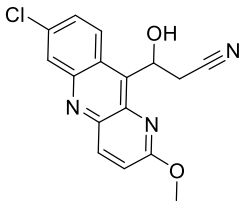
**Schmelzpunkt:** 185 °C.

**$^1$H-NMR ($CDCl_3$, 300 MHz):** $\delta$ 11.74 (s, 1H), 9.13 (dd, $J$ = 9.5, 0.6 Hz, 1H), 8.28 (d, $J$ = 9.3 Hz, 1H), 8.17 (dd, $J$ = 2.2, 0.5 Hz, 1H), 7.60 (dd, $J$ = 9.4, 2.2 Hz, 1H), 7.23 (d, $J$ = 2.0 Hz, 1H), 4.13 (s, 3H).

**$^{13}$C-NMR ($CDCl_3$, 75 MHz):** $\delta$ 195.58, 162.60, 147.52, 145.47, 140.40, 139.24, 135.57, 131.06, 128.45, 127.84, 126.90, 122.44, 120.25, 54.57.

**HR-MS ($ESI^+$)** ber.: $C_{14}H_{10}ClN_2O_2$ [M+H] 273.0425; gef.: 273.0425.

5.3.3 Synthese von 3-(7-Chlor-2-methoxybenzo[*b*][1,5] naphthyridin-10-yl)-3-hydroxypropanenitril **3x**




**3x**

$C_{16}H_{12}ClN_3O_2$

[313.0618]

**3x** wurde angelehnt an eine Vorschrift von *Leven* et al. hergestellt.[183]

Unter Argonatmosphäre wurden Tricyclohexylphosphin (0.08 Äq.) und Methoxy(cyclooctadien)rhodium(I)-dimer (0.05 Äq.) unter Argonatmosphäre vorgelegt und in trockenem Toluol (0.04 mL/Äq.) gelöst. Die Lösung wurde für 30 min bei RT gerührt und das Toluol wurde anschließend unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer verdampft. Unter Argonatmosphäre wurden anschließend trockenes DMSO (0.03 mL/Äq.), der Aldehyd **2x** (1.00 Äq.) und trockenes ACN (19.0 Äq.) zum Rückstand hinzugegeben. Die Lösung wurde für 5 h bei RT gerührt und über Celite® filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und die säulenchromatographische Reinigung an Silicagel erfolgte mit einem Laufmittelgemisch aus Cyclohexan und Ethylacetat mittels Flashtechnik.

**Ausbeute:** 83 %, 190 mg (0.61 mmol), weiß-gelber Feststoff.

**HPLC:** 10.673 min.; 100 %.

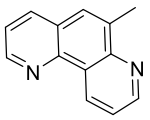
**HR-MS (ESI$^+$)** ber.: $C_{16}H_{13}ClN_3O_2$ [M+H] 314.0691; gef.: 314.0690.

**$^1$H-NMR ($CDCl_3$, 300 MHz):** $\delta$ 8.36 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 8.23 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 8.12 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 7.82 (d, J = 10.1 Hz, 1H), 7.62 (dd, J = 9.3, 2.2 Hz, 1H), 7.29 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 6.21 (dt, J = 10.1, 6.5 Hz, 1H), 4.15 (s, 3H), 3.20 (dd, J = 16.7, 6.9 Hz, 1H), 3.14 (dd, J = 16.7, 6.0 Hz, 1H).

**$^{13}$C-NMR ($CDCl_3$, 151 MHz):** $\delta$ 161.24, 147.26, 143.81, 141.90, 137.71, 135.90, 135.88, 129.38, 129.36, 123.83, 123.68, 120.18, 117.18, 67.84, 54.80, 27.71.

## 5.4 Synthese des Phenanthrolinderivats **4a**

### 5.4.1 Synthese von 6-Methyl-1,7-phenanthrolin **1a**



**1a**

$C_{13}H_{10}N_2$

[194.0844 g/mol]

**1a** wurde angelehnt an eine Vorschrift von *Tan* et al. hergestellt. [227]

2,4-Diaminotoluol **XXXIVb** (1.25 g, 10.0 mmol, 1.00 Äq.) und NaI (1.62 g, 10.8 mmol, 1.08 Äq.) wurden vorgelegt. Schwefelsäure (80 %, 2.51 mL) wurde zugegeben und Glycerol (1.86 g, 20.0 mmol, 2.00 Äq.) wurde über 30 Minuten bei 140 °C zugetropft. Anschließend wurde 48 h bei 140 °C gerührt. Nach Abkühlen wurde das Reaktionsgemisch auf Eis gegeben. Die wässrige Phase wurde mit Natronlauge (25 %) auf pH 8-11 eingestellt und über Celite® filtriert.

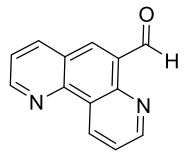
Anschließend wurde die wässrige Phase mit Dichlormethan (3 × 20 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit Wasser (2 × 20 mL) und gesättigter Natriumchlorid-Lösung (1 x 30 mL) gewaschen und mithilfe von Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatografische Reinigung an Silicagel erfolgte mit einem Laufmittelgemisch aus Cyclohexan und Ethylacetat mittels Flashtechnik.

**Ausbeute:** 14 % (263 mg. 1.35 mmol), hellbrauner Feststoff.

**HPLC (Methode 1):** $t_R$ = 6.0 min, AUC = 96.8 %.

**$^1$H-NMR (300 MHz, DMSO-$d_6$):** $\delta$ 9.48 (dd, $J$ = 8.3, 1.8 Hz, 1H), 9.09 (dd, $J$ = 4.3, 1.8 Hz, 1H), 8.98 (dd, $J$ = 4.4, 1.7 Hz, 1H), 8.38 (dd, $J$ = 8.1, 1.7 Hz, 1H), 7.97 (q, $J$ = 1.2 Hz, 1H), 7.83 - 7.65 (m, 2H), 2.77 (d, $J$ = 1.2 Hz, 3H).

## 5.4.2 Synthese von 1,7-Phenanthrolin-6-carbaldehyd **2a**




**2a**

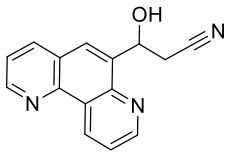
$C_{13}H_8N_2O$

[208.0637 g/mol]

**2a** wurde angelehnt an eine Vorschrift von *Bao* et al. hergestellt.[193]
Unter Stickstoffatmosphäre wurde Methylphenanthrolin **1a** (388 mg, 2.00 mmol, 1.00 Äq.) in 1,2-Dichlorbenzol (31.1 mL) vorgelegt. Es wurde Selen(IV)-oxid (536 mg, 4.83 mmol, 2.41 Äq.) zugegeben und anschließend für 4 Stunden auf 180 °C erhitzt. Das entstandene Reaktionsgemisch wurde nach Abkühlen über Celite® filtriert und mit HCl (1 M, 10 mL) gewaschen, bevor das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt wurde. Die wässrige Phase wurde mit Dichlormethan (5 x 20 mL) extrahiert. Die Trocknung der vereinten organischen Phasen erfolgte mithilfe von Natriumsulfat. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatografische Reinigung an Silicagel erfolgte mit einem Laufmittelgemisch aus Cyclohexan und Ethylacetat mittels Flashtechnik.

**Ausbeute:** 87 % (362 mg, 1.74 mmol), hellgelber Feststoff.
**HPLC (Methode 1):** $t_R$ = 5.0 min, AUC = 95.1 %.
**$^1$H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$):** $\delta$ 11.44 (s, 1H), 9.56 (d, $J$ = 8.3 Hz, 1H), 9.14 - 9.07 (m, 2H), 8.56 (s, 1H), 8.37 (d, $J$ = 8.0 Hz, 1H), 7.71 (dd, $J$ = 8.2, 4.3 Hz, 1H), 7.63 (dd, $J$ = 7.9, 4.3 Hz, 1H).
**$^{13}$C-NMR (151 MHz, $CDCl_3$):** $\delta$ 192.61, 151.75, 151.41, 148.11, 147.96, 138.31, 133.12, 130.86, 130.67, 127.18, 125.02, 123.20, 122.62.

5.4.3 Synthese von 3-Hydroxy-3-(1,7-phenanthrolin-6-yl)propanenitril **3a**




**3a**

$C_{15}H_{11}N_3O$

[249.0902 g/mol]

**3a** wurde angelehnt an eine Vorschrift von *Leven* et al. hergestellt.[183]

In einem sekurierten Schlenkrohr wurde *n*-Butyllithium (1.6 M in *n*-Hexan, 0.57 mL, 0.91 mmol, 1.30 Äq.) bei -78 °C unter Schutzgasatmosphäre mit Tetrahydrofuran (3.38 mL) verdünnt. Acetonitril (0.05 mL, 0.91 mmol, 1.30 Äq.) wurde in Tetrahydrofuran (0.68 mL) gelöst und über einen Zeitraum von 5 Minuten hinzugetropft. Der Reaktionsansatz wurde eine Stunde bei -78 °C gerührt, wobei sich eine weiße Suspension bildete. Anschließend wurde der Aldehyd **2a** in Tetrahydrofuran (0.68 mL) gelöst und langsam zur Suspension getropft. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur wurde weitere 30 Minuten gerührt. Anschließend wurde die Lösung auf eine Eis-Wasser-Mischung, die 10 % (v/v) konzentrierte Salzsäure enthielt, gegeben. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase wurde mit Diethylether (3 × 50 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Extrakte wurden mit einer gesättigten Natriumchlorid-Lösung gewaschen und anschließend mit Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatografische Reinigung an Silicagel erfolgte mit einem Laufmittelgemisch aus Cyclohexan und Ethylacetat mittels Flashtechnik.

**Ausbeute:** 57 % (99.0 mg, 0.40 mmol), oranger Feststoff.

**HPLC (Methode 1):** $t_R$ = 6.5 min, AUC = 100.0 %.

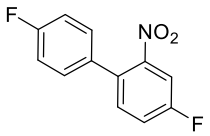
**$^1$H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$):** $\delta$ 9.71 (d, $J$ = 8.2 Hz, 1H), 9.06 (d, $J$ = 4.3 Hz, 1H), 8.99 (d, $J$ = 4.3 Hz, 1H), 8.31 (d, $J$ = 8.0 Hz, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.75 (dd, $J$ = 8.2, 4.4 Hz, 1H), 7.66 (dd, $J$ = 7.9, 4.4 Hz, 1H), 5.57 (t, $J$ = 6.7 Hz, 1H), 3.26 (d, $J$ = 6.7 Hz, 2H).

**$^{13}$C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$):** $\delta$ 150.12, 149.67, 147.51, 145.60, 136.60, 135.49, 134.31, 127.85 - 127.76 (m), 125.63, 123.21, 122.47, 117.80, 71.88, 27.58.

**MS (ESI$^+$):** m/z: ber.: [$C_{15}H_{11}N_3O$ +$H^+$] 250.10; gef.: 250.10.

## 5.5 Synthese der Phenanthridinderivate **4b-e**

### 5.5.1 Synthese von 4,4'-Difluor-2-nitro-1,1'-biphenyl **5**




**5**

$C_{12}H_7F_2NO_2$

[235.0445 g/mol]

**5** wurde angelehnt an eine Vorschrift von *Zhang* et al. hergestellt.[196]

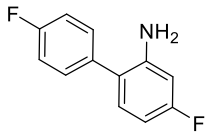
Unter Stickstoffatmosphäre wurden 4-Fluor-1-iod-2-nitrobenzol **LVI** (1.36 g, 5.00 mmol, 1.00 Äq.), (4-Fluorphenyl)boronsäure **LVIIa** (1.43 g, 10.0 mmol, 2.00 Äq.) und Kaliumcarbonat (1.73 g, 12.5 mmol, 2.50 Äq.) vorgelegt und in Aceton (10 mL) und Wasser (12 mL) gelöst. Der Kolben wurde erneut mit Stickstoff gespült, bevor Palladium(II)acetat (0.12 g, 0.50 mmol, 10 mol%) in Aceton (2 mL) zugegeben wurde. Anschließend wurde 16 h bei 65 °C gerührt. Nach Abkühlen des Reaktionsgemischs wurde die wässrige Phase mit Ethylacetat (4 x 40 mL) extrahiert. Die vereinte organische Phase wurde mit Wasser (1 x 50 mL) gewaschen. Die Trocknung der organischen Phase erfolgte mithilfe von Natriumsulfat. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatografische Reinigung an Silicagel erfolgte mit einem Laufmittelgemisch aus Cyclohexan und Ethylacetat mittels Flashtechnik.

**Ausbeute:** 61 % (711 mg, 3.02 mmol), gelber Feststoff.

**HPLC (Methode 1):** $t_R$ = 15.0 min, AUC = 99.7 %.

**$^1$H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$):** $\delta$ 7.76 (dd, $J$ = 8.0, 2.5 Hz, 1H), 7.59 - 7.46 (m, 2H), 7.40 (ddt, $J$ = 8.1, 5.1, 2.5 Hz, 2H), 7.30 - 7.22 (m, 2H).

## 5.5.2 Synthese von 4,4'-Difluor-[1,1'-biphenyl]-2-amin **6**




**6**

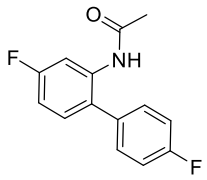
$C_{12}H_9F_2N$

[205.0703 g/mol]

**6** wurde angelehnt an eine Vorschrift von *Mo* et al. hergestellt.[197]
Unter Stickstoffatmosphäre wurde das Nitrobiphenyl **5** (1.07 g, 4.53 mmol, 1.00 Äq.) vorgelegt und in Methanol (36 mL) gelöst. Pd/C (0.19 g, 0.18 mmol, 4.00 mol%) wurde sequenziell zugegeben, ehe Wasserstoffgas über 10 min eingeleitet wurde. Das Reaktionsgemisch wurde für 4 h bei RT gerührt und anschließend über Celite® filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt.

**Ausbeute:** 97 % (906 mg, 4.41 mmol), gelbes Öl.
**HPLC (Methode 1):** $t_R$ = 13.5 min, AUC = 99.2 %.
**$^1$H-NMR (300 MHz, DMSO-$d_6$):** $\delta$ 7.43 - 7.37 (m, 2H), 7.25 (t, *J* = 8.9 Hz, 2H), 6.96 (dd, *J* = 8.3, 6.9 Hz, 1H), 6.53 (dd, *J* = 11.7, 2.6 Hz, 1H), 6.39 (td, *J* = 8.5, 2.6 Hz, 1H), 5.09 (s, 2H).

5.5.3 Synthese von *N*-(4,4'-Difluor-[1,1'-biphenyl]-2-yl)acetamid **7**




**7**

$C_{14}H_{11}F_2NO$

[247.0809 g/mol]

**7** wurde angelehnt an eine Vorschrift von *Lu* et al. hergestellt.[198]

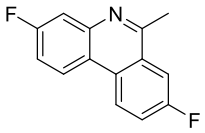
Unter Stickstoffatmosphäre wurde das Biphenylamin **6** (420 mg, 2.05 mmol, 1.00 Äq.) vorgelegt und in DCM (8.19 mL) gelöst. Triethylamin (1.43 mL, 10.2 mmol, 5.00 Äq.) wurde zugegeben, ehe Acetylchlorid (0.18 mL, 2.46 mmol, 1.20 Äq.) zugetropft wurde. Das Reaktionsgemisch wurde für 1 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Wasser (10 mL) abgebrochen. Die wässrige Phase wurde mit Dichlormethan (3 × 10 mL) extrahiert. Die Trocknung der vereinten organischen Phasen erfolgte mithilfe von Natriumsulfat. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatografische Reinigung an Silicagel erfolgte mit einem Laufmittelgemisch aus Cyclohexan und Ethylacetat mittels Flashtechnik.

**Ausbeute:** 58.6 % (290 mg, 1.17 mmol), gelbes Öl.

**HPLC (Methode 1):** $t_R$ = 12.0 min, AUC = 96.2 %.

**$^1$H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$):** $\delta$ 7.52 - 7.22 (m, 7H), 7.19 - 7.04 (m, 1H), 1.91 (s, 3H).

## 5.5.4 Synthese von 3,8-Difluor-6-methylphenanthridin **1e**




**1e**

$C_{14}H_9F_2N$

[229.0703 g/mol]

**1e** wurde angelehnt an eine Vorschrift von *Harnish et al.* hergestellt.[199]
Unter Stickstoffatmosphäre wurde das Acetamid **7** (726 mg, 2.94 mmol, 1.00 Äq.) vorgelegt und Polyphosphorsäure (4.58 mL) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 48 h bei 120 °C gerührt. Die Reaktion wurde auf Eis gekippt und gerührt, bis eine homogene Lösung entstand. Mithilfe einer wässrigen Ammoniumhydroxid-Lösung (25 %) wurde ein pH von 9 eingestellt. Der weiße Niederschlag wurde abfiltriert, in Ethylacetat (10 mL) gelöst und erneut filtriert. Das Filtrat wurde mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (3 × 15 mL) gewaschen. Die Trocknung der vereinten organischen Phasen erfolgte mithilfe von Natriumsulfat. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mit einem Gemisch aus Ethylacetat und *n*-Hexan umkristallisiert.

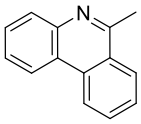
**Ausbeute:** 88 % (589 mg, 2.57 mmol), weißer Feststoff.
**HPLC (Methode 1):** $t_R$ = 8.0 min, AUC = 100.0 %.
**$^1$H-NMR (300 MHz, $CD_3OD$):** $\delta$ 9.02 (dd, $J$ = 9.2, 5.0 Hz, 2H), 8.96 (dd, $J$ = 9.2, 5.3 Hz, 1H), 8.41 (dd, $J$ = 9.2, 2.5 Hz, 1H), 8.11 (t, $J$ = 7.4 Hz, 1H), 7.93 (d, $J$ = 8.7 Hz, 1H), 7.78 (t, $J$ = 8.7 Hz, 1H), 3.31 (d, $J$ = 2.2 Hz, 3H).

### 5.5.5 *AAV 1*: Synthese der Methylphenanthridine **1b**-**1d**

Die Methylphenanthridine **1b**-**1d** wurden angelehnt an eine Vorschrift von *Xu et al.* hergestellt.[195]

In einem sekurierten Schlenkrohr wurden Silbertrifluormethansulfonat (20 mol%) und Dichlor(*p*-cymen)ruthenium(II)-Dimer (5 mol%) unter Argonatmosphäre vorgelegt. Es wurde erneut sekuriert, bevor das Biphenylamin **(XLVb-d)** (1.00 Äq.), But-2-insäuremethylester **XLVIII** (1.50 Äq.), Essigsäure (0.11 mL/mmol) und THF (6.68 mL/mmol) zugegeben wurden. Das Reaktionsgemisch wurde für 20 h auf 120 °C erhitzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von wässriger Natriumcarbonat-Lösung beendet und über Celite® filtriert. THF wurde unter vermindertem Druck entfernt. Die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat (3 × 12 mL) extrahiert. Anschließend wurden die vereinten organischen Phasen mit Wasser (1 x 10 mL) und gesättigter Natriumchlorid-Lösung (1 x 10 mL) gewaschen. Die Trocknung der organischen Phase erfolgte mithilfe von Natriumsulfat. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatografische Reinigung an Silicagel erfolgte mit einem Laufmittelgemisch aus Cyclohexan und Ethylacetat mittels Flashtechnik.

*6-Methylphenanthridin* ***1b***



**1b**

$C_{14}H_{11}N$

[193.0891 g/mol]

**1b** wurde hergestellt gemäß *AAV 1* aus 52.3 mg (0.30 mmol) der Verbindung 2-Aminobiphenyl **XLVb**.

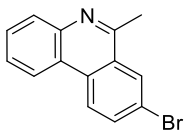
**Ausbeute:** 50 % (29.0 mg, 0.15 mmol), gelber Feststoff.

**HPLC (Methode 1):** $t_R$ = 6.7 min, AUC = 99.6 %.

**$^1$H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$):** $\delta$ 8.64 (dd, *J* = 8.4, 2.2 Hz, 1H), 8.55 (dt, *J* = 8.2, 1.6 Hz, 1H), 8.24 (dt, *J* = 8.3, 1.7 Hz, 1H), 8.21 - 8.07 (m, 1H), 7.94 - 7.79 (m, 1H), 7.72 (dtt, *J* = 8.0, 4.7, 1.3 Hz, 2H), 7.65 (td, *J* = 7.6, 1.8 Hz, 1H), 3.09 (d, *J* = 3.6 Hz, 3H).

**$^{13}$C-NMR (151 MHz, $CDCl_3$):** $\delta$ 159.13, 132.88, 131.18, 129.04, 128.87, 127.68, 126.91, 126.81, 125.88, 123.95, 122.54, 122.13, 29.84, 14.27.

*8-Brom-6-methylphenanthridin* ***1c***




**1c**

$C_{14}H_{10}BrN$

[270.9997 g/mol]

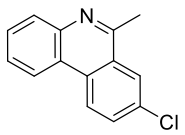
**1c** wurde hergestellt gemäß *AAV 1* aus 1.83 g (7.36 mmol) der Verbindung **XLVc**.

**Ausbeute:** 46 % (928 mg, 3.41 mmol), gelber Feststoff.

**HPLC (Methode 1):** $t_R$ = 8.4 min, AUC = 99.8 %.

**$^1$H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*$_6$, 50 °C):** $^1$H NMR (600 MHz, DMSO) δ 10.41 (s, 1H), 9.40 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 9.17 (s, 1H), 8.76 (d, J = 6.1 Hz, 2H), 8.09 (dd, J = 8.8, 1.9 Hz, 1H), 7.72 (ddd, J = 10.6, 9.0, 2.3 Hz, 1H), 3.17 (d, J = 2.0 Hz, 3H).

*8-Chlor-6-methylphenanthridin* ***1d***




**1d**

$C_{14}H_{10}ClN$

[227.0502 g/mol]

**1d** wurde hergestellt gemäß *AAV 1* aus 1.03 g (5.00 mmol) der Verbindung 4‘-Chlor-(1,1‘-biphenyl)-2-amin **XLVd**.

**Ausbeute:** 29 % (325 mg, 1.43 mmol), weißer Feststoff.

**HPLC (Methode 1):** $t_R$ = 8.1 min, AUC = 98.6 %.

**$^1$H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$):** *δ* 8.85 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 8.72 (dd, *J* = 8.1, 1.5 Hz, 1H), 8.33 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 8.05 - 7.89 (m, 2H), 7.80 - 7.62 (m, 2H), 2.95 (s, 3H).

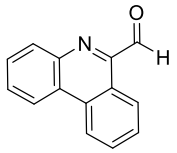
**$^{13}$C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$):** *δ* 157.75, 143.69, 133.20, 130.96, 129.60, 129.03, 126.84, 126.80, 125.91, 124.11, 123.15, 121.88, 23.39.

### 5.5.6 *AAV 2*: Synthese der Phenanthridincarbaldehyde **2b-e**

Die Phenanthridincarbaldehyde **2b-e** wurden angelehnt an eine Vorschrift von *Bao* et al. hergestellt.[193]

Unter Stickstoffatmosphäre wurde Methylphenanthridin **(1b-1e)** (1.00 Äq.) in 1,4-Dioxan (16 mL/mmol) und Wasser (1 mL/mmol) vorgelegt. Es wurde Selen(IV)-oxid (1.80 Äq.) zugegeben und anschließend für 6 Stunden auf 110 °C erhitzt. Das Lösungsmittel wurde anschließend unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Dichlormethan (10 mL) aufgenommen und über Celite® filtriert. Die organische Phase wurde mit Wasser (3 × 20 mL) gewaschen. Die Trocknung der organischen Phase erfolgte mithilfe von Natriumsulfat. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatografische Reinigung an Silicagel erfolgte mit einem Laufmittelgemisch aus Cyclohexan und Ethylacetat mittels Flashtechnik.

