

Entwicklung von 17β -HSD2-Inhibitoren mit und ohne Strukturelement für das Knochen-Targeting

Dissertation

Zur Erlangung des Grades des Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

vorgelegt von

Ahmed Merabet, M. Sc.

aus Batna (Algerien)

Saarbrücken 2022

Tag des Kolloquiums: 16. März 2023
Dekan: Prof. Dr. Ludger Santen
Berichterstatter: Prof. Dr. Rolf W. Hartmann
Prof. Dr. Anna K. H. Hirsch
Akad. Mitarbeiter: Dr. Oliver Andler
Vorsitz: Prof. Dr.-Ing. Markus Gallei

Die vorliegende Arbeit wurde von Dezember 2016 bis Oktober 2018 an der Philipps-Universität Marburg ferner bis Dezember 2020 unter Anleitung von Prof. Dr. Rolf W. Hartmann in der Fachrichtung Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der Universität des Saarlandes sowie am Helmholtz-Institut für Pharmazeutische Forschung Saarland (HIPS) in der Abteilung Drug Design and Optimization (DDOP) angefertigt.

Für meine Familie

*„With courage you will dare to take risks, have the strength to be compassionate, and the wisdom to be humble.
Courage is the foundation of integrity“ — Mark Twain*

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem Verfahren zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

Frankfurt am Main, den

Unterschrift

Ahmed Merabet

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Rolf W. Hartmann danke ich für die ausgezeichnete Unterstützung und Förderung während meiner Promotion, sowie die Möglichkeit mich im Rahmen der Kooperationsprojekte mit Wissenschaftlern anderer Fakultäten fachlich auseinanderzusetzen und weiterzuentwickeln, als auch die Übernahme des Erstgutachtens. Die wissenschaftliche Freiheit mich verschiedenen synthetischen Fragestellungen stellen zu dürfen, hat mich in meiner persönlichen wie auch wissenschaftlichen Entwicklung gefördert und geprägt.

Ich möchte mich bei Frau Prof. Dr. Anna K. H. Hirsch für die exzellente wissenschaftliche Begleitung und die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Dr. Andreas Kany danke ich für den Beisitz als akademischer Mitarbeiter in der Prüfungskommission.

Prof Dr. Gerhard Klebe danke ich für die Möglichkeit, die erste Zeit meiner Promotion in seinem Arbeitskreis an der Philipps-Universität Marburg forschen zu dürfen und mich interdisziplinär weiterzuentwickeln.

Dr. Sandrine Marchais Oberwinkler danke ich für die wundervolle Unterstützung während meiner Promotion. Vielen Dank für die unzähligen wissenschaftlichen Diskussionen.

Bei Chris J. van Koppen möchte ich mich für die gemeinsame Zeit am Projekt, für die Durchführung vieler *in vivo* Experimente und die fachlichen Diskussionen bedanken.

Ich möchte mich bei meinen Vertiefern in Person von Niklas Klangwart, Olaf Kleykamp und Dennis Wiens für die unzähligen Reaktionsansätze bedanken.

Ich möchte mich bei meinen Kollaborationspartnern von der TU Dresden in Person von Prof. Dr. Günter Vollmer, Prof. Dr. Oliver Zierau und Dr. Sebastian Müller bedanken. Vielen Dank für die äußerst engagierte Zusammenarbeit, für die Durchführung der Tierversuche und in diesem Zusammenhang bereitgestellten vielen Plasmaproben.

Ich möchte mich bei den aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des AK Klebe für die wunderschöne Zeit bedanken. Hervorgehoben sind Dr. Florian Braun, Dr. Khang Ngo und Dr. Sandrine Marchais Oberwinkler mit denen ich mir ein Büro und ein Labor teilen durfte. Dr. Mohammed Jud Badran und Dr. Alexander Metz danke ich ebenfalls für die wissenschaftlichen Ausflüge in andere Themengebiete.

II

Ich möchte mich bei den aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des AK Hartmann und AK Hirsch am Helmholtz-Institut für Pharmazeutische Forschung Saarland (HIPS) in der Abteilung Drug Design and Optimization (DDOP) und Chemical Biology of Carbohydrates (CBCH) bedanken. Wir hatten nur eine etwas kürzere Zeit miteinander aber ihr habt mich schnell integriert, was mir den Einstieg sehr erleichtert hat. Vielen Dank an Dr. Jörg Hauptenthal und Dr. Walid A. M. Elgaher, das ich in eurem PostDoc Büro einen Platz finden durfte. Uladzislau Hapko danke ich für die gemeinsame Zeit im Labor und die vielen wissenschaftlichen Diskussionen.

Einen großen Dank gilt Dr. Ahmed Saad Abdelsamie für die Bereitstellung der Synthesesequenz zum *Precursor*. Sie war die Grundlage für viele Optimierungen und hat einen großen Anteil an der Fertigstellung des Zielmoleküls. Zudem möchte ich mich herzlich bei allen Wissenschaftler/innen in Person von Dr. Ahmed Saad Abdelsamie, Dr. Mohamed Salah, Dr. Lorenz Siebenbürger, Dr. Claudia Scheuer, PD Dr. Martin Frotscher, Dr. Sebastian Müller, Prof. Dr. Oliver Zierau, Prof. Dr. Günter Vollmer, Prof. Dr. Michael Menger, Prof. Dr. Matthias Laschke, Dr. van Koppen, Dr. Sandrine Marchais Oberwinkler und Prof. Dr. Rolf Hartmann bedanken, die unermüdlich an diesem sehr facettenreichen und spannenden Thema geforscht haben. Zudem bedanke ich mich für die Bereitstellung der *in vivo* Daten zu den 17β -HSD2 Inhibitoren.

Ich möchte mich herzlich bei Dr. Teresa Röhrig bedanken, die ersten Phosphonsäuren gemessen zu haben. Zusätzlich möchte ich einen großen Dank an Jeannine Jung, Simone Amann und Tabea Wittmann für die vielzähligen Analysen aussprechen!

Ich möchte mich bei Dr. Lukas Junk und Michael Kohr, zwei sehr hilfsbereiten Wissenschaftlern aus dem AK KAZMEIER, für die Bereitstellung und Durchführung von Hydrierungen im Reaktionsautoklaven bedanken.

Ein großer Dank gilt der 5. Etage der Maternistraße. Vielen Dank für die schönen Ablenkungen neben der Arbeit und Finalisierung dieser Doktorarbeit.

Bei Daniel Andrew Hines, Nick Kwidzinski und Konstantin Dern möchte ich mich für die Freundschaft bedanken. Egal wie wir verstreut sind, auf euch kann ich immer zählen!!

Ich möchte mich bei meiner Familie für die bedingungslose Unterstützung während der Hochschul- ausbildung und Promotion bedanken.

Der letzte und wichtigste Dank gilt meiner wundervollen Ehefrau Lea. Ich bedanke mich dafür, dass du eine wahre Stütze bist. Vielen Dank für deine Geduld und Muße die du mit mir hast. Vielen Dank für all die schönen Momente, die du mir geschenkt hast, aber auch für deine Unterstützung, wenn

ich sie gebraucht habe. Vielen Dank für deine Liebe, die du mir entgegenbringst, denn sie ist nicht selbstverständlich. Ich bin einfach unfassbar stolz, Vater zu sein und unser kleines Würmchen im Arm halten zu dürfen.

Abstract

Osteoporosis is a systemic disease of the skeletal apparatus and manifests itself in a degeneration of the bone density and regression in the microarchitecture of the bone tissue. The bone structure is a dynamic tissue that is subject to a permanent remodeling mechanism. Two predominant processes are considered, which can be traced back to two cell types: bone loss by osteoclasts and bone formation by osteoblasts. Since 17β -hydroxysteroid dehydrogenase 2 (17β -HSD2) is expressed in the osteoclasts, which are responsible for bone loss, the inhibition of this enzyme offers an interesting starting point in osteoporosis therapy. Bone loss due to osteoclasts should be inhibited and bone formation stimulated.

This work describes the design and synthesis of a 17β -HSD2 inhibitor, which was successfully evaluated in an *in vivo* experiment. With the help of an animal model, the formation of bone structure was visualized and attested with a μ CT. This 17β -HSD2 inhibitor was then successfully converted into a *Drug* and refunctionalized with a bisphosphonic acid for *bone targeting* in order to bind to the bone tissue and release the active ingredient locally on the bone material. In a further pharmacokinetic study, the obtained *Drug* could be declared as bioavailable because it was metabolized to the 17β -HSD2 inhibitor.

In another project, three nonsteroidal, potentially selective 17β -hydroxysteroid dehydrogenase 14 (17β -HSD14) inhibitors were successfully synthesized in a multistep synthesis. The pharmacological examination and evaluation is currently still pending.

Kurzfassung

Osteoporose ist eine systemische Erkrankung des skelettalen Apparates und äußert sich in einer Degression der Knochendichte und in der Mikroarchitektur des Knochengewebes. Die Knochenstruktur stellt ein dynamischen Gewebe dar, das einem permanenten Umbaumechanismus unterzogen ist. Dabei werden zwei überwiegende Prozesse betrachtet, die auf zwei Zelltypen zurückzuführen sind: Knochenabbau durch Osteoklasten und Knochenbildung durch Osteoblasten. Da 17β -Hydroxysteroid Dehydrogenase 2 (17β -HSD2) in den Osteoklasten exprimiert wird, die für den Knochenabbau verantwortlich sind, bietet die Inhibierung dieses Enzyms einen interessanten Ansatzpunkt in der Osteoporose Therapie. Dabei soll der Knochenabbau durch die Osteoklasten gehemmt und der Knochenaufbau stimuliert werden.

Diese Arbeit beschreibt das Design und die Synthese von einem 17β -HSD2 Inhibitor, der in einem *in vivo* Experiment erfolgreich evaluiert wurde. Mit Hilfe eines Tiermodells wurde der Knochenaufbau mit einem μ CT visualisiert und nachgewiesen. Dieser 17β -HSD2 Inhibitor wurde im Anschluss erfolgreich umgewandelt und für das *Bone targeting* mit einer Bisphosphonsäure umfunktionalisiert, um am Knochengewebe zu binden und den Wirkstoff lokal am Knochenmaterial freizusetzen. In einer weiteren pharmakokinetischen Studie konnte das erhaltene *Drug* als bioverfügbar deklariert werden, da es zum 17β -HSD2 Inhibitor verstoffwechselt wurde.

In einem weiteren Projekt konnten erfolgreich drei nichtsteroidale potentiell selektive 17β -Hydroxysteroid Dehydrogenase 14 (17β -HSD14) Inhibitoren in einer mehrstufigen Synthese hergestellt werden. Die pharmakologische Untersuchung und Betrachtung steht aktuell noch aus.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------------|--|
| 6PG | 6-Phosphogluconat |
| 6PGDH | 6-Phosphogluconat Dehydrogenase |
| A | Akzeptor |
| Å | Ångström |
| Abb. | Abbildung |
| Ac | Acetyl |
| AFF | Atypische Fermurfraktur |
| AKR | Aldo Keto Reductase |
| Alox | Aluminiumoxid |
| Ar. | Aromatisch |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| 17 β -HSD1-14 | 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase 1-14 |
| h17 β -HSD1-2 | 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase 1-2 (Human) |
| m17 β -HSD1-2 | 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase 1-2 (Maus) |
| r17 β -HSD1-2 | 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase 1-2 (Ratte) |
| BMU | Bone remodeling Unit |
| Bn | Benzyl |
| Boc | <i>tert</i> -butyloxycarbonyl |
| Boc ₂ O | Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat |
| br | Breit |
| brsm | Based on recovered starting material |
| bzw. | Beziehungsweise |
| c | Konzentration |
| calc. | Calculated |
| Cbz | Carboxybenzyl |
| CEE | Conjugated equine estrogens |
| CDI | 1,1'-Carbonyldiimidazol |
| CHD | 1,4-Cyclohexadien |
| cLogP | Hydrophiler Verteilungskoeffizient |
| cLogD | Hydrophiler Verteilungskoeffizient |
| COSY | Correlated spectroscopy |
| Cpd | Compound |
| Cy | Cyclohexyl |

| | |
|---------------------|--|
| CYP | Cytochrom P450 |
| δ | Delta, Chemische Verschiebung |
| d | Dublett, day/s |
| dd | Dublett vom Dublett |
| ddd | Dublett vom Dublett vom Dublett |
| dt | Dublett vom Triplett |
| DC | Dünnschichtchromatographie |
| DCC | Dicyclohexylcarbodiimid |
| DCM | Dichlormethan |
| DEA | Diethylamin |
| DEE | Diethylether |
| DFP | Difluorphenol |
| DHEA | Dehydroepiandrosteron |
| DHT | Dihydrotestosteron |
| DME | Dimethylether |
| DMF | Dimethylformamid |
| DMAE | <i>N,N</i> -Dimethylethanolamin |
| DMAP | 4-(Dimethylamino)-pyridin |
| DMSO-d ₆ | Dimethylsulfoxid, deuteriert |
| DNS | Desoxyribonukleinsäure |
| dppf | 1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocen |
| E ₁ | Estron |
| E ₂ | Estradiol |
| EI | Electron impact ionization |
| ESI | Electrospray ionization |
| Et | Ethyl |
| EtOH | Ethanol |
| eq | Equivalent |
| ER α | Estrogen Rezeptor α |
| ER β | Estrogen Rezeptor β |
| et al. | Et alii, et aliae, et alia (<i>Lat.</i> : und andere) |
| EtOAc | Ethylacetat |
| eV | Electronvolt |
| evt. | Eventuell |

VIII

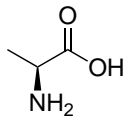
| | |
|--------------------|--|
| FTIR-Spektroskopie | Fourier Transform Infrarot Spektroskopie |
| g | Gramm |
| G6P | Glukose-6-Phosphat |
| G6PDH | Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase |
| GC-MS | Gas chromatography mass spectrometry |
| ges. | Gesättigt |
| ggf. | Gegebenenfalls |
| °C | Grad Celsius |
| h | hour/s |
| HA | Wasserstoffakzeptor |
| HD | Wasserstoffdonator |
| HMBC | Heteronuclear multiple bond correlation |
| HPLC | High performance liquid chromatography |
| HRMS | High resolution mass spectroscopy |
| <i>hS9</i> | Humane S9 Fraktion |
| HSD | Hydroxysteroid Dehydrogenasen |
| HSQC | Heteronuclear single quantum coherence |
| IC ₅₀ | mittlere inhibitorische Konzentration |
| <i>iPr</i> | Isopropyl |
| IR | Infrarotspektroskopie |
| i.v. | Intravenös |
| <i>J</i> | Kopplungskonstante |
| K | Kelvin |
| KOAc | Kaliumacetat |
| L | Liter |
| λ | Lambda, Wellenlänge, |
| LC | Liquid chromatography |
| LC-MS | Liquid chromatography-mass spectrometry |
| LC-MS/MS | Liquid chromatography-tandem mass spectrometry |
| LD ₅₀ | Mittlere letale Dosis |
| M | Molare Masse |
| m | Medium, Meter, mittel, Multiplett |
| M | Molar |
| Me | Methyl |

| | |
|----------------|---|
| MeOH | Methanol |
| MHz | Megahertz |
| min. | Minute/s |
| μM | Mikromolar |
| μCT | Mikro Computertomographie |
| m.p. | Melting point |
| <i>mS9</i> | Maus S9 Fraktion |
| m/z | Masse/Ladung Verhältnis |
| n | Nano |
| NAD(H) | Nicotinamidadenindinukleotid(H) |
| NADP(H) | Nicotinamidadenindinukleotidphosphat(H) |
| <i>n</i> -BuLi | <i>n</i> -Butyllithium |
| NBS | <i>N</i> -Bromsuccinimid |
| NMR | Nuclear magnetic resonance spectroscopy |
| ν | Nü, wellenzahl |
| ONJ | osteonecrosis of the jaw |
| OPG | Osteoprotegerin |
| ovx | Ovariectomiziert |
| PAPS | 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat |
| PEG400 | Polyethylenglykol 400 |
| Ph | Phenyl |
| P.o. | Peroral |
| ppm | Parts per million |
| <i>prim.</i> | Primär |
| q | Quartett |
| quant. | Quantitativ |
| quin | Quintett |
| RANKL | Receptor Activator of Nuclear Factor- κB Ligand |
| ρ | Rho, Dichte |
| rt | Room temperature |
| s | Singulett, stark |
| SAR | Structure activity relationship |
| S.c. | Subkutan |
| SDR | Short chain Dehydrogenase/Reductase |

X

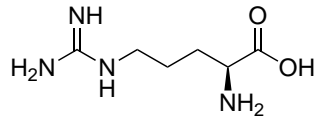
| | |
|---------------|--|
| sec. | Second/s |
| , <i>sek.</i> | Sekundär |
| SERM | Selektiver estrogen rezeptor Modulator |
| sext | Sextett |
| sept | Septett |
| s.f. | Selektivitätsfaktor |
| T | Temperatur, Testosteron |
| t | Triplett, Zeit |
| $t_{1/2}$ | Halbwertszeit |
| <i>t</i> Bu | <i>tert</i> -butyl |
| <i>tert.</i> | Tertiär |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| THF | Tetrahydrofuran |
| TLC | Thin layer chromatography |
| TMS | Trimethylsilyl |
| TMSBr | Trimethylsilylbromid |
| TMS-DAM | Trimethylsilyldiazomethan |
| TMSI | Trimethylsilyliodid |
| u | atomic mass unit |
| UDPGA | Uridin-5'-diphosphoglucuronsäure |
| w | weak |
| wt% | Gewichtsprozent |

Übersicht über die proteinogenen α -Aminosäuren mit Ein- und Dreibuchstabencode



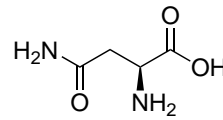
Alanin

Ala, A



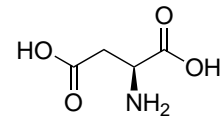
Arginin

Arg, R



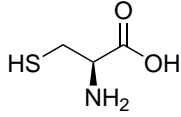
Asparagin

Asn, N



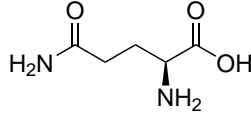
Asparaginsäure

Asp, D



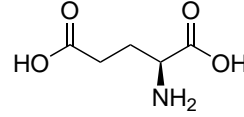
Cystein

Cys, C



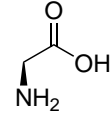
Glutamin

Gln, Q



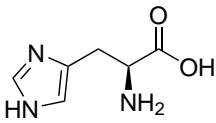
Glutaminsäure

Glu, E



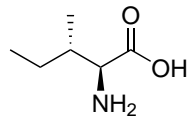
Glycin

Gly, G



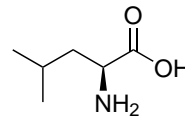
Histidin

His, H



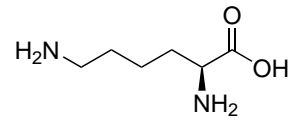
Isoleucin

Ile, I



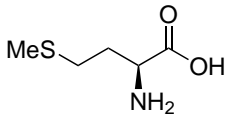
Leucin

Leu, L



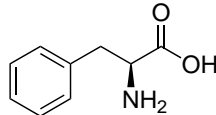
Lysin

Lys, K



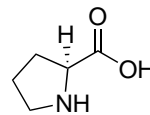
Methionin

Met, M



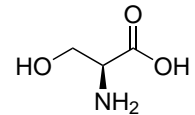
Phenylalanin

Phe, F



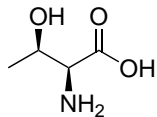
Prolin

Pro, P



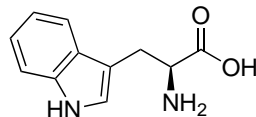
Serin

Ser, S



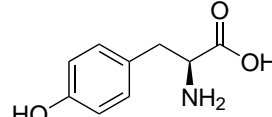
Threonin

Thr, T



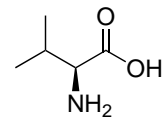
Tryptophan

Trp, W



Tyrosin

Tyr, Y



Valin

Val, V

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|------------|
| 1 | Vorwort | 1 |
| 2 | Einleitung | 2 |
| 2.1 | Sexualhormone | 2 |
| 2.2 | Hydroxysteroid Dehydrogenasen (HSDs) | 2 |
| 2.2.1 | 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenasen (17 β -HSDs) | 4 |
| 2.2.2 | Katalysemechanismus | 7 |
| 2.2.3 | 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase 2 (17 β -HSD2) | 7 |
| 2.2.4 | 17 β -HSD2 als Osteoporosetarget | 13 |
| 2.3 | Therapie in der Osteoporose | 15 |
| 3 | Ziel der Arbeit | 19 |
| 4 | Ergebnisse und Diskussion | 21 |
| 4.1 | Synthetische Darstellung von nichtsteroidalen selektiven 17 β -HSD14 Inhibitoren . . . | 21 |
| 4.2 | Synthetische Darstellung von nichtsteroidalen selektiven 17 β -HSD2 Inhibitoren . . . | 25 |
| 4.3 | Pharmakokinetische Evaluierung der 17 β -HSD2 Inhibitoren | 27 |
| 4.4 | Synthetische Darstellung eines <i>Drugs</i> | 32 |
| 4.5 | Pharmakologische Untersuchung | 51 |
| 5 | Zusammenfassung | 52 |
| 6 | Experimenteller Teil | 55 |
| 6.1 | Vorbemerkung zum experimentellen Teil | 55 |
| 6.1.1 | Materialien und Methoden | 55 |
| 6.1.2 | Chromatographie | 56 |
| 6.1.3 | Physikalische Daten | 57 |
| 6.1.4 | Physikochemische Daten | 59 |
| 6.1.5 | Sprache | 59 |
| 6.2 | Versuchsbeschreibung zur synthetischen Darstellung von nichtsteroidalen selektiven 17 β -HSD14 Inhibitoren | 60 |
| 6.3 | Versuchsbeschreibung nichtsteroidalen selektiven 17 β -HSD2 Inhibitoren | 76 |
| 6.4 | Versuchsbeschreibung zur synthetischen Darstellung eines <i>Drugs</i> | 86 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 155 |

| | |
|---|------------|
| 8 Supplementary | 163 |
| 8.1 Permission of reprint of publications | 163 |

1 Vorwort

Im Rahmen dieser wissenschaftlichen Arbeit wurden zwei voneinander unabhängige Projekte bearbeitet. Jedes Projekt wurde, bis auf die Einleitung, isoliert betrachtet und in zwei unabhängige Teile separiert. Die Projektberichte beginnen mit einer Einleitung, welche den aktuellen Forschungsstand zusammenfasst und Enden mit einer Zusammenfassung der Ergebnisse die im jeweiligen Projekt erzielt werden konnten.

2 Einleitung

2.1 Sexualhormone

Hormone sind chemische Botenstoffe die von einer Drüse produziert und anschließend freigesetzt werden. Rezeptorvermittelt adressieren sie verschiedene Organe wie auch Gewebe um spezifische Steroidregulierungen in Gang zu setzen.^[1] Sie bilden den Grundstein für die chemische Kommunikation zwischen zwei Zellen und besitzen eine Vielzahl an Funktionen: Fortpflanzung und sexuelle Differenzierung, Entwicklung und Wachstum, Wartung des Körpers und die Regulierung des Stoffwechsels sowie die Nährstoffversorgung.^[2] Wird ein Botenstoff von einer Drüse produziert, freigesetzt und in den Blutkreislauf geleitet, der wiederum rezeptorvermittelt auf eine spezifische Zielzelle einwirkt, wird von einem endokrinen Signalmechanismus gesprochen. Findet dieser Prozess innerhalb einer Zelle statt, ohne den intrazellulären Raum zu verlassen, folgt dieser einem intrakrinen Signalmechanismus.^[2,3]

Hormone sind in vier Klassen gegliedert; Aminosäurederivate (z.B. Thyroxin), Polypeptide (z.B. Insulin), Eicosanoide (z.B. Prostaglandin) und Steroide (z.B. Cholesterol **1**).^[2] Steroide sind lipophile chemische Verbindungen, die sich von Cholesterol **1** ableiten lassen. Steroide werden in drei Subkategorien gegliedert: Androgene, repräsentiert durch Testosteron (T) **2**, Dihydrotestosteron (DHT) **3** und 4-androstene-3,17-dione (Δ^4 -dione) **4**, die klassisch als „männliche Sexualhormone“ bezeichnet werden. Als „weibliche Sexualhormone“ werden Estrogene bezeichnet, deren populärste Vertreter Estron (E_1) **5** und Estradiol (E_2) **6** darstellen. Summarisch werden sie mit den Gestagenen als steroidale Sexualhormone zusammengefasst. Estrogene und Androgene haben verschiedene Effekte auf Organe und Gewebe und nehmen eine entscheidende Rolle in der Ausprägung von primären und sekundären Geschlechtsmerkmalen, als auch Stoffwechselfvorgängen in Knochen und Leber ein.^[1,4-6] In der Biosynthese von Androgenen und Estrogenen nehmen Hydroxysteroid Dehydrogenasen (HSDs) eine Schlüsselfunktion ein, da sie die finalen Schritte zu den aktiven Steroiden katalysieren.^[6,7] Aufgrund der Vielzahl steroidogener Enzyme, die in der Biosynthese von Androgenen und Estrogenen beteiligt sind, erscheint der Ansatz einer zielgerichtete Behandlung hormonabhängiger Krankheiten durch Inhibierung mittels potenter und selektiver Hemmstoffe als attraktive Herausforderung.