*Phenanthridin-6-carbaldehyd* ***2b***




**2b**

$C_{14}H_9NO$

[207.0684 g/mol]

**2b** wurde gemäß *AAV 2* aus 96.6 mg (0.50 mmol) der Verbindung 6-Methylphenanthridin **1b** hergestellt.

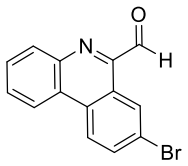
**Ausbeute:** 68 % (70.0 mg, 0.34 mmol), weißer Feststoff.

**HPLC (Methode 1):** $t_R$ = 7.7 min, AUC = 100.0 %.

**$^1$H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$):** *δ* 10.42 (s, 1H), 9.42 (ddd, *J* = 8.3, 1.4, 0.7 Hz, 1H), 8.78 - 8.50 (m, 2H), 8.46 - 8.24 (m, 1H), 7.91 (ddd, *J* = 8.4, 7.1, 1.4 Hz, 1H), 7.87 - 7.81 (m, 2H), 7.80 - 7.75 (m, 1H).

**$^{13}$C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$):** *δ* 195.28, 149.03, 143.31, 135.14, 131.89, 131.79, 131.54, 130.49, 129.63, 126.25, 125.11, 124.24, 123.61, 122.21.

*8-Bromphenanthridin-6-carbaldehyd* ***2c***




**2c**

$C_{14}H_8BrNO$

[284.9789 g/mol]

**2c** wurde gemäß *AAV 2* aus 846 mg (3.11 mmol) der Verbindung 8-Brom-6-methylphenanthridin **1c** hergestellt.

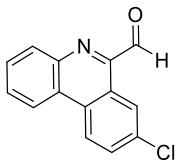
**Ausbeute:** 61 % (566 mg, 1.98 mmol), gelber Feststoff.

**HPLC (Methode 1):** $t_R$ = 14.8 min, AUC = 97.6 %.

**$^1$H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$):** *δ* 10.37 (s, 1H), 9.62 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 8.64 - 8.46 (m, 2H), 8.39 - 8.26 (m, 1H), 7.99 (dd, *J* = 8.9, 2.1 Hz, 1H), 7.94 - 7.77 (m, 2H).

**$^{13}$C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$):** *δ* 195.25, 148.93, 143.31, 134.55, 132.10, 131.58, 130.50, 129.72, 129.44, 125.15, 124.56, 123.71, 123.39, 122.18.

*8-Chlorphenanthridin-6-carbaldehyd* ***2d***




**2d**

$C_{14}H_8ClNO$

[241.0294 g/mol]

**2d** wurde gemäß *AAV 2* aus 3.50 g (13.1 mmol) der Verbindung 8-Chlor-6-methylphenanthridin **1d** hergestellt.

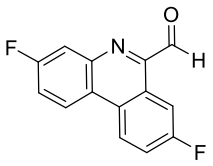
**Ausbeute:** 72 % (2.06 g, 8.28 mmol), gelber Feststoff.

**HPLC (Methode 1):** $t_R$ = 14.4 min, AUC = 95.2 %.

**$^1$H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$):** *δ* 10.35 (s, 1H), 9.42 (s, 1H), 8.58 - 8.51 (m, 2H), 8.31 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.86 - 7.80 (m, 3H).

**$^{13}$C-NMR (151 MHz, $CDCl_3$):** *δ* 195.34, 149.14, 143.41, 135.21, 131.97, 131.90, 131.60, 130.52, 129.66, 126.33, 125.20, 124.34, 123.68, 122.27.

*3,8-Difluorphenanthridin-6-carbaldehyd* ***2e***




**2e**

$C_{14}H_7F_2NO$

[243.0496 g/mol]

**2e** wurde gemäß *AAV 2* aus 580 mg (2.53 mmol) der Verbindung **1e** mit folgender Modifikation hergestellt: Dem Reaktionsgemisch wurden 10 mol% TBHP zugegeben, ehe es auf 80 °C erhitzt wurde.

**Ausbeute:** 47 % (288 mg, 1.18 mmol), hellgelber Feststoff.

**HPLC (Methode 1):** $t_R$ = 6.9 min, AUC = 99.6 %.

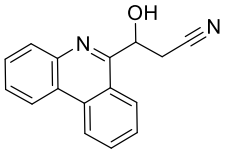
**$^1$H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$):** $\delta$ 10.36 (s, 1H), 9.13 (dd, $J$ = 10.3, 2.7 Hz, 1H), 8.59 (ddd, $J$ = 14.9, 9.2, 5.4 Hz, 2H), 7.98 (dd, $J$ = 9.2, 2.7 Hz, 1H), 7.64 (dddd, $J$ = 22.5, 9.1, 7.9, 2.7 Hz, 2H).

**$^{13}$C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$):** $\delta$ 195.27, 150.43, 130.36, 124.46, 124.34, 124.26, 124.14, 121.41, 121.09, 119.90, 119.58, 115.60, 112.09, 111.78.

### 5.5.7 *AAV* 3: Synthese der Phenanthridinnitrile **3b-d**

Die Phenantridinnitrile **3b-d** wurden angelehnt an eine Vorschrift von *Leven* et al. hergestellt.[183] In einem sekurierten Schlenkrohr wurde *n*-Butyllithium (1.2 mL/mmol, 1.6 M in *n*-Hexan) bei -78 °C unter Schutzgasatmosphäre mit Tetrahydrofuran (2.1 mL/mmol) verdünnt. Acetonitril (3.0 Äq.) wurde in Tetrahydrofuran (0.3 mL/mmol) gelöst und über einen Zeitraum von 5 Minuten hinzugetropft. Der Reaktionsansatz wurde eine Stunde bei -78 °C gerührt, wobei sich eine weiße Suspension bildete. Anschließend wurde der entsprechende Aldehyd **2b-d** in Tetrahydrofuran (1 mL/mmol) gelöst und langsam zur Suspension getropft. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung auf eine Eis-Wasser-Mischung, die 10 % (v/v) konzentrierte Salzsäure enthielt, gegeben. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase mit Diethylether (3 × 50 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Extrakte wurden mit einer gesättigten Natriumchlorid-Lösung gewaschen und anschließend über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatografische Reinigung an Silicagel erfolgte mit einem Laufmittelgemisch aus Cyclohexan und Ethylacetat mittels Flashtechnik.

*3-Hydroxy-3-(phenanthridin-6-yl)propannitril* ***3b***




**3b**

$C_{16}H_{12}N_2O$

[248.0950 g/mol]

**3b** wurde gemäß *AAV* 3 aus 60.1 mg (0.29 mmol) der Verbindung Phenanthridin-6-carbaldehyd **2b** hergestellt.

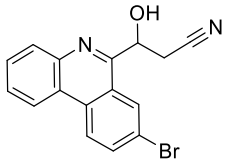
**Ausbeute:** 76 % (55 mg, 0.22 mmol), gelber Feststoff.

**HPLC (Methode 1):** $t_R$ = 8.5 min, AUC = 95.8 %.

**$^1$H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$):** $\delta$ 8.73 (d, $J$ = 8.3 Hz, 1H), 8.61 (d, $J$ = 8.2 Hz, 1H), 8.21 (d, $J$ = 8.1 Hz, 1H), 8.06 (d, $J$ = 8.2 Hz, 1H), 7.93 (dt, $J$ = 16.7, 8.0 Hz, 1H), 7.79 (q, $J$ = 8.0 Hz, 2H), 7.74 (t, $J$ = 7.6 Hz, 1H), 5.85 - 5.80 (m, 1H), 3.16 (dd, $J$ = 16.8, 4.0 Hz, 1H), 2.89 (dd, $J$ = 16.8, 6.3 Hz, 1H).

**$^{13}$C-NMR (151 MHz, $CDCl_3$):** $\delta$ 156.82, 141.98, 133.86, 131.61, 129.93, 129.46, 128.06 (d, $J$ = 10.9 Hz), 125.96, 124.57, 124.31, 123.41, 122.66, 122.34, 116.94, 65.69, 63.96.

*3-(8-Bromphenanthridin-6-yl)-3-hydroxypropannitril* ***3c***




**3c**

$C_{16}H_{11}BrN_2O$

[326.0055 g/mol]

**3c** wurde gemäß *AAV* 3 aus 378 mg (1.32 mmol) der Verbindung 8-Bromphenanthridin-6-carbaldehyd **2c** hergestellt.

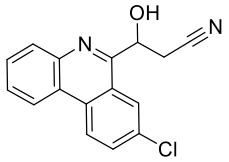
**Ausbeute:** 40 % (174 mg, 0.53 mmol), gelber Feststoff.

**HPLC (Methode 1):** $t_R$ = 6.9 min, AUC = 99.6 %.

**$^1$H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$):** $\delta$ 8.55 - 8.46 (m, 2H), 8.21 - 8.10 (m, 2H), 7.96 (dd, *J* = 8.9, 2.0 Hz, 1H), 7.75 (dddd, *J* = 22.2, 8.4, 7.1, 1.5 Hz, 2H), 5.70 (dd, *J* = 6.0, 4.3 Hz, 1H), 3.16 (dd, *J* = 16.7, 4.2 Hz, 1H), 2.90 (dd, *J* = 16.7, 6.0 Hz, 1H).

**$^{13}$C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$)**: $\delta$ 155.58, 141.83, 134.70, 132.34, 130.05, 129.78, 128.40, 126.86, 125.06, 123.94, 123.90, 122.16, 122.08, 116.76, 65.65, 27.54, 27.04.

*3-(8-Chlorphenanthridin-6-yl)-3-hydroxypropannitril* ***3d***




**3d**

$C_{16}H_{11}ClN_2O$

[282.0560 g/mol]

**3d** wurde gemäß *AAV* 3 aus 251 mg (1.04 mmol) der Verbindung 8-Chlorphenanthridin-6-carbaldehyd **2d** hergestellt.

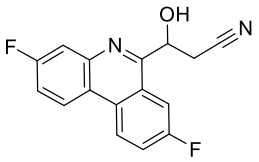
**Ausbeute:** 34 % (127 mg, 0.45 mmol), gelber Feststoff.

**HPLC (Methode 1):** $t_R$ = 6.9 min, AUC = 99.6 %.

**$^1$H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$):** $\delta$ 8.66 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 8.55 (dd, *J* = 7.9, 1.7 Hz, 1H), 8.24 - 8.18 (m, 1H), 8.01 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.88 (dd, *J* = 8.9, 2.1 Hz, 1H), 7.85 - 7.71 (m, 2H), 5.74 (t, *J* = 5.1 Hz, 1H), 5.63 (s, 1H), 3.18 (dd, *J* = 16.7, 4.3 Hz, 1H), 2.92 (dd, *J* = 16.7, 6.0 Hz, 1H).

**$^{13}$C-NMR (151 MHz, $CDCl_3$):** $\delta$ 155.77, 141.96, 134.20, 132.17, 132.14, 130.11, 129.77, 128.46, 125.10, 123.98, 123.71, 123.65, 122.19, 116.70, 65.69, 27.61.

## 5.5.8 Synthese von 3-(3,8-Difluorphenanthridin-6-yl)-3-hydroxypropannitril **3e**




**3e**

$C_{16}H_{10}F_2N_2O$

[284.0761 g/mol]

**3e** wurde nach einer Vorschrift von *Fan* et al. hergestellt.[200]

Unter Stickstoffatmosphäre wurde der Phenanthridinaldehyd **2e** (74.6 mg, 0.31 mmol, 1.00 Äq.) vorgelegt und in DMF (1.50 mL) gelöst. IPr (6.08 mg, 0.02 mmol, 5.00 mol%) wurde zugegeben, ehe TMSAN (54.8 mg, 0.46 mmol, 1.50 Äq.) zugegeben wurde. Das Reaktionsgemisch wurde für 42 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von HCl (1 M, 1.00 mL) und Methanol (1.00 mL) abgebrochen. Die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat (3 × 20 mL) extrahiert. Die Trocknung der vereinten organischen Phase erfolgte mithilfe von Natriumsulfat. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatografische Reinigung an Silicagel erfolgte mit einem Laufmittelgemisch aus Cyclohexan und Ethylacetat mittels Flashtechnik.

**Ausbeute:** 27 % (23.5 mg, 0.08 mmol), orangefarbenes Öl.

**HPLC (Methode 1):** $t_R$ = 6.9 min, AUC = 99.6 %.

**$^1$H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$):** *δ* 8.65 (dd, J = 8.9, 5.1 Hz, 1H), 8.55 - 8.48 (m, 1H), 7.87 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.70 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 7.50 (t, J = 8.5 Hz, 1H), 5.72 (t, J = 5.0 Hz, 1H), 3.23 - 3.10 (m, 1H), 2.94 (dd, J = 16.8, 5.6 Hz, 1H).

**$^{13}$C-NMR (151 MHz, $CDCl_3$):** *δ* 163.76, 162.34, 162.10, 160.67, 157.62, 157.59, 142.89, 142.81, 130.40, 125.88, 125.83, 124.18, 124.12, 123.48, 123.43, 121.55, 121.39, 120.92, 117.80, 117.64, 116.54, 114.65, 114.51, 109.50, 109.36, 65.90, 27.40.

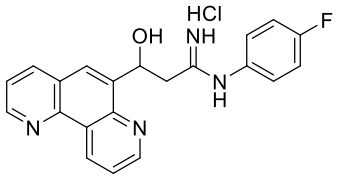
## 5.6 Synthese der 3-Hydroxypropanamidine **4a-e** und **7a-v**

### 5.6.1 *AAV* 4: Synthese der 3-Hydroxypropanamidine **4a-e** und **7a-s**

Die 3-Hydroxypropanamidine **4a-e** und **7a-s** wurden angelehnt an eine Vorschrift von *Knaab* et al. hergestellt.[184]

Unter Stickstoffatmosphäre wurde das entsprechende Amin (2.00 Äq.) in trockenem Toluol (5 mL/mmol) bei Raumtemperatur gelöst. Trimethylaluminium (3.00 Äq., 2 M in Toluol) wurde über einen Zeitraum von fünf Minuten zugetropft und die Lösung wurde für 30 Minuten bei 60 °C gerührt. Das Nitril **3a-s** wurde in trockenem Toluol (2.5 mL/mmol) und THF (2.5 mL/mmol) gelöst und zum Reaktionsgemisch zugetropft. Anschließend wurde für 16 h bei 60 °C gerührt, bevor das Reaktionsgemisch auf eine Wasser-Eis-Mischung (10 mL) gegeben wurde. Ethylacetat (5 mL) wurde zugegeben und die Phasen wurden im Scheidetrichter getrennt. Die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat (3 × 20 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden anschließend mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (3 × 20 mL) gewaschen und anschließend mit Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Die Aufreinigung erfolgte wie jeweils aufgeführt.

*N-(4-Fluorphenyl)-3-hydroxy-3-(1,7-phenanthrolin-6-yl)propanimidamid Hydrochlorid* ***4a***




**4a**

$C_{21}H_{18}ClFN_4O$

[396.1153 g/mol]

**4a** wurde gemäß *AAV 4* aus 85.0 mg (0.34 mmol) der Verbindung **3a** mit folgender Modifikation hergestellt:

Anstelle von 3.00 Äq. Trimethylaluminium (2 M in Toluol) wurden 4.00 Äq. Trimethylaluminium (2 M in Toluol) eingesetzt.

Die säulenchromatografische Reinigung an Silicagel erfolgte mit einem Laufmittelgemisch aus Dichlormethan und Methanol (10 %) mittels Flashtechnik. HCl/1,4-Dioxan wurde langsam zugegeben, bevor fünf Minuten gerührt wurde. Der entstandene Niederschlag wurde zweimal mit Acetonitril gewaschen und über eine Glasfritte (Porengröße 4) abgesaugt. Der erhaltene Feststoff wurde in Methanol gelöst und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt.

**Ausbeute:** 34 %, (46.3 mg, 0.12 mmol), weiß-grauer Feststoff.

**Schmelzpunkt:** 176.5 °C.

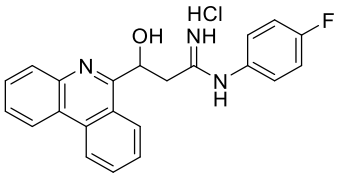
**HPLC (Methode 1):** $t_R$ = 6.9 min, AUC = 99.6 %.

**$^1$H-NMR (300 MHz, $CD_3OD$):** $\delta$ 10.01 (dd, $J$ = 8.5, 1.7 Hz, 1H), 9.35 (dd, $J$ = 5.0, 1.7 Hz, 1H), 9.25 (dd, $J$ = 4.9, 1.6 Hz, 1H), 8.97 (dd, $J$ = 8.2, 1.7 Hz, 1H), 8.71 (d, $J$ = 0.9 Hz, 1H), 8.26 - 8.05 (m, 1H), 7.49 - 7.38 (m, 3H), 7.34 - 7.27 (m, 2H), 6.27 (ddd, $J$ = 9.4, 4.0, 1.0 Hz, 1H), 3.51 (dd, $J$ = 14.0, 4.0 Hz, 1H), 3.21 (dd, $J$ = 14.0, 9.4 Hz, 1H).

**$^{13}$C-NMR (75 MHz, $CD_3OD$):** $\delta$ 166.96, 150.13, 149.80, 143.55, 141.81, 140.11, 131.68, 131.05, 129.44, 128.70, 126.41, 125.04, 118.50, 118.19, 69.27, 42.75.

**HR-MS (ESI$^+$):** m/z: ber.: [$C_{21}H_{17}FN_4O+H^+$] 361.1459; gef.: 361.1457.

*N-(4-Fluorphenyl)-3-hydroxy-3-(phenanthridin-6-yl)propanimidamid Hydrochlorid* ***4b***




**4b**

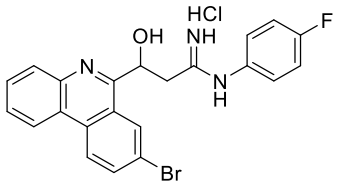
$C_{22}H_{19}ClFN_3O$

[395.1201 g/mol]

**4b** wurde gemäß *AAV 4* aus 49.7 mg (0.20 mmol) der Verbindung **3b** hergestellt. Die säulenchromatografische Reinigung an Silicagel erfolgte mit einem Laufmittelgemisch aus Dichlormethan und Methanol (10 %) mittels Flashtechnik. HCl/1,4 Dioxan wurde langsam zugegeben, bevor fünf Minuten gerührt wurde. Der entstandene Niederschlag wurde zweimal mit Acetonitril gewaschen und über eine Glasfritte (Porengröße 4) abgesaugt. Der erhaltene Feststoff wurde in Methanol gelöst und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt.

**Ausbeute:** 37 % (29.0 mg, 0.07 mmol), weiß-grauer Feststoff.
**Schmelzpunkt**: 139.6 °C.
**HPLC (Methode 1):** $t_R$ = 8.2 min, AUC = 98.3 %.
**$^1$H-NMR (600 MHz, $CD_3OD$):** $\delta$ 8.91 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.81 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.75 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.28 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.07 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.92 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.89 - 7.80 (m, 2H), 7.44 - 7.37 (m, 2H), 7.34 - 7.26 (m, 2H), 6.24 (dd, *J* = 8.7, 4.3 Hz, 1H), 3.51 (dd, *J* = 14.4, 4.4 Hz, 1H), 3.37 - 3.32 (m, 1H).
**$^{13}$C-NMR (151 MHz, $CD_3OD$):** $\delta$ 168.18, 135.15, 131.40, 130.47, 129.26 (d, *J* = 4.3 Hz), 129.21, 129.15, 127.37, 125.87, 124.84, 124.16, 123.78, 118.33 (d, *J* = 23.4 Hz), 69.58, 49.57, 40.79.
**HR-MS (ESI$^+$):** m/z: ber.: [$C_{22}H_{18}FN_3O+H^+$] 360.1507; gef.: 360.1515.

*3-(8-Bromphenanthridin-6-yl)-N-(4-fluorphenyl)-3-hydroxypropanimidamid Hydrochlorid* ***4c***




**4c**

$C_{22}H_{18}BrClFN_3O$

[473.0306 g/mol]

**4c** wurde gemäß *AAV 4* aus 50.0 mg (0.15 mmol) der Verbindung **3c** mit folgender Modifikation hergestellt:

Anstelle von 3.00 Äq. Trimethylaluminium (2 M in Toluol) wurden 4.00 Äq. Trimethylaluminium (2 M in Toluol) eingesetzt.

Die säulenchromatografische Reinigung an Silicagel erfolgte mit einem Laufmittelgemisch aus Dichlormethan und Methanol (10 %) mittels Flashtechnik. HCl/1,4 Dioxan wurde langsam zugegeben, bevor fünf Minuten gerührt wurde. Der entstandene Niederschlag wurde zweimal mit Acetonitril gewaschen und über eine Glasfritte (Porengröße 4) abgesaugt. Der erhaltene Feststoff wurde in Methanol gelöst und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt.

**Ausbeute:** 43 % (31.0 mg, 0.07 mmol), weiß-grauer Feststoff.

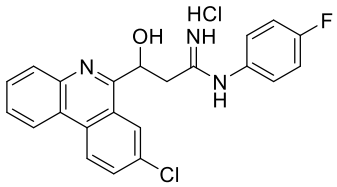
**Schmelzpunkt**: 174.4 °C.

**HPLC (Method 1):** $t_R$ = 10.9 min, AUC = 98.1 %.

**$^1$H-NMR (600 MHz, $CD_3OD$):** *δ* 9.09 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.99 - 8.89 (m, 1H), 8.49 - 8.40 (m, 1H), 8.32 (dd, *J* = 9.0, 2.0 Hz, 1H), 8.05 - 7.93 (m, 1H), 7.49 - 7.41 (m, 3H), 7.35 - 7.25 (m, 3H), 6.32 (dd, *J* = 9.2, 4.3 Hz, 1H), 3.53 (dd, *J* = 14.4, 4.3 Hz, 1H), 3.35 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H).

**$^{13}$C-NMR (75 MHz, $CD_3OD$):** *δ* 168.47, 158.87, 143.78, 135.53, 133.65, 130.81, 130.61, 129.90, 129.37, 129.24, 129.12, 126.58, 126.15, 125.18, 123.60, 122.93, 118.47, 118.16, 47.91, 9.25. **HR-MS (ESI+):** m/z: ber.: $[C_{22}H_{17}BrFN_3O+H^+]$ 438.0612; gef.: 438.0615.

*3-(8-Chlorphenanthridin-6-yl)-N-(4-fluorphenyl)-3-hydroxypropanimidamid Hydrochlorid* ***4d***




**4d**

$C_{22}H_{18}Cl_2FN_3O$

[429.0811 g/mol]

**4d** wurde gemäß *AAV 4* aus 70.0 mg (0.25 mmol) der Verbindung **3d** mit folgender Modifikation hergestellt:

Anstelle von 3.00 Äq. Trimethylaluminium (2 M in Toluol) wurden 4.00 Äq. Trimethylaluminium (2 M in Toluol) eingesetzt.

Die säulenchromatografische Reinigung an Silicagel erfolgte mit einem Laufmittelgemisch aus Dichlormethan und Methanol (10 %) mittels Flashtechnik. HCl/1,4 Dioxan wurde langsam zugegeben, bevor fünf Minuten gerührt wurde. Der entstandene Niederschlag wurde zweimal mit Acetonitril gewaschen und über eine Glasfritte (Porengröße 4) abgesaugt. Der erhaltene Feststoff wurde in Methanol gelöst und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt.

**Ausbeute:** 30 % (20.0 mg, 0.05 mmol), weiß-grauer Feststoff.

**Schmelzpunkt:** 167.3 °C.

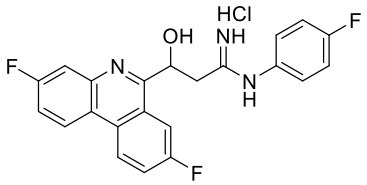
**HPLC (Method 1):** $t_R$ = 10.5 min, AUC = 96.6 %.

**$^1$H-NMR (300 MHz, $CD_3OD$):** *δ* 7.26 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.22 - 7.07 (m, 2H), 6.66 - 6.56 (m, 1H), 6.36 (dd, *J* = 8.9, 2.2 Hz, 1H), 6.32 - 6.13 (m, 2H), 5.55 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H), 5.48 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 4.40 (dd, *J* = 8.0, 4.9 Hz, 1H), 1.67 (dd, *J* = 14.2, 5.0 Hz, 1H), 1.57 (dd, *J* = 14.2, 8.0 Hz, 1H).

**$^{13}$C-NMR (151 MHz, $CD_3OD$):** *δ* 165.32, 159.74, 143.85, 134.80, 133.31, 132.71, 130.70, 130.44, 129.17, 127.37, 126.63, 126.18, 126.02, 125.07, 123.56, 117.74, 117.59, 70.40, 49.57, 27.97.

**HR-MS (ESI$^+$):** m/z: ber.: [$C_{22}H_{17}ClFN_3O+H^+$] 394.1117; gef.: 394.1119.

*3-(3,8-Difluorphenanthridin-6-yl)-N-(4-fluorphenyl)-3-hydroxypropanimidamid Hydrochlorid* ***4e***




**4e**

$C_{22}H_{17}ClF_3N_3O$

[431.1012 g/mol]

**4e** wurde gemäß *AAV 4* aus 94.0 mg (0.33 mmol) der Verbindung **3e** mit folgender Modifikation hergestellt:

Anstelle von 3.00 Äq. Trimethylaluminium (2 M in Toluol) wurden 4.00 Äq. Trimethylaluminium (2 M in Toluol) eingesetzt.

Die säulenchromatografische Reinigung an Silicagel erfolgte mit einem Laufmittelgemisch aus Dichlormethan und Methanol (10 %) mittels Flashtechnik. HCl/1,4 Dioxan wurde langsam zugegeben, bevor fünf Minuten gerührt wurde. Der entstandene Niederschlag wurde zweimal mit Acetonitril gewaschen und über eine Glasfritte (Porengröße 4) abgesaugt. Der erhaltene Feststoff wurde in Methanol gelöst und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt.

**Ausbeute:** 4 % (5.00 mg, 0.01 mmol), weiß-grauer Feststoff.

**Schmelzpunkt:** 170.4 °C.

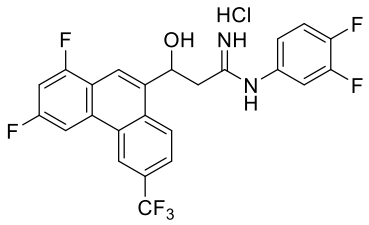
**HPLC (Methode 1):** $t_R$ = 10.4 min, AUC = 96.9 %.

**$^1$H-NMR (600 MHz, DMSO-*d6*):** $\delta$ 11.39 (s, 1H), 9.62 (s, 1H), 8.99 (dd, *J* = 9.2, 5.4 Hz, 1H), 8.91 (dd, *J* = 9.2, 5.9 Hz, 1H), 8.67 (s, 1H), 8.48 (dd, *J* = 10.4, 2.7 Hz, 1H), 7.92 (td, *J* = 8.7, 2.6 Hz, 1H), 7.84 (dd, *J* = 9.7, 2.8 Hz, 1H), 7.72 - 7.64 (m, 2H), 7.42 - 7.37 (m, 3H), 6.56 (s, 1H), 5.98 (s, 1H), 1.72 - 1.40 (m, 2H).

**$^{13}$C-NMR (151 MHz, DMSO- *d6*):** $\delta$ 175.55, 171.13 (d, *J* = 2.0 Hz), 170.72, 170.19, 169.91 (d, *J* = 3.5 Hz), 169.49, 152.61 (d, *J* = 11.8 Hz), 141.06, 140.07, 139.21, 137.56 (d, *J* = 9.0 Hz), 135.72 (d, *J* = 8.2 Hz), 135.06 (d, *J* = 9.5 Hz), 134.19 (d, *J* = 8.9 Hz), 130.59 - 129.89 (m), 126.59, 126.47 (d, *J* = 9.7 Hz), 123.21 (d, *J* = 20.4 Hz), 120.98 (d, *J* = 21.7 Hz), 78.32, 48.65 (d, *J* = 21.0 Hz), 38.50.

**HR-MS (ESI+):** m/z: ber.: [$C_{22}H_{16}F_3N_3O+H^+$] 396.1318; gef.: 396.1317.

*3-(1,3-Difluor-6-(trifluormethyl)phenanthren-9-yl)-N-(3,4-difluorphenyl)-3-hydroxypropanimidamid Hydrochlorid* ***7a***




**7a**

$C_{24}H_{16}ClF_7N_2O$

[516.0839 g/mol]

**7a** wurde gemäß *AAV 4* aus 221 mg (0.63 mmol) 3-(1,3-Difluor-6-(trifluormethyl)phenanthren-9-yl)-3-hydroxypropannitril hergestellt**.**

Nachdem HCl/Diethylether langsam zugegeben worden war, wurde fünf Minuten gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde zweimal mit Acetonitril gewaschen und über eine Glasfritte (Porengröße 4) abgesaugt. Der erhaltene Feststoff wurde in Methanol gelöst und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt.

**Ausbeute:** 85 % (275 mg, 0.53 mmol), gelber Feststoff.

**Schmelzpunkt:** 197.4 °C.

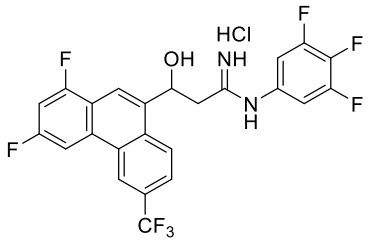
**HPLC (Methode 1):** $t_R$ = 12.4 min, AUC = 98.5 %.

**$^1$H-NMR (300 MHz, $CD_3OD$):** *δ* 9.06 (s, 1H), 8.71 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 8.48 (s, 1H), 8.46 - 8.36 (m, 1H), 8.02 (dd, *J* = 8.8, 1.8 Hz, 1H), 7.47 (dt, *J* = 10.2, 8.7 Hz, 1H), 7.36 (dddd, *J* = 10.8, 7.1, 5.4, 2.8 Hz, 2H), 7.19 (ddt, *J* = 8.4, 4.0, 2.0 Hz, 1H), 6.03 (dd, *J* = 9.4, 3.7 Hz, 1H), 3.37 - 3.31 (m, 1H), 3.10 (dd, *J* = 14.1, 9.4 Hz, 1H).

**$^{13}$C-NMR (75 MHz, $CD_3OD$):** *δ* 167.80, 138.42, 133.98 - 133.62 (m), 133.11, 131.76 (ddd, *J* = 7.9, 5.1, 3.0 Hz), 130.98 - 130.49 (m), 130.32 - 130.08 (m), 129.76 (d, *J* = 1.4 Hz), 127.56, 126.89, 125.07, 124.26, 122.95 - 122.67 (m), 120.20, 119.95, 119.48 (d, *J* = 2.3 Hz), 119.30, 119.12, 117.09, 116.83, 105.70 (d, *J* = 1.4 Hz), 105.38, 104.28, 103.94 (d, *J* = 3.7 Hz), 103.59, 68.98, 42.40.

**HR-MS (ESI$^+$):** m/z: ber.: [$C_{24}H_{15}F_7N_2O+H^+$] 481.1145; gef.: 481.1150.

*3-(1,3-Difluor-6-(trifluormethyl)phenanthren-9-yl)-3-hydroxy-N-(3,4,5-trifluorphenyl)propanimidamid Hydrochlorid* ***7b***




**7b**

$C_{24}H_{15}ClF_8N_2O$

[534.0745 g/mol]

**7b** wurde gemäß *AAV* 4 aus 200 mg (0.57 mmol) 3-(1,3-Difluor-6-(trifluormethyl)phenanthren-9-yl)-3-hydroxypropannitril hergestellt**.**

Nachdem HCl/Diethylether langsam zugegeben worden war, wurde fünf Minuten gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde zweimal mit Acetonitril gewaschen und über eine Glasfritte (Porengröße 4) abgesaugt. Der erhaltene Feststoff wurde in Methanol gelöst und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt.

**Ausbeute:** 85 % (260 mg, 0.49 mmol), weiß-grauer Feststoff.

**Schmelzpunkt:** 203.4 °C.

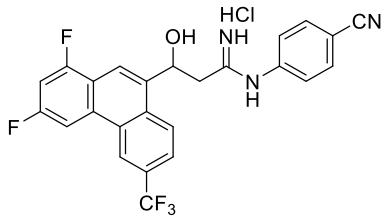
**HPLC (Methode 1):** $t_R$ = 12.6 min, AUC = 98.0 %.

**$^1$H-NMR (600 MHz, $CD_3OD$):** *δ* 9.06 (s, 1H), 8.70 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.47 (s, 1H), 8.42 (dd, *J* = 10.7, 2.2 Hz, 1H), 8.02 (dd, *J* = 8.7, 1.8 Hz, 1H), 7.37 (ddd, *J* = 10.6, 8.7, 2.3 Hz, 1H), 7.24 (dd, *J* = 7.8, 6.0 Hz, 2H), 6.02 (dd, *J* = 9.5, 3.5 Hz, 1H), 3.33 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 3.09 (dd, *J* = 14.1, 9.5 Hz, 1H).

**$^{13}$C-NMR (151 MHz, $CD_3OD$):** *δ* 168.08, 163.90, 163.81, 162.26, 162.17, 162.05, 161.96, 160.37, 160.28, 153.86, 152.23, 142.39, 142.29, 140.61, 138.34, 133.87 - 133.71 (m), 133.08, 131.13, 130.76, 130.41 - 130.29 (m), 130.11, 129.90, 129.68, 128.47 (d, *J* = 3.4 Hz), 126.88, 126.66, 125.07, 124.86, 123.06, 122.85 (d, *J* = 4.4 Hz), 119.43, 119.33, 119.08 (d, *J* = 6.1 Hz), 112.88, 112.84, 112.75, 112.72, 105.66, 105.51, 104.12, 103.94 (d, *J* = 3.7 Hz), 103.77, 68.94, 42.47.

**HR-MS (ESI+):** m/z: ber.: [$C_{24}H_{14}F_8N_2O+H^+$] 499,1051; gef.: 499.1063.

*N-(4-Cyanphenyl)-3-(1,3-difluor-6-(trifluormethyl)phenanthren-9-yl)-3-hydroxypropanimidamid Hydrochlorid* ***7c***




**7c**

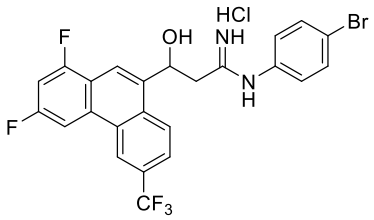
$C_{25}H_{17}ClF_5N_3O$

[505.0980 g/mol]

**7c** wurde gemäß *AAV* 4 aus 200 mg (0.57 mmol) der Verbindung 3--(1,3-Difluor-6-(trifluormethyl)phenanthren-9-yl)-3-hydroxypropannitril hergestellt.
Die säulenchromatografische Reinigung an Silicagel erfolgte mit einem Laufmittelgemisch aus Dichlormethan und Methanol (10 %) mittels Flashtechnik. HCl/1,4 Dioxan wurde langsam zugegeben, bevor fünf Minuten gerührt wurde. Der entstandene Niederschlag wurde zweimal mit Acetonitril gewaschen und getrocknet, um anschließend mit Methanol umkristallisiert zu werden.

**Ausbeute:** 10 % (50.0 mg, 0.10 mmol), weißer Feststoff.
**Schmelzpunkt:** 217.1 °C.
**HPLC (Methode 1):** $t_R$ = 12.2 min, AUC = 98.6 %.
**$^1$H-NMR (600 MHz, $CD_3OD$):** $\delta$ 9.12 (s, 1H), 8.69 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 8.52 - 8.45 (m, 2H), 8.03 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.93 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.52 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.41 (t, *J* = 9.4 Hz, 1H), 6.01 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 3.35 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 3.13 (dd, *J* = 13.9, 9.6 Hz, 1H).
**$^{13}$C-NMR (151 MHz, $CD_3OD$):** $\delta$ 167.40, 163.94 (d, *J* = 13.6 Hz), 162.29 (d, *J* = 13.1 Hz), 162.05 (d, *J* = 13.6 Hz), 160.38 (d, *J* = 13.6 Hz), 144.34, 139.73, 138.35, 135.50, 134.64, 134.21, 133.87, 133.14, 130.89, 130.18, 129.97, 127.42, 126.71, 125.01, 124.87, 122.99 (d, *J* = 3.8 Hz), 120.98, 119.41 (d, *J* = 15.3 Hz), 119.16 (d, *J* = 6.0 Hz), 118.79, 115.00, 113.83, 105.66 (dd, *J* = 23.2, 4.1 Hz), 104.02 (dd, *J* = 28.6, 24.8 Hz), 69.13, 58.29 - 56.75 (m), 49.57, 42.67.
**HR-MS (ESI$^+$):** m/z: ber.: [$C_{25}H_{16}F_5N_3O+H^+$] 470.1286; gef.: 470.1292.

*N-(4-bromphenyl)-3-(1,3-difluor-6-(trifluormethyl)phenanthren-9-yl)-3-hydroxypropanimidamid Hydrochlorid* ***7d***




**7d**

$C_{24}H_{17}BrClF_5N_2O$

[558.0133 g/mol]

**7d** wurde gemäß *AAV* 4 aus 200 mg (0.57 mmol) 3-(1,3-Difluor-6-(trifluormethyl)phenanthren-9-yl)-3-hydroxypropannitril hergestellt.

Nachdem HCl/Diethylether langsam zugegeben worden war, wurde fünf Minuten gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde zweimal mit Acetonitril gewaschen und über eine Glasfritte (Porengröße 4) abgesaugt. Der erhaltene Feststoff wurde in Methanol gelöst und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt.

**Ausbeute:** 77 % (244 mg, 0.44 mmol), weiß-grauer Feststoff.

**Schmelzpunkt:** 241.1 °C.

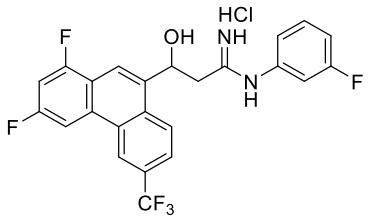
**HPLC (Methode 1):** $t_R$ = 12.7 min, AUC = 97.0 %.

**$^1$H-NMR (300 MHz, DMSO-*d6*)**: $\delta$ 11.95 (s, 1H), 9.91 (s, 1H), 9.27 (s, 1H), 9.03 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 8.85 - 8.79 (m, 2H), 8.39 (s, 1H), 8.00 (dd, *J* = 8.9, 1.8 Hz, 1H), 7.77 - 7.71 (m, 2H), 7.61 - 7.56 (m, 1H), 7.34 - 7.29 (m, 2H), 7.24 - 7.20 (m, 1H), 6.03 (dd, *J* = 10.5, 3.6 Hz, 1H), 3.33 - 3.22 (m, 1H), 2.97 (dd, *J* = 13.6, 10.3 Hz, 1H).

**$^{13}$C-NMR (151 MHz, $CD_3OD$):** $\delta$ 167.26, 163.85 (d, *J* = 13.1 Hz), 162.12 (dd, *J* = 27.8, 13.1 Hz), 160.35 (d, *J* = 13.6 Hz), 138.41, 134.64, 134.48, 134.40, 134.09, 133.82 (dd, *J* = 10.4, 4.9 Hz), 133.15, 131.57, 130.85 - 130.72 (m), 130.32, 130.10, 129.88 (d, *J* = 3.3 Hz), 129.67, 128.60, 126.90, 126.67, 126.04, 125.03, 124.87, 123.83, 123.64, 122.87, 119.41 (dd, *J* = 15.3, 2.2 Hz), 119.16, 105.57 (d, *J* = 27.8 Hz), 104.23 - 103.65 (m), 69.05, 49.57, 42.45.

**HR-MS (ESI+):** m/z: ber.: [$C_{24}H_{16}BrF_5N_2O+H^+$] 523.0439; gef.: 523.0439.

*3-(1,3-Difluor-6-(trifluormethyl)phenanthren-9-yl)-N-(3-fluorophenyl)-3-hydroxypropanimidamid Hydrochlorid* ***7e***




**7e**

$C_{24}H_{17}ClF_6N_2O$

[498.0934 g/mol]

**7e** wurde gemäß *AAV* 4 aus 200 mg (0.57 mmol) 3-(1,3-Difluor-6-(trifluormethyl)phenanthren-9-yl)-3-hydroxypropannitril hergestellt.

Nachdem HCl/Diethylether langsam zugegeben wurde, wurde fünf Minuten gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde zweimal mit Acetonitril gewaschen und über eine Glasfritte (Porengröße 4) abgesaugt. Der erhaltene Feststoff wurde in Methanol gelöst und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt.

**Ausbeute:** 57 % (163 mg, 0.33 mmol), weiß-grauer Feststoff.

**Schmelzpunkt:** 206.5 °C,

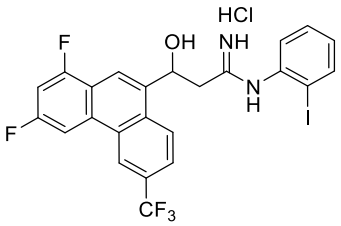
**HPLC (Methode 1):** $t_R$ = 12.5 min, AUC = 98.6 %.

**$^1$H-NMR (300 MHz, DMSO-*d6*):** $\delta$ 11.99 (s, 1H), 9.95 (s, 1H), 9.28 (s, 1H), 9.02 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.93 - 8.79 (m, 2H), 8.40 (s, 1H), 8.02 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.75 - 7.53 (m, 2H), 7.34 - 7.16 (m, 3H), 6.85 (dd, *J* = 11.5, 6.8 Hz, 1H), 6.04 (dd, *J* = 10.1, 3.6 Hz, 1H), 3.27 (dd, *J* = 13.6, 3.6 Hz, 1H), 3.06 - 2.92 (m, 1H).

**$^{13}$C-NMR (151 MHz, $CD_3OD$):** $\delta$ 167.28, 165.53, 165.28, 163.90 (d, *J* = 3.3 Hz), 163.83, 163.63, 162.23 (d, *J* = 13.1 Hz), 162.03 (d, *J* = 13.1 Hz), 160.35 (d, *J* = 13.6 Hz), 138.36, 136.74 (d, *J* = 9.8 Hz), 134.35 (d, *J* = 9.2 Hz), 133.83 (dd, *J* = 10.4, 4.9 Hz), 133.14, 133.05, 130.86 - 130.74 (m), 130.01 (q, *J* = 32.4 Hz), 126.88, 126.66, 125.05, 124.86, 122.89 (q, *J* = 4.0 Hz), 122.64 (d, *J* = 3.4 Hz), 119.92 (d, *J* = 3.3 Hz), 119.40 (d, *J* = 13.6 Hz), 119.16 (d, *J* = 6.0 Hz), 117.29, 117.15, 116.70 (d, *J* = 21.3 Hz), 114.25, 114.08, 111.59 (d, *J* = 25.6 Hz), 105.59 (dd, *J* = 23.2, 4.1 Hz), 103.96 (dd, *J* = 28.6, 24.8 Hz), 69.06, 49.57, 42.51.

**HR-MS (ESI$^+$):** m/z: ber.: [$C_{24}H_{16}F_6N_2O+H^+$] 463.1240; gef.: 463.1240.

*3-(1,3-Difluor-6-(trifluormethyl)phenanthren-9-yl)-3-hydroxy-N-(2-iodphenyl)propanimidamid Hydrochlorid* ***7f***




**7f**

$C_{24}H_{17}ClF_5IN_2O$

[605.9994 g/mol]

**7f** wurde gemäß *AAV* 4 aus 275 mg (0.78 mmol) 3-(1,3-Difluor-6-(trifluormethyl)phenanthren-9-yl)-3-hydroxypropannitril hergestellt.

Nachdem HCl/Diethylether langsam zugegeben worden war, wurde fünf Minuten gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde zweimal mit Acetonitril gewaschen und über eine Glasfritte (Porengröße 4) abgesaugt. Der erhaltene Feststoff wurde in Methanol gelöst und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt.

**Ausbeute:** 47 % (217 mg, 0.36 mmol), brauner Feststoff.

**Schmelzpunkt**: 273.3 °C.

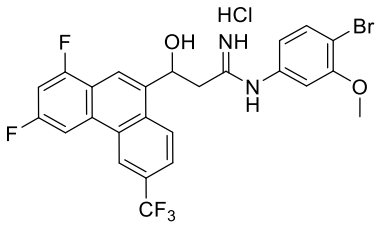
**HPLC (Methode 1):** $t_R$ = 13.0 min, AUC = 100.0 %.

**$^1$H-NMR (600 MHz, $CD_3OD$):** $\delta$ 9.08 (s, 1H), 8.71 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 8.51 (s, 1H), 8.43 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H), 8.04 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.56 (s, 1H), 7.38 (s, 2H), 7.26 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 6.07 (s, 1H), 3.34 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 3.19 (s, 1H).

**$^{13}$C-NMR (151 MHz, $CD_3OD$):** $\delta$ 167.50, 163.81 (d, *J* = 13.1 Hz), 162.09 (dd, *J* = 24.8, 13.4 Hz), 160.33 (d, *J* = 13.1 Hz), 141.84 (d, *J* = 4.5 Hz), 138.28, 137.67, 133.82 (dd, *J* = 10.1, 5.2 Hz), 133.14, 132.54, 131.54, 130.89 - 130.74 (m), 129.95 (q, *J* = 32.4 Hz), 129.42, 128.42, 126.86, 126.62, 125.05, 124.82, 123.02, 122.84 (d, *J* = 3.5 Hz), 119.43 (d, *J* = 13.6 Hz), 119.31 (d, *J* = 5.4 Hz), 105.52 (dd, *J* = 23.2, 4.1 Hz), 103.91 (t, *J* = 25.9 Hz), 97.61, 69.06, 58.30, 41.88.

**HR-MS (ESI$^+$):** m/z: ber.: [$C_{24}H_{16}F_5IN_2O+H^+$] 571.0300; gef.: 571.0296.

*N-(4-Brom-3-methoxyphenyl)-3-(1,3-difluor-6-(trifluormethyl)phenanthren-9-yl)-3-hydroxypropanimidamid Hydrochlorid* ***7g***




**7g**

$C_{25}H_{19}BrClF_5N_2O_2$

[588.0239 g/mol]

**7g** wurde gemäß *AAV* 4 aus 120 mg (0.34 mmol) 3-(1,3-Difluor-6-(trifluormethyl)phenanthren-9-yl)-3-hydroxypropannitril hergestellt.

Die säulenchromatografische Reinigung an Silicagel erfolgte mit einem Laufmittelgemisch aus Dichlormethan und Methanol (10 %) mittels Flashtechnik. HCl/1,4 Dioxan wurde langsam zugegeben, bevor fünf Minuten gerührt wurde. Der entstandene Niederschlag wurde zweimal mit Acetonitril gewaschen und über eine Glasfritte (Porengröße 4) abgesaugt. Der erhaltene Feststoff wurde in Methanol gelöst und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt.

**Ausbeute:** 7 % (15.0 mg, 0.03 mmol), weißer Feststoff.

**Schmelzpunkt:** 250.4 °C.

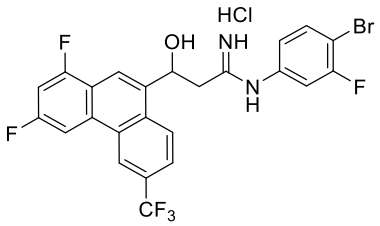
**HPLC (Methode 1):** $t_R$ = 13.3 min, AUC = 97.4 %.

**$^1$H-NMR (600 MHz, $CD_3OD$):** *δ* 9.03 (s, 1H), 8.71 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.47 (s, 1H), 8.39 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H), 8.02 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.68 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 7.36 (t, *J* = 9.3 Hz, 1H), 6.97 (s, 1H), 6.82 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.05 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 3.94 - 3.88 (m, 3H), 3.33 (d, *J* = 13.0 Hz, 1H), 3.13 (t, *J* = 11.0 Hz, 1H).