2.2 Hydroxysteroid Dehydrogenasen (HSDs)

HSDs sind Bestandteil des intrakrinen Systems und regulieren die intrazelluläre Besetzung der Steroidrezeptoren.^[8,9] In der Biosynthese von Steroiden und ihrer Regulierung, nehmen HSDs eine entscheidende Rolle ein. Sie katalysieren die finalen Schritte in der Steroid-Biosynthese von Andro-

genen, wie z.B. Testosteron **2**, Dihydrotestosteron (DHT) **3** und 4-androstene-3,17-dione (Δ^4 -dione) **4** als auch Estrogenen, wie z.B. Estron (E_1) **5** und Estradiol (E_2) **6** als auch Progesteron **7** (siehe Abbildung 1).^[7,8,10]

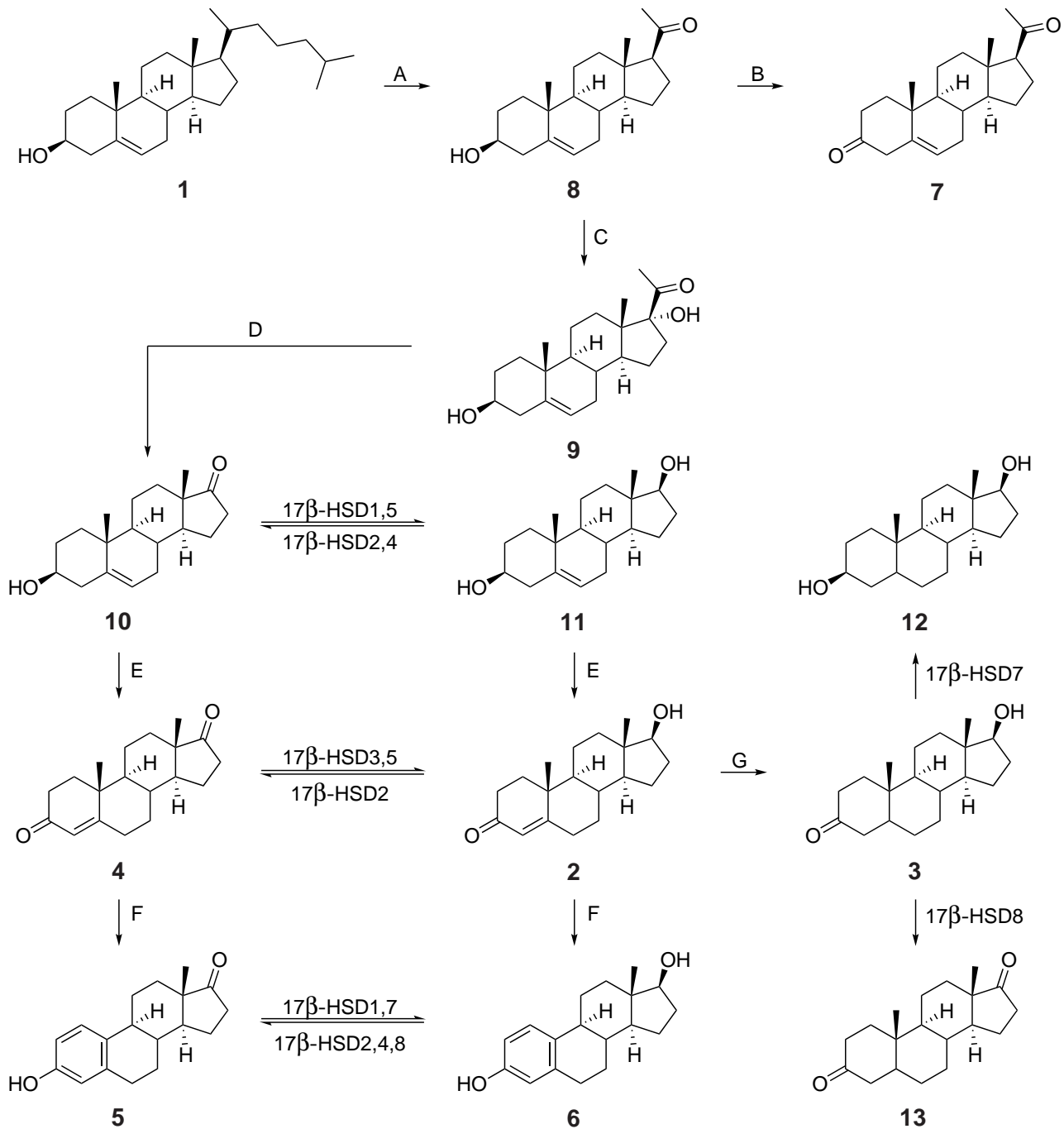
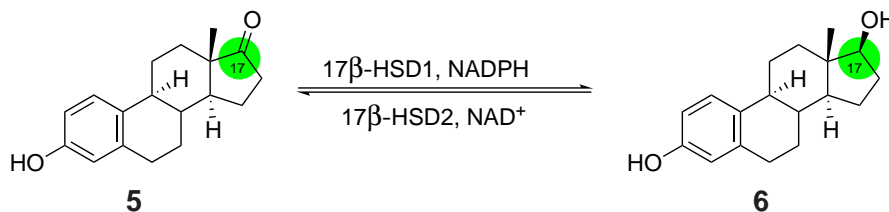


Abbildung 1: Schematische Zusammenfassung der Steroid-Biosynthese. Folgende steroidogene Enzyme werden verwendet: (A) CYP11A1; (B) 3 β -HSD; (C) CYP17; (D) CYP17; (E) 3 β -HSD/ Δ^5 - Δ^4 -isomerase; (F) Aromatase; (G) 5 α -reduktase. **1:** Cholesterin; **8:** Pregnenolon; **7:** Progesteron; **9:** 17 α -Hydroxypregnenolon; **10:** Dehydroepiandrosterone (DHEA); **11:** 5-androstene-3 β ,17 β -diol (Δ^5 -diol); **4:** 4-androstene-3,17-dione (Δ^4 -dione); **2:** Testosteron (T); **3:** Dihydrotestosteron (DHT); **12:** 5 α -androstane-3 β , 17 β -diol (3 β -diol); **13:** 5 α -androstane-3,17-dione (A-dione); **5:** Estron (E_1); **6:** Estradiol (E_2).^{[7],[10]}

HSDs sind Oxidoreduktasen die *sekundäre* Alkohole in die korrespondierenden Ketone oxidieren

und *vice versa*. Die regio- und stereoselektive Katalyse zu den steroidal Substraten (3α -, 3β -, 11β -, 17β -, 20α -, 20β) wird durch die Cofaktoren NAD(P)H (Elektronendonator) bzw. NAD(P)⁺ (Elektronenakzeptor) vorgegeben und gewährleistet eine bidirektionale Synthese der Steroidhormone (siehe Schema 1).



Schema 1: Katalytische Umsetzung von Estron (E₁) 5 zu Estradiol (E₂) 6 mittels 17β-HSD1/2 als steroidogene Enzyme und NAD(P)H und NAD⁺ als Cofaktoren.

2.2.1 17β-Hydroxysteroid Dehydrogenasen (17β-HSDs)

17β-HSDs wird eine entscheidende Rolle in der Hormonregulation und der Steroid-Biosynthese wie Estrogenen und Androgenen zuteil, da sie potente Steroide inaktivieren können um die Genexpression intrazellulär zu regulieren.^[7] Sie katalysieren die Reduktion von 17β-Ketosteroiden und die Oxidation von 17β-Hydroxysteroiden unter Verwendung von NAD(P)H bzw. NAD(P)⁺ als Cofaktor. Bisher konnten 14 verschiedene Isoenzyme der 17β-HSDs identifiziert werden, von denen 12 Subtypen im humanen Gewebe nachgewiesen wurden. 17β-HSD6 und 17β-HSD9 waren bisher ausschließlich in Nagetieren nachweisbar.^[11] Mit Ausnahme von 17β-HSD5, welches zur Superfamilie der *Aldo Keto Reductase* (AKRs) zählt, gehören die restlichen 17β-HSDs der Superfamilie der *Short chain Dehydrogenase/Reductase* (SDRs) an.^[12] Sie unterscheiden sich in ihrer Gewebeverteilung, katalytischen Präferenz und der subzellulären Lokalisation sowie der Substratspezifität, wie in Tabelle 1 zusammengefasst.^[13]

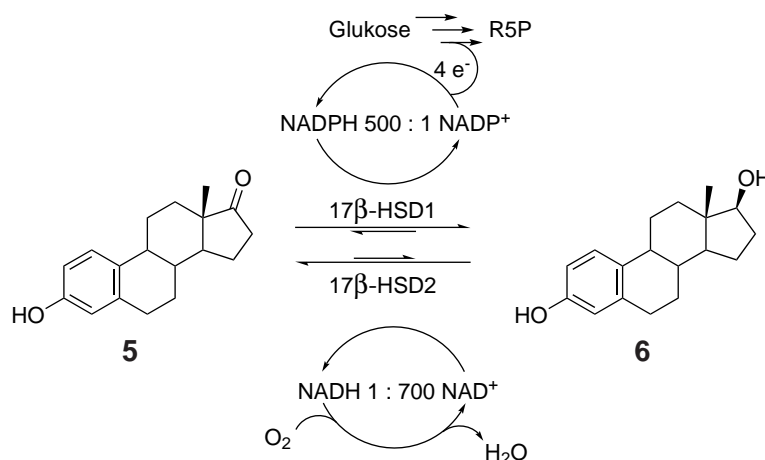
Neben Steroiden, die von allen HSDs als Substrat verwendet werden, sind die Mehrzahl der Enzyme multifunktional und spielen eine entscheidende Rolle in weiteren metabolischen Abläufen, zu denen beispielsweise die Lipid- (17β-HSD12) oder der Retinol-Metabolismus (17β-HSD6) zählen.^[57] Sie können als molekulare Schalter wirken und bieten daher ein *Target* für die Therapie hormonbedingter Krankheiten.^[10] Hierzu zählen verschiedene Arten von Krebs, wie z.B. Brust- (17β-HSD1) oder Prostatakrebs (17β-HSD3), aber auch hormonelle Krankheiten wie Osteoporose (17β-HSD2).^[58] Die 17β-HSDs als Ansatzpunkt für mögliche Arzneistoffe bieten gegenüber anderen Behandlungsansätzen verschiedene Vorteile. Durch die gewebsspezifische Expression, könnte für die Behandlung eine lokale Freisetzung des Inhibitors völlig ausreichend sein. Weiterhin vorteilhaft ist, dass die Enzyme oftmals die letzte Stufe der Steroid-Biosynthese katalysieren.^[14] Durch diese Eigenschaften

Tabelle 1: Zusammenfassung der unterschiedlichen subzellulären Lokalisation, Cofaktor, katalytische Präferenz, Substratspezifität und der Gewebeverteilung der humanen 17 β -HSDs. Cofaktor und Substratspezifität sind bisher noch nicht für 17 β -HSD13 bekannt.

| 17 β -HSD | Lokalisation | Cofaktor | Substratspezifität | Gewebeverteilung |
|-----------------|---|-----------------------------------|---|---|
| 1 | Cytosol ^[14] | NADP/NADPH ^[15,16] | Estrogene, Androgene ^[15,16] | Ovarien, Placenta, Brust ^[17,18] |
| 2 | Endoplasmatisches Retikulum ^[19] | NAD/NADH ^[19,20] | Estrogene, Androgene, Gestagene, Progestine ^[19,20] | Leber, Darm, Plazenta, Pancreas, Prostata ^[19,21,22] |
| 3 | Endoplasmatisches Retikulum ^[23] | NADP/NADPH ^[24] | Estrogene, Androgene ^[24] | Testes, Hirn ^[24,25] |
| 4 | Peroxisom ^[26] | NAD/NADH ^[27,28] | Estrogene, Androgene, Fettsäuren ^[27,28] | Leber, Herz, Prostata, Lunge, Niere ^[29] |
| 5 | Cytosol ^[30] | NAD(P)/NAD(P)H ^[31,32] | Estrogene, Androgene , Progestine, Prostaglandine ^[31,32] | Prostata, Leber, Herz, Niere, Lunge, Gebärmutter ^[31,33] |
| 7 | Endoplasmatisches Retikulum ^[34] | NADP/NADPH ^[34,35] | Estrogene, Androgene, Progestine, Styriene ^[34,35] | Ovarien, Gebärmutter, Plazenta, Leber, Brust, Lunge, Prostata ^[35-37] |
| 8 | Mitochondrium ^[38] | NAD/NADH ^[38] | Estrogene, Androgene ^[38] | Prostata, Plazenta, Niere, Hirn, Herz, Lunge, Ovarien, Testes ^[38] |
| 10 | Mitochondrium ^[39] | NAD/NADH ^[40,41] | Estrogene, Androgene, Progestine ^[40,41] | Leber, Darm, Niere, Herz, Ovarien, Plazenta, Lunge, Milz, Prostata ^[42,43] |
| 11 | Endoplasmatisches Retikulum ^[44] | NAD/NADH ^[45,46] | Estrogene, Androgene ^[45,46] | Leber, Pancreas, Niere, Herz, Lunge, Darm, Ovarien, Plazenta ^[46,47] |
| 12 | Endoplasmatisches Retikulum ^[48] | NADP/NADPH ^[49-51] | Estrogene, Androgene, Fettsäuren ^[49-51] | Herz, Leber, Plazenta, Niere, Pancreas, Lunge, Prostata ^[50,52] |
| 13 | Endoplasmatisches Retikulum ^[53] | | | Leber, Lunge, Ovarien, Niere, Hirn, Knochenmark ^[54] |
| 14 | Cytosol ^[55] | NAD/NADH ^[55] | Estrogene, Androgene ^[55] | Leber, Hirn, Plazenta, Brust ^[55,56] |

werden weniger Nebenwirkungen als bei alternativen Behandlungsmethoden erwartet. Deshalb ist es für die therapeutische Anwendung von besonderer Bedeutung, die Rolle einzelner Isoformen zu untersuchen und sich deren Eigenschaften bei der Entwicklung von Inhibitoren zunutze zu machen.

In vitro sind alle 17β -HSDs in der Lage bidirektional steroidogene Substraten umzusetzen. *In vivo* zeigen sie jedoch eine eindeutige Präferenz, in dem sie entweder als oxidative oder reduktive 17β -HSD interagieren, wobei nur 17β -HSD1-3 in den Steroidmetabolismus involviert sind und ausschließlich Steroide als Substrate akzeptieren.^[11,22] Ausschlaggebend ist die intrazelluläre Konzentration der Cofaktoren NAD(P)H und NAD(P)⁺. Intrazellulär liegen NADPH und NAD⁺ im mM-Bereich vor. NADPH reduziert die Ketosteroide, wobei es selber zu NADP⁺ oxidiert wird. Über den Pentosephosphatweg wird NADP⁺, welches im μ M-Bereich vorliegt, zu NADPH reduziert. Dabei nehmen zwei Schlüsselenzyme eine wichtige Funktion ein, damit NADPH in einer ausreichend hohen Konzentration vorliegt: Glukose-6-phosphat (G6P) Dehydrogenase (G6PDH) und 6-Phosphogluconat (6PG) Dehydrogenase (6PGDH).^[59] Glukose wirkt dabei als biochemischer Treibstoff und liefert über den Pentosephosphatweg die notwendigen Elektronen für die Reoxidation von NADP⁺ zu NADPH.^[59] NAD⁺ fungiert als Elektronenakzeptor, oxidiert Hydroxy- zu Ketosteroide und wird selbst zu NADH reduziert, liegt dann ebenfalls im μ M-Bereich vor, reduziert.^[56,59] NADH ist ein ausgesprochen guter Elektronendonator für die Elektronentransportkette in den Mitochondrien um die oxidative Phosphorylierung und die Adenosintriphosphat (ATP) Generierung über die Zellatmung anzutreiben.^[59] Dabei wird NADH zu NAD⁺ reoxidiert und steht erneut für weitere Katalysezyklen bereit. Die Katalyserichtung bestimmt also, ob die jeweiligen Subtypen eine aktivierende oder eine mindernde Funktion einnehmen. Während die reduktiven Subtypen die weniger aktiven 17-Ketosteroide in die aktiveren 17-Hydroxysteroide überführen, sorgen die oxidativen Typen für eine Minderung der hormonellen Aktivität (siehe Schema 2).



Schema 2: Katalytische Umsetzung von Estron (E₁) 5 zu Estradiol (E₂) 6 mittels 17β -HSD1/2 als steroidogene Enzyme und NADPH und NAD⁺ als Cofaktoren.^[60]

Kinetische Studien haben ergeben, dass 17β -HSDs unterschiedliche Bindungsaffinitäten zum phosphorylierten (NADP) bzw. nicht phosphorylierten (NAD) als Cofaktor aufweisen.^[60–62] Durch Röntgenkristallstrukturanalysen konnte gezeigt werden, dass in der N-terminalen Region des ROSSMANN FOLD von reduktiven 17β -HSDs, eine positiv geladene Aminosäure vorhanden ist.^[63] Bei 17β -HSD1 sitzt in dieser Region Arg₃₇, welches eine Salzbrücke mit dem 2'-Phosphatrest des NADPHs ausbildet.^[63] Dadurch wird die Bindungsaffinität zum phosphorylierten Cofaktor stark erhöht. Bei oxidativen 17β -HSDs (z.B. 17β -HSD2) ist an dieser Stelle eine negativ geladene Aminosäure (Asp₁₃₈) lokalisiert, welches in der Lage ist eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Ribose des NAD⁺ auszubilden.^[64] Da repulsive Wechselwirkungen vom negative Aspartat mit der Phosphatgruppe von NADPH zu erwarten sind, erhöht sich die Bindungsaffinität.^[64] Die Beobachtungen konnten auch durch Mutagenesestudien bestätigt werden.^[65,66]

2.2.2 Katalysemechanismus

Der Katalysemechanismus von 17β -HSDs kann in zwei Richtungen erfolgen. Entweder läuft die Oxidation mit einem Protonentransfer des Steroids auf NAD⁺ ab oder es erfolgt im Gegensatz bei der Reduktion ein Hydridtransfer von NADPH auf das Steroid. Ob die Katalyse schrittweise oder konzertiert verläuft, konnte bis heute noch nicht bestätigt werden.^[8,67] Die Katalysfunktion der reduktiven 17β -HSDs beinhaltet einen reversiblen Hydridtransfer von NADPH zu Estron (E₁) **5**. Dabei bilden Ser₁₄₂, Tyr₁₅₅, Lys₁₅₉ und Asn₁₁₄ zusammen mit z.B. Estron (E₁) **5**, NADPH und konservierten Wassermolekülen eine katalytische Domäne, katalytische Tetrade, aus, in der die Katalysereaktion entropisch begünstigt ausgeführt wird (siehe Abbildung 2).^[68] Das Ketosteroid wird über die Seitenkette des konservierten Serins gebunden.^[45,69] Tyr₁₅₅ bildet ein Wasserstoffbrückennetzwerk mit Ser₁₄₂, Lys₁₅₉ und der Ribose aus NADPH aus. Dabei entziehen Lys₁₅₉ und Ser₁₄₂ Elektronendichte von Tyr₁₅₅.^[70] Zusätzlich wird durch π -Stacking von Phe₁₉₂ und Tyr₁₅₅ der pKa abgesenkt und gleichzeitig die CH-Azidität erhöht.^[70] Dadurch wird der Pro-(S)-Hydridtransfer von NADPH an die α -Seite des Ketosteroids begünstigt.^[70] Das intermediär gebildete Oxyanion ist nun in der Lage das azide Proton von Tyr₁₅₅, unter Zuhilfenahme zweier konservierter Wassermoleküle und Asn₁₁₄, zu abstrahieren.^[69]

2.2.3 17β -Hydroxysteroid Dehydrogenase 2 (17β -HSD2)

17β -HSD2 stellt den zweiten Subtyp der 17β -HSD-Familie dar. Wie bereits in Tabelle 1 zusammengefasst, ist es intrazellulär im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert und wird in vielen Gewebepartien, wie z.B. Endometrium, Plazenta und Uterus, exprimiert.^[19,21,22] Die Expression von 17β -HSD2 wurde auch im Knochengewebe nachgewiesen, was einen wichtigen Bestandteil dieser

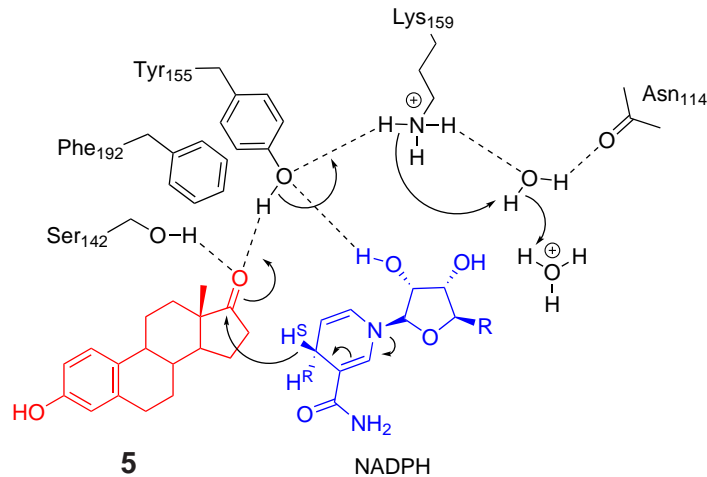


Abbildung 2: Postulierte katalytische reversible Umsetzung von Estron (E_1) **5** zu Estradiol (E_2) **6** mittels 17β -HSD1 als steroidogenes Enzym und $NADP^+$ als Cofaktor in einer katalytischen Tetrade.

Arbeit darstellt.^[71–74] 17β -HSD2 gehört wie auch 17β -HSD1 zu den Vertretern der Superfamilie der *Short chain Dehydrogenase/Reductase* (SDRs). 17β -HSD2 spezifiziert Estrogene, Androgene, Gestagene und Progestine als Substrate und weist Selektivität gegenüber 20α -HSD auf.^[19,20] Die Reaktionen von 17β -HSD2 laufen unter Zuhilfenahme von NAD/NADH als Cofaktoren ab.^[19,20] 17β -HSD2 ist ein membranständiges Enzym, das die Oxidation von Estradiol (E_2) **6** zu Estron (E_1) **5**, Testosteron (T) **2** zu 4-androstene-3,17-dione (Δ^4 -dione) **4**, 5-androstene-3 β ,17 β -diol (Δ^5 -diol) **11** zu Dehydroepiandrosterone (DHEA) **10** katalysiert (siehe Abbildung 1).^[19] Es besteht aus 387 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 42.785 kDa und ist am chromatin 16 (16q23.3) lokalisiert.^[19,75] Es ist ein transmembran Protein, welches aminoterminal ein Typ II Signal-Anker Motiv, carboxyterminal ein endoplasmatisches Retikulum Retentionsmotiv und ein konserviertes TGxxxGxG Cofaktor Bindungsmotiv besitzt.^[76,77] Es wird nach dem HIDDEN MARKOV MODEL postuliert, dass die aktive Seite von 17β -HSD2 einen Cluster von positiv geladenen Aminosäuren, gefolgt von 33 unpolaren Aminosäuren aufweist, die einen hydrophoben Bereich bilden.^[78] Nahe am N-Terminus von 17β -HSD2 werden auch zwei transmebrane Helices vorhergesagt.^[78,79] Daraus ergibt sich eine N_{Cyto}/N_{Exo} -Orientierung indem aminoterminal ins Cytoplasma eingedrungen wird. Die katalytische Tetrade besteht aus Ser₂₁₉, Tyr₂₃₂, Lys₂₃₆, Asp₁₁₆ und verläuft womöglich analog zu 17β -HSD1 (siehe Abbildung 2).^[70,80,81] Aufgrund der Physiologie von 17β -HSD2, wird davon ausgegangen dass es eine wichtige Rolle in der Hormonregulierung im Bezug auf unkontrollierte und außerordentliche hohe Ausschüttung von aktiven Estradiol (E_2) **6** einnimmt und durch Oxidation zu den weniger aktiven Estron (E_1) **5**, wird 17β -HSD2 einer protektiven Funktion vor überschießender Steroidwirkung zuteil.

Im Gegensatz zur cytosolischen 17β -HSD1, deren Struktur durch eine Vielzahl von Kristallstruk-

turen bekannt ist, lagen zum membrangebundenen 17β -HSD2 keine Strukturinformationen, weder in Form von Kristallstrukturen noch durch Protein-Studien vor. Es ist bislang sehr wenig über die Substrat- und Cofaktorspezifität von 17β -HSD2, wie auch Aminosäuren, die an der Katalyse beteiligt sind, bekannt. Bisher ist es auch nur einer einzigen Forschungsgruppe gelungen, 17β -HSD2 in seiner enzymatisch aktiven Form aufzureinigen.^[76] Vor kurzem wurde ein Homologie-Modell veröffentlicht, welches einen tieferen Einblick und ein besseres Verständnis für die Proteineigenschaften und Topologie von 17β -HSD2 liefert.^[64] Um die Qualität dieses Modells zu verifizieren, wurden 15 ausgewählte Aminosäuren nacheinander ausgetauscht.^[64] Es konnten für die Cofaktor- und Bindungsseite wichtige Aminosäuren identifiziert und ihre Funktion in der Struktur mittels Mutagenese verschiedener Aminosäuren bestätigt werden.^[64] 17β -HSD2 hat eine strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit mit anderen Homologen der Superfamilie der SDRs, wie z.B. 17β -HSD1 und 17β -HSD3.^[11,82] Jedoch liegt diese Homologie zu anderen 17β -HSDs bei 20-30%.^[11] In einem BLAST-Vergleich, konnte herausgefunden werden, das 17β -HSD14 eine Sequenzidentität von 33% zu 17β -HSD2 aufweist.^[64] Durch Kürzung irrelevanter Aminosäuren, konnte die Sequenzidentität auf bis zu 43% erhöht werden.^[64] Diesem Model liegt eine gekürzte Variante von 17β -HSD2 zugrunde. Die ersten 81 Aminosäuren wurden in diesem Homologie-Modell vernachlässigt, da diese in den meisten Templaten nicht existieren, sowie die letzten 17 (372 bis 387) Aminosäuren, da diese zum *flexible loop* gehören, die nur in 17β -HSD2 präsent sind.^[64] Darüber hinaus wird auch berichtet, dass die Aminosäuren zum Teil in der Membran verankert sind.^[83] Als Resultat konnte eine 3D-Struktur von 17β -HSD2 als Monomer erhalten werden, in der fünf Regionen für die Bindung des Liganden, von NAD^+ und Estradiol (E_2) **6** identifiziert werden konnten (siehe Abbildung 3): „Adenosine binding site“ (Thr₈₈-Cys₉₂, Ala₁₁₁-Asn₁₁₅, Met₁₃₇-Pro₁₄₂, und Ala₁₉₀-Gly₁₉₅), „Hydrophobic coil“ (Asn₁₆₇-Thr₁₇₅), „Turn coil“ (Ser₂₁₉-Lys₂₃₆), „FG-segment“ (Pro₂₆₂-Pro₃₂₀), „C-terminal chain“ (Pro₃₄₀-Lys₃₇₁).^[64] All diese Regionen sind auch in anderen 17β -HSD2-ähnlichen HSDs wie z.B. 17β -HSD1 oder 11β -HSD1 existent.^[64] Die N-terminale Region des ROSSMANN FOLD setzt sich aus sechs β -Strängen und Helices zusammen, die NAD^+ fixieren.