**$^{13}$C-NMR (151 MHz, $CD_3OD$):** *δ* 167.50, 163.81 (d, *J* = 13.1 Hz), 162.09 (dd, *J* = 24.8, 13.4 Hz), 160.33 (d, *J* = 13.1 Hz), 141.84 (d, *J* = 4.5 Hz), 138.28, 137.67, 133.82 (dd, *J* = 10.1, 5.2 Hz), 133.14, 132.54, 131.54, 130.89 - 130.74 (m), 129.95 (q, *J* = 32.4 Hz), 129.42, 128.42, 126.86, 126.62, 125.05, 124.82, 123.02, 122.84 (d, *J* = 3.5 Hz), 119.43 (d, *J* = 13.6 Hz), 119.31 (d, *J* = 5.4 Hz), 105.52 (dd, *J* = 23.2, 4.1 Hz), 103.91 (t, *J* = 25.9 Hz), 97.61, 69.06, 58.30, 41.88.

**HR-MS (ESI$^+$):** m/z: ber.: [$C_{25}H_{18}BrF_5N_2O_2$+$H^+$] 553.0545; gef.: 553.0552.

*N-(4-Brom-3-fluorphenyl)-3-(1,3-difluor-6-(trifluormethyl)phenanthren-9-yl)-3-hydroxypropanimidamid Hydrochlorid* ***7h***




**7h**

$C_{24}H_{16}BrClF_6N_2O$

[576.0039 g/mol]

**7h** wurde gemäß *AAV* 4 aus 250 mg (0.71 mmol) 3-(1,3-Difluor-6-(trifluormethyl)phenanthren-9-yl)-3-hydroxypropannitril hergestellt.

Nachdem HCl/Diethylether langsam zugegeben worden war, wurde fünf Minuten gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde zweimal mit Acetonitril gewaschen und über eine Glasfritte (Porengröße 4) abgesaugt. Der erhaltene Feststoff wurde in Methanol gelöst und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt.

**Ausbeute:** 85 % (350 mg, 0.61 mmol), weiß-grauer Feststoff.

**Schmelzpunkt:** 207.1 °C.

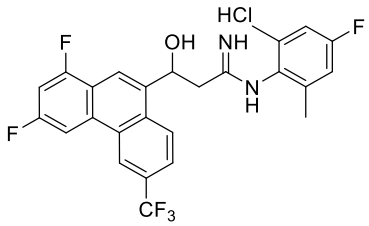
**HPLC (Methode 1):** $t_R$ = 13.2 min, AUC = 96.6 %.

**$^1$H-NMR (600 MHz, $CD_3OD$):** $\delta$ 8.98 (s, 1H), 8.62 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.33 (d, *J* = 10.6 Hz, 1H), 7.93 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.73 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.28 (t, *J* = 9.3 Hz, 1H), 7.19 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.05 (t, *J* = 10.0 Hz, 1H), 5.96 - 5.91 (m, 1H), 3.25 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 3.02 (dd, *J* = 14.0, 9.6 Hz, 1H).

**$^{13}$C-NMR (151 MHz, $CD_3OD$):** $\delta$ 167.52, 163.85 (d, *J* = 13.1 Hz), 162.11 (dd, *J* = 29.7, 13.4 Hz), 161.76, 161.48, 160.34 (d, *J* = 13.6 Hz), 160.11, 159.83, 138.36, 136.41, 136.18, 136.11, 136.05, 133.80 (dd, *J* = 10.4, 4.9 Hz), 133.11, 130.85 - 130.68 (m), 130.00 (q, *J* = 32.4 Hz), 126.89, 128.52 - 122.99 (m), 125.04, 124.13 (d, *J* = 3.7 Hz), 122.84 (d, *J* = 4.4 Hz), 121.06, 119.39 (dd, *J* = 15.3, 2.2 Hz), 119.12 (d, *J* = 5.3 Hz), 115.58, 115.42, 112.51 (d, *J* = 25.6 Hz), 110.59, 110.45, 105.56 (dd, *J* = 23.4, 4.4 Hz), 103.94 (dd, *J* = 28.4, 24.5 Hz), 69.00, 49.57, 42.51.

**HR-MS (ESI$^+$):** m/z: ber.: [$C_{24}H_{15}BrF_6N_2O+H^+$] 541.0345; gef.: 541.0345.

*3-(1,3-Difluor-6-(trifluormethyl)phenanthren-9-yl)-N-(4-fluor-2,6-dimethylphenyl)-3-hydroxypropanimidamid Hydrochlorid* ***7i***




**7i**

$C_{26}H_{21}ClF_6N_2O$

[526.1247 g/mol]

**7i** wurde gemäß *AAV* 4 aus 200 mg (0.57 mmol) 3-(1,3-Difluor-6-(trifluormethyl)phenanthren-9-yl)-3-hydroxypropannitril hergestellt.

Nachdem HCl/Diethylether langsam zugegeben worden war, wurde mit Methanol umkristallisiert.

**Ausbeute:** 38 % (115 mg, 0.22 mmol), weißer Feststoff.

**Schmelzpunkt:** 217.4 °C.

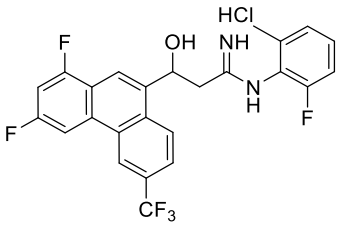
**HPLC (Methode 1):** $t_R$ = 13.3 min, AUC = 96.1 %.

**$^1$H-NMR (300 MHz, $CD_3OD$):** *δ* 9.08 (s, 1H), 8.74 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 8.51 (s, 1H), 8.44 (d, *J* = 10.7 Hz, 1H), 8.02 (dd, *J* = 8.8, 1.8 Hz, 1H), 7.44 - 7.31 (m, 1H), 7.00 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 6.01 (dd, *J* = 9.8, 3.7 Hz, 1H), 3.47 - 3.30 (m, 1H), 3.14 (dd, *J* = 14.1, 9.9 Hz, 1H), 2.26 (d, *J* = 3.4 Hz, 6H).

**$^{13}$C-NMR (151 MHz, $CD_3OD$):** *δ* 167.69, 164.89, 163.86 (d, *J* = 13.1 Hz), 163.25, 162.13 (dd, *J* = 26.4, 13.4 Hz), 160.37 (d, *J* = 13.1 Hz), 142.35, 139.97 (d, *J* = 9.4 Hz), 139.79 (d, *J* = 9.4 Hz), 138.61, 133.86 (dd, *J* = 10.1, 5.2 Hz), 133.17, 130.90 - 130.79 (m), 130.00 (q, *J* = 32.7 Hz), 128.50 - 128.38 (m), 127.19, 126.94, 126.68, 125.04 (q, *J* = 3.5 Hz), 124.88, 123.08, 122.86 (q, *J* = 4.4 Hz), 119.90, 119.52, 119.41 (d, *J* = 2.7 Hz), 119.25 (d, *J* = 6.0 Hz), 118.13, 116.98, 116.80 (d, *J* = 3.2 Hz), 116.65 (d, *J* = 3.2 Hz), 105.63 (d, *J* = 4.2 Hz), 105.48 (d, *J* = 4.3 Hz), 103.93 (dd, *J* = 28.6, 24.8 Hz), 69.33, 58.33, 49.57, 41.89, 18.36, 18.01, 17.94, 0.78.

**HR-MS (ESI$^+$):** m/z: ber.: [$C_{26}H_{20}F_6N_2O+H^+$] 491.1553; gef.: 491.1560.

*3-(1,3-Difluor-6-(trifluormethyl)phenanthren-9-yl)-N-(2-fluor-6-methylphenyl)-3-hydroxypropanimidamid Hydrochlorid* ***7j***




**7j**

$C_{25}H_{19}ClF_6N_2O$

[512.1090 g/mol]

**7j** wurde gemäß *AAV* 4 aus 140 mg (0.40 mmol) 3-(1,3-Difluor-6-(trifluormethyl)phenanthren-9-yl)-3-hydroxypropannitril hergestellt.

Nachdem HCl/Diethylether langsam zugegeben worden war, wurde fünf Minuten gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde zweimal mit Acetonitril gewaschen und über eine Glasfritte (Porengröße 4) abgesaugt. Der erhaltene Feststoff wurde in Methanol gelöst und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt.

**Ausbeute:** 14 % (41.0 mg, 0.08 mmol), weißer Feststoff.

**Schmelzpunkt:** 196.7 °C.

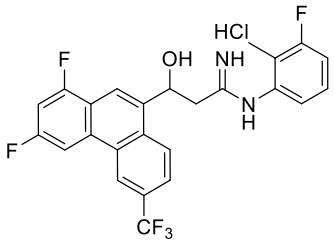
**HPLC (Methode 1):** $t_R$ = 12.7 min, AUC = 98.6 %.

**$^1$H-NMR (600 MHz, $CD_3OD$):** $\delta$ 9.11 (s, 1H), 8.70 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.52 (s, 1H), 8.47 (d, *J* = 10.6 Hz, 1H), 8.04 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.45 - 7.37 (m, 2H), 7.23 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.16 (t, *J* = 9.0 Hz, 1H), 6.00 (s, 1H), 3.39 (s, 1H), 3.18 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 2.30 (s, 3H).

**$^{13}$C-NMR (151 MHz, $CD_3OD$):** $\delta$ 167.91, 162.18 (d, *J* = 14.3 Hz), 159.92, 158.26, 139.47, 138.28, 133.18, 132.38, 132.14 (d, *J* = 8.9 Hz), 128.11 (d, *J* = 3.3 Hz), 126.72 (d, *J* = 12.6 Hz), 125.03, 122.92, 119.63 - 119.16 (m), 115.37 (d, *J* = 19.6 Hz), 105.72 - 105.44 (m), 103.96 (dd, *J* = 28.3, 24.5 Hz), 69.31, 49.57, 17.35.

**HR-MS (ESI$^+$):** m/z: ber.: $[C_{25}H_{18}F_6N_2O+H^+]$ 477.1396; gef.: 477.1398.

*3-(1,3-Difluor-6-(trifluormethyl)phenanthren-9-yl)-N-(3-fluor-2-methylphenyl)-3-hydroxypropanimidamid Hydrochlorid* ***7k***




**7k**

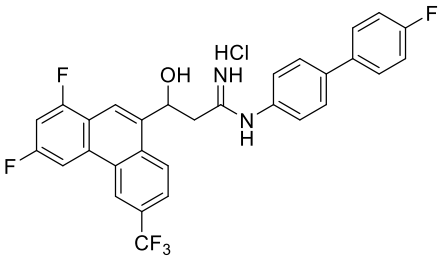
$C_{25}H_{19}ClF_6N_2O$

[512.1090 g/mol]

**7k** wurde gemäß *AAV* 4 aus 150 mg (0.43 mmol) 3-(1,3-Difluor-6-(trifluormethyl)phenanthren-9-yl)-3-hydroxypropannitril mit folgender Modifikation hergestellt:
Anstelle von 3.00 Äq. Trimethylaluminium (2 M in Toluol) wurden 4.00 Äq. Trimethylaluminium (2 M in Toluol) eingesetzt. Die säulenchromatografische Reinigung an Silicagel erfolgte mit einem Laufmittelgemisch aus Dichlormethan und Methanol (10 %) mittels Flashtechnik. HCl/1,4 Dioxan wurde langsam zugegeben, bevor fünf Minuten gerührt wurde. Der entstandene Niederschlag wurde zweimal mit Acetonitril gewaschen und über eine Glasfritte (Porengröße 4) abgesaugt. Der erhaltene Feststoff wurde in Methanol gelöst und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt.

**Ausbeute:** 3 % (5.00 mg, 0.01 mmol), weißer Feststoff.
**Schmelzpunkt:** 207.5 °C.
**HPLC (Methode 1):** tR = 14.1 min, AUC = 95.0 %.
**$^1$H-NMR (300 MHz, $CD_3OD$):** $\delta$ 9.12 (s, 1H), 8.72 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 8.50 (d, *J* = 15.3 Hz, 2H), 8.09 - 7.99 (m, 1H), 7.48 - 7.32 (m, 2H), 7.24 (t, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.10 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.01 (dd, *J* = 9.5, 3.8 Hz, 1H), 3.45 - 3.34 (m, 1H), 3.21 - 3.07 (m, 1H), 2.22 (d, *J* = 2.1 Hz, 3H).
**$^{13}$C-NMR (151 MHz, $CD_3OD$):** $\delta$ 166.33, 162.79, 162.51 (d, *J* = 13.6 Hz), 161.16, 160.92, 160.67 (d, *J* = 10.4 Hz), 158.98 (d, *J* = 13.6 Hz), 142.34 (dd, *J* = 43.9, 21.8 Hz), 137.15 - 137.01 (m), 133.89 (d, *J* = 6.8 Hz), 132.58 - 132.38 (m), 131.77, 129.49 (t, *J* = 4.0 Hz), 128.76, 128.54, 128.28, 125.33 (d, *J* = 14.9 Hz), 123.64, 123.47, 123.19 (d, *J* = 18.7 Hz), 122.44 (d, *J* = 0.8 Hz), 121.57 (d, *J* = 4.1 Hz), 118.10 (d, *J* = 1.4 Hz), 118.00 (d, *J* = 1.4 Hz), 117.81 (d, *J* = 5.2 Hz), 116.04 (d, *J* = 22.6 Hz), 104.44 - 104.04 (m), 102.59 (dd, *J* = 28.6, 24.2 Hz), 67.83, 48.17, 40.75.
**HR-MS (ESI$^+$):** m/z: ber.: [$C_{25}H_{18}F_6N_2O+H^+$] 477.1396; gef.: 477.1395.

*3-(1,3-Difluor-6-(trifluormethyl)phenanthren-9-yl)-N-(4'-fluor-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-3-hydroxypropanimidamid Hydrochlorid* ***7l***




**7l**

$C_{30}H_{21}ClF_6N_2O$

[574.1247 g/mol]

**7l** wurde gemäß *AAV* 4 aus 200 mg (0.57 mmol) 3-(1,3-Difluor-6-(trifluormethyl)phenanthren-9-yl)-3-hydroxypropannitril hergestellt.

Nachdem HCl/Diethylether langsam zugegeben worden war, wurde fünf Minuten gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde zweimal mit Acetonitril gewaschen und über eine Glasfritte (Porengröße 4) abgesaugt. Der erhaltene Feststoff wurde in Methanol gelöst und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt.

**Ausbeute:** 64 % (210 mg, 0.37 mmol), weißer Feststoff.

**Schmelzpunkt:** 217,5 °C.

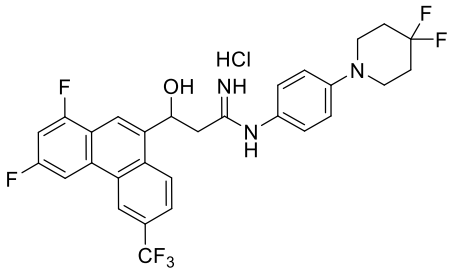
**HPLC (Methode 1):** $t_R$ = 14.0 min, AUC = 96.3 %.

**$^1$H-NMR (300 MHz, DMSO-*d6*):** *δ* 11.89 (s, 1H), 9.85 (s, 1H), 9.28 (s, 1H), 9.03 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 8.84 (d, *J* = 11.3 Hz, 2H), 8.41 (s, 1H), 8.03 (dd, *J* = 8.8, 1.8 Hz, 1H), 7.88 - 7.67 (m, 6H), 7.47 - 7.26 (m, 4H), 6.05 (dd, *J* = 10.4, 3.7 Hz, 1H), 3.31 - 3.23 (m, 1H), 3.01 (dd, *J* = 13.6, 10.1 Hz, 1H).

**$^{13}$C-NMR (151 MHz, DMSO-*d6*):** *δ* 164.66, 162.96, 161.34, 158.15, 138.88, 138.33, 135.44, 135.42, 133.63, 131.71, 129.02, 128.80, 128.75, 128.15, 127.67, 127.45, 126.58, 125.75, 125.29, 123.68, 123.49, 122.30, 117.71, 117.60, 116.03, 115.89, 105.66, 103.54 (d, *J* = 24.9 Hz), 67.26, 41.48, 40.06.

**HR-MS (ESI$^+$):** m/z: ber.: [$C_{30}H_{20}F_6N_2O$+$H^+$] 539.1553; gef.: 539.1554.

*3-(1,3-Difluor-6-(trifluormethyl)phenanthren-9-yl)-N-(4-(4,4-difluorpiperidin-1-yl)phenyl)-3-hydroxypropanimidamid Hydrochlorid* ***7m***




**7m**

$C_{29}H_{25}ClF_7N_3O$

[599.1574 g/mol]

**7m** wurde gemäß *AAV* 4 aus 120 mg (0.34 mmol) 3-(1,3-Difluor-6-(trifluormethyl)phenanthren-9-yl)-3-hydroxypropannitril hergestellt.

Die säulenchromatografische Reinigung an RP-18 Kieselgel erfolgte mit einem Laufmittelgemisch aus Wasser und Acetonitril mittels Flashtechnik. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. HCl/1,4 Dioxan wurde langsam zugegeben, bevor fünf Minuten gerührt wurde. Der entstandene Niederschlag wurde zweimal mit Acetonitril gewaschen und über eine Glasfritte (Porengröße 4) abgesaugt. Der erhaltene Feststoff wurde in Methanol gelöst und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt.

**Ausbeute:** 13 % (26 mg, 0.04 mmol), weißer Feststoff.

**Schmelzpunkt:** 190.8 °C.

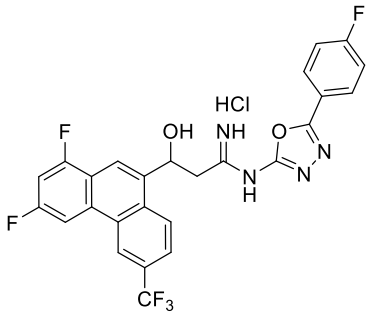
**HPLC (Methode 1):** $t_R$ = 13.7 min, AUC = 96.4 %.

**$^1$H-NMR (300 MHz, $CD_3OD$):** $\delta$ 9.10 (s, 1H), 8.71 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.47 (d, *J* = 14.1 Hz, 2H), 8.03 (dd, *J* = 8.8, 1.8 Hz, 1H), 7.48 - 7.22 (m, 5H), 6.02 (dd, *J* = 9.2, 3.8 Hz, 1H), 3.55 (q, *J* = 5.6 Hz, 4H), 3.34 (s, 0H), 3.28 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H), 3.11 (dd, *J* = 14.1, 9.1 Hz, 1H), 2.21 (tt, *J* = 13.5, 5.8 Hz, 4H).

**$^{13}$C-NMR (151 MHz, DMSO-*d6*):** $\delta$ 167.05, 163.86 (d, *J* = 13.2 Hz), 162.30 - 161.95 (m), 160.40, 150.93, 138.39, 134.00 - 133.70 (m), 133.18, 130.81 (t, *J* = 3.5 Hz), 130.10, 129.89, 127.68, 127.29, 126.86, 126.67, 125.03 (d, *J* = 2.1 Hz), 124.87, 122.89 (d, *J* = 3.9 Hz), 124.44 - 118.01 (m), 119.42 (d, *J* = 15.4 Hz), 119.21 - 118.98 (m), 105.59 (dd, *J* = 23.4, 3.6 Hz), 103.96 (dd, *J* = 28.4, 24.8 Hz), 69.06, 47.93, 42.19, 34.19 (t, *J* = 23.4 Hz).

**HR-MS (ESI$^+$):** m/z: ber.: [$C_{29}H_{24}F_7N_3O+H^+$] 564.1880; gef.: 564.1880.

*3-(1,3-Difluor-6-(trifluormethyl)phenanthren-9-yl)-N-(5-(4-fluorphenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl)-3-hydroxypropanimidamid Hydrochlorid* ***7n***




**7n**

$C_{26}H_{17}ClF_6N_4O_2$

[566.0944 g/mol]

**7n** wurde gemäß *AAV* 4 aus 200 mg (0.57 mmol) 3-(1,3-Difluor-6-(trifluormethyl)phenanthren-9-yl)-3-hydroxypropannitril hergestellt.

Die säulenchromatografische Reinigung an RP-18 Kieselgel erfolgte mit einem Laufmittelgemisch aus Wasser und Acetonitril mittels Flashtechnik. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. HCl/1,4 Dioxan wurde langsam zugegeben, bevor fünf Minuten gerührt wurde. Der entstandene Niederschlag wurde zweimal mit Acetonitril gewaschen und über eine Glasfritte (Porengröße 4) abgesaugt. Der erhaltene Feststoff wurde in Methanol gelöst und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt.

**Ausbeute:** 13 % (40.8 mg, 0.07 mmol), weißer Feststoff.

**Schmelzpunkt:** 188.8 °C.

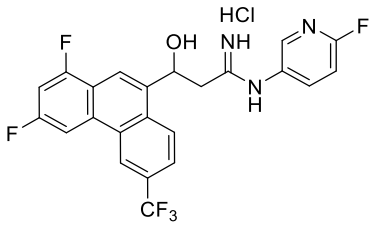
**HPLC (Methode 1):** $t_R$ = 16.0 min, AUC = 100.0 %.

**$^1$H-NMR (300 MHz, DMSO-*d6*):** $\delta$ 9.34 (s, 2H), 9.27 (s, 1H), 8.90 (s, 1H), 8.82 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H), 8.63 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 8.32 (s, 1H), 8.11 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.06 - 7.95 (m, 2H), 7.77 - 7.64 (m, 1H), 7.43 (t, *J* = 8.9 Hz, 2H), 5.93 (dd, *J* = 9.4, 3.4 Hz, 1H), 4.98 (s, 8H), 3.03 (dd, *J* = 14.2, 3.5 Hz, 1H), 2.85 (dd, *J* = 14.1, 9.4 Hz, 1H).

**$^{13}$C-NMR (151 MHz, DMSO-*d6*):** $\delta$ 166.46, 166.21, 164.45, 162.80, 161.53 (d, *J* = 13.6 Hz), 159.90 (d, *J* = 13.6 Hz), 159.68 (d, *J* = 14.2 Hz), 158.09, 158.01 (d, *J* = 14.3 Hz), 138.90, 131.88, 131.68 (dd, *J* = 10.5, 5.1 Hz), 128.98 - 128.85 (m), 128.35 (d, *J* = 8.7 Hz), 127.46, 127.25, 127.07, 125.79, 125.26, 123.80 (d, *J* = 2.7 Hz), 123.45, 122.25 (d, *J* = 3.8 Hz), 121.65, 120.80 (d, *J* = 3.3 Hz), 117.71, 117.61, 116.89 (d, *J* = 6.0 Hz), 116.56, 116.41, 105.40 (dd, *J* = 23.0, 3.9 Hz), 103.25 (dd, *J* = 28.6, 24.3 Hz), 67.69, 44.54, 40.05.

**HR-MS (ESI$^+$):** m/z: ber.: [$C_{26}H_{16}F_6N_4O_2$+$H^+$] 531.1250; gef.: 531.1250.

*3-(1,3-Difluor-6-(trifluormethyl)phenanthren-9-yl)-N-(6-fluorpyridin-3-yl)-3-hydroxypropanimidamid Hydrochlorid* ***7o***




**7o**

$C_{23}H_{16}ClF_6N_3O$

[499.0886 g/mol]

**7o** wurde gemäß *AAV* 4 aus 250 mg (0.71 mmol) 3-(1,3-Difluor-6-(trifluormethyl)phenanthren-9-yl)-3-hydroxypropannitril hergestellt.

Nachdem HCl/Diethylether langsam zugegeben worden war, wurde fünf Minuten gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde zweimal mit Acetonitril gewaschen und über eine Glasfritte (Porengröße 4) abgesaugt. Der erhaltene Feststoff wurde in Methanol gelöst und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt.

**Ausbeute:** 39 % (140 mg, 0.28 mmol), brauner Feststoff.

**Schmelzpunkt:** 248.2 °C.

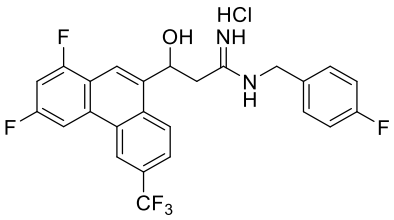
**HPLC (Methode 1):** $t_R$ = 11.7 min, AUC = 98.1 %.

**$^1$H-NMR (300 MHz, DMSO-*d6*):** *δ* 12.03 (s, 1H), 10.02 (s, 1H), 9.27 (s, 1H), 9.08 - 8.95 (m, 2H), 8.83 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.27 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 8.02 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.84 - 7.65 (m, 1H), 7.52 - 7.37 (m, 1H), 6.54 (s, 1H), 6.06 (dd, *J* = 10.4, 3.3 Hz, 1H), 3.29 (dd, *J* = 13.6, 3.3 Hz, 1H), 2.97 (dd, *J* = 13.5, 10.3 Hz, 1H).

**$^{13}$C-NMR (151 MHz, DMSO-*d6*):** *δ* 166.44, 166.15, 162.76, 161.66 (d, *J* = 13.1 Hz), 161.19, 159.87 (dd, *J* = 49.0, 13.6 Hz), 158.04 (d, *J* = 14.2 Hz), 145.23 (d, *J* = 16.3 Hz), 140.31 (d, *J* = 8.7 Hz), 138.31, 131.82 (dd, *J* = 10.6, 5.7 Hz), 131.61, 129.67 (d, *J* = 4.4 Hz), 128.93, 127.46 (q, *J* = 32.2 Hz), 127.05, 126.79, 125.24, 123.55, 123.44, 122.15 (d, *J* = 3.8 Hz), 121.63, 117.62 (d, *J* = 14.7 Hz), 117.43 (d, *J* = 6.5 Hz), 111.04 (d, *J* = 39.8 Hz), 105.47 (dd, *J* = 23.2, 4.1 Hz), 103.34 (dd, *J* = 28.9, 24.5 Hz), 67.07, 41.35, 41.06.

**HR-MS (ESI$^+$):** m/z: ber.: [$C_{23}H_{15}F_6N_3O$+$H^+$] 464.1192; gef.: 464.1201.

*3-(1,3-Difluor-6-(trifluormethyl)phenanthren-9-yl)-N-(4-fluorbenzyl)-3-hydroxypropanimidamid Hydrochlorid* ***7p***




**7p**

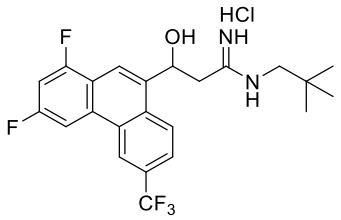
$C_{25}H_{19}ClF_6N_2O$

[512.1090 g/mol]

**7p** wurde gemäß *AAV* 4 aus 120 mg (0.34 mmol) 3-(1,3-Difluor-6-(trifluormethyl)phenanthren-9-yl)-3-hydroxypropannitril mit folgender Modifikation hergestellt:
Anstelle von 3.00 Äq. Trimethylaluminium (2 M in Toluol) wurden 2.00 Äq. Trimethylaluminium (2 M in Toluol) eingesetzt. Die säulenchromatografische Reinigung an Silicagel erfolgte mit einem Laufmittelgemisch aus Dichlormethan und Methanol (10 %) mittels Flashtechnik. HCl/Diethylether wurde langsam zugegeben, bevor fünf Minuten gerührt wurde. Der entstandene Niederschlag wurde zweimal mit Acetonitril gewaschen und über eine Glasfritte (Porengröße 4) abgesaugt. Der erhaltene Feststoff wurde in Methanol gelöst und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt.

**Ausbeute:** 26 % (46.0 mg, 0.09 mmol), weißer Feststoff.
**Schmelzpunkt:** 203.2 °C.
**HPLC (Methode 1):** $t_R$ = 12.6 min, AUC = 100.0 %.
**$^1$H-NMR (300 MHz, $CD_3OD$):** *δ* 9.10 (s, 1H), 8.64 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 8.47 (d, *J* = 10.7 Hz, 1H), 8.41 (s, 1H), 8.01 (dd, *J* = 8.7, 1.8 Hz, 1H), 7.40 (ddd, *J* = 10.8, 8.9, 2.3 Hz, 1H), 7.36 - 7.26 (m, 2H), 7.11 - 6.98 (m, 2H), 5.92 (dd, *J* = 9.0, 4.0 Hz, 1H), 4.49 (d, *J* = 2.6 Hz, 2H), 3.21 (dd, *J* = 14.2, 4.0 Hz, 1H), 3.04 (dd, *J* = 14.2, 9.0 Hz, 1H).
**$^{13}$C-NMR (75 MHz, $CD_3OD$):** *δ* 166.62, 162.38, 138.22, 133.14, 131.71, 130.82 (d, *J* = 8.4 Hz), 126.80, 124.98, 122.93, 119.89 - 118.86 (m), 116.80, 116.51, 106.26 - 105.16 (m), 104.56 - 103.30 (m), 69.09, 57.48, 46.39, 42.19.
**HR-MS ($ESI^+$):** m/z: ber.: $[C_{25}H_{18}F_6N_2O+H^+]$ 477.1396; gef.: 477.1400.

*3-(1,3-Difluor-6-(trifluormethyl)phenanthren-9-yl)-3-hydroxy-N-neopentylpropanimidamid Hydrochlorid* ***7q***




**7q**

$C_{23}H_{24}ClF_5N_2O$

[474.1497 g/mol]

**7q** wurde gemäß *AAV* 4 aus 200 mg (0.57 mmol) 3-(1,3-Difluor-6-(trifluormethyl)phenanthren-9-yl)-3-hydroxypropannitril hergestellt.

Nachdem HCl/Diethylether langsam zugegeben worden war, wurde fünf Minuten gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde zweimal mit Acetonitril gewaschen und über eine Glasfritte (Porengröße 4) abgesaugt. Der erhaltene Feststoff wurde in Methanol gelöst und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt.

**Ausbeute:** 39 % (105 mg, 0.22 mmol), weißer Feststoff.

**Schmelzpunkt:** 213.7 °C.

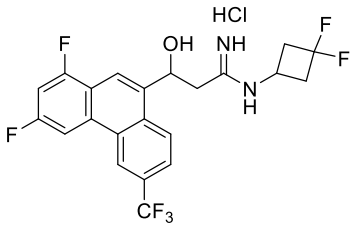
**HPLC (Methode 1):** $t_R$ = 14.7 min, AUC = 100.0 %.

**$^1$H-NMR (300 MHz, $CD_3OD$):** $\delta$ 9.50 (d, $J$ = 5.8 Hz, 2H), 9.25 (s, 1H), 8.92 (d, $J$ = 8.6 Hz, 2H), 8.81 (dd, $J$ = 11.3, 2.3 Hz, 1H), 8.34 (s, 1H), 8.01 (dd, $J$ = 8.8, 1.8 Hz, 1H), 7.70 (ddd, $J$ = 11.0, 9.0, 2.2 Hz, 1H), 6.34 (d, $J$ = 4.2 Hz, 1H), 5.93 - 5.83 (m, 1H), 3.13 (td, $J$ = 9.9, 5.6 Hz, 3H), 2.94 (dd, $J$ = 13.8, 9.9 Hz, 1H), 0.91 (s, 9H).

**$^{13}$C-NMR (151 MHz, $CD_3OD$):** $\delta$ 165.10, 161.77, 160.22, 159.90, 158.23, 158.14, 138.30, 131.92, 131.85, 129.08, 127.71, 127.49, 126.75, 125.39, 123.76, 123.59, 122.23, 117.78, 117.68, 105.61, 105.45, 103.63, 103.46, 103.27, 67.38, 52.65, 40.99, 40.06, 32.70, 26.87.

**HR-MS (ESI$^+$):** m/z: ber.: [$C_{23}H_{23}F_5N_2O+H^+$] 439.1803; gef.: 439.1811.

*3-(1,3-Difluor-6-(trifluormethyl)phenanthren-9-yl)-N-(3,3-difluorcyclobutyl)-3-hydroxypropanimidamid Hydrochlorid* ***7r***




**7r**

$C_{22}H_{18}ClF_7N_2O$

[494.0996 g/mol]

**7r** wurde gemäß *AAV* 4 aus 105 mg (0.30 mmol) 3-(1,3-Difluor-6-(trifluormethyl)phenanthren-9-yl)-3-hydroxypropannitril hergestellt.

Die säulenchromatografische Reinigung an Silicagel erfolgte mit einem Laufmittelgemisch aus Dichlormethan und Methanol (10 %) mittels Flashtechnik. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. HCl/1,4 Dioxan wurde langsam zugegeben, bevor fünf Minuten gerührt wurde. Der entstandene Niederschlag wurde zweimal mit Acetonitril gewaschen und über eine Glasfritte (Porengröße 4) abgesaugt. Der erhaltene Feststoff wurde in Methanol gelöst und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt.

**Ausbeute:** 13 % (19.0 mg, 0.04 mmol), weiß-grauer Feststoff.

**Schmelzpunkt:** 177.5 °C.

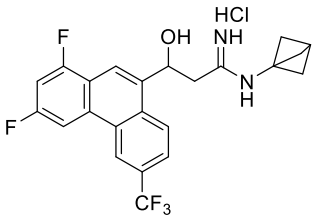
**HPLC (Methode 1):** $t_R$ = 8.2 min, AUC = 98.3 %.

**$^1$H-NMR (600 MHz, DMSO-*d6*):** *δ* 10.48 - 10.44 (m, 1H), 9.70 (s, 1H), 9.27 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 8.98 (s, 1H), 8.95 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.82 (dd, *J* = 11.3, 2.4 Hz, 1H), 8.33 (s, 1H), 8.01 (dd, *J* = 8.8, 1.8 Hz, 1H), 7.71 (ddd, *J* = 10.9, 8.9, 2.3 Hz, 1H), 6.39 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 5.90 (dt, *J* = 10.8, 4.2 Hz, 1H), 4.11 (p, *J* = 6.8 Hz, 1H), 3.21 - 3.10 (m, 1H), 3.08 (dd, *J* = 13.9, 3.8 Hz, 1H), 2.90 - 2.80 (m, 2H), 2.77 (dd, *J* = 13.8, 10.3 Hz, 1H).

**$^{13}$C-NMR (151 MHz, DMSO-*d6*):** *δ* 164.56, 161.73, 161.63, 160.10, 160.01, 159.78, 159.71 - 159.63 (m), 158.09 (d, *J* = 3.9 Hz), 158.01, 138.39, 131.88, 131.85, 131.82, 131.64, 128.94, 127.58, 127.37, 126.78, 125.28, 123.60, 123.47, 122.18, 120.60, 118.82, 117.67, 117.56, 117.41, 116.95, 105.57, 105.43, 103.53, 103.36, 103.16 (q, *J* = 6.5 Hz), 67.04, 41.47, 41.31, 41.16, 41.03, 40.06, 36.45, 36.40, 36.33, 36.28.

**HR-MS (ESI$^+$):** m/z: ber.: [$C_{22}H_{17}F_7N_2O$+$H^+$] 459.1302; gef.: 459.1306.

*N-(Bicyclo[1.1.1]pentan-1-yl)-3-(1,3-difluor-6-(trifluormethyl)phenanthren-9-yl)-3-hydroxypropanimidamid Hydrochlorid* ***7s***




**7s**

$C_{23}H_{20}ClF_5N_2O$

[470.1184 g/mol]

**7s** wurde gemäß *AAV* 4 aus 141 mg (0.40 mmol) 3-(1,3-Difluor-6-(trifluormethyl)phenanthren-9-yl)-3-hydroxypropannitril hergestellt.

Die säulenchromatografische Reinigung an Silicagel erfolgte mit einem Laufmittelgemisch aus Dichlormethan und Methanol (10 %) mittels Flashtechnik. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. HCl/1,4 Dioxan wurde langsam zugegeben, bevor fünf Minuten gerührt wurde. Der entstandene Niederschlag wurde zweimal mit Acetonitril gewaschen und über eine Glasfritte (Porengröße 4) abgesaugt. Der erhaltene Feststoff wurde in Methanol gelöst und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt.

**Ausbeute:** 15 % (29.0 mg, 0.06 mmol), weißer Feststoff.

**Schmelzpunkt:** 145.5 °C.

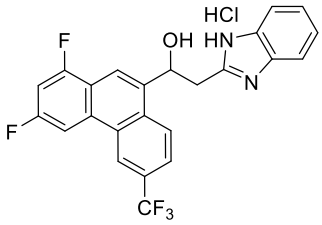
**HPLC (Methode 1):** $t_R$ = 12.3 min, AUC = 98.7 %.

**$^1$H-NMR (300 MHz, DMSO-*d6*):** $\delta$ 10.31 (s, 1H), 9.66 (s, 1H), 9.28 (s, 1H), 8.94 - 8.77 (m, 2H), 8.31 (s, 1H), 8.16 - 7.98 (m, 2H), 7.83 - 7.64 (m, 1H), 6.33 (d, $J$ = 4.2 Hz, 1H), 5.93 - 5.74 (m, 1H), 3.09 - 2.95 (m, 1H), 2.82 - 2.70 (m, 1H), 2.57 (s, 1H), 2.20 (s, 6H).

**$^{13}$C-NMR (75 MHz, $CD_3OD$):** $\delta$ 166.16, 138.27, 133.88, 133.15, 130.74, 130.17, 129.74, 126.84, 124.93, 123.96, 122.86, 119.49, 119.19, 105.68, 105.43, 104.28, 103.90, 103.57, 68.94, 52.73, 49.15, 42.42, 25.72.

**HR-MS (ESI$^+$):** m/z: ber.: [$C_{23}H_{19}F_5N_2O$+$H^+$] 435.1490; gef.: 435.1490.

*N-(1H-Benz[d]imidazol-2-yl)-3-(1,3-difluor-6-(trifluormethyl)phenanthren-9-yl)-3-hydroxypropanimidamid Hydrochlorid* ***7v***




**7v**

$C_{24}H_{16}ClF_5N_2O$

[478.0871 g/mol]

**7v** wurde angelehnt an eine Vorschrift von *Peng* et al. hergestellt.[228]

**7f** (60 mg, 0.1 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Wasser (1.5 mL/mmol) gelöst. Kupfer(I)oxid (5 mol%) und *N*,*N*'-Dimethylethylendiamin (10 mol%) wurden zugegeben, gefolgt von Kaliumcarbonat (2.0 Äq.). Das Reaktionsgemisch wurde in einem vorgeheizten Ölbad für 30 h bei 100 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von Wasser (3 mL/mmol) abgebrochen. Anschließend wurde zweimal mit Ethylacetat (5 mL/mmol) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit Natriumsulfat getrocknet und anschließend filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatografische Reinigung an Silicagel erfolgte mit einem Laufmittelgemisch aus Cyclohexan und Ethylacetat mittels Flashtechnik. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Es wurde HCl/Diethylether zugegeben und es wurde anschließend für 5 Minuten gerührt. Das Lösungsmittel wurde erneut unter vermindertem Druck entfernt.

**Ausbeute:** 53 % (26.8 mg, 0.06 mmol), gelber Feststoff.

**Schmelzpunkt:** 308.4 °C.

**HPLC (Methode 1):** $t_R$ = 12.2 min, AUC = 96.2 %.

**$^1$H-NMR (600 MHz, $CD_3OD$):** $\delta$ 9.11 (s, 1H), 8.62 (d, $J$ = 8.6 Hz, 1H), 8.45 (d, $J$ = 10.6 Hz, 1H), 8.32 (s, 1H), 8.05 (d, $J$ = 8.6 Hz, 1H), 7.74 (d, $J$ = 3.0 Hz, 1H), 7.58 (dd, $J$ = 5.9, 2.8 Hz, 2H), 7.34 (t, $J$ = 9.3 Hz, 1H), 6.10 - 6.05 (m, 1H), 3.84 (d, $J$ = 15.0 Hz, 1H), 3.61 (dd, $J$ = 15.0, 8.1 Hz, 1H).

**$^{13}$C-NMR (151 MHz, $CD_3OD$):** $\delta$ 163.86 (d, $J$ = 13.1 Hz), 162.09 (dd, $J$ = 39.5, 13.4 Hz), 160.28 (d, $J$ = 13.6 Hz), 152.23, 138.12, 133.82, 133.06, 132.45, 130.88, 130.17, 129.95, 127.37, 126.66, 126.36, 125.13 (d, $J$ = 3.3 Hz), 124.86, 123.04 (d, $J$ = 4.4 Hz), 119.32 (d,

*J* = 16.9 Hz), 118.72 (d, *J* = 6.5 Hz), 114.70, 105.58 (dd, *J* = 23.4, 4.4 Hz), 103.93 (dd, *J* = 28.6, 24.8 Hz), 68.70, 49.57, 36.63.

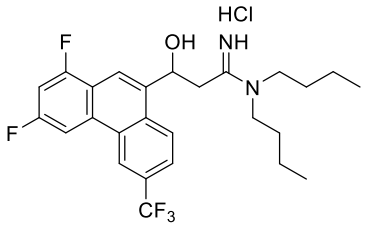
**HR-MS (ESI$^+$):** m/z: ber.: [$C_{24}H_{15}F_5N_2O+H^+$] 443.1177; gef.: 443.1182.

### 5.6.2 *AAV* 5: Synthese der 3-Hydroxypropanamidine **(7t, 7u)**

Die 3-Hydroxypropanamidine **7t** und **7u** wurden angelehnt an eine Vorschrift von *Pinto* et al. hergestellt.[229]

Zu einer Suspension von Methyl-3-(1,3-difluor-6-(trifluormethyl)phenanthren-9-yl)-3-hydroxypropanimidat (1.0 Äq.) in trockenem DCM (10 mL) wurde das entsprechende Amin (1.0 Äq.) unter Eiskühlung zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 12 h bei Raumtemperatur gerührt, wobei sich zunächst eine klare Lösung bildete, aus der sich im weiteren Verlauf ein weißer Feststoff abschied. Der Feststoff wurde abfiltriert und mit Methanol/Diethylether umkristallisiert. Die säulenchromatografische Reinigung an RP-18 Kieselgel erfolgte mit einem Laufmittelgemisch aus Wasser und Acetonitril mit 0.1 % Ameisensäure mittels Flashtechnik. Das aufgearbeitete Produkt wurde in 1,4-Dioxan gelöst, bevor HCl/1,4-Dioxan (0.5 mL) unter Eiskühlung zugegeben wurde. Es wurde 30 min bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde erneut unter vermindertem Druck entfernt.

*N,N-Dibutyl-3-(1,3-difluor-6-(trifluormethyl)phenanthren-9-yl)-3-hydroxypropanimidamid Hydrochlorid 7t*




**7t**

$C_{26}H_{30}ClF_5N_2O$

[516.1967 g/mol]

**7t** wurde gemäß *AAV* 5 aus 176 mg (0.50 mmol) Methyl-3-(1,3-difluor-6-(trifluormethyl)phenanthren-9-yl)-3-hydroxypropanimidat hergestellt.

**Ausbeute:** 13 % (27.0 mg, 0.05 mmol), weiß-grauer Feststoff.

**Schmelzpunkt:** 177.9 °C,

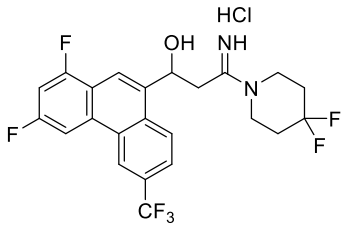
**HPLC (Method 1):** $t_R$ = 14.9 min, AUC = 95.3 %.

**$^1$H-NMR (600 MHz, $CD_3OD$):** $\delta$ 9.10 (s, 1H), 8.66 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.46 (d, *J* = 10.6 Hz, 1H), 8.41 (s, 1H), 8.04 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.40 (t, *J* = 9.3 Hz, 1H), 5.96 (s, 1H), 3.48 - 3.40 (m, 1H), 3.37 (dd, *J* = 17.0, 7.6 Hz, 2H), 3.25 (d, *J* = 15.1 Hz, 3H), 1.51 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 1.36 - 1.29 (m, 4H), 1.22 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.15 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H), 0.93 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 0.86 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H).

**$^{13}$C-NMR (151 MHz, $CD_3OD$):** $\delta$ 163.96, 162.54, 162.45, 160.90, 160.81, 160.64, 160.55, 158.97, 158.88, 136.64, 132.44, 132.41, 132.38, 132.34, 131.76, 131.02, 129.42, 129.40, 129.37, 129.20, 129.01, 128.79, 128.58, 128.46, 128.36, 127.02, 125.28, 125.22, 123.79, 123.42, 121.66, 121.63, 121.61, 121.58, 118.00, 117.93, 117.90, 104.32, 104.29, 104.16, 104.14, 102.82, 102.65, 102.63, 102.46, 68.01, 51.29, 49.15, 38.08, 29.64, 27.77, 19.35, 19.27, 12.75, 12.45.

**HR-MS (ESI$^+$):** m/z: ber.: [$C_{26}H_{29}F_5N_2O+H^+$] 481.2273; gef.: 481.2278.

*1-(1,3-Difluor-6-(trifluormethyl)phenanthren-9-yl)-3-(4,4-difluorpiperidin-1-yl)-3-iminopropan-1-ol Hydrochlorid* ***7u***




**7u**

$C_{23}H_{20}ClF_7N_2O$

[508.1152 g/mol]

**7u** wurde gemäß *AAV* 5 aus 150 mg (0.39 mmol) Methyl-3-(1,3-difluor-6-(trifluormethyl)phenanthren-9-yl)-3-hydroxypropanimidat hergestellt.

**Ausbeute:** 13 % (26.0 mg, 0.05 mmol), weiß-grauer Feststoff.

**Schmelzpunkt:** 210.9 °C.

**HPLC (Methode 1):** $t_R$ = 12.4 min, AUC = 100.0 %.

**$^1$H-NMR (600 MHz, $CD_3OD$):** $\delta$ 9.12 - 9.00 (m, 1H), 8.47 - 8.40 (m, 2H), 7.99 (s, 1H), 7.76 - 7.59 (m, 1H), 7.36 (d, $J$ = 8.7 Hz, 1H), 6.06 - 5.83 (m, 1H), 4.19 (d, $J$ = 5.6 Hz, 1H), 3.74 (d, $J$ = 8.9 Hz, 1H), 3.31 (s, 2H), 1.36 (s, 2H), 1.29 (s, 4H).

**$^{13}$C-NMR (151 MHz, $CD_3OD$):** $\delta$ 139.00, 133.59, 132.41, 129.88, 128.18, 126.63, 124.87, 122.79, 118.39, 69.53, 68.48, 49.57, 38.43, 34.82, 33.31, 32.42, 27.56, 23.68, 20.98, 14.72, 14.40.

**HR-MS (ESI$^+$):** m/z: ber.: [$C_{23}H_{19}F_7N_2O+H^+$] 473.1458; gef.: 473.1456.

# 6 Literaturverzeichnis


(1) Stich, A. Die wichtigste tropische Infektionskrankheit: Malaria. Pharm. Unserer Zeit **2009**, *38* (6), 508–511. https://doi.org/10.1002/pauz.200900337.

(2) Tuteja, R. Malaria - An Overview. *FEBS J.* **2007**, *274* (18), 4670–4679. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05997.x.

(3) Calderaro, A.; Piccolo, G.; Gorrini, C.; Rossi, S.; Montecchini, S.; Dell'Anna, M. L.; De Conto, F.; Medici, M. C.; Chezzi, C.; Arcangeletti, M. C. Accurate identification of the six human Plasmodium spp. causing imported malaria, including Plasmodium Ovale Wallikeri and Plasmodium Knowlesi. *Malar. J.* **2013**, *12* (321), 1–6. https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-321.