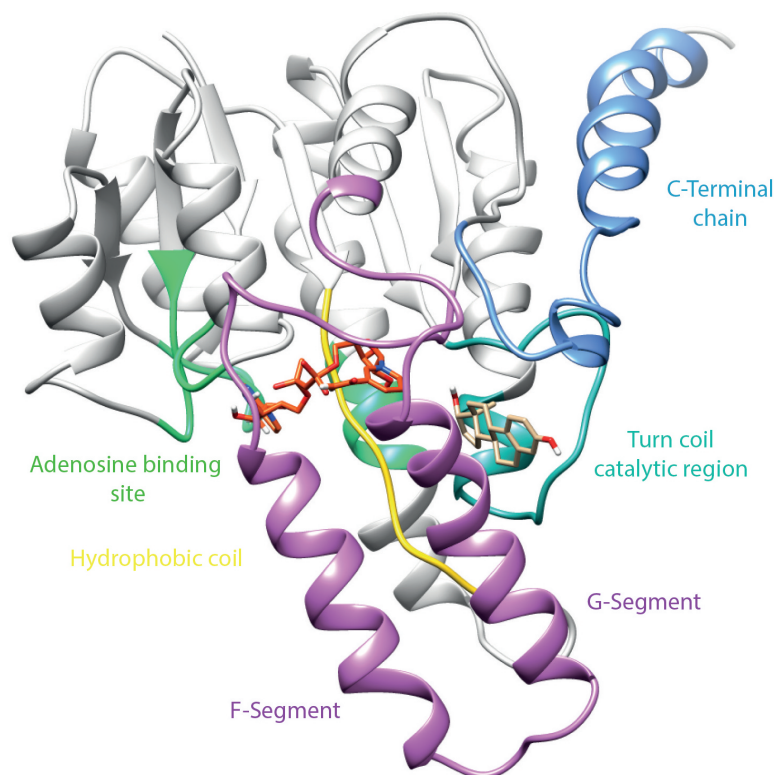


Abbildung 3: Gemodelte 3D-Struktur (Aminosäure 82 bis 371) von 17β -HSD2 als Monomer-Ribbon dargestellt. Fünf Regionen wurden für das *Ligand binding* als relevant identifiziert: „Adenosine binding site“ (grün), „Hydrophobic coil“ (gelb), „Turn coil“ (türkis), „FG-segment“ (magenta) und „C-terminal chain“ (cyan). Regionen die im *Ligand binding* nicht beteiligt sind, wurden in grau hinterlegt. NAD^+ (orange) und Estradiol (E_2) 6 (tan) sind als Stäbchen abgebildet. Diese Darstellungen wurde von SAGER *et al.*^[64] adaptiert und mit Chimera bearbeitet.

In der *Molecular Dynamics Simulation* wurde von einem Homodimer ausgegangen, da es als solches in Lösung beschrieben wurde.^[76] In der katalytischen Domäne wird NAD^+ über Wasserstoffbrückenbindung (Asp_{138} (Adenosingerüst), Asn_{167} (Phosphatsauerstoff), Leu_{94} , Ala_{168} , Gly_{169} , Lys_{236} (Ribose)), π - π - (Trp_{276}) und VAN DER WAALS-Wechselwirkung (Leu_{94} , Ile_{139} , Val_{170} , Val_{217} , Pro_{262}) stabilisiert.^[64] In den unverfeinerten Simulationen, wurde Leu_{114} nicht in Richtung des Adenosingerüst orientiert, wobei eine Fehlstellung von NAD^+ im 17β -HSD2- NAD^+ -Estradiol (E_2) 6 Komplex beobachtet werden konnte.^[64] Dadurch konnte bestätigt werden, dass Leu_{114} das Adenosingerüst von NAD^+ mittels CH- π -Wechselwirkungen fixiert (siehe Abbildung 4).^[64] Zusätzlich orientierte sich Leu_{114} in vielen Simulationen in Richtung von NAD^+ . Dabei scheint Leu_{114} die Aminosäuren Arg_{38} (17β -HSD1) oder Arg_{66} (11β -HSD11) nachzuahmen, und könnte in der Cofaktorpräferenz eine entscheidende Rolle spielen.^[62,64]

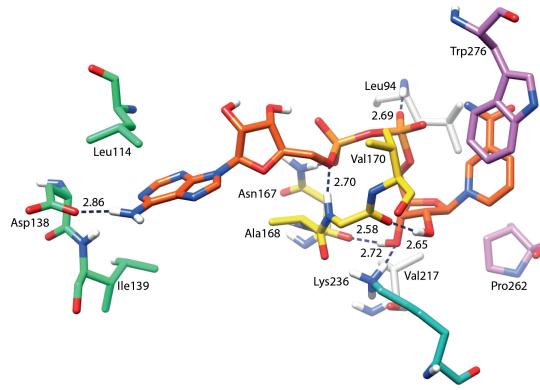


Abbildung 4: Wechselwirkungen der Aminosäuren mit dem Cofaktor NAD^+ im finalen $17\beta\text{-HSD2-NAD}^+$ -Estradiol (E_2) **6** Komplex. NAD^+ ist in orange abgebildet, während die Aminosäuren in der Farbe der jeweiligen Lokalisation dargestellt sind: „Adenosine binding site“ (grün), „Hydrophobic coil“ (gelb), „Turn coil“ (türkis), „FG-segment“ (magenta) und „C-terminal chain“ (cyan). Wasserstoffbrückenbindungen und Salzbrücken sind als gestrichelte Linien dargestellt und die Abstände in Å angegeben. Diese Darstellungen wurde von SAGER *et al.*^[64] adaptiert und mit Chimera bearbeitet.

In der *Cofactor binding site* positioniert sich Lys_{275} in einem Salzbrückenabstand (sub 4Å) zu Asp_{91} und Asp_{274} .^[64] Asp_{91} ist ein Teil des konservierten $\text{T}_{88}\text{GxD}_{91}\text{GxG}_{95}$ Cofaktor Bindungsmotivs.^[64] Durch die Bildung der Salzbrücke von Lys_{275} zu den beiden Aspartaten, wird der Eintritt in die Bindungstasche limitiert.^[64] Darüber hinaus wird durch die Wechselwirkung zwischen Asp_{91} und Lys_{275} der $\alpha_1\beta_1$ loop im Proteingerüst stabilisiert und verbessert die Wechselwirkung zwischen NAD^+ und $17\beta\text{-HSD2}$.^[64] Glu_{116} ist in der „Adenosine binding site“ von $17\beta\text{-HSD2}$ lokalisiert, orientiert sich jedoch nicht in Richtung von NAD^+ und nimmt folglich in der Katalyse keine bedeutende Rolle ein (siehe Abbildung 5).^[64]

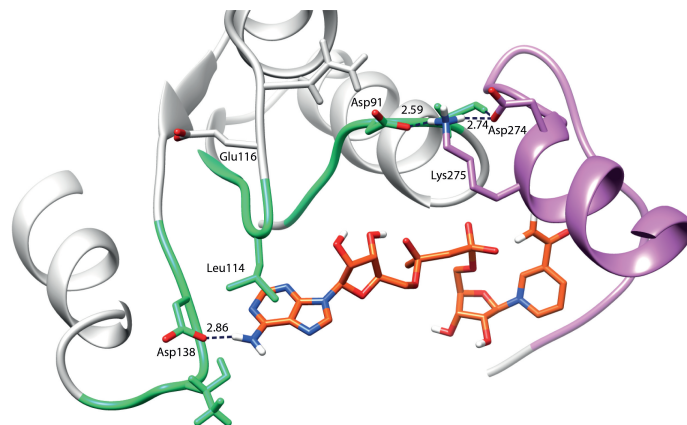


Abbildung 5: *Cofactor binding site* im finalen $17\beta\text{-HSD2-NAD}^+$ -Estradiol (E_2) **6** Komplex. NAD^+ und die beteiligten Aminosäuren sind als Stäbchen dargestellt. NAD^+ ist in orange abgebildet, während die Aminosäuren in der Farbe der jeweiligen Lokalisation dargestellt sind: „Adenosine binding site“ (grün) und „FG-segment“ (magenta). Wasserstoffbrückenbindungen und Salzbrücken sind als gestrichelte Linien abgebildet und die Abstände sind in Å angegeben. Diese Darstellungen wurde von SAGER *et al.*^[64] adaptiert und mit Chimera bearbeitet.

Leu_{171} befindet sich im „Hydrophobic coil“ in unmittelbarer Nähe zum katalytischen Tyr_{232} und Ni-

kotinamid von NAD^+ .^[64] Der „*Hydrophobic coil*“ ist am *Cofactor binding* beteiligt und toleriert in den ersten Positionen keine sperrigen Aminosäuren, da dies den Eintritt von NAD^+ erschweren würde.^[84,85] Leu_{171} reduziert die „*Substrate binding site*“ und interagiert durch VAN DER WAALS-Wechselwirkung mit Estradiol (E_2) **6**, welches dabei so fixiert wird, dass Wasserstoffbrückenbindungen mit Ser_{219} und Tyr_{232} gewährleistet sind (siehe Abbildung 6).^[64]

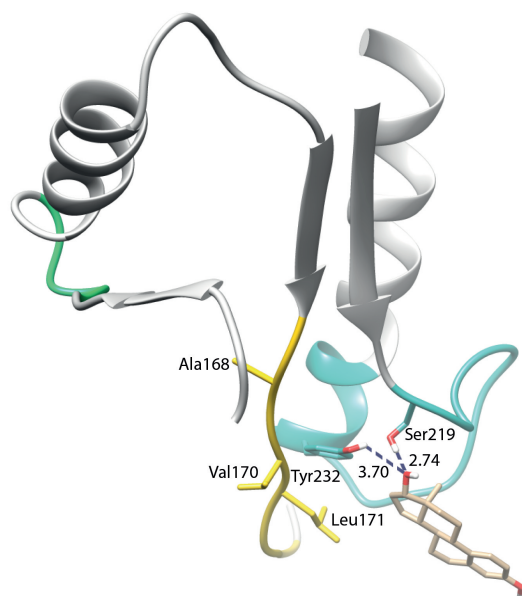


Abbildung 6: Eindringen von Leu_{171} (lokalisiert im „*Hydrophobic coil*“, gelb markiert) in die „*Turn coil*“, cyan markiert. Wasserstoffbrückenbindungen und Salzbrücken sind als gestrichelte Linien dargestellt und die Abstände in Å angegeben. Diese Darstellungen wurde von SAGER *et al.*^[64] adaptiert und mit Chimera bearbeitet.

Die Hydroxyfunktion an der C17-Position von Estradiol (E_2) **6** wechselwirkt durch Wasserstoffbrückenbindung mit Ser_{219} und Tyr_{232} (siehe Abbildung 6 & Abbildung 7).^[64] Eine weitere Wasserstoffbrückenbindung findet zwischen der phenolischen Hydroxyfunktion (C3) von Estradiol (E_2) **6** und $\text{Asp}_{370'}$, und weitere VAN DER WAALS-Wechselwirkungen mit Arg_{228} , Gly_{264} , Ala_{302} , Asn_{305} , Phe_{306} , Leu_{309} , und Trp_{347} , statt.^[64] Die Indol-Seitenkette von Trp_{347} wechselwirkt über eine Wasserstoffbrückenbindung mit $\text{Asp}_{370'}$ und schließt zusammen mit Tyr_{345} den Eingang in die Tasche.^[64] Die Hydroxyfunktion von Tyr_{345} orientiert sich nicht in Richtung der phenolischen Hydroxyfunktion (C3) von Estradiol (E_2) **6** und trägt nicht zu einer Stabilisierung oder Fixierung bei. Die Distanz zwischen Tyr_{345} und der Hydroxyfunktion von Estradiol (E_2) **6** ist dabei zu groß und führt zu keiner Stabilisierung.^[64] Die beiden Methionine, Met_{220} und Met_{226} nehmen eine Schlüsselfunktion in der Stabilisierung von Estradiol (E_2) **6** in der Bindungstasche ein, indem sie zusammen mit Ser_{219} und Tyr_{232} eine Wand in der *Steroid binding site* bilden.^[64]

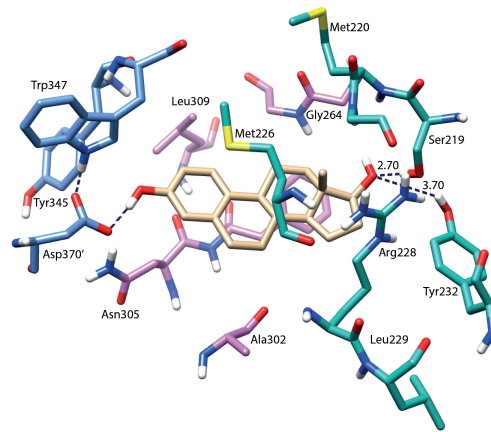


Abbildung 7: Wechselwirkung der Aminosäuren mit Estradiol (E_2) **6** im finalen 17β -HSD2-NAD⁺-Estradiol (E_2) **6** Komplex. Estradiol (E_2) **6** ist in tan abgebildet, während die Aminosäuren in der Farbe der jeweiligen Lokalisation dargestellt sind: „Adenosine binding site“ (grün), „Hydrophobic coil“ (gelb), „Turn coil“ (türkis), „FG-segment“ (magenta) und „C-terminal chain“ (cyan). Wasserstoffbrückenbindungen und Salzbrücken sind als gestrichelte Linien dargestellt und die Abstände in Å angegeben. Diese Darstellungen wurde von SAGER *et al.*^[64] adaptiert und mit Chimera bearbeitet.

2.2.4 17β -HSD2 als Osteoporosetarget

Bei der Osteoporose handelt es sich um eine systemische skelettale Erkrankung, die sich durch eine geringe Knochendichte sowie den Verlust der Mikroarchitektur des Knochengewebes offenbart.^[86] Daraus resultiert ein Anstieg der Fragilität und erhöht die Anfälligkeit für Knochenfrakturen.^[87] Die Osteoporose lässt sich in zwei Subtypen klassifizieren; Primär tritt sie physiologisch als Typ I (Menopause) und Typ II (Alterserscheinung) auf. Als Ursache für die sekundäre Osteoporose sind endokrine (Cushing-Syndrom), gastrointestinale (Darmerkrankungen), hämatologische (Lymphome) und rheumatische Erkrankungen (rheumatoide Arthritis) bekannt.^[88] Sowohl Frauen (Typ I & II) als auch Männer (Typ II) erleiden im höheren Alter eine Osteoporose, die sich im Verlust von Knochenmasse bemerkbar macht. Postmenopausal werden innerhalb weniger Jahre bis zu 30% an Knochenmasse eingebüßt.^[89] Der Knochenstoffwechsel ist einem lebenslangen, dynamischen Prozess unterzogen, wobei altes Knochengewebe entfernt und durch neues ersetzt wird.^[87,90] Die Knochensubstanz besteht aus einer organischen und anorganischen Matrix. Die organische Matrix wird aus Typ 1 Kollagen, Proteoglykanen und nichtkollagenen Proteinen wie z.B. Osteocalcin, Osteonectin und Osteopontin gebildet. Die anorganische Matrix ist in Form von Hydroxyapatit eingelagert.^[91] Das Knochengewebe setzt sich im Wesentlichen aus drei Komponenten zusammen. Der Knochen besitzt eine harte Außenschale, *Substantia corticalis* oder auch Kortikalis abgekürzt. Die Kortikalis ist für die Stabilität verantwortlich und schützt die *Substantia spongiosa*, auch Spongiosa genannt.^[91] Dieses Gewebe lässt sich als ein schwammartiges System aus Trabekeln beschreiben und ist für die Elastizität des Knochen verantwortlich. In seinen Hohlräumen befindet sich das Knochenmark. Im Hinblick auf die Zusammensetzung des Knochens ist das Verhältnis von

Kortikalis und Spongiosa abhängig von der Lokalisation unterschiedlich.^[91] Im Bereich der Wirbelkörper ist der Spongiosa-Anteil besonders hoch, wobei in den peripheren skelettalen Bereichen der Kortikalis-Anteil überwiegt. Die Spongiosa ist für den systemischen Knochenstoffwechsel (75%) verantwortlich. Die restlichen 25% werden über die Kortikalis gesteuert.^[90] Knochen übernehmen einige essentielle Funktionen in unserem Körper, wie z.B. als Teil des Stütz- bzw. Bewegungsapparates und als Ansatzpunkt für die Muskulatur, als Mineralspeicher und Regulator für den Calcium- bzw. Phosphathaushalt.^[87] Darüber hinaus schützen Knochen das Gehirn sowie weitere innere Organe. Zudem werden im Knochenmark rote und weiße Blutkörperchen, wie auch die Blutplättchen gebildet.^{[92][93]}

Am Knochenstoffwechsel nehmen zwei Zelltypen eine übergeordnete Rolle ein: Osteoblasten, welche Knochengewebe generieren und Osteoklasten, die selbiges zerstören.^{[94][95]} Osteoblasten sind knochenbildende Zellen, die extrazelluläre Matrixproteine produzieren. Während dieser Synthese werden große Mengen an alkalischer Phosphatase gebildet und bereiten die Matrix auf die Mineralisation vor.^[91] Im Knochenaufbau werden die Osteoblasten in der neu synthetisierten Knochensubstanz eingebaut und wandeln sich in Osteozyten und Lining-Zellen um, welche die Oberfläche des gebildeten Knochens auskleiden. Die mechanische und biochemische Information werden über die Osteozyten weitergegeben, die ein skelettales Netzwerk ausbilden.^[91] Osteoklasten sind mehrkernige Zellen die aus der Monozyten-Makrophagen-Linie gebildet werden und verantwortlich für den Knochenabbau sind. Sie weisen eine hohe Stoffwechselaktivität auf und sind reich an lysosomalen Proteinen, wie z.B. saurer Phosphatase und Cathepsin K, die für den Abbau der Knochensubstanz verantwortlich sind.^[91] Der Anstieg der Fragilität und die Anfälligkeit für Knochenfrakturen ist auf die unterschiedlichen Aktivitäten dieser beider Zelltypen zurückzuführen, welcher prämenopausal einem Gleichgewicht folgen.^[87]

Unser Skelettsystem stellt ein dynamisches Gewebe dar, das einem permanenten Umbaumechanismus unterzogen ist und als *Bone remodeling* bezeichnet wird. Dabei wird dieser *Bone remodeling* Prozess durch *Bone remodeling Units* (BMUs) charakterisiert, welche postmenopausal ansteigt und in einer definierten Abfolge verläuft. Ein Anstieg dieser Zahl ist gleichbedeutend mit einer Erhöhung der Knochenresorption, der wiederum nicht durch einen Anstieg der Knochenbildung ausgeglichen wird.^[89] Die Lebenszeit einer BMU beträgt zwischen 6 und 9 Monaten, wobei die Bildung von Knochenmaterial die längste Zeit in Anspruch nimmt.^[91] Die Hauptfunktion von *Bone remodeling* ist, die Knochenmasse, unter Beibehaltung der Knochenform, zu erhöhen.^[96] Die Bildung von Knochen wird als *formation modeling*, der Abbau als *resorptive modeling* bezeichnet. Diese Prozesse können an der Periost, Kortikalis und der Spongiosa stattfinden und obliegen im wesentlichen zwei Schritte, der Aktivierung, gefolgt von Bildung oder Abbau an Knochenmaterial.^[87] Das *Bone remodeling* wird

mit einer Aktivierung der Knochenoberfläche für eine Resorption gestartet. Die auf der Oberfläche befindlichen Lining-Zellen werden durch Osteoklasten verdrängt. Im nachfolgenden Schritt bildet sich ein Resorptionslakune aus, welche durch Osteoblasten mit einer nicht mineralisierten Knochenmatrix (Osteoid) gefüllt wird. Im letzten Schritt wird das Osteoid mineralisiert und die Osteoblasten werden in Lining-Zellen umgewandelt und beenden den *Bone remodeling* Prozess.^[97]

In einem Lebenszyklus, obliegt die Hormonregulierung einem fortwährenden Gleichgewicht zwischen Estradiol- (E_2) 6 und Estron (E_1) 5 sowie Testosteron (T) 2 und 4-androstene-3,17-dione (Δ^4 -dione) 4. Im normalen Fall befinden sich beide Systeme in einem Gleichgewicht, können aber durch verschiedene Faktoren verschoben werden.^[90] Der Knochenstoffwechsel wird z.B. durch das Lebensalter, körperliche Aktivität, Geschlecht und Verlust von Estrogene in der Menopause beeinflusst.^[98] Im fortgeschrittenen Alter sinken die Estradiol- (E_2) 6 und Testosteron 2-konzentrationen.^[99] Diese Ursache kann besonders bei älteren Menschen und postmenopausalen Frauen zu einer Osteoporose führen.^[99] Estradiol- (E_2) 6 und Testosteron 2 werden im Knochengewebe ausgeschüttet, wobei physiologische Konzentrationen die Knochenbildung induzieren während sie hingegen den Abbau unterdrücken.^[21,71] Die Estrogenproduktion in den Ovarien entfällt beim Eintritt in die Menopause und verlagert sich hauptsächlich in der Ausschüttung in peripheren Gewebe wie z.B. Muskel- und Fettgewebe, oder auch in der Leber.^[100] Die prämenopausale Estrogensynthese ist auf eine Produktionsrate von 75% limitiert und erhöht sich postmenopausal auf 100%.^[9] 17β -HSD2 exprimiert in den Osteoblasten (Abbau) und ist dadurch ein lukratives *Target* für die Behandlung der Osteoporose. Durch Inhibierung von 17β -HSD2 werden die lokalen Konzentrationen von Estradiol (E_2) 6 und Testosteron (T) 2 erhöht, wie es bereits schon in einem *in vivo* Experiment an Langschwanzmakaken demonstriert werden konnte.^[101] Diese Ergebnisse konnten vor Kurzem auch an Experimenten an Ratten und Mäusen bestätigt werden.^[102,103]

2.3 Therapie in der Osteoporose

Für die Prävention der Osteoporose, bieten sich einige Angriffspunkte an. Um einer Osteoporose vorzubeugen, wird eine ausreichende Zufuhr an Calcium und Vitamin D empfohlen. Der Calcium- und Vitamin D-Bedarf kann über die Nahrung aufrecht erhalten werden. Lässt sich dies nicht realisieren, kann bei Bedarf auch auf Nahrungsergänzungsmittel zurückgegriffen werden. Vitamin D wird nur zu einem geringen Teil über die Nahrung aufgenommen (ca. 10-20%).^[104] Der Körper bildet selbst Vitamin D bei der Exposition an Sonnenlicht, die einen höheren Anteil ausmacht (80-90%).^[104] Ein weiterer positiver Effekt geht von körperlicher Aktivität aus. Dabei werden durch Bewegung die Osteoklasten angeregt und stimulieren den Knochenaufbau^[104,105] Um das Gleichgewicht zwischen Knochenabbau und Knochenbildung wieder herzustellen, gibt es verschiedene

Ansatzpunkte. Die anti-resorptive Therapie umfasst die Estrogensubstitution, den Einsatz von selektiven Estrogenrezeptor-Modulatoren (SERM) und Bisphosphonaten.^[106]

Estrogen für Hormonersatztherapie

Estrogene wurden in der Hormonersatztherapie ausführlich als Präventivmaßnahme gegen Osteoporose genutzt, da eine effektive Erhöhung der Knochendichte gewährleistet wird.^[107–109] Durch eine kombinierte Zugabe konjugierter Estrogene mit Medroxyprogesteroneacetat **14**, Mestranol **15** oder auch *Conjugated equine estrogens* (CEE) **16** (siehe Abbildung 8) wurde eine signifikante Reduktion der Hüftfrakturen demonstriert.^[108] Obwohl ein positiver Effekt auf die Mikroarchitektur und Knochendichte zu beobachten ist, treten kardiovaskuläre Krankheiten wie auch Brustkrebs als Nebenwirkung auf, wodurch diese Therapie nicht mehr akut verfolgt wird.^[110]

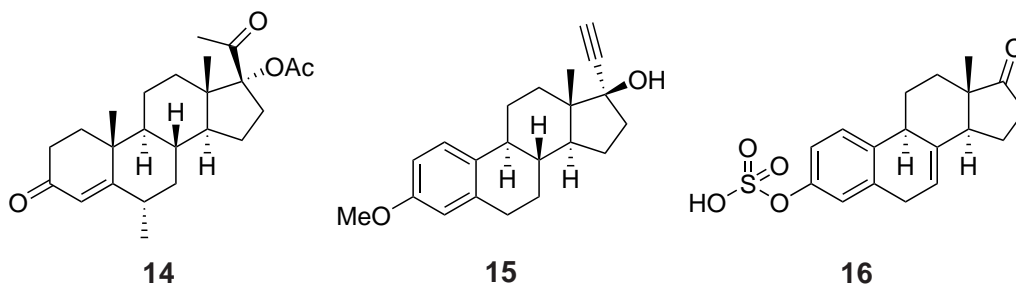


Abbildung 8: In der Vergangenheit eingesetzte Hormone in der Hormonersatztherapie.

SERM

Die Behandlung von Osteoporose mit selektiven Estrogenrezeptor-Modulatoren (SERMs) ist eine vielversprechende und oft genutzte Therapie.^[111] SERMs sind nichtsteroidale Verbindungen, die gewebespezifisch Interaktionen zeigen. Raloxifen **17** und Bazedoxifen **18** (siehe Abbildung 9) sind zugelassen für die Behandlung der postmenopausalen Osteoporose und wirken als Agonist anti-resorptiv an den Estrogenrezeptoren im Knochengewebe und beugen so den Knochenabbau vor.^[112–114] Sie wirken zusätzlich durch Antiestrogen-Effekte an Brustgewebe und Uterus^[115] Sie tragen nachweislich zu einer Absenkung des Knochenumbaus, einer Erhöhung der Knochendichte und zu einer Minimierung für Frakturen bei.^[111] Sie zeigen keine Nebenwirkungen an Brust- und Endometriumgewebe, jedoch erhöht die Applikation das Risiko für Hitzewallungen, Thromboembolien und Schlaganfälle.^[107,112,116] Zudem kommt es nach Absetzen der SERMs zu einem Verlust der Knochendichte auf den Ausgangswert der Therapie.^[117]

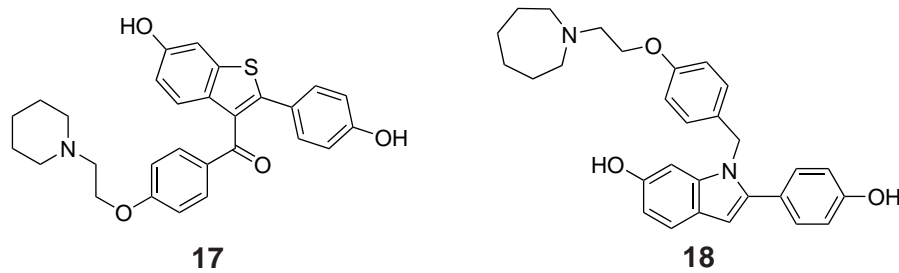


Abbildung 9: In der Vergangenheit eingesetzte Hormone in der Hormonersatztherapie.

RANKL

Osteoporose ist meist auf eine erhöhte Aktivität der Osteoklasten zurückzuführen.^[94] Einer der wichtigsten Aktivaktoren für die Osteoklastenaktivität ist der RANK-Ligand (RANKL: *Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand*).^[118,119] Für die Reifung und Überleben der Osteoklasten ist RANKL essentiell, da Osteoklasten-Vorläuferzellen an RANK Rezeptoren binden und die Ausdifferenzierung der Zellen bewirkt.^[120,121] RANKL wird durch Osteoprotegerin (OPG) reguliert. Osteoprotegerin (OPG) ist ein löslicher Rezeptor der RANKL reguliert, von Osteoblasten gebildet und sezerniert wird.^[122] Durch die Bindung an von OPG an RANKL wird dessen Wechselwirkung mit RANKL gehemmt und unterbindet die Bildung und Funktion von Osteoklasten.^[118,122] Eine Überexpression von OPG führt zu einer ausgeprägten Osteoporose, wie es experimentell an OPG *Knock out* Mäusen belegt werden konnte.^[122–124] Denosumab ist ein monoklonaler, vollhumaner IgG₂- Antikörper, der mit einer sehr hohen Spezifität an RANKL bindet, die Wechselwirkung mit RANKL hemmt und die Bildung, Funktion sowie das Überleben von Osteoklasten unterbindet.^[124] Denosumab Verringert das Risiko für vertebrale, nichtvertebrale und Hüftfrakturen. Nach der Absetzung einer durch Osteoporose angeordneten Zugabe von Denosumab, ist der Wachstum von Knochenmasse reversibel, wobei multiple Frakturen zu beobachten sind.^[125] Es wird empfohlen nach der monoklonalen Antikörpertherapie, die Reversibilität durch Zugabe von antiresorptiven Bisphosphonaten zu kompensieren.^[126]

Bisphosphonate

Entgegen des Wirkmechanismus von Denosumab, werden Bisphosphonate von Hydroxyapatit im Knochen gebunden und von Osteoklasten resorbiert.^[124,127] Dabei werden die Osteoklasten irreversibel in ihrer Funktion, durch Inhibierung der Isoprenylierung, gehemmt.^[127] Durch diese Inhibierung wird zwar die Funktion der Osteoklasten gehemmt, nicht aber deren Neubildung und inhibieren so das *Bone remodeling*.^[128] Zusätzlich wird die Apoptose von Osteoklasten gesteigert.^[114] Es stellt sich als ein besonderer Vorteil heraus, dass die antiresorptive Wirkung der Bisphosphona-

te nach einer Behandlung aufgrund der starken Bindungsaffinität zum Hydroxyapatit noch Jahre anhält.^[128] Einige Versuchsreihen zur peroralen (p. o.) und subkutanen (s. c.) Verabreichung sind bisher veröffentlicht und zeigen eine signifikante Reduzierung der Wirbel- und Knochenfrakturen.^[129,130] Alendronsäure **19** sowie Zoledronsäure **20** haben eine längere inhibierende Wirkungsdauer, die wohl möglich auf eine stärkere Bindungsaffinität zurückzuführen ist. Langzeitstudien in der Verabreichung von Alendronsäure **19**, Zoledronsäure **20** und Risedronsäure **21** (siehe Abbildung 10) an Frauen mit postmenopausaler Osteoporose, zeigen nach einer 10- bzw. 6-jährigen Therapie, dass das Frakturrisiko abnimmt und zu einer Verringerung von vertebrealen und nichtvertebralen Hüft- sowie Wirbelfrakturen führt.^[125,131,132] Ibandronsäure **22** zeigt eine ähnliche Reduktion von vertebrealen und nichtvertebralen Frakturen.^[114] Nachteilig wirkt sich die Zugabe von Bisphosphonaten in einer Ausbildung von atypischen Femurfrakturen (AFF), Kieferosteonekrosen (ONJ) oder Hypokalzämie aus.

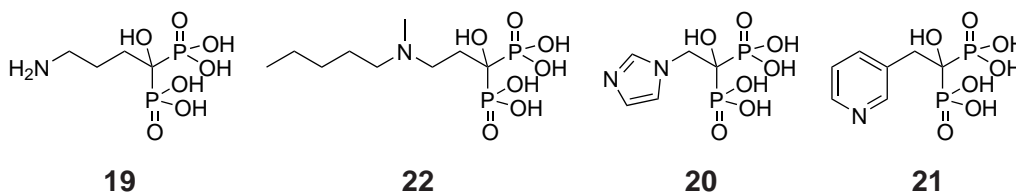
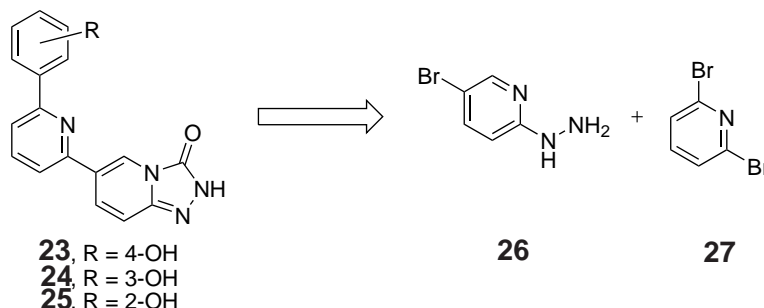


Abbildung 10: Wichtige Vertreter von Bisphosphonaten die eine nachweisliche und evidente Wirkung in der Osteoporosetherapie aufweisen.

3 Ziel der Arbeit

Synthetische Darstellung von nichtsteroidalen selektiven 17β -HSD14 Inhibitoren

Das Ziel der in diesem Kapitel beschriebenen Arbeit, befasste sich mit der synthetischen Darstellung von drei nichtsteroidalen potentiell selektiven 17β -HSD14 Inhibitoren (siehe Schema 3). Wie in der Einleitung bereits erwähnt, ist 17β -HSD14 in der Lage die Steroidhormonkonzentrationen von z.B. Estradiol (E_2) **6** und Testosteron (T) **2** gewebsspezifisch zu senken. Mit der Synthese der Zielmoleküle **23**, **24** und **25**, sollte die Grundlage für zukünftige biologische Experimente, und daraus resultierende strukturelle Optimierungen, geschaffen werden. Das Strukturmotiv eines Phenylpyridins verknüpft mit einem Triazolpyridinon ist bisher im Bezug zu 17β -HSD14 nicht Literatur bekannt. Der synthetische Zugang zu den Zielverbindungen **23**, **24** und **25**, sollte in einem konvergenten Ansatz, der auf das Pyridinylhydrazin **26** und dem Dibrompyridin **27** zurückzuführen ist, durchgeführt werden. Diese Arbeit erfolgte in einem wissenschaftlichen Konsens zwischen den Arbeitsgruppen AG HARTMANN, AG KLEBE und AG KOLB. Während sich mein Fokus auf den synthetischen Zugang gelegt hat, sollten alle anderen wichtigen physikochemischen Parameter von der Arbeitsgruppe AG KOLB bestimmt und evaluiert werden.



Schema 3: Ziel- (**23**, **24** und **25**) und Ausgangsverbindung (Pyridinylhydrazin **26**) der potentiell selektiven 17β -HSD14 Inhibitoren.

Synthetische Darstellung von nichtsteroidalen selektiven 17β -HSD2 Inhibitoren

Osteoporose ist eine schleichende Erkrankung der Knochenstruktur, die sich in einem Verlust der Knochendichte und Knochenstabilität widerspiegelt. Frauen in der Menopause sind besonders von dieser Krankheit betroffen, während dieses Krankheitsbild bei Männern aufgrund einer langsameren Abnahme der Steroidhormone später und milder in Erscheinung tritt. Ausschlaggebend für die postmenopausale Osteoporose ist ein erhöhter Knochenabbau, der auf das Einstellen des menstruellen Zyklus zurückzuführen ist. Für die Behandlung gegen Osteoporose wurden Medikamente (*Drugs*) entwickelt, die eine weitere Knochenresorption inhibieren. Ziel dieser Arbeit war es, basierend auf zurückliegenden Forschungsarbeiten der Arbeitsgruppe AG HARTMANN, 17β -HSD2 Inhi-

bitoren zu entwickeln, welche nicht nur die Knochenresorption inhibieren, sondern zeitgleich die Knochenbildung induzieren. Die Zielmoleküle sind in Abbildung 11 dargestellt. Durch die Inhibierung von 17β -HSD2 wird angenommen, dass die Steroidhormonkonzentrationen von Estradiol (E_2) **6** und Testosteron (T) **2** im Knochengewebe zunimmt. Durch die Inhibierung von 17β -HSD2 wird die Knochenresorption durch Osteoklasten gehemmt und die Bildung von Osteoblasten induziert.

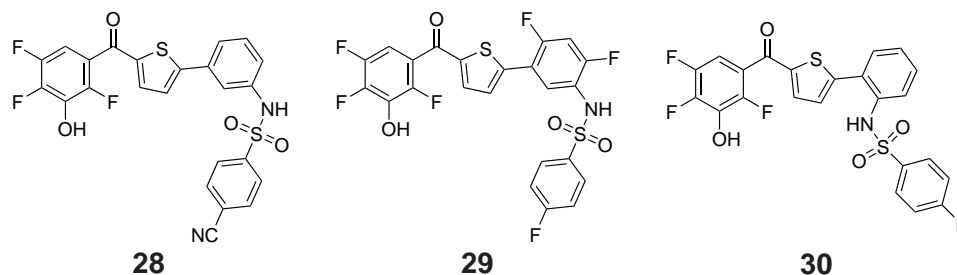


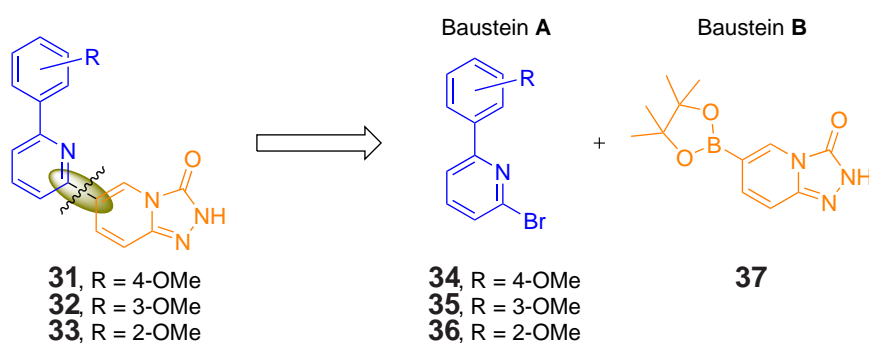
Abbildung 11: In dieser Arbeit beschriebene Inhibitoren **28**, **29** und **30**.

Die synthetisierten 17β -HSD2 Inhibitoren sollen im Anschluss in einer Kollaboration mit der Arbeitsgruppe AG VOLLMER (TU Dresden) in einem Tiermodel (Wistar-Hannover Ratten) getestet werden um die pharmakokinetischen Parameter zu bestimmen. Der Favorit soll im nächsten Tiermodel (Wistar-Hannover Ratten) über einem längeren Zeitraum verabreicht werden um den Heilungsprozess einer induzierten Osteoporose zu beobachten. Die nächste Aufgabe beschäftigt sich mit der Entwicklung einer Synthesestrategie für die Herstellung eines *Drug*, der auf den vorher eingesetzten 17β -HSD2 Inhibitor zurückzuführen ist. Diese Arbeit erfolgte in einem wissenschaftlichen Konsens zwischen den Arbeitsgruppen AG HARTMANN und AG VOLLMER (TU Dresden). Unser Fokus lag in der synthetischen Darstellung und Ermittlung der pharmakokinetischen Parameter des *Drugs* und der eingesetzten 17β -HSD2 Inhibitoren. Die Tierversuche wurden von unseren Kollaborationspartner der Arbeitsgruppe AG VOLLMER (TU Dresden) durchgeführt.

4 Ergebnisse und Diskussion

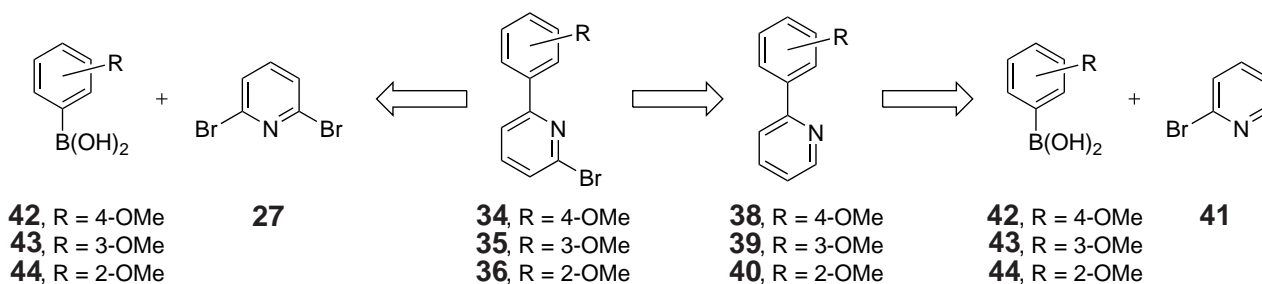
4.1 Synthetische Darstellung von nichtsteroidalen selektiven 17 β -HSD14 Inhibitoren

In einer retrosynthetischen Betrachtung, sollte das Grundgerüst der potentiellen 17 β -HSD14 Inhibitoren auf zwei Bausteine zurückgeführt werden. Wie in Schema 4 abgebildet, wurde ein C-C-Bindungsschnitt zwischen den beiden Heterozyklen geplant. Um die Bausteine **A** und **B** miteinander zu verknüpfen, bieten sich eine Reihe von Palladium katalysierten Kreuzkupplungsreaktionen wie z.B. nach SONOGASHIRA, STILLE oder auch NEGISHI an. Reaktionen nach SUZUKI und MIYAUURA sind die bisher am weitesten entwickelten Kreuzkupplungsreaktionen, die eine effektive als auch robuste Kupplungsreaktion von Arylboronsäuren mit heterozyklischen Bromidverbindungen darstellen. Sie tolerieren eine Reihe von funktionellen Gruppen und können bei sehr milden Bedingungen durchgeführt werden.^[133,134]



Schema 4: Geplanter Bindungsbruch in der retrosynthetischen Betrachtung.

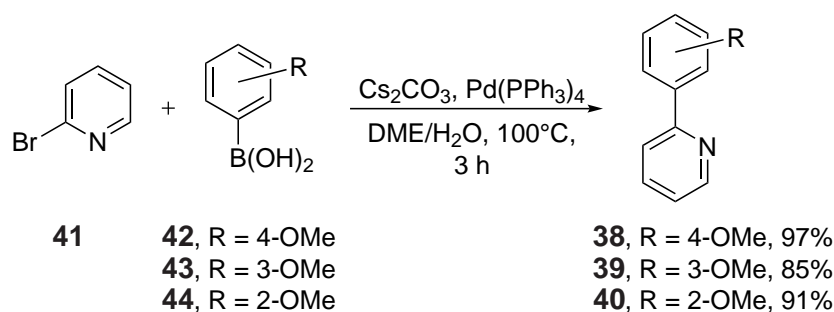
Der synthetische Zugang zu den Phenylbrompyridinen (Baustein A) wurde über zwei Syntheserouten geplant. Grund dafür liefert ein mögliches Selektivitätsproblem, das auf eine Doppeladdition zurückzuführen ist. Es wurde primär versucht, die Bausteine A über die Phenylpyridine **38**, **39** und **40** in einer Kreuzkupplung nach SUZUKI MIYAUURA mit Monobrompyridin **41** in zwei Schritten darzustellen (Schema 5). Im Anschluss war angedacht, in der α -Position des Pyridins ein Bromidsubstituent einzuführen.



Schema 5: Zwei geplante Syntheserouten um die gewünschten Phenylbrompyridine **34**, **35** und **36** zu erhalten.

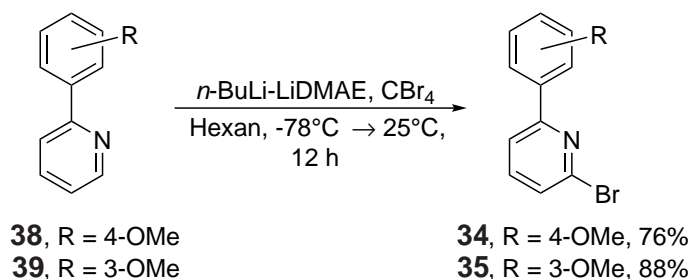
Die Phenylpyridine **38**, **39** und **40** konnten in einer klassischen Kreuzkupplung, beschrieben nach

SUZUKI und MIYAUURA in exzellenten Ausbeuten von 85-97% durchgeführt werden.^[135,136]



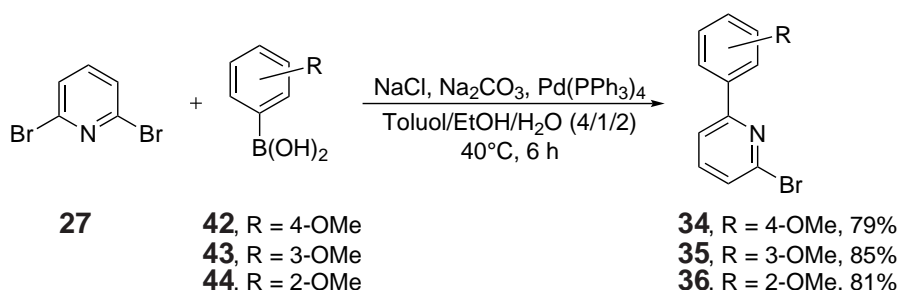
Schema 6: Palladium katalysierte SUZUKI MIYAUURA Kupplung am Brompyridin **41** um Phenylbromopyridine **38**, **39** und **40** zu erhalten.

Im nächsten Schritt konnte in der α -Position des Pyridins ein Bromidsubstituent eingeführt werden. Ausschlaggebend für den Erfolg dieser Reaktion war der Einsatz der Superbase *n*-Buli-LiDMAE und die hohe Azidität des α -Proton am Pyridin.^[137] Andere Basen wurden getestet, jedoch blieb der Erfolg aus, oder die Ausbeuten waren nicht zufriedenstellend. Angemerkt sei, dass die Reaktion von Phenylpyridin **40** zur Bromverbindung **36** nicht beobachtet wurde. Ein Grund könnte die räumliche Nähe der Methylether sein, die eine Art Li-Aggregat mit dem Pyridin-Stickstoff ausbildet.^[137,138]



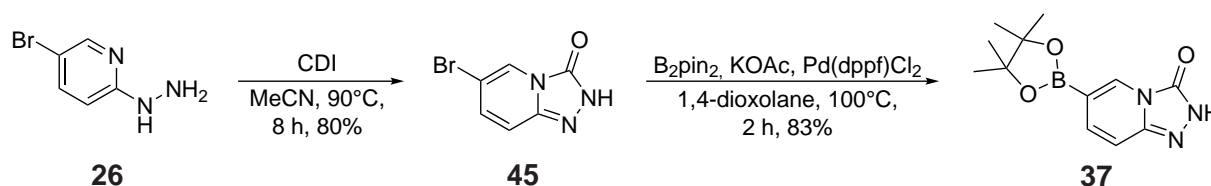
Schema 7: Direkte Ring selektive α -Lithierung und anschließende Umsetzung mit CBr_4 als Elektrophil zu den gewünschten Phenylbromopyridinen **34** und **35**.

Da für den Vergleich der verschiedenen Substitutionsmuster unbedingt Bromverbindung **36** hergestellt werden sollte, wurde der Syntheseweg auf eine Kreuzkupplung nach SUZUKI und MIYAUURA mit Dibrompyridin **27** abgeändert um Baustein **A** in einem Schritt darzustellen. Die Bindungsknüpfung konnte in einer Palladium katalysierten SUZUKI MIYAUURA Kupplungsreaktion, beschrieben von MIGNARD *et al.*, durchgeführt werden (Schema 8).^[139] In dieser Publikation wurden die experimentellen Parameter untersucht, in der die Monokupplung bevorzugt abläuft. Die gleichen Parameter wurden genutzt und so die Brompyridine **34**, **35** und **36** in guten Ausbeuten (79-85%) zu erhalten.^[139]



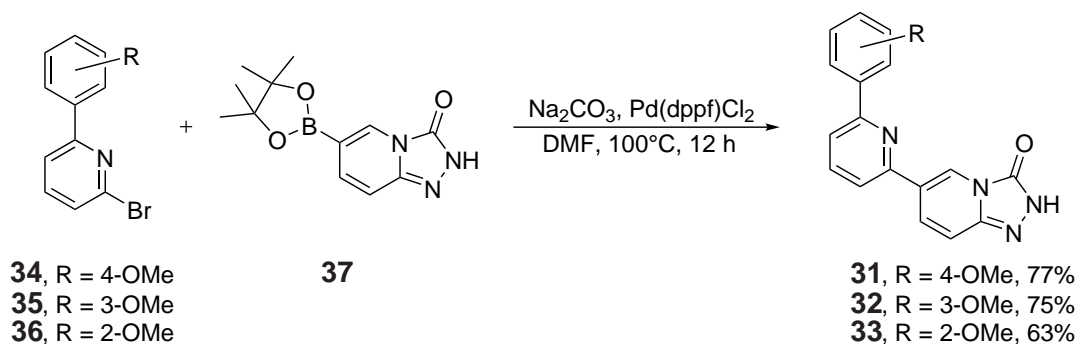
Schema 8: Selektive Palladium katalysierte SUZUKI MIYAUURA Monokupplung am symmetrischen Dibromopyridin **27** um Phenylbromopyridine **34**, **35** und **36** zu erhalten.

Um im Baustein **B** die Triazolfunctionalität aufzubauen, wurde ausgehend vom Hydrazinopyridin **26** in einer CDI vermittelten Carbonylierung (siehe Schema 9), das Pyridin-3-on **45** in einer exzellenten Ausbeute von 80% hergestellt.^[140] Die Fertigstellung von Pinakolboran **37** (Baustein **B**) konnte in einer Palladium katalysierten SUZUKI MIYAUURA Reaktion ausgehend vom Bromverbindung **45** mit 83%iger Ausbeute synthetisiert werden.^[141,142]



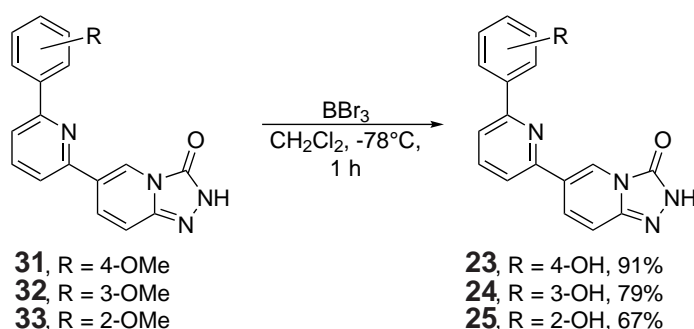
Schema 9: CDI vermittelte Carbonylierung von Hydrazinopyridin **26** zu Pyridin-3-on **45**. Einführung eines Pinakolborans in einer Palladium katalysierten SUZUKI MIYAUURA Reaktion.