(4) World Health Organization. *World Malaria Report 2025: Addressing the threat of antimalarial drug resistance*; Geneva, 2025.

(5) Kojom Foko, L. P.; Kumar, A.; Hawadak, J.; Singh, V. Plasmodium Cynomolgi in humans: current knowledge and future directions of an emerging zoonotic malaria parasite. *Infection* **2023**, *51*, 623–640. https://doi.org/10.1007/s15010-022-01952-2.

(6) Novita, R.; Suprayogi, A.; Agusta, A.; Nugraha, A. B.; Darusman, H. S. Unveiling the Diversity and Zoonotic Potential of Plasmodium Inui: a Comprehensive Review of Insights from Indonesia and Southeast Asia. *Acta Parasitol.* **2025**, *70* (1), 1–10. https://doi.org/10.1007/s11686-025-00995-3.

(7) Brasil, P.; Zalis, M. G.; de Pina-costa, A.; Siqueira, A. M.; Júnior, C. B.; Silva, S.; Areas, A. L. L.; Pelajo-Machado, M.; de Alvarenga, D. A. M.; da Silva Santelli, A. C. F.; Albuquerque, H. G.; Cravo, P.; de Abreu, F. V. S.; Peterka, C. L.; Zanini, G. M.; Suárez Mutis, M. C.; Pissinatti, A.; Lourenço-de-Oliveira, R.; Alves de Brito, C. F.; Ferreira-da-Cruz, M. F.; Culleton, R.; Daniel-Ribeiro, C. T. Outbreak of human malaria caused by Plasmodium simium in the atlantic forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. Lancet Glob. *Health* **2017**, *5* (10), https://doi.org/10.1016/S2214-109X(17)30333-9.

(8) Mourier, T.; de Alvarenga, D. A. M.; Kaushik, A.; de Pina-Costa, A.; Douvropoulou, O.; Guan, Q.; Guzmán-Vega, F. J.; Forrester, S.; de Abreu, F. V. S.; Júnior, C. B.; de Souza Junior, J. C.; Moreira, S. B.; Hirano, Z. M. B.; Pissinatti, A.; Ferreira-da-Cruz, M. de F.; de Oliveira, R. L.; Arold, S. T.; Jeffares, D. C.; Brasil, P.; de Brito, C. F. A.; Culleton, R.; Daniel-Ribeiro, C. T.; Pain, A. The genome of the zoonotic malaria parasite Plasmodium simium reveals adaptations to host switching. *BMC Biol.* **2021**, *19* (219), 1–17. https://doi.org/10.1186/s12915-021-01139-5.

(9) Jeyaprakasam, N. K.; Phang, W. K.; Shahari, S.; Vythilingam, I. Plasmodium cynomolgi: Potential Emergence of New Zoonotic Malaria in Southeast Asia. *Parasit. Vectors* **2025**, *18* (151), 1–17. https://doi.org/10.1186/s13071-025-06784-1.

(10) Coatney, G. R.; Collins, W. E.; Warren, McW.; Contacos P. G. *The Primate Malarias* [Online]; U.S. Department of Health, Education, and Welfare: Bethesda, MD, 1971 (elektronische Ausgabe des CDC, 2003). https://stacks.cdc.gov/view/cdc/6538 (abgerufen am 06.06.2026).

(11) Kotepui, M.; Kotepui, K. U.; De Jesus Milanez, G.; Masangkay, F. R. Plasmodium spp. mixed infection leading to severe malaria: a systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.* **2020**, *10* (11068), 1–12. https://doi.org/10.1038/s41598-020-68082-3.

(12) Sato, S. Plasmodium-a brief introduction to the parasites causing human malaria and their basic biology. *J. Physiol. Anthropol.* **2021**, *40* (1), 1. https://doi.org/10.1186/s40101-020-00251-9.

(13) Ramaprasad, A.; Klaus, S.; Douvropoulou, O.; Culleton, R.; Pain, A. Plasmodium vinckei genomes provide insights into the pan-genome and evolution of rodent malaria parasites. *BMC Biol.* **2021**, *19* (69), 1–22. https://doi.org/10.1186/s12915-021-00995-5.

(14) Martinsen, E. S.; Perkins, S. L.; Schall, J. J. A three-genome phylogeny of malaria parasites (Plasmodium and closely related genera): Evolution of life-history traits and host switches. *Mol. Phylogenet. Evol.* **2008**, *47* (1), 261–273. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2007.11.012.

(15) Craig, A. G.; Grau, G. E.; Janse, C.; Kazura, J. W.; Milner, D.; Barnwell, J. W.; Turner, G.; Langhorne, J. The Role of Animal Models for Research on Severe Malaria. *PLOS Pathog.* **2012**, *8* (2), e1002401. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002401.

(16) Singh, B.; Daneshvar, C. Human infections and detection of Plasmodium knowlesi. *Clin. Microbiol. Rev.* **2013**, *26* (2), 165–184. https://doi.org/10.1128/CMR.00079-12.

(17) Jeyaprakasam, N. K.; Low, V. L.; Pramasivan, S.; Liew, J. W. K.; Wan-Sulaiman, W. Y.; Vythilingam, I. High transmission efficiency of the simian malaria vectors and population expansion of their parasites Plasmodium cynomolgi and Plasmodium inui. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2023**, *17* (6), e0011438. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011438.

(18) De Alvarenga, D. A. M.; Culleton, R.; De Pina-Costa, A.; Rodrigues, D. F.; Bianco, C.; Silva, S.; Nunes, A. J. D.; De Souza, J. C.; Hirano, Z. M. B.; Moreira, S. B.; Pissinatti, A.; De Abreu, F. V. S.; Lisboa Areas, A. L.; Lourenço-De-Oliveira, R.; Zalis, M. G.; Ferreira-Da-Cruz, M. D. F.; Brasil, P.; Daniel-Ribeiro, C. T.; De Brito, C. F. A. An Assay for the identification of Plasmodium simium infection for diagnosis of zoonotic malaria in

the Brazilian Atlantic Forest. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (86), 1–10. https://doi.org/10.1038/s41598-017-18216-x.

(19) Delves, M.; Plouffe, D.; Scheurer, C.; Meister, S.; Wittlin, S.; Winzeler, E. A.; Sinden, R. E.; Leroy, D. The Activities of Current Antimalarial Drugs on the Life Cycle Stages of Plasmodium: A Comparative Study with Human and Rodent Parasites. *PLoS Med.* **2012**, *9* (2), e1001169. https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001169.

(20) Cowman, A. F.; Healer, J.; Marapana, D.; Marsh, K. Malaria: Biology and Disease. *Cell* **2016**, *167* (3), 610–624. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.055.

(21) Lee, A. H.; Symington, L. S.; Fidock, D. A. DNA Repair Mechanisms and Their Biological Roles in the Malaria Parasite Plasmodium Falciparum. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2014**, *78* (3), 469–486. https://doi.org/10.1128/mmbr.00059-13.

(22) Frischknecht, F.; Baldacci, P.; Martin, B.; Zimmer, C.; Thiberge, S.; Olivo-Marin, J. C.; Shorte, S. L.; Ménard, R. Imaging movement of malaria parasites during transmission by Anopheles mosquitoes. *Cell. Microbiol.* **2004**, *6* (7), 687–694. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00395.x.

(23) Medica, D. L.; Sinnis, P. Quantitative Dynamics of Plasmodium yoelii Sporozoite Transmission by Infected Anopheline Mosquitoes. *Infect. Immun.* **2005**, *73* (7), 4363–4369. https://doi.org/10.1128/IAI.73.7.4363-4369.2005.

(24) Beier, J. C.; Davis, J. R.; Vaughan, J. A.; Noden, B. H.; Beier, M. S. Quantitation of Plasmodium falciparum Sporozoites Transmitted in Vitro by Experimentally Infected Anopheles gambiae and Anopheles stephensi. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1991**, *44* (5), 564–570. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1991.44.564.

(25) Yamauchi, L. M.; Coppi, A.; Snounou, G.; Sinnis, P. Plasmodium sporozoites trickle out of the injection site. *Cell. Microbiol.* **2007**, *9* (5), 1215–1222. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00861.x.

(26) Amino, R.; Thiberge, S.; Martin, B.; Celli, S.; Shorte, S.; Frischknecht, F.; Ménard, R. Quantitative imaging of Plasmodium transmission from mosquito to mammal. *Nat. Med.* **2006**, *12* (2), 220–224. https://doi.org/10.1038/nm1350.

(27) Prudêncio, M.; Rodriguez, A.; Mota, M. M. The silent path to thousands of merozoites: the Plasmodium liver stage. *Nat. Rev. Microbiol.* **2006**, *4* (11), 849–856. https://doi.org/10.1038/nrmicro1529.

(28) Soulard, V.; Bosson-Vanga, H.; Lorthiois, A.; Roucher, C.; Franetich, J. F.; Zanghi, G.; Bordessoulles, M.; Tefit, M.; Thellier, M.; Morosan, S.; Le Naour, G.; Capron, F.;

Suemizu, H.; Snounou, G.; Moreno-Sabater, A.; Mazier, D. Plasmodium falciparum full life cycle and Plasmodium ovale liver stages in humanized mice. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 7690. https://doi.org/10.1038/ncomms8690.

(29) Dembélé, L.; Franetich, J. F.; Lorthiois, A.; Gego, A.; Zeeman, A. M.; Kocken, C. H. M.; Le Grand, R.; Dereuddre-Bosquet, N.; Van Gemert, G. J.; Sauerwein, R.; Vaillant, J. C.; Hannoun, L.; Fuchter, M. J.; Diagana, T. T.; Malmquist, N. A.; Scherf, A.; Snounou, G.; Mazier, D. Persistence and activation of malaria hypnozoites in long-term primary hepatocyte cultures. *Nat. Med.* **2014**, *20* (3), 307–312. https://doi.org/10.1038/nm.3461.

(30) Miller, L. H.; Baruch, D. I.; Marsh, K.; Doumbo, O. K. The pathogenic basis of malaria. *Nature* **2002**, *415* (6872), 673–679. https://doi.org/10.1038/415673a.

(31) Greenwood, B. M.; Fidock, D. A.; Kyle, D. E.; Kappe, S. H. I.; Alonso, P. L.; Collins, F. H.; Duffy, P. E. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *J. Clin. Invest*. **2008**, *118* (4), 1266–1276. https://doi.org/10.1172/JCI33996.

(32) Weatherall, D. J.; Miller, L. H.; Baruch, D. I.; Marsh, K.; Doumbo, O. K.; Casals-Pascual, C.; Roberts, D. J. Malaria and the Red Cell. *Hematology* **2002**, *2002* (1), 35–57. https://doi.org/10.1182/asheducation-2002.1.35.

(33) Fujioka, H.; Aikawa, M. Structure and Life Cycle. Chem. *Immunol*. **2002**, *80*, 1–26. https://doi.org/10.1159/000058837.

(34) Sinnis, P.; Sim, B. K. L. Cell invasion by the vertebrate stages of Plasmodium. *Trends Microbiol.* **1997**, *5* (2), 52–58. https://doi.org/10.1016/S0966-842X(97)84657-4.

(35) Cowman, A. F.; Crabb, B. S. Invasion of Red Blood Cells by Malaria Parasites. *Cell* **2006**, *124* (4), 755–766. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.006.

(36) Goldberg, D. E.; Zimmerberg, J. Hardly Vacuous: The Parasitophorous Vacuolar Membrane of Malaria Parasites. *Trends Parasitol.* **2020**, *36* (2), 138–146. https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.11.006.

(37) Kozicki, M.; Czepiel, J.; Biesiada, G.; Nowak, P.; Garlicki, A.; Wesełucha-Birczyńska, A. The ring-stage of Plasmodium falciparum observed in RBCs of hospitalized malaria patients. *Analyst* **2015**, *140* (23), 8007–8016. https://doi.org/10.1039/c5an01598g.

(38) Sherman, I. W.; Tanigoshi, L. Incorporation of 14C-amino acids by malarial plasmodia (Plasmodium lophurae): VI. Changes in the kinetic constants of amino acid transport during infection. *Exp. Parasitol.* **1974**, *35* (3), 369–373. https://doi.org/10.1016/0014-4894(74)90042-3.

(39) Sherman, I. W. Amino acid metabolism and protein synthesis in malarial parasites. *Bull.*

*World Health Organ.* **1977**, *55* (2-3), 265–276. PMID: 338183; PMCID: PMC2366754.

(40) Lee, S. J.; Stepniewska, K.; Anstey, N.; Ashley, E.; Barnes, K.; Binh, T. Q.; D'Alessandro, U.; Day, N. P. J.; De Vries, P. J.; Dorsey, G.; Guthmann, J. P.; Mayxay, M.; Newton, P.; Nosten, F.; Olliaro, P.; Osario, L.; Pinoges, L.; Price, R.; Rowland, M.; Smithuis, F.; Taylor, R.; White, N. J. The relationship between the haemoglobin concentration and the haematocrit in Plasmodium falciparum malaria. *Malar. J.* **2008**, *7* (149), 14. https://doi.org/10.1186/1475-2875-7-149.

(41) Slater, A. F. ; Swiggard, W. J.; Orton, B. R.; Flitter, W. D.; Goldberg, D. E.; Cerami, A.; Henderson, G. B. An iron-carboxylate bond links the heme units of malaria pigment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, *88* (2), 325–329. https://doi.org/10.1073/pnas.88.2.325.

(42) Gerald, N.; Mahajan, B.; Kumar, S. Mitosis in the Human Malaria Parasite Plasmodium falciparum. Eukaryot. *Cell* **2011**, *10* (4), 474–482. https://doi.org/10.1128/EC.00314-10.

(43) Sinden, R. E. Malaria, sexual development and transmission: retrospect and prospect. *Parasitology* **2009**, *136* (12), 1427–1434. https://doi.org/10.1017/S0031182009990667.

(44) Buckling, A.; Ranford-Cartwright, L. C.; Miles, A.; Read, A. F. Chloroquine Increases Plasmodium falciparum gametocytogenesis in vitro. *Parasitology* **1999**, *118* (4), 339–346. https://doi.org/10.1017/S0031182099003960.

(45) Billker, O.; Shaw, M. K.; Margos, G.; Sinden, R. E. The roles of temperature, pH and mosquito factors as triggers of male and female gametogenesis of Plasmodium berghei in vitro. *Parasitology* **1997**, *115* (1), 1–7. https://doi.org/10.1017/S0031182097008895.

(46) Phillips, M. A.; Burrows, J. N.; Manyando, C.; Van Huijsduijnen, R. H.; Van Voorhis, W. C.; Wells, T. N. C. Malaria. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2017**, *3* (17050). https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.50.

(47) Pasvol, G. Protective hemoglobinopathies and Plasmodium falciparum transmission. *Nat. Genet.* **2010**, *42* (4), 284–285. https://doi.org/10.1038/ng0410-284.

(48) Ghosh, A.; Edwards, M. J.; Jacobs-Lorena, M. The Journey of the Malaria Parasite in the Mosquito: Hopes for the New Century. *Parasitol. Today* **2000**, *16* (5), 196–201. https://doi.org/10.1016/S0169-4758(99)01626-9.

(49) Baia-Da-Silva, D. C.; Alvarez, L. C. S.; Lizcano, O. V.; Costa, F. T. M.; Lopes, S. C. P.; Orfanó, A. S.; Pascoal, D. O.; Nacif-Pimenta, R.; Rodriguez, I. C.; Guerra, M. D. G. V. B.; Lacerda, M. V. G.; Secundino, N. F. C.; Monteiro, W. M.; Pimenta, P. F. P. The role of the peritrophic matrix and red blood cell concentration in Plasmodium vivax infection

of Anopheles aquasalis. *Parasites Vectors* **2018**, *11* (148), 1–10. https://doi.org/10.1186/s13071-018-2752-5.

(50) Sinden, R. E. The biology of Plasmodium in the mosquito. *Experientia* **1984**, *40* (12), 1330–1343. https://doi.org/10.1007/BF01951886.

(51) Aly, A. S. I.; Vaughan, A. M.; Kappe, S. H. I. Malaria Parasite Development in the Mosquito and Infection of the Mammalian Host. *Annu. Rev. Microbiol.* **2009**, *63*, 195–221. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073403.

(52) Wang, Q.; Fujioka, H.; Nussenzweig, V. Exit of Plasmodium Sporozoites from Oocysts Is an Active Process That Involves the Circumsporozoite Protein. *PLoS Pathog.* **2005**, *1* (1), 0072–0079. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0010009.

(53) Smith, R. C.; Barillas-Mury, C. Plasmodium Oocysts: Overlooked Targets of Mosquito Immunity. *Trends Parasitol.* **2016**, *32* (12), 979–990. https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.08.012.

(54) Bronzan, R. N.; McMorrow, M. L.; Kachur, S. P. Diagnosis of Malaria: Challenges for Clinicians in Endemic and Non-Endemic Regions. *Mol. Diagnosis Ther.* **2008**, *12* (5), 299–306. https://doi.org/10.1007/BF03256295.

(55) Stonely, A. Prevalence of Malaria in Sub-Saharan Africa. *Ballard Br.* **2023**, *2023* (1), Article 6.

(56) Frischknecht, F. *Malaria: Tödliche Parasiten, spannende Forschung und keine Impfung*; Springer Spektrum: Wiesbaden, Germany, 2019. https://doi.org/10.1007/978-3-658-25300-4.

(57) Deutsche Gesellschaft für Tropenmedizin, Reisemedizin und Globale Gesundheit (DTG). *Leitlinie: Diagnostik und Therapie der Malaria*; AWMF-Registernummer 042-001, Version 30.08.2025; DTG: Hamburg, Germany, 2025. https://register.awmf.org/de/leitlinien/detail/042-001 (abgerufen am 06.06.2026).

(58) Meissner, T. Malaria: Zahl der Erkrankten steigt an. *CME* **2017**, *14* (6), 23. https://doi.org/10.1007/s11298-017-6205-9.

(59) Jung, N.; Mayet, W.-J.; Mertens, P. R.; Meyer (federführend), J.; Müller, O.-A.; Pfeifer, M.; Schellinger, P.; Weiss, N.; Wendtner, C.-M. *L – Infektionskrankheiten. Rationelle Diagnostik und Therapie in der Inneren Medizin*; Urban & Fischer, 2020. https://doi.org/10.1016/B978-3-437-06282-7.50018-8.

(60) Hora, R.; Kapoor, P.; Thind, K. K.; Mishra, P. C. Cerebral malaria – clinical manifestations and pathogenesis. *Metab. Brain Dis.* **2016**, *31*, 225–237.

https://doi.org/10.1007/s11011-015-9787-5.

(61) Idro, R.; Jenkins, N. E.; Newton, C. R. J. C. Pathogenesis, clinical features, and neurological outcome of cerebral malaria. *Lancet Neurol*. **2005**, *4* (12), 827–840. https://doi.org/10.1016/s1474-4422(05)70247-7.

(62) Löscher, T.; Hoelscher, M.; Nothdurft, H. D. Malaria - Diagnostik. *Dtsch. Med. Wochenschr.* **2003**, *128* (23), 1290–1293. https://doi.org/10.1055/s-2003-39793.

(63) Klaus, S.; Binder, P.; Kim, J.; Machado, M.; Funaya, C.; Schaaf, V.; Klaschka, D.; Kudulyte, A.; Cyrklaff, M.; Laketa, V.; Höfer, T.; Guizetti, J.; Becker, N. B.; Frischknecht, F.; Schwarz, U. S.; Ganter, M. Asynchronous nuclear cycles in multinucleated Plasmodium falciparum facilitate rapid proliferation. *Sci. Adv.* **2022**, *8* (13), 1–12. https://doi.org/10.1126/sciadv.abj5362.

(64) Schulz, E.-C. Welche Symptome zeigt ein Malaria-Patient? In *Mikrobiologie für die mündliche Prüfung*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1998; p 121. https://doi.org/10.1007/978-3-642-80349-9_121.

(65) Markus, M. B. Malaria: Origin of the Term “Hypnozoite.” *J. Hist. Biol.* **2011**, *44* (4), 781–786. https://doi.org/10.1007/s10739-010-9239-3.

(66) Alberer, M.; Löscher, T.; Berens-Riha, N. Malaria. *Monatsschrift Kinderheilkd.* **2016**, *164* (8), 705–718. https://doi.org/10.1007/s00112-016-0118-7.

(67) Weise, M.; Ehrich, J. H. H.; Voller, A. Nierenbeteiligung Bei Malaria. *Klin. Wochenschr.* **1976**, *54* (14), 651–660. https://doi.org/10.1007/BF01469144.

(68) White, N. J. Plasmodium Knowlesi: The Fifth Human Malaria Parasite. *Clin. Infect. Dis.* **2008**, *46* (2), 172–173. https://doi.org/10.1086/524889.

(69) Fan, L.; Lee, S. Y.; Koay, E.; Harkensee, C. Plasmodium knowlesi infection: a diagnostic challenge. *BMJ Case Rep*. **2013**, *2013*, bcr2013009558. https://doi.org/10.1136/bcr-2013-009558.

(70) Cox-Singh, J.; Davis, T. M. E.; Lee, K.-S.; Shamsul, S. S. G.; Matusop, A.; Ratnam, S.; Rahman, H. A.; Conway, D. J.; Singh, B. Plasmodium knowlesi Malaria in Humans Is Widely Distributed and Potentially Life Threatening. *Clin. Infect. Dis.* **2008**, *46* (2), 165–171. https://doi.org/10.1086/524888.

(71) Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *CDC Yellow Book 2020: Health Information for International Travel*; Brunette, G. W., Nemhauser, J. B., Eds.; Oxford University Press: New York, NY, 2019. https://doi.org/10.1093/med/9780190928933.001.0001.

(72) Castelli, F.; Odolini, S.; Autino, B.; Foca, E.; Russo, R. Malaria Prophylaxis: A Comprehensive Review. *Pharmaceuticals* **2010**, *3* (10), 3212–3239. https://doi.org/10.3390/ph3103212.

(73) Freedman, D. O. Malaria Prevention in Short-Term Travelers. *N. Engl. J. Med.* **2008**, *359* (6), 603–612. https://doi.org/10.1056/NEJMcp0803572.

(74) Soto, J.; Medina, F.; Dember, N.; Berman, J. Efficacy of Permethrin-Impregnated Uniforms in the Prevention of Malaria and Leishmaniasis in Colombian Soldiers. *Clin. Infect. Dis.* **1995**, *21* (3), 599–602. https://doi.org/10.1093/clinids/21.3.599.

(75) Pickett, J. A.; Birkett, M. A.; Logan, J. G. DEET Repels ORNery Mosquitoes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105* (36), 13195–13196. https://doi.org/10.1073/pnas.0807167105.

(76) Carroll, S. P.; Loye, J. PMD, a Registered Botanical Mosquito Repellent with Deet-like Efficacy. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **2006**, *22* (3), 507–514. https://doi.org/10.2987/8756-971X(2006)22[507:PARBMR]2.0.CO;2.

(77) *World Health Organization. International Travel and Health 2012; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2012. ISBN 978-92-4-158047-2*.

(78) Schwartz, E. Prophylaxis of malaria. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* **2012**, *4* (1), e2012045. https://doi.org/ 10.4084/MJHID.2012.45.

(79) Schwartz, E.; Parise, M.; Kozarsky, P.; Cetron, M. Delayed Onset of Malaria — Implications for Chemoprophylaxis in Travelers. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *349* (16), 1510–1516. https://doi.org/10.1056/nejmoa021592.

(80) Baird, J. K.; Rieckmann, K. H. Can primaquine therapy for vivax malaria be improved? *Trends Parasitol.* **2003**, *19* (3), 115–120. https://doi.org/10.1016/S1471-4922(03)00005-9.

(81) Javorsky, D. J.; Tremont, G.; Keitner, G. I.; Parmentier, A. H. Cognitive and Neuropsychiatric Side Effects of Mefloquine. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* **2001**, *13* (2), 302–306. https://doi.org/10.1176/jnp.13.2.302.