Nach Fertigstellung beider Bausteine **A** und **B** sollten diese miteinander verknüpft werden. Die Palladium katalysierte SUZUKI MIYAUURA Reaktion bietet sich an dieser Stelle ebenfalls an, jedoch konnten durch Verwenden der Bedingungen die in Schema 8 und Schema 6 (Pd(0) als Katalysator) gewählt wurden, nicht die gewünschten Kupplungsprodukte erhalten werden. ARTERBURN *et al.* haben sich ebenfalls mit der Synthese verschiedener Pyridin-2-ylhydrazine in einer SUZUKI MIYAUURA Reaktion beschäftigt und konnten demonstrieren, das mit 1,1-bis(diphenylphosphino)ferrocene (dppf) als Ligand, Pd(II) eine herausragende Katalysatoralternative darstellt.^[134,143-145] Die Kupplungsprodukte **31**, **32** und **33** konnten in guten Ausbeuten von 63-77% (siehe Schema 10) synthetisiert werden.



Schema 10: Palladium katalysierte SUZUKI MIYAUURA Kupplung am Pinakolester **37** um die Kupplungsprodukte **31**, **32** und **33** zu erhalten.

Im letzten Schritt der Synthesesequenz wurden die Methyletherfunktionen mit Bortribromid BBr_3 gespalten und die gewünschten Zielverbindungen **23**, **24** und **25** in guten Ausbeuten von 67-91% dargestellt werden. Für weitere Untersuchungen wurden die finalen Produkte der Arbeitsgruppe AG KOLB übergeben, um weitere Experimente durchzuführen.



Schema 11: LEWIS Säure induzierte Methyletherspaltung zu den gewünschten Zielverbindungen.

Alle in Abbildung 12 abgebildeten nichtsteroidalen potentielle 17β -HSD14 Inhibitoren konnten in sehr guten Ausbeuten dargestellt werden. Für weitere Untersuchungen und zum erfassen weiterer physikochemischer Daten, wurden die Verbindungen an den Arbeitskreis AG KOLB übergeben.

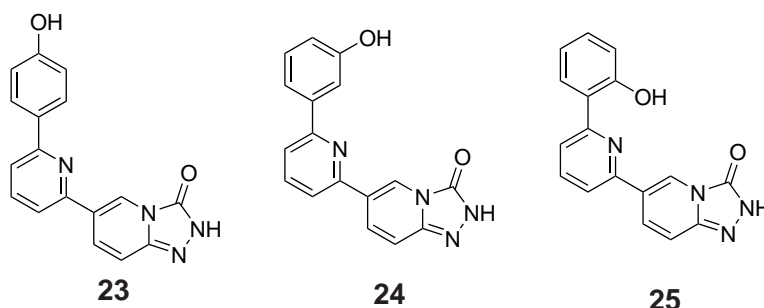


Abbildung 12: Synthetische Darstellung von 3 nichtsteroidalen selektiven 17β -HSD14 Inhibitoren.

4.2 Synthetische Darstellung von nichtsteroidalen selektiven 17 β -HSD2 Inhibitoren

Das Ziel und wissenschaftliche Interesse der in diesem Kapitel beschriebenen Arbeit beschäftigt sich mit der synthetischen Darstellung von drei nichtsteroidalen potentiell selektiven 17 β -HSD2 Inhibitoren, die zum einen die Knochenbildung induzieren und zum anderen die Knochenresorption inhibieren. Die Auswahl eines geeigneten Kandidaten als Inhibitor gegenüber 17 β -HSD2 lässt sich auf einige Publikationen zurückführen^[102,146,147]. Den für den Auswahlprozess entscheidenden wissenschaftlichen Beitrag konnten ABDELSAMIE *et al.* erbringen, in dem pharmakologische sowie pharmakokinetische Parameter ermittelt, als auch Synthesestrategien entwickelt wurden.^[147] Um einen geeigneten Kandidaten zu entwickeln, muss dieser gewisse Kriterien erfüllen. Dazu gehört eine ausreichende orale Bioverfügbarkeit sowie metabolische Stabilität. Zusätzlich muss dieser den LIPINSKI's „rule of five“ entsprechen.^[148] Darüber hinaus wurden diese Kandidaten hinsichtlich ihrer inhibitorischen und pharmakologischen Eigenschaften gegenüber 17 β -HSD2 *in vivo* getestet und evaluiert. In einer retrosynthetischen Betrachtung, sollte das Grundgerüst auf vier Bausteine zurückgeführt werden. Wie in Abbildung 13 gezeigt, wurde ein C-C-Bindungsschnitt zwischen Carbonyl und Thiophenyl (Gelb) angedacht. Der zweite Schnitt wurde zwischen Thiophenyl und Aryl (Blau) geplant. Das Sulfonamid sollte über das Sulfonsäurechlorid (Grün) dargestellt und der Inhibitor im letzten Schritt durch Spaltung der Methylether (Rot) fertiggestellt werden.

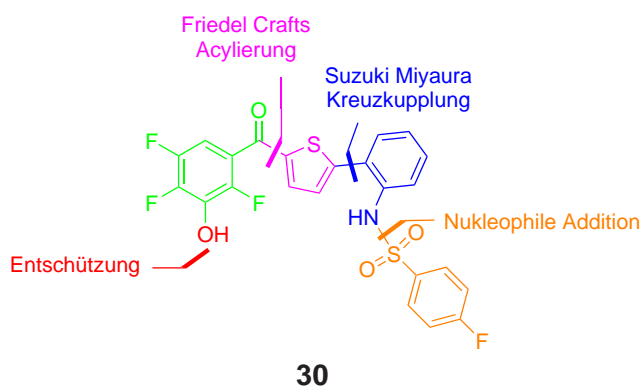
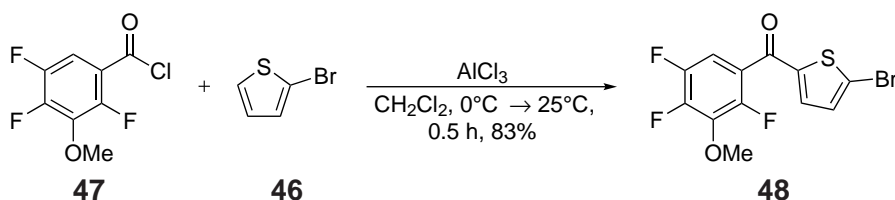


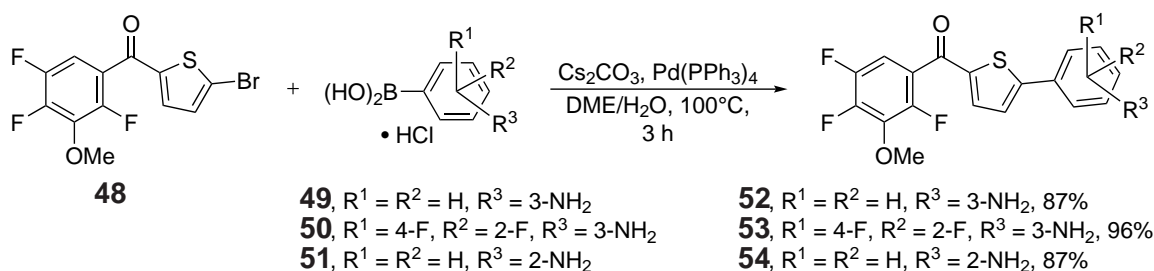
Abbildung 13: Geplante Bindungsbrüche in der retrosynthetischen Betrachtung am Beispiel von 17 β -HSD2 Inhibitor 30.

Im ersten Schritt wurde das Bromthiophen **46** mit dem Benzoylchlorid **47** in einer FRIEDEL CRAFTS Acylierung zum Benzoylthiophen **48** in einer sehr guten Ausbeute von 83% dargestellt (siehe Schema 12). Die Methode konnte im Bezug auf die Reaktionsparameter dahingehend optimiert werden, dass die Reaktion im Multigramm-Maßstab (> 60 g, bezogen auf Benzoylchlorid **47**) durchgeführt und Benzoylthiophen **48** durch Kristallisation aus Methanol aufgereinigt werden konnte.



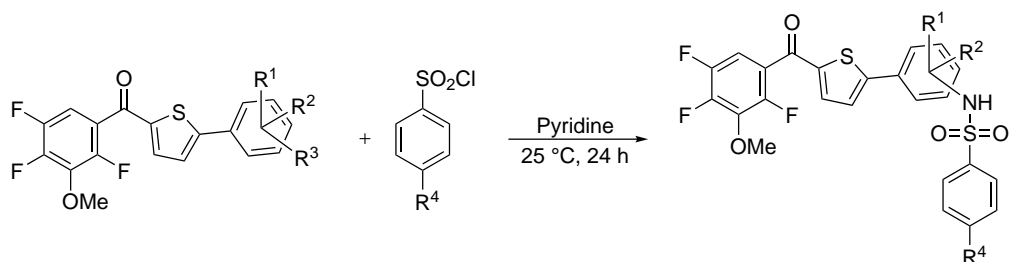
Schema 12: FRIEDEL CRAFTS Acylierung von Bromthiophen **46** an Benzoylchlorid **47** zum Benzoylthiophen **48**.

Der Baustein **48** wurde im Anschluss mit drei unterschiedlichen Phenylboronsäuren **49**, **50** und **51** in einer SUZUKI MIYAUURA Kupplung zu den Anilinen **52**, **53** und **54** in sehr guten Ausbeuten umgesetzt (siehe Schema 13). Hier wurden ebenfalls durch Adjustierungen der Reaktionsparameter die SUZUKI MIYAUURA Kupplung dahingehend optimiert, dass z.B. die Reaktion an **51** mit dem Baustein **48** zum Anilin **54** ebenfalls im Multigramm-Maßstab (> 40 g, bezogen auf Baustein **48**), in exzellenter Ausbeute von 87% durchgeführt werden konnte. Die Aufreinigung erfolgte in diesem Fall durch Umkristallisation aus Cyclohexan.



Schema 13: Zusammenfassung der Ergebnisse aus der SUZUKI MIYAUURA Kupplung der Boronsäuren **49**, **50** und **51** an Baustein **48** zu den Anilinen **52**, **53** und **54**.

Im Folgenden wurden die freien Aminfunktionen der Aniline **52**, **53** und **54** mit den Sulfonsäurechloriden **55** und **56** zu den korrespondierenden Sulfonsäureamiden **57**, **58** und **59** umgesetzt (siehe Schema 14). Die Reaktionsparameter wurden in diesem Schritt der Synthesesequenz ebenfalls optimiert, so dass auch hier die Reaktion im Multigramm-Maßstab (> 35 g, bezogen auf Baustein **54**), in exzellenter Ausbeute von 98% durchgeführt werden konnte. Die Aufreinigung erfolgte durch Umkristallisation aus Methanol.



52, R¹ = R² = H, R³ = 3-NH₂

53, R¹ = 4-F, R² = 2-F, R³ = 3-NH₂

54, R¹ = R² = H, R³ = 2-NH₂

55, R⁴ = CN

56, R⁴ = F

57, R¹ = R² = H, R³ = 3-NH₂, R⁴ = CN, 93%

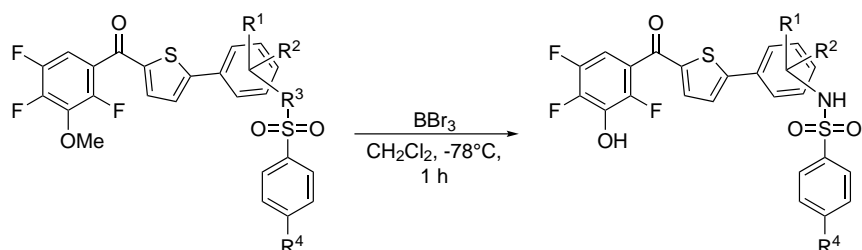
58, R¹ = 4-F, R² = 2-F, R³ = 3-NH₂, R⁴ = F, 98%

59, R¹ = R² = H, R³ = 2-NH₂, R⁴ = F, 98%

Schema 14: Zusammenfassung der Ergebnisse aus der Addition der Aniline **52**, **53** und **54** an die Sulfonsäurechloride **55** und **56** zu den korrespondierenden Sulfonsäureamiden **57**, **58** und **59**.

Im finalen Schritt dieser Synthesesequenz wurden die *Precursor* **57**, **58** und **59** zu den 17 β -HSD2 Inhibitoren **28**, **29** und **30** in einer LEWIS Säure (BBr₃) vermittelten Demethylierung umgesetzt (siehe Tabelle 2). Die Reaktionsparameter wurden in diesem Schritt der Synthesesequenz ebenfalls optimiert, so dass auch hier die Reaktion im Multigramm-Maßstab (> 20 g, bezogen auf Baustein **59**), in exzellenter Ausbeute von 97% durchgeführt werden konnte. Die Aufreinigung erfolgte durch Umkristallisation aus Toluol. Der 17 β -HSD2 Inhibitor **30** konnte in der linearen Synthese in einer Gesamtausbeute von 69% dargestellt werden.

Tabelle 2: Zusammenfassung der Ergebnisse der LEWIS Säure (BBr₃) vermittelten Demethylierung der *Precursor* **57**, **58** und **59** zu den 17 β -HSD2 Inhibitoren **28**, **29** und **30**.



57, R¹ = R² = H, R³ = 3-NH₂, R⁴ = CN

58, R¹ = 4-F, R² = 2-F, R³ = 3-NH₂, R⁴ = F

59, R¹ = R² = H, R³ = 2-NH₂, R⁴ = F

28, R¹ = R² = H, R³ = 3-NH₂, R⁴ = CN, 93%

29, R¹ = 4-F, R² = 2-F, R³ = 3-NH₂, R⁴ = F, 94%

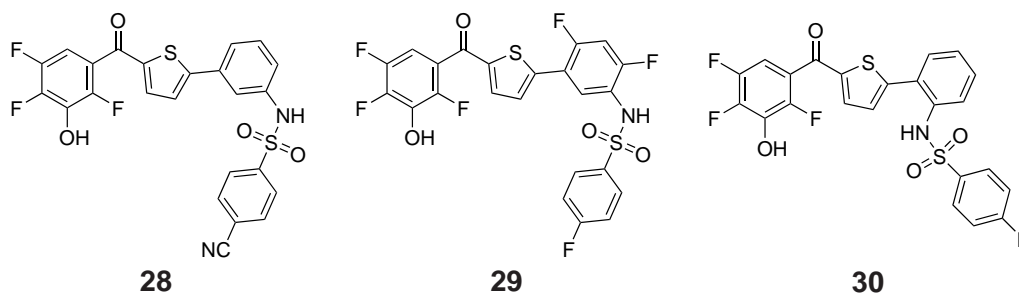
30, R¹ = R² = H, R³ = 2-NH₂, R⁴ = F, 97%

| Amid | R ¹ | R ² | R ³ | R ⁴ | Produkt | Ausbeute [%] |
|-----------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------|--------------|
| 57 | H | H | 3-NH- | CN | 28 | 93 |
| 58 | 2-F | 4-F | 3-NH- | F | 29 | 94 |
| 59 | H | H | 2-NH- | F | 30 | 97 |

4.3 Pharmakokinetische Evaluierung der 17 β -HSD2 Inhibitoren

Die 17 β -HSD2 Inhibitoren **28**, **29** und **30** sind von einer Grundstruktur abgeleitet, die bereits als 17 β -HSD2 und 17 β -HSD1 Inhibitor beschrieben wurde.^[102,146,149,150] Es wurde untersucht, ob gewisse

Strukturveränderungen einen Einfluss auf die pharmakologischen Eigenschaften haben. Diese Untersuchungen wurden in unserer Arbeitsgruppe AG HARTMANN durchgeführt und mündeten in einer Publikation.^[147] Die in der *Structure activity Relationship* (SAR) gewonnen Erkenntnisse zeigen auf, dass die phenolische Hydroxygruppe sich als essentiell für die Aktivität gegenüber 17 β -HSD2 darstellt.^[147] Gleiches gilt für die Fluorsubstituenten, die eine bedeutende pK_s-Absenkung der phenolischen Hydroxygruppe hervorrufen und zusätzlich eine wichtige Rolle bei der Selektivität gegenüber 17 β -HSD1 einnehmen.^[102,147] Zudem nehmen sie eine übergeordnete Rolle in der metabolischen Stabilität ein.^[147] Der 17 β -HSD2 Inhibitor **28** hat eine sehr hohe metabolische Stabilität mit einer Halbwertszeit (t_{1/2}) von 42 min in der humanen Leber S9 Fraktion (*hS9*). Bemerkenswert ist die noch höhere Stabilität in der Maus Leber S9 Fraktion (*mS9*) von über > 120 min (siehe Tabelle 3). In ihrer Kernstruktur unterscheiden sich die Inhibitoren **28** und **29** nicht merklich. In der 2,4-Position im Thiophen-2-ylphenyl-Fragment von Inhibitor **29** sind Fluorsubstituenten eingebaut. In gleicher Position sind die anderen Inhibitoren **28** und **30** mit Wasserstoffen substituiert. Zudem weist Inhibitor **28** in *para* Stellung ein Nitril auf, wobei in gleicher Position bei Inhibitor **29** ein Fluor vorhanden ist. Durch diese Strukturabänderungen konnte eine Verbesserung der Selektivität gegenüber 17 β -HSD2 und eine Erhöhung der metabolischen Stabilität im Vergleich zu **28** (t_{1/2} in *hS9* von 55 min) erreicht werden. Die pharmakokinetischen Daten konnten durch Entfernen der beiden Fluorsubstituenten und eine Verschiebung des Benzulfonamids in *ortho*-Stellung zum Thiophenylfragments nochmals verbessert werden. In der Folge wurde die Selektivität von 3,5 (**28**) auf 7,5 (**30**) und die metabolische Stabilität mit einer Halbwertszeit (t_{1/2}) von 42 min (**28**) auf 66 min (**30**) verbessert.

Tabelle 3: Zusammenstellung der pharmakologischen Daten.^[147]

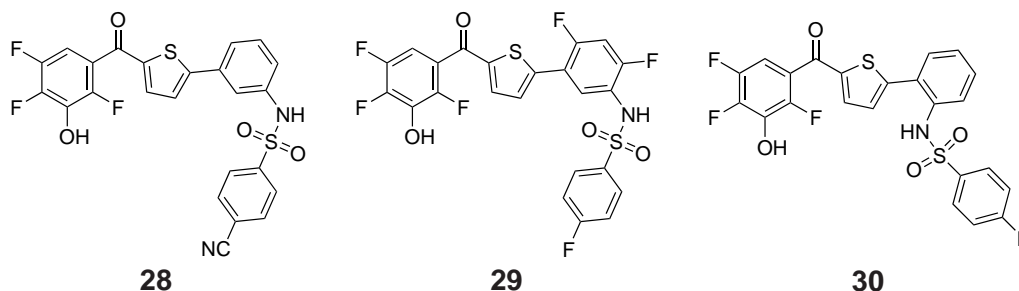
| Inhibitor | IC ₅₀ [nM] ^a | | IC ₅₀ [nM] ^a | | Inh @ 1 μM [%] ^a | |
|-----------|------------------------------------|-------------------|------------------------------------|-------------------|-----------------------------|-------------------|
| | <i>h</i> 17β-HSD2 | <i>h</i> 17β-HSD1 | <i>m</i> 17β-HSD2 | <i>m</i> 17β-HSD1 | <i>m</i> 17β-HSD2 | <i>m</i> 17β-HSD1 |
| 28 | 2.9 | 10.1 | 25 | | 43 | |
| 29 | 0.6 | 3.9 | 32 | | 19 | |
| 30 | 6.1 | 45.8 | 22 | | 80 | |

| s.f. ^b | t _{1/2} [min] ^c | | K ^d | | M [g/mol] ^e | HD ^e | HA ^e | Löslichkeit _{Aq.} ^e |
|-------------------|-------------------------------------|-------------|----------------|-------|------------------------|-----------------|-----------------|---|
| | <i>h</i> S9 | <i>m</i> S9 | cLogP | cLogD | | | | |
| 3.5 | 42 | > 120 | 4.46 | 2.16 | 514 | 2 | 6 | > 200 μM |
| 6.5 | 55 | 75 | 4.8 | 2.86 | 543 | 2 | 5 | > 200 μM |
| 7.5 | 66 | 61 | 5.03 | 3.01 | 507 | 2 | 5 | > 200 μM |

^aMittelwert von mindestens zwei Messungen mit einer relativen Standardabweichungen $\sigma_{Rel.} < 20\%$. Die Finalkonzentrationen von Estron (E₁) **5** und Estradiol (E₂) **6** in *h*17β-HSD1 und *h*17β-HSD2 betragen jeweils 500 nM und jeweils 10 mM in *m*17β-HSD1 und *m*17β-HSD2 respektive. ^bs.f.: Selektivitätsfaktor = $hIC_{50}(17\beta\text{-HSD1})/hIC_{50}(17\beta\text{-HSD2})$. ^cPooled Humane oder Maus Leber S9 Fraktion (1 mg/mL), 2 mM Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADP), 1 mM Uridin-5'-diphosphoglucuronsäure (UDPGA), 0.1 mM 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) und 1 μM **28**, **29** und **30** bei 37 °C. ^dBerechnete Verteilungskoeffizienten Log P und Log D bei pH 7.4 mit ACD/Labs Software. ^eM: Molekulargewicht, HD: Anzahl Wasserstoffdonator. HA: Anzahl Wasserstoffakzeptor. Die wässrige Löslichkeit wurde in einer Phosphat gepufferten physiologischen Kochsalzlösung bei pH 7.2 und 2% Dimethylsulfoxid (DMSO) bestimmt.

Unter Berücksichtigung das der zelluläre IC₅₀ von *h*17β-HSD2 um einen Faktor von 8-16 größer ist, als der IC₅₀ von *h*17β-HSD2 in einem zellfreien *Assay*, könnten die Plasmaspiegel der 17β-HSD2 Inhibitoren **28**, **29** und **30** womöglich nicht ausreichend sein.^[147,151] Im Nachgang wurde untersucht, wie sich die Inhibitoren in einem Rattenmodell verhalten. Dafür wurden zuerst die IC₅₀ Werte gegenüber Ratten *r*17β-HSD2, resp. *r*17β-HSD1 ermittelt und die metabolische Stabilität in unserer Arbeitsgruppe AG HARTMANN untersucht. Wie die Daten aus Tabelle 4 aufzeigen, sind die Inhibitoren **28**, **29** und **30** sehr potent gegenüber *r*17β-HSD2 und weisen eine ausreichend hohe metabolische Stabilität (t_{1/2}) in der Ratten Leber S9 Fraktion (*r*S9) auf.

Tabelle 4: Inhibition von $r17\beta$ -HSD2 und $r17\beta$ -HSD1 sowie metabolische Stabilität von 17β -HSD2 Inhibitor **28**, **29** und **30** in $rS9$.^[147]



| Cpd | IC ₅₀ [nM] ^a | | t _{1/2} [min] ^b |
|-----------|------------------------------------|------------------|-------------------------------------|
| | $r17\beta$ -HSD2 | $r17\beta$ -HSD1 | $rS9$ |
| 28 | 10 | 1334 | 60 |
| 29 | 9 | 388 | 60 |
| 30 | 10 | 9 | 92 |

^aMittelwert von mindestens zwei Messungen mit einer relativen Standardabweichungen $\sigma_{Rel.} < 20\%$. Die Finalkonzentrationen von Estron (E_1) **5** und Estradiol (E_2) **6** in $r17\beta$ -HSD1 und $r17\beta$ -HSD2 betragen jeweils 10 nM.^bRatten Leber S9 Fraktion (1 mg/mL), Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADP), Uridin-5'-diphosphoglucuronsäure (UDPGA) und 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS).

Im Anschluss wurde in einer Kollaboration mit der Arbeitsgruppe AG VOLLMER (TU Dresden), eine pharmakokinetische Untersuchung mit den 17β -HSD2 Inhibitoren **28**, **29** und **30** durchgeführt. Die Verabreichung der Substanzen erfolgte peroral an Wistar-Hannover Ratten in einer Dosis von 50 mg/kg Körpergewicht pro Tier (n = 5). Als Vehikel wurde Erdnussbutter verwendet.^[152] Nach peroraler Verabreichung konnten wir in den ersten Pilotversuchen über einen längeren Zeitraum noch sehr hohe Plasmaspiegel ermitteln. Bis zur höchsten Konzentration (10 μ M) hat keiner der Inhibitoren agonistische oder antagonistische Aktivität am Estrogen Rezeptor α (ER α) gezeigt.^[147] Wie aus Abbildung 14 entnommen werden kann, zeigt Inhibitor **30** (rot) einen enorm hohen Plasmaspiegel. Selbst nach 24 h war ein ausreichend hoher Plasmaspiegel zu beobachten, verglichen mit dem IC₅₀ von 10 nM $r17\beta$ -HSD2 aus Tabelle 4.

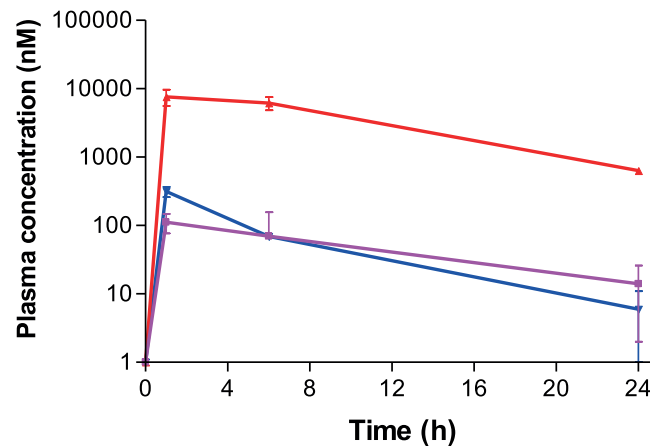


Abbildung 14: Pharmakokinetische Profile der 17β -HSD2 Inhibitoren **28** (blau), **29** (lila) und **30** (rot) nach oraler Verabreichung an Wistar-Hannover Ratten. Die Inhibitoren wurden in Erdnussbutter suspendiert und in einer Konzentration von 50 mg/kg Körpergewicht. Plasmaproben wurden nach 1, 6 und 24 Stunden entnommen. Bei den dargestellten Daten handelt es sich um Mittelwerte \pm Standardabweichung. Diese Abbildung wurde aus ABDELSAMIE *et al.* adaptiert.^[147] Die Erlaubnis zur Veröffentlichung dieser Abbildung in meiner Doktorarbeit wurde durch das Journal gegeben.