(82) Okwu, D. G.; Manego, R. Z.; Duparc, S.; Kremsner, P. G.; Ramharter, M.; Mombo-Ngoma, G. The non-artemisinin antimalarial drugs under development: a review. *Clin. Microbiol. Infect.* **2025**, *31* (6), 941-947. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2025.03.009.

(83) Overbosch, D.; Schilthuis, H.; Bienzle, U.; Behrens, R. H.; Kain, K. C.; Clarke, P. D.; Toovey, S.; Knobloch, J.; Nothdurft, H. D.; Shaw, D.; Roskell, N. S.; Chulay, J. D.; Malarone International Study Team. Atovaquone-Proguanil versus Mefloquine for Malaria Prophylaxis in Nonimmune Travelers: Results from a Randomized, Double-

Blind Study. *Clin. Infect. Dis.* **2001**, *33* (7), 1015–1021. https://doi.org/10.1086/322694.

(84) Tangpukdee, N.; Duangdee, C.; Wilairatana, P.; Krudsood, S. Malaria Diagnosis: A Brief Review. *Korean J. Parasitol.* **2009**, *47* (2), 93–102. https://doi.org/10.3347/kjp.2009.47.2.93.

(85) Robert Koch-Institut. RKI-Ratgeber für Ärzte: Malaria. *Epidemiologisches Bulletin* **2015**, *17*, 140–144.

(86) World Health Organization. *Management of Severe Malaria: A Practical Handbook*, 2nd ed.; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2000.

(87) Dondorp, A.; Nosten, F.; Stepniewska, K.; Day, N.; White, N. J.; South East Asian Quinine Artesunate Malaria Trial (SEAQUAMAT) Group. Artesunate versus quinine for treatment of severe falciparum malaria: a randomised trial. *Lancet* **2005**, *366* (9487), 717–725. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67176-0.

(88) Nyaaba, N.; Andoh, N. E.; Amoh, G.; Amuzu, D. S. Y.; Ansong, M.; Ordonez-Mena, J. M.; Hirst, J. Comparative efficacy and safety of the artemisinin derivatives compared to quinine for treating severe malaria in children and adults: A systematic update of literature and network meta-analysis. *PLoS One* **2022**, *17* (7), e0269391. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269391.

(89) Tu, Y. The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. *Nat. Med.* **2011**, *17* (10), 1217–1220. https://doi.org/10.1038/nm.2471.

(90) Nosten, F.; White, N. J. Artemisinin-Based Combination Treatment of Falciparum Malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2007**, *77* (6), 181–192. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2007.77.181.

(91) World Health Organization. *Guidelines for the Treatment of Malaria*, 3rd ed.; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2015; ISBN 978-92-4-154912-7.

(92) World Health Organization. *Q&A on Artemisinin Resistance*; Background Document for Session 2, Malaria Policy Advisory Committee Meeting, Geneva, Switzerland, 11–13 April 2018; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2018.

(93) Metoh, T. N.; Somo-Moyou, R.; Fon, P. G.; Tambo, E.; Chen, J.-H.; Xiao-Nong, Z. Efficacy and Safety Assessment of Three Artemisinin-Based Combination Therapy (Acts) in the Treatment of P. Falciparum Malaria in Cameroon. *J. Infect. Dis. Epidemiol.* **2021**, *7* (12). https://doi.org/10.23937/2474-3658/1510242.

(94) Rajneesh, N.; Tiwari, R.; Singh, V. K.; Kumar, A.; Gupta, R. P.; Singh, A. K.; Gautam, V.; Kumar, R. Advancements and Challenges in Developing Malaria Vaccines:

Targeting Multiple Stages of the Parasite Life Cycle. *ACS Infect. Dis.* **2023**, *9* (10), 1795–1814. https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.3c00332.

(95) Fatmaningsih, L.; Samasta, N. A.; Octa, L. Differences in the Life Cycle and Growth of Plasmodium knowlesi, Inui, Vivax, Malariae, Falciparum, Ovale. *J. Biomed. Techno Nanomater.* **2024**, *1* (2), 59–69. https://doi.org/10.55849/jbtn.v1i1.172.

(96) Coppi, A.; Tewari, R.; Bishop, J. R.; Bennett, B. L.; Lawrence, R.; Esko, J. D.; Billker, O.; Sinnis, P. Heparan Sulfate Proteoglycans Provide a Signal to Plasmodium Sporozoites to Stop Migrating and Productively Invade Host Cells. *Cell Host Microbe* **2007**, *2* (5), 316–327. https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.10.002.

(97) Cerami, C.; Frevert, U.; Sinnis, P.; Takacs, B.; Clavijo, P.; Santos, M. J.; Nussenzweig, V. The Basolateral Domain of the Hepatocyte Plasma Membrane Bears Receptors for the Circumsporozoite Protein of Plasmodium falciparum Sporozoites. *Cell* **1992**, *70* (6), 1021–1033. https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90251-7.

(98) Armistead, J. S.; Wilson, I. B. H.; Van Kuppevelt, T. H.; Dinglasan, R. R. A role for heparan sulfate proteoglycans in Plasmodium falciparum sporozoite invasion of anopheline mosquito salivary glands. *Biochem. J.* **2011**, *438* (3), 475–483. https://doi.org/10.1042/BJ20110694.

(99) RTS,S Clinical Trials Partnership. Efficacy and Safety of RTS,S/AS01 Malaria Vaccine with or without a Booster Dose in Infants and Children in Africa: Final Results of a Phase 3, Individually Randomised, *Controlled Trial. Lancet* **2015**, *386* (9988), 31–45. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60721-8.

(100) World Health Organization. WHO Recommends Groundbreaking Malaria Vaccine for Children at Risk. October 6, 2021. https://www.who.int/news/item/06-10-2021-who-recommends-groundbreaking-malaria-vaccine-for-children-at-risk (abgerufen am 06.06.2026).

(101) Baird, J. K. 8-Aminoquinoline Therapy for Latent Malaria. *Clin. Microbiol. Rev.* **2019**, *32* (4), e00011-19. https://doi.org/10.1128/CMR.00011-19.

(102) GlaxoSmithKline. *Malarone® (Atovaquone and Proguanil Hydrochloride) Tablets: U.S. Prescribing Information*; GlaxoSmithKline: Research Triangle Park, NC, USA. https://gskpro.com/content/dam/global/hcpportal/en_US/Prescribing_Information/Malarone/pdf/MALARONE.PDF (abgerufen am 06.06.2026).

(103) Haston, J. C.; Hwang, J.; Tan, K. R. Guidance for Using Tafenoquine for Prevention and Antirelapse Therapy for Malaria — United States, 2019. MMWR. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2019**, *68* (46), 1062–1068. https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6846a4.

(104) Stanway, R. R.; Bushell, E.; Chiappino-Pepe, A.; Roques, M.; Sanderson, T.; Franke-Fayard, B.; Caldelari, R.; Golomingi, M.; Nyonda, M.; Pandey, V.; Schwach, F.; Chevalley, S.; Ramesar, J.; Metcalf, T.; Herd, C.; Burda, P.-C.; Rayner, J. C.; Soldati-Favre, D.; Janse, C. J.; Hatzimanikatis, V.; Billker, O.; Heussler, V. T. Genome-Scale Identification of Essential Metabolic Processes for Targeting the Plasmodium Liver Stage. *Cell* **2019**, *179* (5), 1112-1128.e26. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.030.

(105) The Wellcome Sanger Institute. New Malaria Drug Targets Identified in Liver Stage of Life Cycle; 14.11.2019. https://www.sanger.ac.uk/news_item/new-malaria-drug-targets-identified-in-liver-stage-of-life-cycle/ (abgerufen am 06.06.2026).

(106) Agop-Nersesian, C.; Niklaus, L.; Wacker, R.; Heussler, V. T. Host cell cytosolic immune response during Plasmodium liver stage development. *FEMS Microbiol. Rev.* **2018**, *42* (3), 324–334. https://doi.org/10.1093/femsre/fuy007.

(107) Sturm, A.; Amino, R.; van de Sand, C.; Regen, T.; Retzlaff, S.; Rennenberg, A.; Krueger, A.; Pollok, J. M.; Ménard, R.; Heussler, V. T. Manipulation of Host Hepatocytes by the Malaria Parasite for Delivery into Liver Sinusoids. *Science* **2006**, *313* (5791), 1287–1290. https://doi.org/10.1126/science.1129720.

(108) White, N. Antimalarial drug resistance and combination chemotherapy. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **1999**, *354* (1384), 739–749. https://doi.org/10.1098/rstb.1999.0426.

(109) Loria, P.; Miller, S.; Foley, M.; Tilley, L. Inhibition of the peroxidative degradation of haem as the basis of action of chloroquine and other quinoline antimalarials. *Biochem. J.* **1999**, *339* (2), 363–370. https://doi.org/10.1042/0264-6021:3390363.

(110) Egan, T. J. Haemozoin Formation. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2008**, *157* (2), 127–136. https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2007.11.005.

(111) Srivastava, I. K.; Vaidya, A. B. A Mechanism for the Synergistic Antimalarial Action of Atovaquone and Proguanil. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43* (6), 1334–1339. https://doi.org/10.1128/aac.43.6.1334.

(112) Srivastava, I. K.; Rottenberg, H.; Vaidya, A. B. Atovaquone, a Broad Spectrum Antiparasitic Drug, Collapses Mitochondrial Membrane Potential in a Malarial Parasite. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (7), 3961–3966. https://doi.org/10.1074/jbc.272.7.3961.

(113) Dahl, E. L.; Rosenthal, P. J. Apicoplast translation, transcription and genome replication: targets for antimalarial antibiotics. *Trends Parasitol.* **2008**, *24* (6), 279–284. https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.03.007.

(114) White, N. J. Antimalarial Drug Resistance. *J. Clin. Invest.* **2004**, *113* (8), 1084–1092.

https://doi.org/10.1172/JCI200421682.

(115) Bloland, P. B.; Ettling, M.; Meek, S. Combination therapy for malaria in africa: hype or hope? *Bull. World Health Organ.* **2000**, *78* (12), 1378–1388.

(116) Jäschke, A.; Coulibaly, B.; Remarque, E. J.; Bujard, H.; Epp, C. Merozoite Surface Protein 1 from Plasmodium falciparum Is a Major Target of Opsonizing Antibodies in Individuals with Acquired Immunity against Malaria. *Clin. Vaccine Immunol.* **2017**, *24* (11), e00155-17. https://doi.org/10.1128/CVI.00155-17.

(117) Beeson, J. G.; Drew, D. R.; Boyle, M. J.; Feng, G.; Fowkes, F. J. I.; Richards, J. S. Merozoite surface proteins in red blood cell invasion, immunity and vaccines against malaria. *FEMS Microbiol. Rev.* **2016**, *40* (3), 343–372. https://doi.org/10.1093/femsre/fuw001.

(118) Doolan, D. L.; Dobaño, C.; Baird, J. K. Acquired Immunity to Malaria. *Clin. Microbiol. Rev.* **2009**, *22* (1), 13–36. https://doi.org/10.1128/CMR.00025-08.

(119) Rowe, J. A.; Claessens, A.; Corrigan, R. A.; Arman, M. Adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Expert Rev. Mol. Med.* **2009**, *11*, e16. https://doi.org/10.1017/S1462399409001082.

(120) Scherf, A.; Lopez-Rubio, J. J.; Riviere, L. Antigenic Variation in Plasmodium falciparum. *Annu. Rev. Microbiol.* **2008**, *62*, 445–470. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093134.

(121) Barfod, L.; Dalgaard, M. B.; Pleman, S. T.; Ofori, M. F.; Pleass, R. J.; Hviid, L. Evasion of immunity to Plasmodium falciparum malaria by IgM masking of protective IgG epitopes in infected erythrocyte surface-exposed PfEMP1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108* (30), 12485–12490. https://doi.org/10.1073/pnas.1103708108.

(122) Horrocks, P.; Pinches, R.; Christodoulou, Z.; Kyes, S. A.; Newbold, C. I. Variable var transition rates underlie antigenic variation in malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101* (30), 11129–11134. https://doi.org/10.1073/pnas.0402347101.

(123) Marsh, K.; Kinyanjui, S. Immune effector mechanisms in malaria. *Parasite Immunol.* **2006**, *28* (1–2), 51–60. https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2006.00808.x.

(124) Laurens, M. B.; Plowe, C. V. Malaria Vaccines. In *Encyclopedia of Sustainability Science and Technology*; Meyers, R. A., Ed.; Springer New York: New York, NY, 2020; pp 1–32. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2493-6_536-3.

(125) Kengne-Ouafo, J. A.; Sutherland, C. J.; Binka, F. N.; Awandare, G. A.; Urban, B. C.;

Dinko, B. Immune Responses to the Sexual Stages of Plasmodium falciparum *Parasites. Front. Immunol.* **2019**, *10*, 136. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00136.

(126) Laurens, M. B.; Plowe, C. V. Malaria Vaccines. In *Infectious Diseases*, 2nd ed.; Shulman, L. M., Ed.; Springer Nature: New York, NY, 2023; pp 123–154. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2463-0_536-3.

(127) Ippolito, M. M.; Moser, K. A.; Kabuya, J.-B. B.; Cunningham, C.; Juliano, J. J. Antimalarial Drug Resistance and Implications for the WHO Global Technical Strategy. *Curr. Epidemiol. Reports* **2021**, *8* (2), 46–62. https://doi.org/10.1007/s40471-021-00266-5.

(128) Amambua-Ngwa, A.; Button-Simons, K. A.; Li, X.; Kumar, S.; Brenneman, K. V.; Ferrari, M.; Checkley, L. A.; Haile, M. T.; Shoue, D. A.; McDew-White, M.; Tindall, S. M.; Reyes, A.; Delgado, E.; Dalhoff, H.; Larbalestier, J. K.; Amato, R.; Pearson, R. D.; Taylor, A. B.; Nosten, F. H.; D'Alessandro, U.; Kwiatkowski, D.; Cheeseman, I. H.; Kappe, S. H. I.; Avery, S. V.; Conway, D. J.; Vaughan, A. M.; Ferdig, M. T.; Anderson, T. J. C. Chloroquine Resistance Evolution in Plasmodium falciparum Is Mediated by the Putative Amino Acid Transporter AAT1. *Nat. Microbiol.* **2023**, *8* (7), 1213–1226. https://doi.org/10.1038/s41564-023-01377-z.

(129) Kim, J.; Tan, Y. Z.; Wicht, K. J.; Erramilli, S. K.; Dhingra, S. K.; Okombo, J.; Vendome, J.; Hagenah, L. M.; Giacometti, S. I.; Warren, A. L.; Nosol, K.; Roepe, P. D.; Potter, C. S.; Carragher, B.; Kossiakoff, A. A.; Quick, M.; Fidock, D. A.; Mancia, F. Structure and Drug Resistance of the Plasmodium falciparum Transporter PfCRT. *Nature* **2019**, *576* (7786), 315–320. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1795-x.

(130) Shafik, S. H.; Richards, S. N.; Corry, B.; Martin, R. E. Mechanistic Basis for Multidrug Resistance and Collateral Drug Sensitivity Conferred to the Malaria Parasite by Polymorphisms in PfMDR1 and PfCRT. *PLoS Biol.* **2022**, *20* (5), e3001616. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001616.

(131) Gil, J. P.; Krishna, S. pfmdr1 (Plasmodium falciparum Multidrug Resistance Gene 1): A Pivotal Factor in Malaria Resistance to Artemisinin Combination Therapies. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **2017**, *15* (6), 527–543. https://doi.org/10.1080/14787210.2017.1313703.

(132) Ariey, F.; Witkowski, B.; Amaratunga, C.; Beghain, J.; Langlois, A.-C.; Khim, N.; Kim, S.; Duru, V.; Bouchier, C.; Ma, L.; Lim, P.; Leang, R.; Duong, S.; Sreng, S.; Suon, S.; Chuor, C. M.; Bout, D. M.; Ménard, S.; Rogers, W. O.; Genton, B.; Fandeur, T.; Miotto, O.; Ringwald, P.; Le Bras, J.; Berry, A.; Barale, J.-C.; Fairhurst, R. M.; Benoit-Vical, F.; Mercereau-Puijalon, O.; Ménard, D. A molecular marker of artemisinin-resistant

Plasmodium falciparum malaria. *Nature* **2014**, *505* (7481), 50–55. https://doi.org/10.1038/nature12876.

(133) Mbengue, A.; Bhattacharjee, S.; Pandharkar, T.; Liu, H.; Estiu, G.; Stahelin, R. V.; Rizk, S. S.; Njimoh, D. L.; Ryan, Y.; Chotivanich, K.; Nguon, C.; Ghorbal, M.; Lopez-Rubio, J.-J.; Pfrender, M.; Emrich, S.; Mohandas, N.; Dondorp, A. M.; Wiest, O.; Haldar, K. A molecular mechanism of artemisinin resistance in Plasmodium falciparum malaria. *Nature* **2015**, *520* (7549), 683–687. https://doi.org/10.1038/nature14412.

(134) Birnbaum, J.; Scharf, S.; Schmidt, S.; Jonscher, E.; Hoeijmakers, W. A. M.; Flemming, S.; Toenhake, C. G.; Schmitt, M.; Sabitzki, R.; Bergmann, B.; Fröhlke, U.; Mesén-Ramírez, P.; Blancke Soares, A.; Herrmann, H.; Bártfai, R.; Spielmann, T. A Kelch13-Defined Endocytosis Pathway Mediates Artemisinin Resistance in Malaria Parasites. *Science* **2020**, *367* (6473), 51–59. https://doi.org/10.1126/science.aax4735.

(135) Rosenthal, P. J.; Asua, V.; Conrad, M. D. Emergence, transmission dynamics and mechanisms of artemisinin partial resistance in malaria parasites in Africa. *Nat. Rev. Microbiol.* **2024**, *22* (6), 373–384. https://doi.org/10.1038/s41579-024-01008-2.

(136) Alemayehu, C.; Mitchell, G.; Nikles, J. Barriers for conducting clinical trials in developing countries- a systematic review. *Int. J. Equity Health* **2018**, *17*, 37. https://doi.org/10.1186/s12939-018-0748-6.

(137) Scheppler, L.; De Clercq, N.; McGoldrick, M.; Dias, J. Regulatory Harmonization and Streamlining of Clinical Trial Applications globally should lead to faster clinical development and earlier access to life-saving vaccines. *Vaccine* **2021**, *39* (5), 790–796. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.11.077.

(138) Okello, G.; Jones, C.; Bonareri, M.; Ndegwa, S. N.; Mcharo, C.; Kengo, J.; Kinyua, K.; Dubeck, M. M.; Halliday, K. E.; Jukes, M. C. H.; Molyneux, S.; Brooker, S. J. Challenges for consent and community engagement in the conduct of cluster randomized trial among school children in low income settings: experiences from Kenya. *Trials* **2013**, *14* (1), 142. https://doi.org/10.1186/1745-6215-14-142.

(139) Mtove, G.; Kimani, J.; Kisinza, W.; Makenga, G.; Mangesho, P.; Duparc, S.; Nakalembe, M.; Phiri, K. S.; Orrico, R.; Rojo, R.; Vandenbroucke, P. Multiple-Level Stakeholder Engagement in Malaria Clinical Trials: Addressing the Challenges of Conducting Clinical Research in Resource-Limited Settings. *Trials* **2018**, *19* (1), 190. https://doi.org/10.1186/s13063-018-2563-1.

(140) Kurtovic, L.; Reiling, L.; Opi, D. H.; Beeson, J. G. Recent clinical trials inform the future for malaria vaccines. *Commun. Med.* **2021**, *1* (1), 26. https://doi.org/10.1038/s43856-

021-00030-2.

(141) Owalla, T. J.; Hergott, D. E. B.; Seilie, A. M.; Staubus, W.; Chavtur, C.; Chang, M.; Kublin, J. G.; Egwang, T. G.; Murphy, S. C. Rethinking Detection of Pre-Existing and Intervening Plasmodium Infections in Malaria Clinical Trials. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 1003452. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1003452.

(142) Bathurst, I.; Hentschel, C. Medicines for Malaria Venture: sustaining antimalarial drug development. *Trends Parasitol.* **2006**, *22* (7), 301–307. https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.05.011.

(143) Medicines for Malaria Venture (MMV). *MMV Strategy 2024–2030*; Medicines for Malaria Venture: Geneva, Switzerland, 2024. https://www.mmv.org/sites/default/files/content/document/MMV_STRATEGY%20FLYER_V12_20241002WEB.pdf (abgerufen am 06.06.2026).

(144) Medicines for Malaria Venture (MMV). *Annual Report 2023*; Medicines for Malaria Venture: Geneva, Switzerland, 2024. https://www.mmv.org/sites/default/files/content/document/AR_Report2023_ENG_20240704.pdf (abgerufen am 06.06.2026).

(145) Valenciano, A. L.; Gomez-Lorenzo, M. G.; Vega-Rodríguez, J.; Adams, J. H.; Roth, A. In vitro models for human malaria: targeting the liver stage. *Trends Parasitol.* **2022**, *38* (9), 758–774. https://doi.org/10.1016/j.pt.2022.05.014.

(146) Wells, T. N. C.; van Huijsduijnen, R. H.; Van Voorhis, W. C. Malaria Medicines: Malaria medicines: a glass half full? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2015**, *14* (6), 424–442. https://doi.org/10.1038/nrd4573.

(147) Cox, A.; Krishnankutty, N.; Shave, S.; Howick, V. M.; Auer, M.; La Clair, J. J.; Philip, N. Repositioning Brusatol as a Transmission Blocker of Malaria Parasites. *ACS Infect. Dis.* **2024**, *10* (10), 3586–3596. https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.4c00434.

(148) Poonam; Gupta, Y.; Gupta, N.; Singh, S.; Wu, L.; Chhikara, B. S.; Rawat, M.; Rathi, B. Multistage inhibitors of the malaria parasite: emerging hope for chemoprotection and malaria eradication. *Med. Res. Rev.* **2018**, *38* (5), 1511–1535. https://doi.org/10.1002/med.21486.

(149) Burrows, J. N.; Hooft Van Huijsduijnen, R.; Möhrle, J. J.; Oeuvray, C.; Wells, T. N. C. Designing the next generation of medicines for malaria control and eradication. *Malar. J.* **2013**, *12*, 187. https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-187.

(150) Burrows, J. N.; Duparc, S.; Gutteridge, W. E.; Hooft Van Huijsduijnen, R.; Kaszubska,

W.; Macintyre, F.; Mazzuri, S.; Möhrle, J. J.; Wells, T. N. C. New developments in anti-malarial target candidate and product profiles. *Malar. J.* **2017**, *16* (1), 26. https://doi.org/10.1186/s12936-016-1675-x.

(151) Gupta, G.; Himanshu; Gupta, A.; Bansal, A. A Concise Review of New Antimalarial Drugs under Clinical Development. *J. Integr. Sci. Technol.* **2026**, *14* (1), 1510. https://doi.org/10.62110/sciencein.jist.2026.v14.1510.

(152) Nath, D.; Debnath, A.; Sarma, M.; Singh, R. K.; Chetia, D. Unlocking the Antimalarial Potential of Novel Steroid-Tetraoxane Hybrids through Consensus Molecular Docking and Molecular Dynamics Investigation. *Sci. Rep.* **2025**, *15*, 30389. https://doi.org/10.1038/s41598-025-13017-z.

(153) Sarma, K.; Sarma, H.; Deka, J. Advancing Global Malaria Control: Therapeutic Strategies, Drug Discovery, and Formulation Innovations. *Infection* **2026**. https://doi.org/10.1007/s15010-026-02770-6.

(154) Novartis Pharmaceuticals. Efficacy, Safety and Tolerability of KLU156 in Adults and Children With Uncomplicated P. Falciparum Malaria. *ClinicalTrials.gov*, 2023. NCT05842954. https://clinicaltrials.gov/study/NCT05842954 (abgerufen am 2026-10-18).