Der 17β -HSD2 Inhibitor **30** hat sich gegenüber Verbindung **28** und **29** in einer *Structure activity Relationship* (SAR) durchgesetzt, zeigt ein vielversprechendes pharmakokinetisches Profil und hat sich dadurch als vielversprechender Kandidat hervorgehoben.^[147] Im Anschluss wurde der 17β -HSD2 Inhibitor **30** in einer Kollaboration mit AG VOLLMER (TU Dresden) einem Tierversuch unterzogen, in dem der Knochenaufbau an Ovariectomie induzierter Osteoporose in einem Tiermodell (Wistar-Hannover Ratten) untersucht wurde.^[103,147] Der Inhibitor **30** wurde in einer täglichen Dosis von 2 mg/kg Körpergewicht über einen Zeitraum von 8 Wochen nach der Ovariectomie verabreicht. Der Effekt der Ovariectomie auf die Struktur der *Tibia* und der *Bone sparing effect* von Inhibitor **30** nach 8 Wochen ist in Abbildung 15 dargestellt. Obwohl die *Tibia* der Kontrollgruppe (Linkes Drittel in Abbildung 15) eine dichte trabekuläre Struktur aufweist (Gelbe Pfeile), ist in der *Tibia* der Ratten, an denen eine Ovariectomie durchgeführt wurde (Mittleres Drittel in Abbildung 15), ein signifikanter Schwund an Knochenmaterial und trabekulärer Struktur zu beobachten. Eine Verabreichung von 17β -HSD2 Inhibitor **30** hatte einen positiven Effekt (Gelbe und rote Pfeile) auf die trabekuläre Struktur und den Knochenaufbau (Rechtes Drittel in Abbildung 15). Wie in Abbildung 15 dargestellt, konnte bewiesen werden, dass eine Verabreichung über einen längeren Zeitraum (8 Wochen) von 17β -HSD2 Inhibitor **30** zu einem Aufbau der trabekulären Struktur und der Knochenmasse führt.



Abbildung 15: Darstellung des *Bone sparing effect* nach Verabreichung von 17β -HSD2 Inhibitor **30** in einem Tiermodell (Wistar-Hannover Ratten) nach einer täglichen Dosierung von 2 mg/kg Körpergewicht über einen Zeitraum von 8 Wochen. Abgebildet ist die *Tibia* der Kontrollgruppe (Control: *Sham surgery*, Schein operiert), der ovariectomierten Gruppe (ovx: ovariectomized) und der ovariectomierten Gruppe + Verabreichung von 17β -HSD2 Inhibitor **30** (ovx + Inhibitor: ovariectomized + **30**). Nach 8 Wochen Studiendauer wurden die Ratten getötet und die *Tibia* entfernt. Aus der *Tibia* wurden repräsentative Scheiben geschnitten und die Struktur mit einem μ CT aufgenommen. Die gelben Pfeile deuten auf die trabekuläre Struktur. Die roten Pfeile deuten auf die Kavitäten und den Verlust der trabekulären Struktur hin. Dieses Bild wurde aus ABDELSAMIE *et al.* entnommen und bearbeitet.^[147] Die Erlaubnis zur Veröffentlichung dieser Abbildung in meiner Doktorarbeit wurde durch das Journal gegeben.

4.4 Synthetische Darstellung eines *Drugs*

Das nächste Ziel bestand darin, aus dem 17β -HSD2 Inhibitor **30** ein *Drug* herzustellen. Dabei soll der aktive 17β -HSD2 Inhibitor **30** in eine inaktive Form (*Drug*) überführt werden. Die Freisetzung des aktiven Wirkstoffes soll lokal am Knochengewebe erfolgen. Da der 17β -HSD2 Inhibitor **30** keine Affinität zum Knochenmaterial aufweist, muss die Struktur von 17β -HSD2 Inhibitor **30** modifiziert werden. Durch Einführen einer Bisphosphonat-Einheit, wird eine hohe Affinität zur Knochenstruktur gewährleistet. Nach erfolgreicher Bindung, wird der 17β -HSD2 Inhibitor **30** enzymatisch aus dem *Drug* freigesetzt und entfaltet seine Wirkung lokal am Knochengewebe. Aufgrund dieser Affinität sollten die Plasmaspiegel niedrig sein, so dass eine evtl. Hemmung von 17β -HSD2 in anderen Geweben nur eine untergeordnete Rolle einnimmt (siehe Abbildung 16).

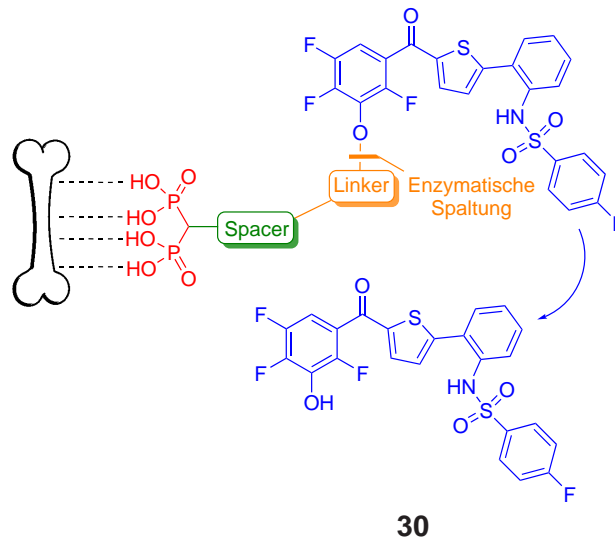
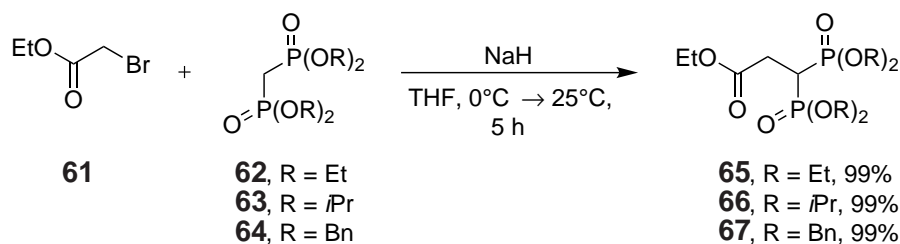


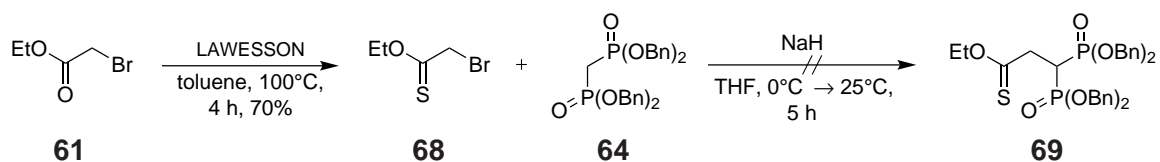
Abbildung 16: Schematische Darstellung der lokalen Freisetzung des 17β-HSD2 Inhibitor 30.

Damit die Erforschung eines passenden *Designs* nicht am Inhibitor 30 durchgeführt werden muss, wurde Difluorphenol 60 als Modellverbindung verwendet. Das Difluorphenol 60 weist Ähnlichkeit zum Inhibitor 30 aufgrund der zwei Fluoratome in *ortho*-Stellung auf. Daraus sollte eine ähnliche Aktivierung der Hydroxyfunktion resultieren, die sich als essentiell für eine Bindung im aktiven Zentrum erwiesen hat. Im Zuge dessen wurde evaluiert, inwieweit ein *Linker* und ein *Spacer* eingebaut werden muss und wie komplex diese in ihrer chemischen Struktur sein müssen. Es muss sichergestellt sein, dass die neu eingeführte Funktionalität die Freisetzung des aktiven Inhibitor 30 gewährleistet. Dafür muss eine Funktionalität eingeführt werden, die es erlaubt den aktiven Inhibitor 30 freizusetzen. Esterfunktionen bieten sich an, da Esterasen im Körper zu genüge vorhanden sind und diese enzymatisch spalten können. Ziel war es, dass das *Drug* oral eingenommen werden kann, und nach Durchlaufen diverser Kompartimente am Knochenmaterial bindet. Esterasen, die sich in den Osteoklasten befinden, sollen dann das aktive *Drug* 30 freisetzen. Ziel der ersten Synthesesequenz war es, die Strukturen weitestgehend unkompliziert zu lassen, mit dem Hintergedanken, dass die Syntheseschritte auf unseren Inhibitor 30 übertragen werden müssen. Als *Binder* am Knochenmaterial war eine Bisphosphonsäure-Funktion vorgesehen, die stark an Hydroxyapatit bindet. Als *Linker* war eine Esterfunktion und eine CH₂-Gruppe als *Spacer* angedacht. Beides kann aus dem Bromessigsäureethylester 61 generiert werden. Es wurden verschieden substituierte Phosphonate (62, 63 und 64) ausgewählt, um die Entschützung zu der freien Phosphonsäure zu untersuchen, die im *Drug* als *Binder* enthalten sein muss. Die Substitution konnte in exzellenten Ausbeuten durchgeführt werden (siehe Schema 15).



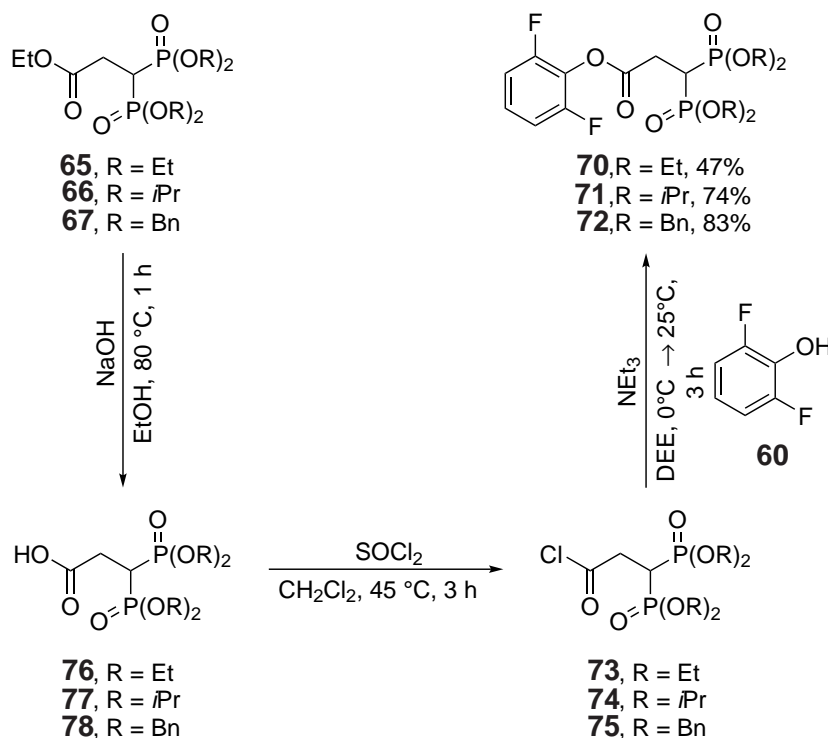
Schema 15: Nukleophile Substitution der Phosphonate **62**, **63** und **64** an Bromessigsäureethylester **61**.

Im Anschluss wurde untersucht, ob diese Reaktion auch an Thiocarbonylen zu einem ähnlich Erfolg führt. Dafür musste zuerst das Thioanalogon **68** ausgehend von Bromacetat **61** in einer LAWESSON-Reaktion hergestellt werden (siehe Schema 16). Das Thioanalogon **68** konnte in akzeptabler Ausbeute hergestellt werden, jedoch war es nicht möglich, die Folgereaktion mit Bisdibenzylphosphonat **64** in einer nukleophilen Substitution zum Thiophosphonat **69** umzusetzen. Ebenfalls konnte mit keinem der in Schema 15 aufgelisteten Derivate die Synthese durchgeführt werden. Die Thiocarbonyle wurden dann nicht mehr weiter verfolgt.



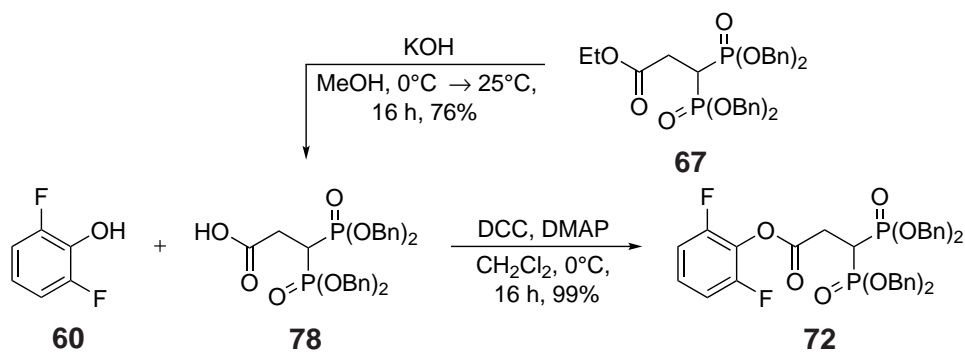
Schema 16: Einführung eines Thiocarbonyls an Bromacetat **61** zum Thioester **68** in einer LAWESSON-Reaktion. Die anschließende nukleophile Substitution zum Thioanalogon **69** konnte nicht erfolgreich umgesetzt werden.

Im nachfolgenden Schritt wurden die Phosphonate in die korrespondierenden Difluorphenolester **70**, **71**, und **72** umgeestert. Dabei wurde zuerst eine Verseifung mit anschließender Chlorierung mit SOCl_2 durchgeführt. Die Säurechloride **73**, **74** und **75** wurden mit Difluorphenol **60** zu den *Pre-cursor* **70**, **71** und **72** umgesetzt (siehe Schema 17).



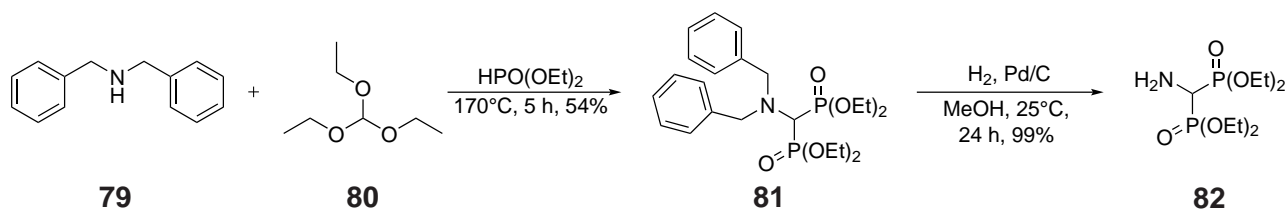
Schema 17: Umesterung der Ethylester **65**, **66** und **67** in die korrespondierenden Difluorphenolester **70**, **71**, und **72**. Die Ausbeuten beziehen sich auf drei Reaktionsschritte.

Simultan zu den vorangegangenen Synthesen wurde versucht, die Carbonsäuren direkt mit Difluorphenol **60** umzusetzen. Dafür wurde die Säure **78** isoliert und in einer DCC-Kupplung quantitativ zum DFP-Ester **72** umgesetzt (siehe Schema 18).



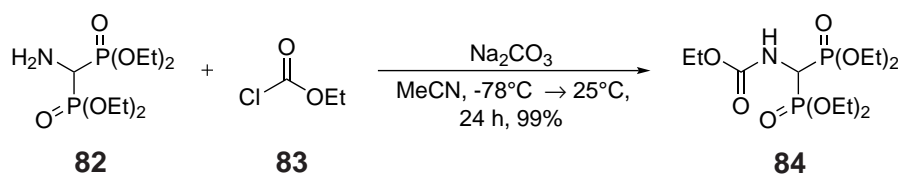
Schema 18: DCC-Kupplung von Difluorphenol **60** mit der Säure **78**.

In den zurückliegenden Synthesen, wurden sehr strukturähnliche Phosphonate in die Synthesen eingebaut. Um chemische Vielfalt zu gewährleisten und neue Angriffspunkte in die Synthesesequenz zu implementieren, wurde im Bisphosphonat eine NH_2 -Funktion eingeführt (siehe Schema 19). Das Dibenzylamin **79** wurde mit Diethylphosphit und Orthoameisensäuretriethylester **80** in mäßigen Ausbeuten zum Dibenzylester **81** umgesetzt. Die anschließende Entschützung konnte in exzellenter Ausbeute zum Aminophosphonat **82** durchgeführt werden.



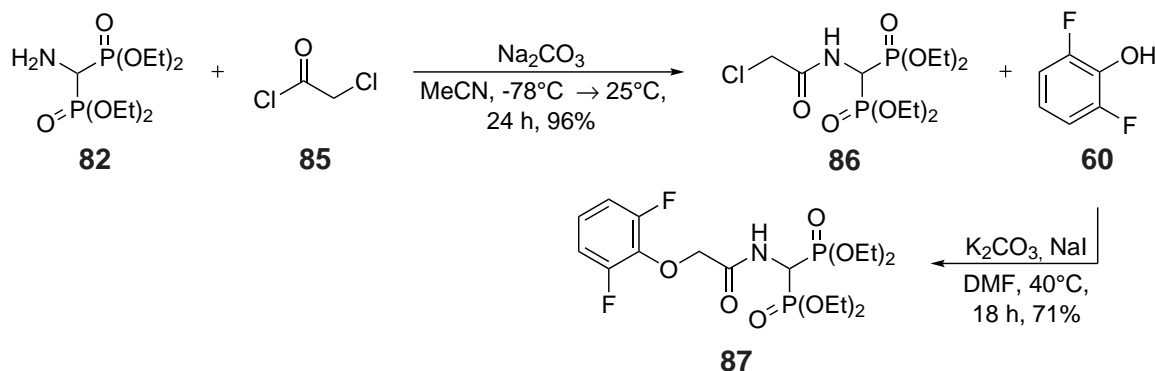
Schema 19: Synthese von Aminophosphonat **82** ausgehend von Dibenzylamin **79**.

Es wurde zuerst versucht, andere *Linker/Spacer* einzubringen. Das Aminophosphonat **82** konnte mit Chlorameisensäureethylester **83** in einer Testreaktion erfolgreich zum Carbamat **84** umgesetzt werden (siehe Schema 20).



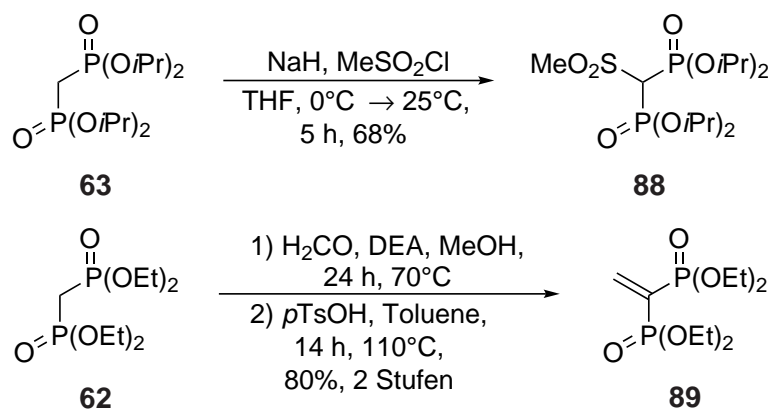
Schema 20: Elektrophile Addition von Aminophosphonat **82** an Chlorameisensäureethylester **83**.

Mit Chloracetylchlorid **85** konnte der erste Vertreter zum Chloracetamid **86** umgesetzt werden (siehe Schema 21). Die anschließende Umsetzung mit Difluorphenol **60** lieferte das erste DFP-Acetamid **87** und bestätigte somit die einfache Umsetzung mit Elektrophilen.



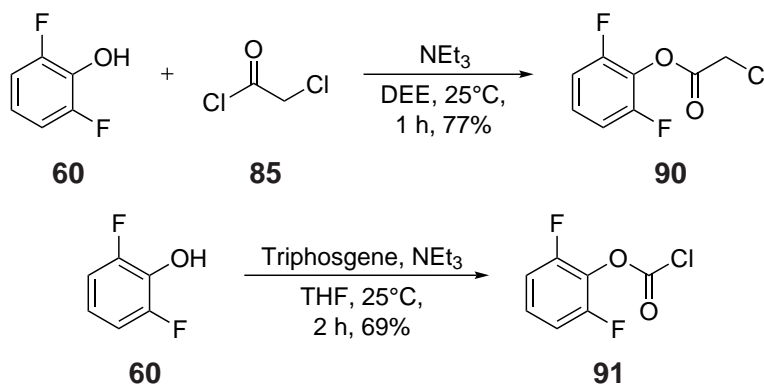
Schema 21: Synthese von DFP-Acetamid **87** in einer zweistufigen Synthese.

Bei den Phosphonaten **63** und **62** wurde versucht unterschiedliche Funktionalitäten einzuführen, um im späteren Verlauf ein breiteres Spektrum an chemischen Modifikationen durchzuführen. Dabei konnte ausgehend vom Isopropylphosphonat **63** eine Mesylgruppe zum Mesylphosphonat **88** eingeführt werden, die als geeignete Abgangsgruppe für spätere nukleophile Reaktionen dienen sollte. Außerdem wurde Ethylphosphonat **62** in einer zweistufigen Synthese zum Phosphonat **89** umgesetzt, welches wiederum in einer FRIEDEL CRAFTS Alkylierung oder elektrophilen Additionen wie z.B. Hydroborierung oder -zirkonierung eingesetzt hätte werden können.



Schema 22: Synthese anderer Phosphonate wie z.B. des Mesylphosphonats **88** und Phosphonats **89**.

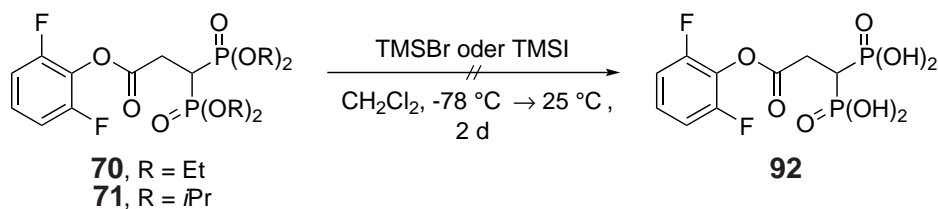
Das Difluorphenol **60** wurde in den zurückliegenden Reaktionen als Nukleophil eingeführt. Es wurde versucht, das ursprünglich verwendete Nukleophil in ein Elektrophil zu transferieren um neue synthetische Zugänge zu generieren. Es bieten sich zwei Ansätze an, um unterschiedliche Elektrophile zu erzeugen, damit zum einen eine *Linker*- und zum anderen eine *Spacer*-Variation durchgeführt werden kann. Die Reaktionen von Difluorphenol **60** mit Chloracetylchlorid **85** oder Triphosgen, lieferte einen alternativen Zugang zu elektrophilen DFP-Verbindungen (siehe Schema 23). Leider konnte eine anschließende Umsetzung mit z.B. Aminophosphonat **82** oder Bisdibenzylphosphonat **64** und seine Alkylderivate nicht erfolgreich durchgeführt werden. Folglich wurde dieser Syntheseweg nicht weiter verfolgt.



Schema 23: Alternativer Zugang zu elektrophilen DFP-Verbindungen.

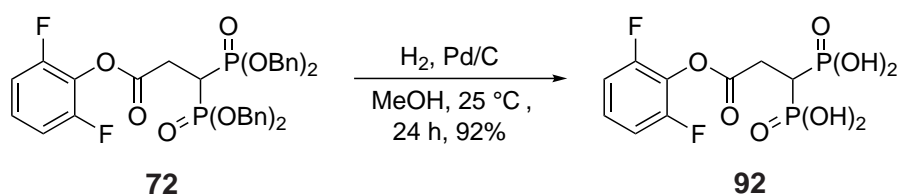
Die Ester sollen im finalen Schritt zu den Bisphosphonsäuren umgesetzt werden. Dabei wurde versucht, die Entschützung über zwei verschiedene Reaktionen durchzuführen, da Alkylester anders entschützt werden als Benzylester. Die Entschützung der Alkylester mit TMSBr oder TMSI als Lewis Säuren sind Literatur bekannt, jedoch konnte die Sequenz nicht auf unser Substrat übertragen werden (siehe Schema 24). Der Difluorphenolester, ist durch die beiden Fluoratome destabilisiert und neigt dazu verseift zu werden. Die zweite labile Position ist am α -CH lokalisiert und weist

aufgrund der beiden benachbarten Phosphonsäure-Gruppen eine hohe CH-Azidität auf. Dadurch sind bei der Reaktionsdurchführung viele Nebenprodukte entstanden, die weiter nicht charakterisiert worden sind. Folglich wurde auf die Verwendung von Phosphonsäurealkylester als *Precursor* verzichtet.



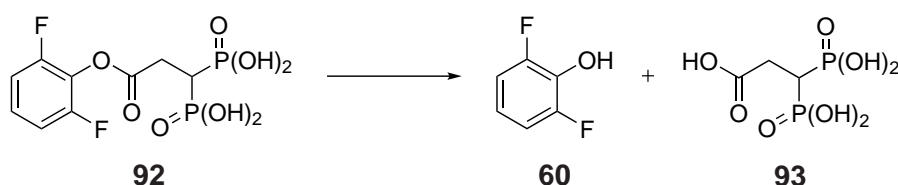
Schema 24: LEWIS Säure vermittelte Entschützung zur Bisphosphonsäure **92**.

Die Reaktionsbedingungen sind bei der Entschützung von Benzylestern wesentlich milder. Es werden keine reaktiven Chemikalien verwendet und als Nebenprodukt entsteht oft nur Toluol. Eine hohe Reinheit des *Precursors* birgt den Vorteil einer vereinfachten Aufreinigung. Die Freisetzung der Bisphosphonsäure **92** konnte unter milden Bedingungen in einer Wasserstoffatmosphäre durchgeführt werden (siehe Schema 25).



Schema 25: Hydrierung von Benzylphosphonat **72** zur Bisphosphonsäure **92**.

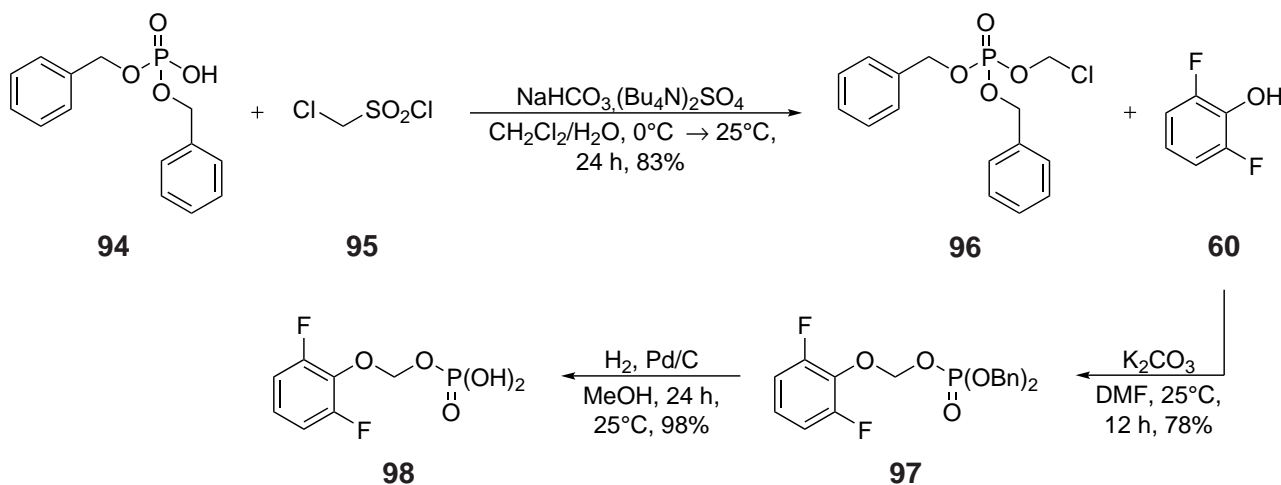
Die Stabilität der Bisphosphonsäure **92** wurde untersucht. Nach Lagerung bei Raumtemperatur und im Kühlschrank, konnte innerhalb einer Woche die Bildung eines Zerfallprodukts festgestellt werden (siehe Schema 26). Die Überprüfung erfolgte durch NMR-Spektroskopie und die Zersetzung zum Difluorphenol **60** konnte nachgewiesen werden. Die Bisphosphonsäure **93** erscheint als logische Nebenkomponente in dieser Zersetzungsreaktion. Diese Eigenschaft würde auch erklären, warum die Entschützung mit den LEWIS Säuren aus Schema 24 nicht zum gewünschten Erfolg geführt hat.



Schema 26: Zersetzung der Bisphosphonsäure **92** zu Difluorphenol **60**.

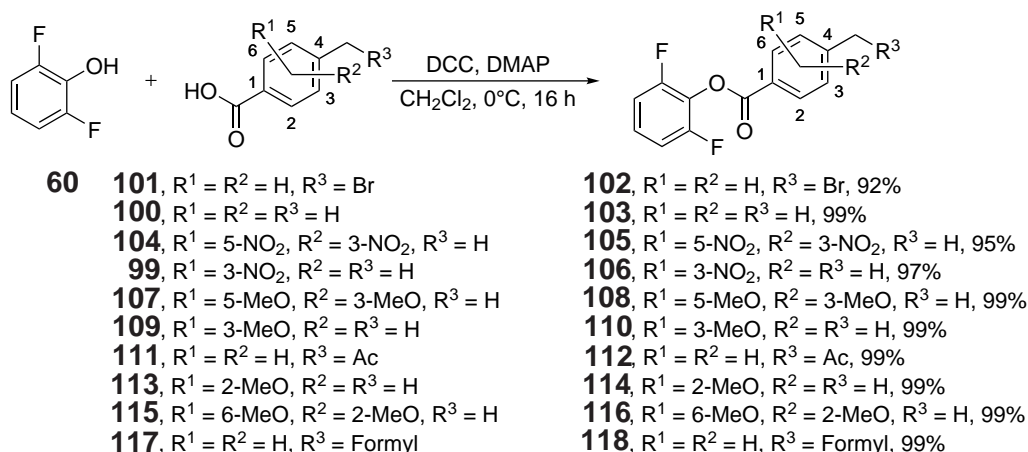
Die Einführung von Benzylschutzgruppen scheint das Mittel der Wahl zu sein, um einen synthetischen Zugang zu Bisphosphonsäuren in sehr guten Ausbeuten zu erhalten. Es wurde daraufhin

untersucht, ob ein ähnlicher Zugang zu Phosphaten zu realisieren ist (siehe Schema 27). Dibenzylphosphat **94**, ist kommerziell erhältlich und trägt schon die wichtigen Benzylschutzgruppen. Es konnte in einer Phasentransferkatalyse mit Chlormethansulfonylchlorid **95** in Anwesenheit von Tetrabutylammoniumsulfat $(\text{Bu}_4\text{N})_2\text{SO}_4$ als Phasentransferreagenz zum Chlormethylphosphat **96** umgesetzt werden. Die anschließende Reaktion mit Difluorphenol **60** zum Dibenzylphosphat **97** verlief mit einer sehr guten Ausbeute. Die finale Hydrierung zum DFP-Phosphat **98** verläuft analog zu Schema 25 und liefert ähnliche Ausbeuten.



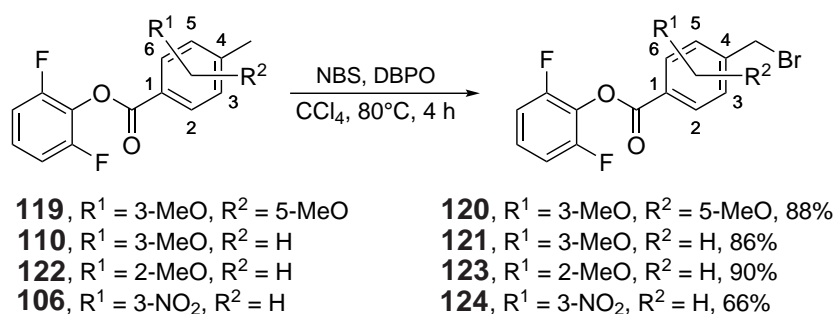
Schema 27: Synthese von DFP-Phosphat **98**.

Mit dieser Erkenntnis wurde der Versuch einen elektronenarmen Ester als *Linker* und eine CH_2 -Gruppe *Spacer* einzuführen nicht mehr weiter verfolgt. Als Konsequenz sollte der elektronenarme Ester mit Elektronendichte stabilisiert werden. Die Esterfunktion sollte als *Linker* erhalten bleiben, und der Labilität durch Einführung von +M-Substituenten entgegengewirkt werden. Als Grundstruktur wurden verschiedene Tolylsäuren verwendet, die mit Methylethern substituiert worden sind. Als *Counterpart* wurden auch Nitrotolylsäuren verwendet, um die Stabilisierung zu bestätigen. Die Nitrotolylsäure **99** wurde selber in einer *ortho*-Nitrierung mit HNO_3 zur Benzylposition hergestellt. Die Benzoesäure **100** konnte aus einer radikalischen Bromierung mit NBS erhalten werden. Um die Tolylsäuren mit Difluorphenol **60** zu kuppeln wurde die DCC-Kupplung verwendet. Sie ist einfach in der Durchführung, lässt sich auf sehr viele Substrate übertragen und liefert eine einfache Aufreinigung mit exzellenten Ausbeuten (siehe Schema 28).



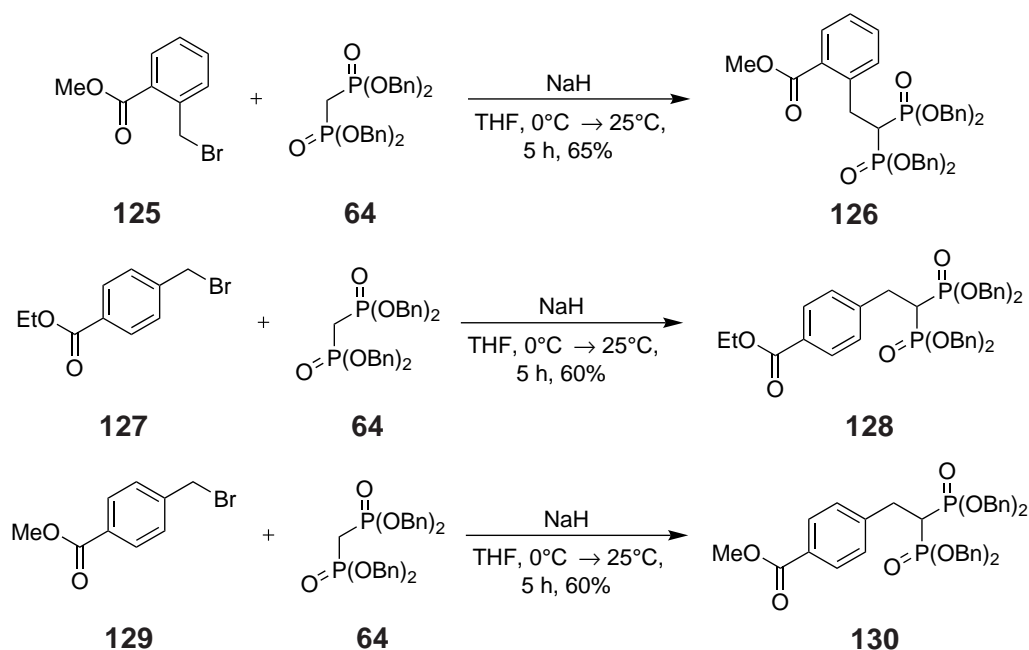
Schema 28: DCC-Kupplung von Difluorphenol **60** mit verschiedenen Tolylsäuren.

Die Benzylposition wurde ausgewählt, um eine Abgangsgruppe einzuführen die im späteren Verlauf gebraucht wird, um die Bisphosphonate einzuführen. Die radikalische Bromierung mit NBS konnte bei elektronenreicheren Aromaten in besseren Ausbeuten durchgeführt werden (siehe Schema 29). Bei Bromierung der elektronenarmen Aromaten (z.B. Nitroaromat **106**) konnte die Reaktion mit nur schlechten Ausbeuten durchgeführt werden. Der Dinitroaromat **105** ließ sich nicht bromieren.



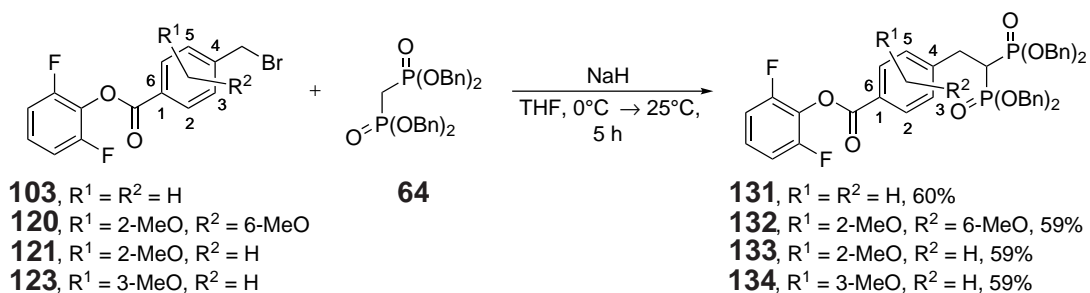
Schema 29: Radikalische Bromierung der Benzylposition mit NBS.

Mit dem Bromid als Abgangsgruppe sollte im Anschluss die Bisphosphonat-Einheit eingeführt werden. Bromide eignen sich sehr gut als Abgangsgruppe und die Benzylposition bietet eine attraktive Möglichkeit Nucleophile einzuführen. Die in Schema 31 aufgezeigte Reaktion konnte erst nach einer Reihe von Voruntersuchungen, an den in Schema 30 abgebildeten Modellverbindungen durchgeführt werden.



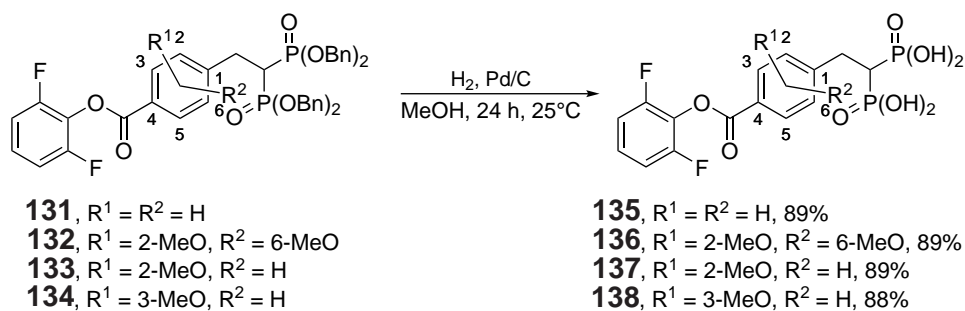
Schema 30: Testsystem für die Validierung der nukleophilen Substitution.

Es wurde zunächst überprüft, wie das Nukleophil generiert werden soll, in welcher Konzentration und in welchem Lösungsmittel es vorliegen muss. Der labile Ester bietet immerhin noch die Möglichkeit, als Elektrophil zu wirken, wobei der sterische Anspruch als zu groß angenommen wurde. Die höchsten Ausbeuten lagen bei ca. 60%. Der elektronenärmere Nitroaromat **106** ließ sich nicht umsetzen.



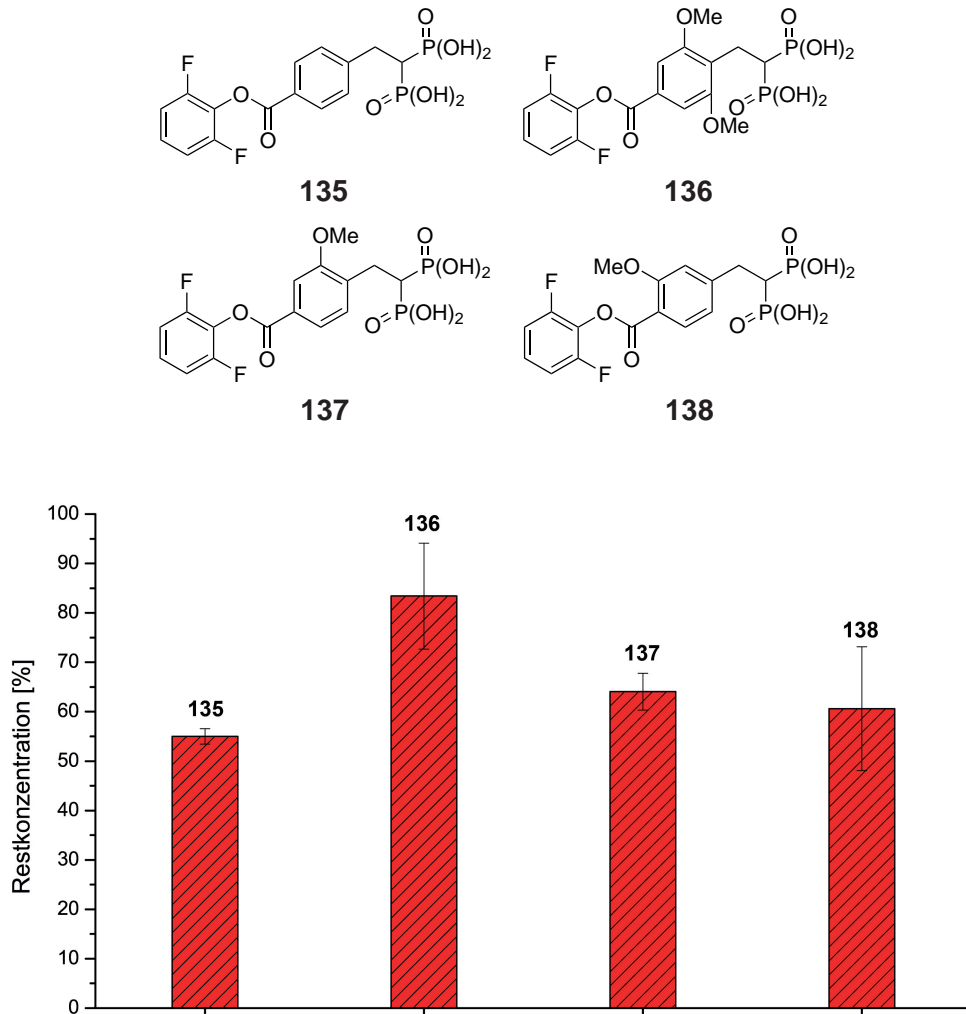
Schema 31: Nukleophile Substitution an der Benzylposition mit dem Phosphonat **64**.

Die synthetisierten Benzylphosphonate wurden im letzten Schritt in einer heterogenen katalytischen Hydrierung zu den freien Bisphosphonsäuren in exzellenten Ausbeuten umgesetzt (siehe Schema 32).



Schema 32: Heterogene katalytische Hydrierung.

Im nachfolgenden wurde die Plasmastabilität der freien Bisphosphonsäuren im Rattenplasma fluoreszenzspektrometrisch von uns untersucht. Dafür mussten zuerst die geeigneten Parameter definiert werden, damit keine Fluoreszenzkorrelation mit dem Lösungsmittel, dem Rattenplasma und/oder den Phosphonsäuren auftritt. Dafür wurden Fluoreszenzbereiche gescreened und aufeinander abgestimmt. Wir sind davon ausgegangen, dass im Rattenplasma Esterasen vorhanden sind, die in der Lage sind die Ester zu spalten. Diese Spaltung äußert sich in einer Abnahme der Startkonzentration. Wie aus Abbildung 17 abgeleitet werden kann, haben die Methoxy-Funktionen einen positiven Effekt auf die Stabilität der Ester und bestätigen somit unser Vorhaben. Sehr interessant ist auch, dass eine *mono* Methoxysubstitution in *ortho/para*-Stellung (die Bisphosphonsäuren **137** und **138**) zu einer im Mittel ähnlichen Plasmastabilität führt. Die unsubstituierte Bisphosphonsäure **135** weist die schwächste Plasmastabilität auf. Die höchste Plasmastabilität konnte bei Bisphosphonsäure **136** nachgewiesen werden.



Die Fluoreszenzmessung wurden an einem Tecan Sapphire 2 unter Verwendung folgender Parameter durchgeführt. $\lambda_{Extinktion} = 309 \text{ nM}$, $\lambda_{Emission} = 498 \text{ nM}$, Slit = 20 nM, T = 37 °C, t = 14 min. Die Verbindungen hatten eine Finalkonzentration von 50 μM in Rattenplasma (1/100) und 0.5% DMSO.

Abbildung 17: Untersuchung der Plasmastabilität der freien Bisphosphonsäuren in Rattenplasma.

Aus den obigen Ergebnissen lässt sich die in Abbildung 18 abgebildete Struktur als Zielmolekül für das *Drug 139* ableiten. In den nächsten Schritten sollte eine geeignete Synthesesequenz entwickelt werden, die in wenigen Synthesestufen und hohen Ausbeuten abläuft. Zudem ist es notwendig die Syntheseschritte so zu optimieren, dass diese Reaktionen im Multigramm-Maßstab durchzuführen sind. Für etwaige *In vivo* Experimente wird eine große Menge an *Drug 139* benötigt.

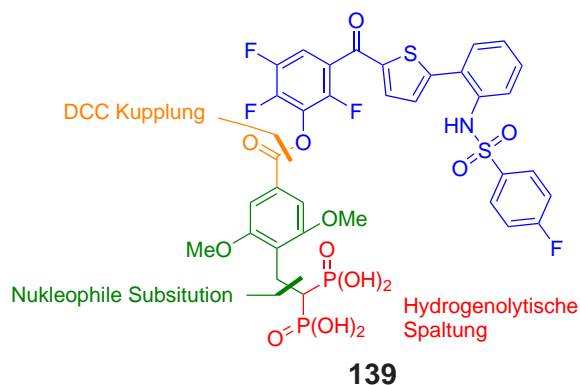
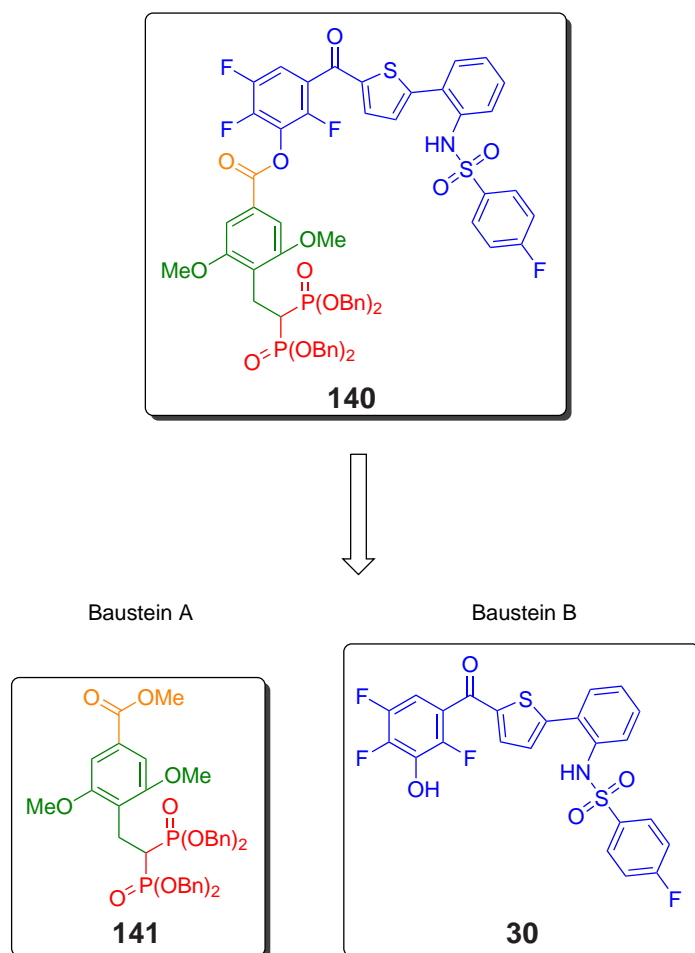


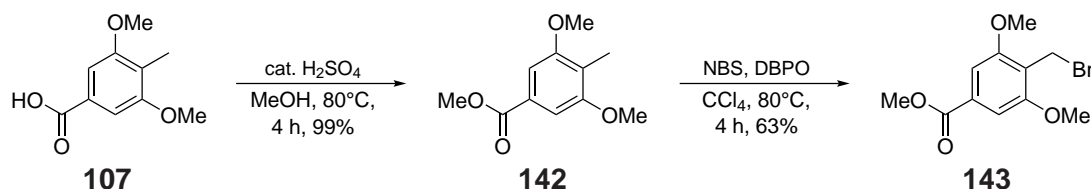
Abbildung 18: Drug 139 als Zielmolekül.

Retrospektiv und basierend auf den bereits erzielten Ergebnissen, ist es sinnvoll den *Precursor* 140 zum Drug 139 in einer konvergenten Synthese aus zwei Bausteinen (A 141 und B 30) aufzubauen (siehe Schema 33). Die Synthese von Baustein B (17 β -HSD2 Inhibitor 30) wurde bereits im oberen Abschnitt erläutert. Um eine geeignete Synthese von Baustein A 141 durchzuführen, mussten vorab einige Untersuchungen durchgeführt werden.



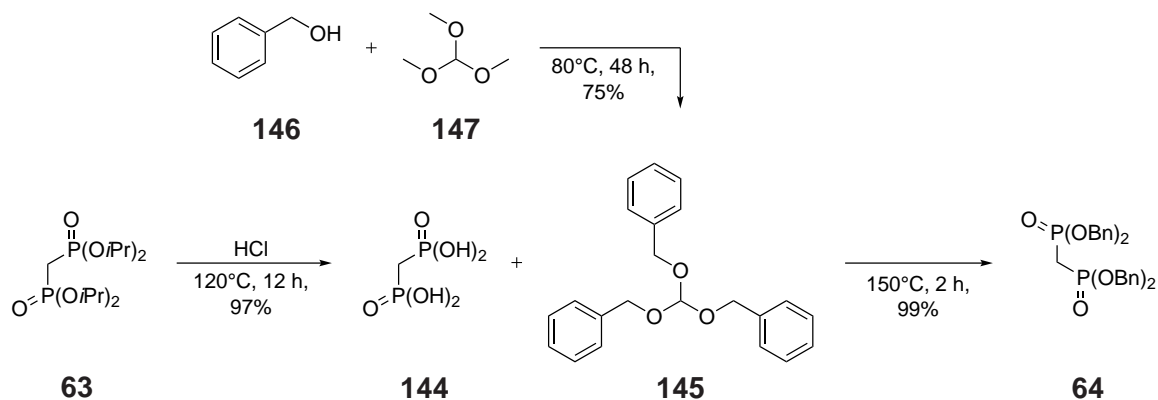
Schema 33: Zurückführung des *Precursors* 140 auf die beiden Bausteine B (17 β -HSD2 Inhibitor 30) und A (Phosphonat 141).