(155) Bill Gates. My New Deadline: 20 Years to Give Away Virtually All My Wealth. https://www.gatesfoundation.org/ideas/articles/next-chapter (abgerufen am 06.06.2026).

(156) Bill & Melinda Gates Foundation. Gates Foundation Malaria Program Webpage. https://www.gatesfoundation.org/our-work/programs/global-health/malaria (abgerufen am 06.06.2026).

(157) Boseley, S. What Is Gene Drive and How Could It Help in the Fight against Malaria? *The Guardian*, Dec 11, 2024. https://www.theguardian.com/global-development/2024/dec/11/what-is-gene-drive-and-how-could-it-help-in-the-fight-against-malaria (abgerufen am 06.06.2026).

(158) Against Malaria Foundation. *9-Month Post-Distribution Monitoring (PDM-9): Post-Distribution Monitoring (PDM)*; Against Malaria Foundation, 2023; pp 1–2. https://www.againstmalaria.com/images/00/33/33496.pdf (abgerufen am 06.06.2026).

(159) Richardson, S. *Quantitative report on seasonal malaria chemoprevention supported by Malaria Consortium in 2020: Coverage and quality in Burkina Faso, Chad, Nigeria, and Togo*; Malaria Consortium: London, UK, 2021. https://www.malariaconsortium.org/media-library/media-

files/20210419092721041 9smccoveragereport2020final.pdf (abgerufen am 06.06.2026).

(160) Wiesner, J.; Ortmann, R.; Jomaa, H.; Schlitzer, M. Neue Antimalaria-Wirkstoffe. *Angew. Chemie* **2003**, *115* (43), 5432–5451. https://doi.org/10.1002/ange.200200569.

(161) Meshnick, S. R.; Dobson, M. J. The History of Antimalarial Drugs. In *Antimalarial Chemotherapy: Mechanisms of Action, Resistance, and New Directions in Drug Discovery*; Rosenthal, P. J., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, 2001; pp 15–24. https://doi.org/10.1007/978-1-59259-111-4.

(162) Schlagenhauf, P.; Wilson, M. E.; Petersen, E.; McCarthy, A.; Chen, L. H. Malaria Chemoprophylaxis. In *Travel Medicine*, 4th ed.; Keystone, J. S.; Kozarsky, P. E.; Connor, B. A.; Nothdurft, H. D.; Mendelson, M.; Leder, K., Eds.; Elsevier: Amsterdam, 2019; pp 145–167. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-54696-6.00015-X.

(163) Karle, J. M.; Karle, I. L. Crystal Structure of (−)-Mefloquine Hydrochloride Reveals Consistency of Configuration with Biological Activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46* (5), 1529–1534. https://doi.org/10.1128/aac.46.5.1529-1534.2002.

(164) Adamcova, M.; Schaerer, M. T.; Bercaru, I.; Cockburn, I.; Rhein, H.-G.; Schlagenhauf, P. Eye Disorders Reported with the Use of Mefloquine (Lariam®) Chemoprophylaxis- A Drug Safety Database Analysis. *Travel Med. Infect. Dis.* **2015**, *13* (5), 400–408. https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2015.04.005.

(165) Palmer, K. J.; Holliday, S. M.; Brogden, R. N. Mefloquine: A Review of Its Antimalarial Activity, Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Efficacy. *Drugs* **1993**, *45* (3), 430–475. https://doi.org/10.2165/00003495-199345030-00009.

(166) Maguire, J. D.; Krisin; Marwoto, H.; Richie, T. L.; Fryauff, D. J.; Baird, J. K. Mefloquine Is Highly Efficacious against Chloroquine-Resistant Plasmodium vivax Malaria and Plasmodium falciparum Malaria in Papua, Indonesia. *Clin. Infect. Dis.* **2006**, *42* (8), 1067–1072. https://doi.org/10.1086/501357.

(167) Nosten, F.; van Vugt, M. Neuropsychiatric Adverse Effects of Mefloquine. *CNS Drugs* **1999**, *11* (1), 1–8. https://doi.org/10.2165/00023210-199911010-00001.

(168) U.S. Food and Drug Administration. FDA Orphan Drug Designations and Approvals Database. https://www.accessdata.fda.gov/scripts/opdlisting/oopd/detailedIndex.cfm?cfgridkey=61791 (abgerufen am 06.06.2026).

(169) Croft, A. M. A A lesson learnt: the rise and fall of Lariam and Halfan. *J. R. Soc. Med.*

**2007**, *100* (4), 170–174. https://doi.org/10.1177/014107680710011411.

(170) White, N. J. Cardiotoxicity of antimalarial drugs. *Lancet Infect. Dis.* **2007**, *7* (8), 549–558. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70187-1.

(171) Bouchaud, O.; Imbert, P.; Touze, J. E.; Dodoo, A. N. O.; Danis, M.; Legros, F. Fatal cardiotoxicity related to halofantrine: a review based on a worldwide safety data base. *Malar. J.* **2009**, *8*, 289. https://doi.org/10.1186/1475-2875-8-289.

(172) Cui, L.; Su, X.-Z. Discovery, Mechanisms of Action and Combination Therapy of Artemisinin. Expert Rev. *Anti. Infect. Ther.* **2009**, *7* (8), 999–1013. https://doi.org/10.1586/eri.09.68.

(173) Yang, J.; Guo, P.; Luo, H.; Tang, X.; Liu, W.; Ren, X. Lumefantrine Ameliorates DSS-Induced Colitis by Targeting FLI-1 to Suppress NF-κB Signaling. *Front. Pharmacol.* **2025**, *16*, 1614978. https://doi.org/10.3389/fphar.2025.1614978.

(174) Makanga, M.; Krudsood, S. The Clinical Efficacy of Artemether/Lumefantrine (Coartem®). *Malar. J.* **2009**, *8* (Suppl. 1), S5. https://doi.org/10.1186/1475-2875-8-S1-S5.

(175) Premji, Z. G. Coartem®: The Journey to the Clinic. *Malar. J.* **2009**, *8* (Suppl. 1), S3. https://doi.org/10.1186/1475-2875-8-S1-S3.

(176) U.S. Food and Drug Administration. Drugs@FDA: FDA-Approved Drugs. https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=BasicSearch.process (abgerufen am 16.05.2026).

(177) Worldwide Antimalarial Resistance Network (WWARN) AL Dose Impact Study Group. The Effect of Dose on the Antimalarial Efficacy of Artemether–Lumefantrine: A Systematic Review and Pooled Analysis of Individual Patient Data. *Lancet Infect. Dis.* **2015**, *15* (6), 692–702. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)70024-1.

(178) White, N. J.; van Vugt, M.; Ezzet, F. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics and Pharmacodynamics of Artemether-Lumefantrine. *Clin. Pharmacokinet.* **1999**, *37* (2), 105–125. https://doi.org/10.2165/00003088-199937020-00002.

(179) Quiliano, M.; Mendoza, A.; Fong, K. Y.; Pabón, A.; Goldfarb, N. E.; Fabing, I.; Vettorazzi, A.; López de Cerain, A.; Dunn, B. M.; Garavito, G.; Wright, D. W.; Deharo, E.; Pérez-Silanes, S.; Aldana, I.; Galiano, S. Exploring the Scope of New Arylamino Alcohol Derivatives: Synthesis, Antimalarial Evaluation, Toxicological Studies, and Target Exploration. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **2016**, *6* (3), 184–198. https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2016.09.004.

(180) Damiani, C.; Soler, F.; Le Govic, Y.; Totet, A.; Bentzinger, G.; Bouchut, A.; Mustière, R.; Agnamey, P.; Dassonville-Klimpt, A.; Sonnet, P. Evaluation of In Vitro Inhibition of *β*-Hematin Formation: A Step Towards a Comprehensive Understanding of the Mechanism of Action of New Arylamino Alcohols. *Microorganisms* **2024**, *12* (12). https://doi.org/10.3390/microorganisms12122524.

(181) Khankischpur, M.; Walter, R. D.; Kurz, T. Synthesis and Antiplasmodial Activity of 4-Alkylidene(Arylidene)Hydrazono-1,3-Oxazinan-2-Ones and 3-Hydroxy-N'-Alkylidene(Arylidene)Propanehydrazonamides. *Aust. J. Chem.* **2010**, *63* (10), 1430–1436. https://doi.org/10.1071/CH10052.

(182) Leven, M.; Held, J.; Duffy, S.; Tschan, S.; Sax, S.; Kamber, J.; Frank, W.; Kuna, K.; Geffken, D.; Siethoff, C.; Barth, S.; Avery, V. M.; Wittlin, S.; Mordmüller, B.; Kurz, T. Blood Schizontocidal and Gametocytocidal Activity of 3-Hydroxy-N′Arylidenepropanehydrazonamides: A New Class of Antiplasmodial Compounds. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (19), 7971–7976. https://doi.org/10.1021/jm500811p.

(183) Leven, M.; Knaab, T. C.; Held, J.; Duffy, S.; Meister, S.; Fischli, C.; Meitzner, D.; Lehmann, U.; Lungerich, B.; Kuna, K.; Stahlke, P.; Delves, M. J.; Buchholz, M.; Winzeler, E. A.; Avery, V. M.; Mordmüller, B.; Wittlin, S.; Kurz, T. 3-Hydroxy-N′-arylidenepropanehydrazonamides with Halo-Substituted Phenanthrene Scaffolds Cure P. berghei Infected Mice When Administered Perorally. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (14), 6036–6044. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00140.

(184) Knaab, T. C.; Held, J.; Burckhardt, B. B.; Rubiano, K.; Okombo, J.; Yeo, T.; Mok, S.; Uhlemann, A. C.; Lungerich, B.; Fischli, C.; Pessanha De Carvalho, L.; Mordmüller, B.; Wittlin, S.; Fidock, D. A.; Kurz, T. 3-Hydroxy-Propanamidines, a New Class of Orally Active Antimalarials Targeting Plasmodium Falciparum. *J. Med. Chem.* **2021**, *64* (6), 3035–3047. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01744.

(185) Knaab, T. C.; Moritz, A.; Pessanha de Carvalho, L.; Klein, S.; Lungerich, B.; Lohse, K.; Kruse, L.; Mombo-Ngoma, G.; Orta, L.; Thibaud, J. L.; de Villiers, K. A.; Fidock, D. A.; Burckhardt, B. B.; Held, J.; Wittlin, S.; Kurz, T. TKK130 Is a 3-Hydroxy-Propanamidine (HPA) with Potent Antimalarial In Vivo Activity and a High Barrier to Resistance. *J. Med. Chem.* **2025**, *68* (1), 95–107. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.4c01465.

(186) de Villiers, K. A.; Marques, H. M.; Egan, T. J. The Crystal Structure of Halofantrine-Ferriprotoporphyrin IX and the Mechanism of Action of Arylmethanol Antimalarials. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102* (8), 1660–1667. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2008.04.001.

(187) Noelting, E.; Trautmann, E. Ueber Einige Derivate Der Toluchinoline Und Des

Metaxylochinolins. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1890**, *23*, 3654–3683. https://doi.org/10.1002/cber.189002302350.

(188) Joule, J. A.; Mills, K. *Heterocyclic Chemistry*, 5th ed.; Wiley-Blackwell: Chichester, U.K., 2010.

(189) Manske, R. H. F.; Kulka, M. The Skraup Synthesis of Quinolines. In *Organic Reactions*; 2011; pp 59–98. https://doi.org/10.1002/0471264180.or007.02.

(190) Palucki, M.; Hughes, D. L.; Yasuda, N.; Yang, C.; Reider, P. J. A Highly Efficient Synthesis of 2-[3-Aminopropyl]-5,6,7,8-Tetrahydronaphthyridine via a Double Suzuki Reaction and a Chichibabin Cyclization. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42* (39), 6811–6814. https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)01424-1.

(191) Palmer, M. H. 710. The Skraup Reaction. Formation of 5- and 7-Substituted Quinolines. *J. Chem. Soc.* **1962**, 3645-3652. https://doi.org/10.1039/jr9620003645.

(192) Yamashkin, S. A.; Oreshkina, E. A. Traditional and modern approaches to the synthesis of quinoline systems by the Skraup and Doebner-Miller methods. (Review). *Chem. Heterocycl. Compd.* **2006**, *42* (6), 701–718. https://doi.org/10.1007/s10593-006-0150-y.

(193) Bao, H.; Zhou, B.; Jin, H.; Liu, Y. Copper-catalyzed three-component reaction of *N*-heteroaryl aldehydes, nitriles, and water. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17* (20), 5021–5028. https://doi.org/10.1039/c9ob00599d.

(194) Knaab, T. C. *Synthese und antiplasmodiale Evaluation neuer Arylaminoalkohol Analoga*; Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf, 2018.

(195) Xu, Y.; Yu, C.; Zhang, X.; Fan, X. Selective Synthesis of Dihydrophenanthridine and Phenanthridine Derivatives from the Cascade Reactions of *o*-Arylanilines with Alkynoates through C-H/N-H/C-C Bond Cleavage. *J. Org. Chem.* **2021**, *86* (8), 5805-5819. https://doi.org/10.1021/acs.joc.1c00256.

(196) Shi, G.; Chen, D.; Jiang, H.; Zhang, Y.; Zhang, Y. Synthesis of Fluorenes Starting from 2-Iodobiphenyls and CH 2 Br 2 through Palladium-Catalyzed Dual C–C Bond Formation. *Org. Lett.* **2016**, *18* (12), 2958–2961. https://doi.org/10.1021/acs.orglett.6b01300.

(197) Mo, C.; Zhang, Z.; Guise, C. P.; Li, X.; Luo, J.; Tu, Z.; Xu, Y.; Patterson, A. V; Smaill, J. B.; Ren, X.; Lu, X.; Ding, K. 2-Aminopyrimidine Derivatives as New Selective Fibroblast Growth Factor Receptor 4 (FGFR4) Inhibitors. *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, *8* (5), 543–548. https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.7b00091.

(198) Lu, R.; Cao, L.; Guan, H.; Liu, L. Iron-Catalyzed Aerobic Dehydrogenative Kinetic

Resolution of Cyclic Secondary Amines. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141* (15), 6318–6324. https://doi.org/10.1021/jacs.9b00615.

(199) Harnish, D. C.; Chadwick, C. C. Methods of Treating Atherosclerosis Using NF-κB Inhibitors. WO 2005/039582, 2005.

(200) Fan, Y.-C.; Du, G.-F.; Sun, W.-F.; Kang, W.; He, L. N-Heterocyclic carbene-catalyzed cyanomethylation of aldehydes with TMSAN. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53* (17), 2231–2233. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2012.02.080.

(201) Klein, S.; Moritz, A.; Pessanha de Carvalho, L.; Knaab, T. C.; Lungerich, B.; Meyer, L.; Sandström, J.; Thibaud, J. L.; de Villiers, K. A.; Fidock, D. A.; Wittlin, S.; Rottmann, M.; Held, J.; Burckhardt, B. B.; Kurz, T. Structure–Activity Relationships of 3-Hydroxypropanamidines (HPAs) with Potent In Vivo Antimalarial Activity. *J. Med. Chem.* **2025**, *68* (18), 19229–19248. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5c01337.

(202) Liu, D.; Zhang, W. Some Progress in Organic Synthesis of Pharmaceuticals in China. In *Pharmaceutical Process Chemistry*; Shioiri, T., Izawa, K., Konoike, T., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2010; pp 273–302. https://doi.org/10.1002/9783527633678.ch14.

(203) Beutler, U.; Fuenfschilling, P. C.; Steinkemper, A. An Improved Manufacturing Process for the Antimalaria Drug Coartem. Part II. *Org. Process Res. Dev.* **2007**, *11* (3), 341–345. https://doi.org/10.1021/op060244p.

(204) Sandmeyer, T. Ueber die Ersetzung der Amidgruppe durch Chlor in den aromatischen Substanzen. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1884**, *17* (2), 1633–1635. https://doi.org/10.1002/cber.18840170219.

(205) Guilbault, A.-A.; Basdevant, B.; Wanie, V.; Legault, C. Y. Catalytic Enantioselective α-Tosyloxylation of Ketones Using Iodoaryloxazoline Catalysts: Insights on the Stereoinduction Process. *J. Org. Chem.* **2012**, *77* (24), 11283–11295. https://doi.org/10.1021/jo302393u.

(206) Degli Innocenti, M.; Schreiner, T.; Breinbauer, R. Recent Advances in Pd-Catalyzed Suzuki-Miyaura Cross-Coupling Reactions with Triflates or Nonaflates. *Adv. Synth. Catal.* **2023**, *365* (23), 4086–4120. https://doi.org/10.1002/adsc.202301124.

(207) Dutta, S.; Bhattacharya, T.; Geffers, F. J.; Bürger, M.; Maiti, D.; Werz, D. B. Pd-catalysed C–H functionalisation of free carboxylic acids. *Chem. Sci.* **2022**, *13* (9), 2551–2573. https://doi.org/10.1039/D1SC05392B.

(208) Muthuppalaniappan, M.; Bhavar, P. K.; Viswanadha, S.; Vakkalanka, S. K. V. S.;

Merikapudi, G. S. Novel Immunomodulator and Anti-Inflammatory Compounds. US 20110275603 A1, 2011.

(209) Çetinkaya, Y.; Artunç, T.; Menzek, A. AlCl3-Catalyzed Cascade Reactions of 1,2,3-Trimethoxybenzene and Adipoyl Chloride: Spectroscopic Investigations and Density Functional Theory Studies. *ACS Omega* **2022**, *7* (43), 38882–38893. https://doi.org/10.1021/acsomega.2c04612.

(210) Hicks, L. D.; Han, J. K.; Fry, A. J. Hypophosphorous acid–iodine: a novel reducing system. Part 1: Reduction of diaryl ketones to diaryl methylene derivatives. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41* (41), 7817–7820. https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)01359-9.

(211) Yang, L.; Gridnev, I. D.; Terada, M.; Jin, T. Intermolecular Oxidative Friedel-Crafts Reaction Triggered Ring Expansion Affording 9,10-Diarylphenanthrenes. *Org. Lett.* **2020**, *22* (22), 8920–8924. https://doi.org/10.1021/acs.orglett.0c03283.

(212) Nicolaou, K. C.; Montagnon, T.; Baran, P. S.; Zhong, Y.-L. Iodine(V) Reagents in Organic Synthesis. Part 4. *o*-Iodoxybenzoic Acid as a Chemospecific Tool for Single Electron Transfer-Based Oxidation Processes. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (10), 2245–2258. https://doi.org/10.1021/ja012127+.

(213) Torii, S.; Tanaka, H.; Inokuchi, T.; Nakane, S.; Akada, M.; Saito, N.; Sirakawa, T. Indirect electrooxidation (an ex-cell method) of alkylbenzenes by recycle use of diammonium hexanitratocerate in various solvent systems. *J. Org. Chem.* **1982**, *47* (9), 1647–1652. https://doi.org/10.1021/jo00348a007.

(214) Amaya, T.; Fujimoto, H. Iron(III) Nitrate-Induced Aerobic and Catalytic Oxidative Cleavage of Olefins. *Tetrahedron Lett.* **2018**, *59* (27), 2657–2660. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2018.05.070.

(215) Shinkai, H.; Ito, T.; Iida, T.; Kitao, Y.; Yamada, H.; Uchida, I. 4-Aminoquinolines: Novel Nociceptin Antagonists with Analgesic Activity. *J. Med. Chem.* **2000**, *43* (24), 4667–4677. https://doi.org/10.1021/jm0002073.

(216) AFRAXIS, Inc.; Campbell, D.; Duron, S. G. 8-Ethyl-6-(Aryl)Pyrido[2,3-*d*]Pyrimidin-7(8H)-Ones for the Treatment of Nervous System Disorders and Cancer. WO 2013043232, 2013.

(217) Gontcharov, A. V.; Khafizova, G.; Potoski, J. R.; Yu, Q.; Shaw, C.-C.; Stack, G. P.; Zhou, D. Asymmetric Synthesis of Substituted Dihydrobenzofurans. WO 2006047228 A1, 2006.

(218) Murray, P. R. D.; Bussink, W. M. M.; Davies, G. H. M.; van der Mei, F. W.; Antropow, A.

H.; Edwards, J. T.; D'Agostino, L. A.; Ellis, J. M.; Hamann, L. G.; Romanov-Michailidis, F.; Knowles, R. R. Intermolecular Crossed [2 + 2] Cycloaddition Promoted by Visible-Light Triplet Photosensitization: Expedient Access to Polysubstituted 2-Oxaspiro[3.3]heptanes. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143* (10), 4055–4063. https://doi.org/10.1021/jacs.1c01173.

(219) Richardson, K.; Gymer, G. E. 3-Aryl-3-Hydroxy-4-(1H-1,2,4-Triazol-1-Yl)Butyramide and Derivatives as Antifungal Agents. US 5047548, 1991.

(220) Zheng, X. Y.; Xia, Y.; Gao, F. H.; Chen, C. Synthesis of 7351, a New Antimalarial Drug (Author's Transl.). *Yao Xue Xue Bao* **1979**, *14* (12), 736–737.

(221) Li, J.; Zhao, N.; Xu, J. Method for Preparing Pyronaridine. WO 2013/159427 A1, 2013.

(222) Lee, D. W.; Lee, S. K.; Cho, J. H.; Yoon, S. S. Improved Manufacturing Process for Pyronaridine Tetraphosphate. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2014**, *35* (2), 521–524. https://doi.org/10.5012/bkcs.2014.35.2.521.

(223) Kincaid, J. R. A.; Kavthe, R. D.; Caravez, J. C.; Takale, B. S.; Thakore, R. R.; Lipshutz, B. H. Environmentally Responsible and Cost-Effective Synthesis of the Antimalarial Drug Pyronaridine. *Org. Lett.* **2022**, *24* (18), 3342–3346. https://doi.org/10.1021/acs.orglett.2c00944.

(224) Lipshutz, B. H.; Ghorai, S.; Abela, A. R.; Moser, R.; Nishikata, T.; Duplais, C.; Krasovskiy, A.; Gaston, R. D.; Gadwood, R. C. TPGS-750-M: A Second-Generation Amphiphile for Metal-Catalyzed Cross-Couplings in Water at Room Temperature. *J. Org. Chem.* **2011**, *76* (11), 4379–4391. https://doi.org/10.1021/jo101974u.

(225) Bassetto, M.; Zaluski, J.; Li, B.; Zhang, J.; Badiee, M.; Kiser, P. D.; Tochtrop, G. P. Tuning the Metabolic Stability of Visual Cycle Modulators through Modification of an RPE65 Recognition Motif. *J. Med. Chem.* **2023**, *66* (12), 8140–8158. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.3c00461.

(226) Goto, A.; Endo, K.; Ukai, Y.; Irle, S.; Saito, S. RhI-Catalyzed Aldol-Type Reaction of Organonitriles under Mild Conditions. *Chem. Commun.* **2008**, *44* (19), 2212–2214. https://doi.org/10.1039/b800634b.

(227) Tan, H.; Khan, R.; Xu, D.; Zhou, Y.; Zhang, X.; Shi, G.; Fan, B. Cobalt-Catalyzed Ring-Opening Addition of Azabenzonorbornadienes via C(Sp 3 )–H Bond Activation of 8-Methylquinoline. *Chem. Commun.* **2020**, *56* (83), 12570–12573. https://doi.org/10.1039/D0CC05374K.

(228) Peng, J.; Ye, M.; Zong, C.; Hu, F.; Feng, L.; Wang, X.; Wang, Y.; Chen, C. Copper-

Catalyzed Intramolecular C−N Bond Formation: A Straightforward Synthesis of Benzimidazole Derivatives in Water. *J. Org. Chem.* **2011**, *76* (2), 716–719. https://doi.org/10.1021/jo1021426.

(229) Bristol-Myers Squibb Co.; Pinto, D. J.; Qiao, J. X.; Gangor, T.; Lam, P. Y. S.; Li, Y.-L. Sulfonyl-Amidino Containing and Tetrahydropyrimidino Containing Compounds as Factor Xa Inhibitors. WO 2004/083174 A2, 2004.