Die erste Fragestellung beschäftigte sich damit einen geeigneten Ester an der Benzoesäure **107** einzuführen. Der Ester sollte weitestgehend stabil sein und in der Folgechemie keine unnötigen Nebenreaktionen eingehen. Im Zuge dieser Doktorarbeit wurden Erfahrungen in der Verseifung von Alkylestern wie z.B. Methyl-, Ethyl- und Isopropylester mit verschiedenen Basen (KOH, NaOH, LiOH) gesammelt. Es ist eine hohe Menge an Energie nötig um diese Ester zu verseifen. Zusätzlich konnte bereits beobachtet werden, dass hohe Temperaturen sich nachteilig auf die Stabilität der labilen Bisphosphonaten auswirken und somit zerfallen. Deswegen war es nötig, einen Methylester in einer FISCHER Veresterung einzuführen, da diese in der Regel milder zu verseifen sind (siehe Schema 34). Der Methylester **142** konnte in einer exzellenten Ausbeute erhalten werden. Im Anschluss wurde in Benzylposition ein Bromidsubstituent in einer radikalischen Bromierung mit NBS eingeführt. Dabei wurde die Bromverbindung **143** in akzeptabler Ausbeute hergestellt und diente als weiteres Fragment um den Baustein **A 141** herzustellen.



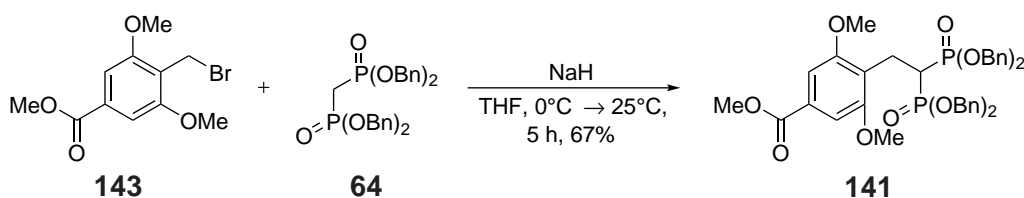
Schema 34: FISCHER Veresterung von Benzoesäure **107** zum Methylester **142** mit anschließender radikalischer Bromierung zur Bromverbindung **143**.

Wie in Schema 24 bereits beschrieben wurde, konnten die Alkylester der Bisphosphonate wie z.B. Isopropyl- oder Ethylester nicht in Gegenwart eines labilen Esters zu den korrespondierenden Bisphosphonsäuren umgesetzt werden. Als Alternative musste Bisisopropylphosphonat **63** umgeestert werden (siehe Schema 35). Hierfür wurde im ersten Schritt der Isopropylester hydrolysiert und die Bisphosphonsäure **144** in exzellenter Ausbeute erhalten. Der Orthoameisensäuretribenzylester **145** wurde im Vorgang aus Benzylalkohol **146** und Orthoameisensäuretrimethylester **147** hergestellt. Die anschließende Veresterung wurde mit Orthoameisensäuretribenzylester **145** zum Bisbenzylphosphonat **64** in hervorragender Ausbeute durchgeführt.



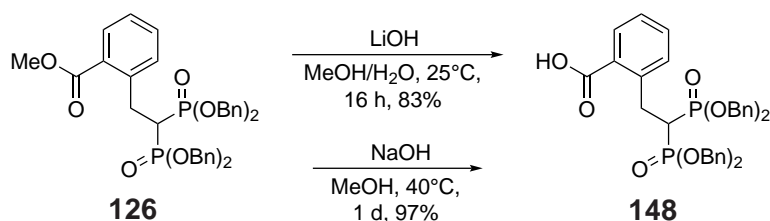
Scheme 35: Esterhydrolyse am Isopropylester **63** mit anschließender Veresterung zum Benzylester **64**.

Das Benzylphosphonat **64** wurde im Anschluss mit **143** in einer nukleophilen Substitution zum Bisphosphonat, dem Baustein **A 141** umgesetzt (siehe Schema 36).



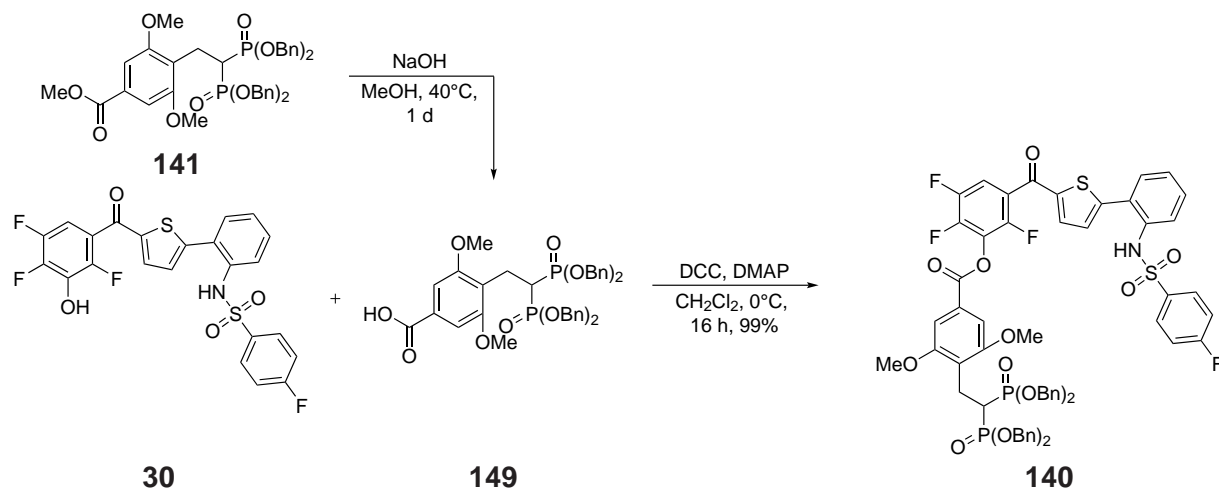
Scheme 36: Nukleophile Substitution von Benzylphosphonat **64** an **143** zum Bisphosphonat **141**.

Das Bisphosphonat **141**, Baustein **A**, und der 17 β -HSD2 Inhibitor, Baustein **B 30**, wurden im nächsten Schritt miteinander verknüpft. Dafür musste allerdings noch Bisphosphonat **141** in einen geeigneten Kupplungspartner umgewandelt werden. Benzoesäuren eignen sich hervorragend für die Kupplung mit Phenolen. Es konnte demonstriert werden, dass die alkalische Verseifung in Gegenwart von NaOH in besseren Ausbeuten durchgeführt werden kann (siehe Schema 37).



Scheme 37: Vergleich der alkalischen Verseifung von Methyl ester **126** mit LiOH und NaOH.

Die Benzoesäure **149** konnte ausgehend von Methyl ester **141** in einer alkalischen Verseifung mit NaOH vollständig hydrolysiert werden. Nach kurzer Aufarbeitung wurde die Benzoesäure **149** in einer DCC-Kupplung mit dem 17 β -HSD2 Inhibitor **30** zum *Precursor* **140** gekuppelt (siehe Schema 38).



Schema 38: Synthese des *Precursors* **140** in einer DCC-Kupplung ausgehend von 17β-HSD2 Inhibitor **30** und der Benzoesäure **149**, die in einer alkalischen Verseifung von Methylester **141** hergestellt wurde.

NMR-Spektroskopisch lassen sich der 17β-HSD2 Inhibitor **30** und der *Precursor* **140** miteinander vergleichen. Nachdem die Benzoesäure **149** am Sulfonamid als auch am Phenol addiert werden könnte, werden ausgehend von 17β-HSD2 Inhibitor **30** zwei Signale betrachtet. Dabei handelt es sich um die Singulettts bei 11.27 ppm und 9.99 ppm die jeweils das phenolische Proton und das Proton am Sulfonamid repräsentieren. Zudem sollten sich durch die fünf weiteren Aromaten eine enorme Anhäufung an Protonen im aromatischen Bereich beobachten lassen. Zusätzlich müssen die benzyli-schen Protonen im Bereich von ca. 5 ppm erscheinen. Im unteren Spektrum von *Precursor* **140** in Abbildung 19 ist eindeutig zu erkennen, dass das phenolische Proton bei 11.27 ppm verschwunden ist sowie eine Erhöhung der Protonendichte im aromatischen Bereich, als auch die benzyli-schen Protonen zu beobachten sind.

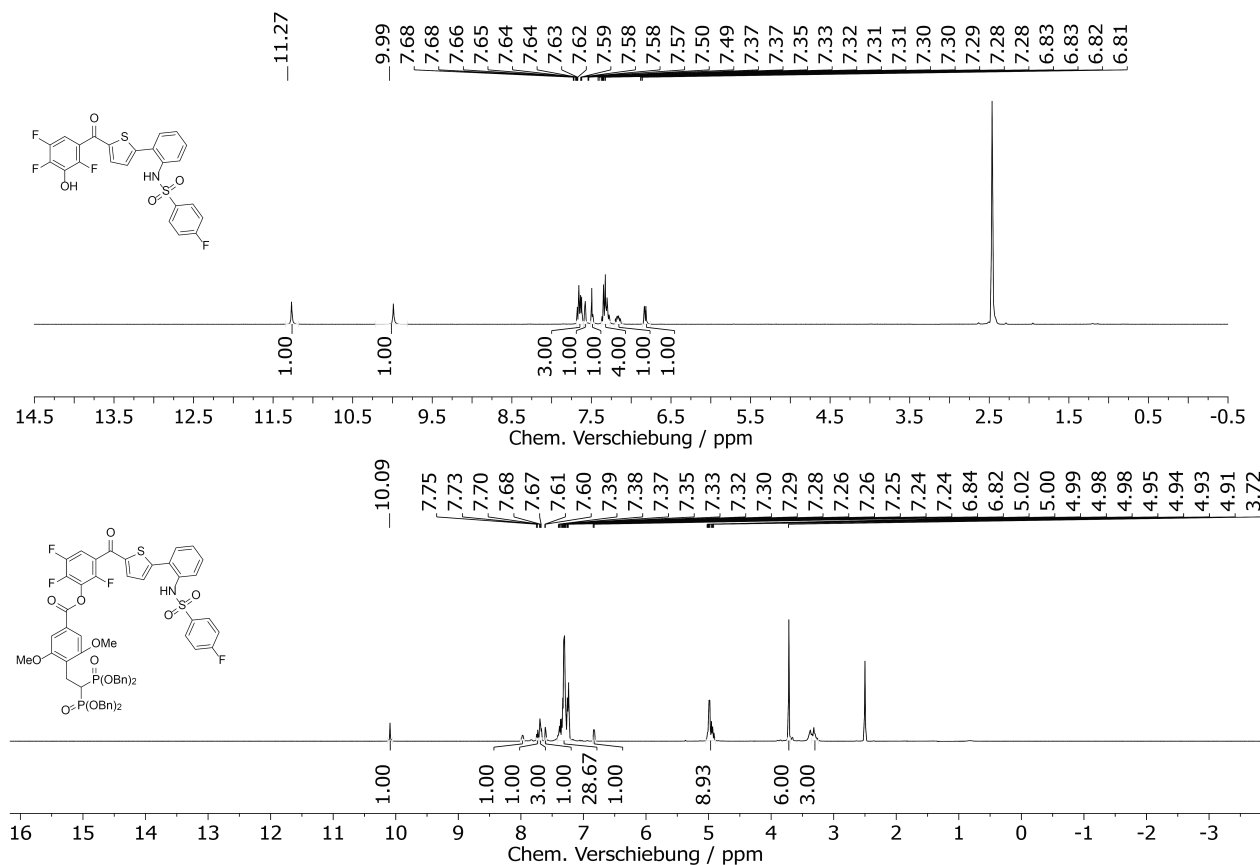


Abbildung 19: Gegenüberstellung der ^1H -NMR Spektren von 17β -HSD2 Inhibitor **30** und *Precursor* **140**.

Im letzten Schritt der Synthesesequenz müssen die Benzylschutzgruppen am *Precursor* **140** entfernt werden. Dies soll in einer heterogenen Katalyse mit Pd/C in einer Wasserstoffatmosphäre, wie es schon in Schema 32 demonstriert wurde, durchgeführt werden. Die Reaktionskontrolle *via* Dünnschichtchromatographie (DC) und *Liquid chromatography–tandem mass spectrometry* (LC-MS/MS) zeigten eine Abnahme der Konzentration an *Precursor* **140**. Zeitgleich konnte die Bildung eines neuen Produkts beobachtet werden, welches sich als *Drug* **139** bestimmen ließ. Die Reaktion lief nie vollständig ab und nach mehrmaligen Versuchen wurde stets Startmaterial reisoliert. Es ist erstrebenswert, dass die Reaktion quantitativ abläuft, ohne Bildung mehrerer Nebenprodukte. Mit solch einer Reaktionsführung, kann die Reaktionslösung einfach filtriert und unter verminderten Druck getrocknet werden, ohne weiterer Aufreinigungsschritte. Ein *Screening* der Reaktionsparameter wurde durchgeführt, um herauszufinden, unter welchen Bedingungen die Reaktion an *Precursor* **140** abläuft. Eine längere Reaktionsdauer, höhere Temperatur oder Wechseln des Lösungsmittels hat zu keiner zufriedenstellenden Ausbeutesteigerung geführt (Tabelle 5).

Tabelle 5: *Screening* der Reaktionsparameter bei der katalytischen Hydrierung.

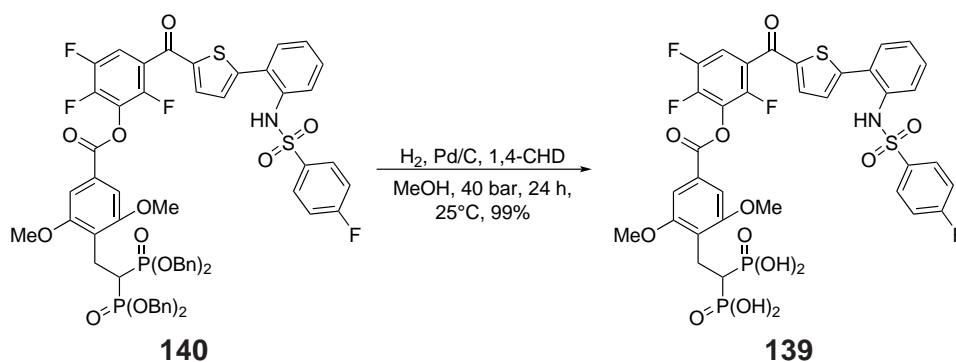
| Lösungsmittel | Temperatur [°C] | Zeit [h] | Umsatz [%] |
|---------------|-----------------|----------|------------|
| Methanol | 25 | 12 | - |
| Methanol | 25 | 24 | 4 |
| Methanol | 25 | 36 | 6 |
| Methanol | 50 | 24 | 11 |
| Methanol | 65 | 24 | 12 |
| Ethylacetat | 75 | 24 | 17 |
| Ethylacetat | 75 | 36 | 17 |
| Toluol | 100 | 24 | 21 |
| Toluol | 100 | 36 | 24 |

Erst nach Hinzufügen eines leichten Überschusses von 1,4-Cyclohexadien (CHD) konnte die Testreaktion (0.1 mM bezogen auf *Precursor 140*) vollständig ablaufen. Für eine pharmakokinetische Studie an einem Tiermodell (Wistar-Hannover Ratten) werden > 10 g an *Drug 139* benötigt und somit eine besonders hohe Anforderung an diese Reaktion gestellt. Das *Upscaling* dieser Reaktion konnte nicht ohne weitere Optimierungen durchgeführt werden, da eine Verbesserung der Ausbeute nicht möglich war. Es wurde untersucht, wie sich der Reaktionsverlauf in einem Autoklaven steuern lässt. Dabei wurde die vorgelegte Menge an *Precursor 140* und 1,4-Cyclohexadien variiert, sowie die Reaktionsparameter wie Druck und Temperatur angepasst. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Molarität der Reaktionslösung keinen Einfluss auf den Reaktionsablauf hat. Als kritischer Parameter ließ sich der Wasserstoffdruck im Reaktionsautoklaven identifizieren (Tabelle 6).

Tabelle 6: *Screening* der Reaktionsparameter bei der katalytischen Hydrierung in einem Reaktionsautoklaven. Es wurde in allen Reaktionen die gleiche Menge an 1,4-CHD (5.00 eq) und Pd/C (10 wt. %) zugegeben.

| Lösungsmittel | H ₂ -Druck [bar] | Zeit [h] | Temperatur [°C] | Einsatz [g] | Umsatz [%] |
|---------------|-----------------------------|----------|-----------------|-------------|------------|
| Methanol | 5 | 24 | 25 | 1 | 3 |
| Methanol | 10 | 24 | 25 | 1 | 28 |
| Methanol | 20 | 24 | 25 | 1 | 76 |
| Methanol | 30 | 24 | 25 | 1 | 82 |
| Methanol | 40 | 24 | 25 | 1 | 99 |
| Methanol | 40 | 24 | 25 | 2 | 99 |
| Methanol | 40 | 24 | 25 | 5 | 99 |
| Methanol | 40 | 24 | 25 | 10 | 99 |

Erst bei einem Druck > 30 bar lief die Reaktion vollständig ab (siehe Schema 39). Es wurden keine Nebenprodukte gebildet, so dass lediglich eine einfache Filtration und Verdampfen des Lösungsmittels durchgeführt werden musste, um *Drug 139* in exzellenter Ausbeute als weißen Feststoff zu erhalten. Es konnten mit dieser Prozedur ca. 15 g an *Drug 139* für weitere Untersuchungen bereitgestellt werden.



Schema 39: Heterogene katalytische Hydrierung von *Precursor* **140** zu *Drug* **139** mit Pd/C.

Der spektroskopische Beweis über den Erhalt der finalen Verbindung *Drug* **139** konnte über Nuclearmagnetresonanz (NMR) erbracht werden. Im Grunde sollen durch die Hydrierung alle Benzylschutzgruppen eliminiert werden. Dadurch wird erwartet, dass der aromatische Bereich wesentlich weniger Protonen enthalten wird und die benzylichen Protonen verschwinden. Zusätzlich wird erwartet, dass die vier Protonen der Bisphosphonsäure zu sehen sein werden. Wie in Abbildung 20 abgebildet sind alle vier Protonen der Bisphosphonsäure zu sehen. Der aromatische Bereich ist um 20 Protonen ärmer und die benzylichen Protonen sind ebenfalls verschwunden.

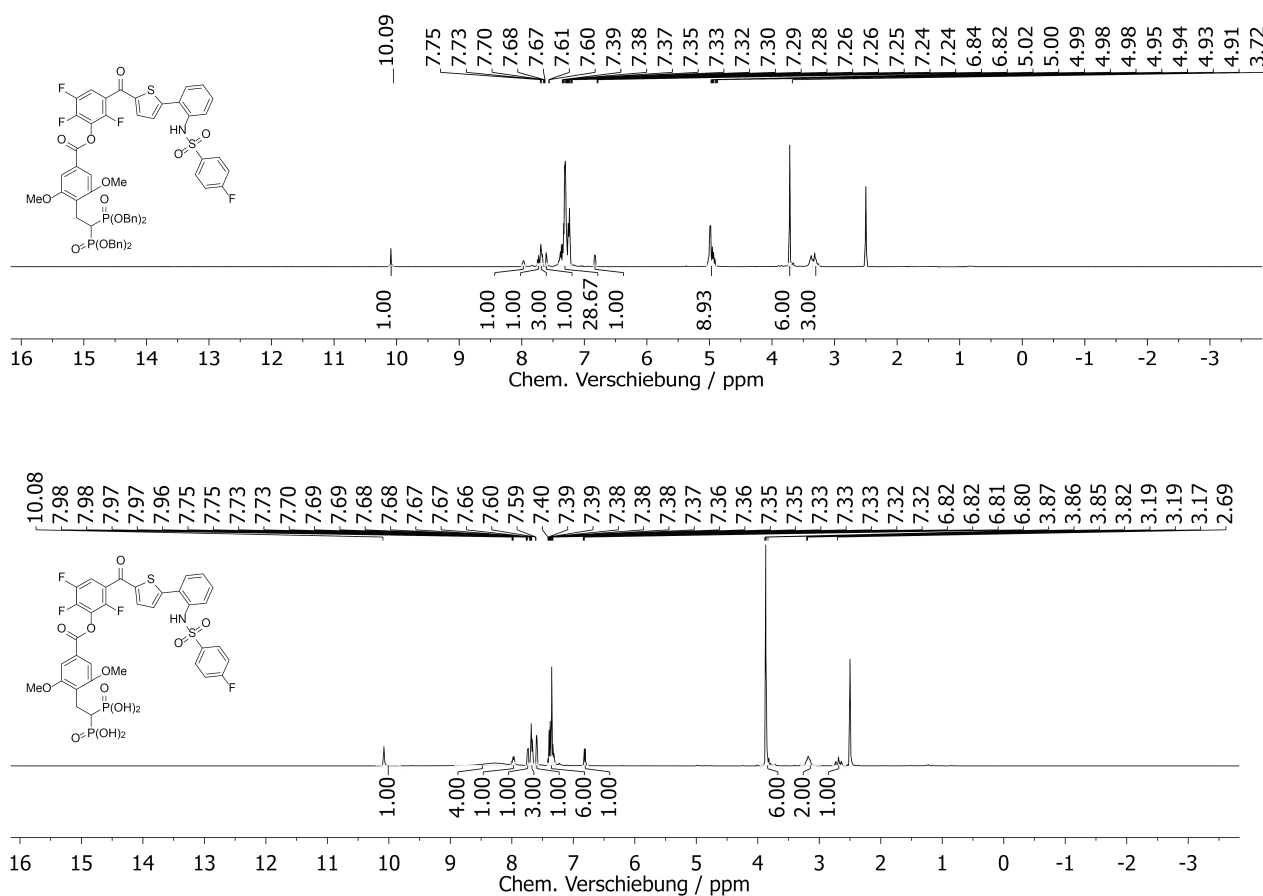


Abbildung 20: Gegenüberstellung des ^1H -NMR Spektren von *Precursor* **140** und *Drug* **139**.

4.5 Pharmakologische Untersuchung

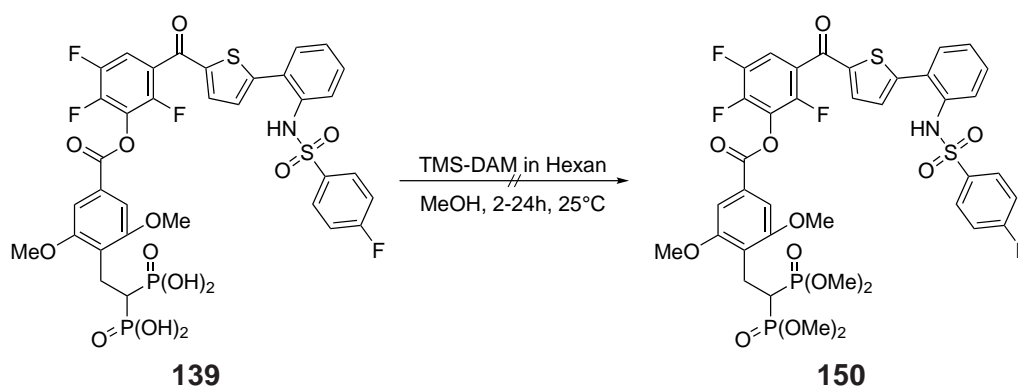
Nach der erfolgreichen Synthese von *Drug 139*, wurde diese Verbindung in einer pharmakokinetischen Studie an einem Tiermodell (Wistar-Hannover Ratten) getestet. Den Tieren sollte *Drug 139* peroral in einer Konzentration von 100 mg/kg Körpergewicht verabreicht werden. Dabei wurde das *Drug 139* mit Erdnussbutter vermengt, suspendiert und den Tieren vorgesetzt. Leider wurde diese Darreichungsform von den Tieren nicht angenommen, so dass eine subkutane Verabreichung erfolgen musste. In der Vergangenheit hat die perorale Verabreichung von 17 β -HSD2 Inhibitor **30** mit Erdnussbutter jedoch funktioniert. *Drug 139* wurde in mehrere Vehikel suspendiert und in einer Konzentration von 20 mg/kg Körpergewicht injiziert. 24 h nach der subkutanen Verabreichung wurde Blut abgenommen und die Plasmakonzentration an *Drug 139* quantifiziert. Beim Aufbau des biologischen *Assays* stellte sich heraus, dass die Nachweisgrenze in der LC-MS/MS relativ hoch ist und die Verbindung nicht nachgewiesen werden konnte. Nach der Erkenntnis, dass *Drug 139* nicht nachgewiesen werden kann, wurde ebenfalls untersucht, in wie weit das *Drug 139* verstoffwechselt wurde. Die Plasmaproben wurden im Anschluss auf 17 β -HSD2 Inhibitor **30** untersucht (Tabelle 7). Eine Mischung aus PEG400, EtOH und H₂O lieferte als Vehikel die höchsten Serumspiegel an 17 β -HSD2 Inhibitor **30**. Aufgrund der hohen Serumspiegel von 17 β -HSD2 Inhibitor **30** in den unterschiedlichen Vehikeln, muss eine Verstoffwechslung von *Drug 139* stattgefunden haben. Das bedeutet im Umkehrschluss, dass *Drug 139*, wenn subkutan verabreicht wird, bioverfügbar ist.

Tabelle 7: Plasmakonzentrationen von 17 β -HSD2 Inhibitor **30** in der *Drug 139* Bioverfügbarkeitsstudie. P.o.: Peroral, S.c.: Subkutan, c: Konzentration.

| Vehikel | Verabreichung | Verteilung | Dosis [mg/kg bw] | c [nM] |
|-------------------------------------|---------------|---------------|------------------|--------|
| Erdnussbutter | P.o. | Homogenisiert | 100 | - |
| Gelatin, Mannitol, H ₂ O | S.c. | Suspendiert | 20 | 130 |
| PEG400, EtOH, H ₂ O | S.c. | Gelöst | 20 | 394 |
| Rizinusöl | S.c. | Suspendiert | 20 | 135 |

Die Quantifizierung von *Drug 139* mittels LC-MS/MS hat sich als äußerst problematisch herausgestellt, da selbst in höheren Konzentrationen (μ M) keine Detektion stattgefunden hat. Die enorme Herausforderung einen biologischen *Assay* mit Phosphonsäuren zu entwickeln, ist Literatur bekannt und die Schwierigkeit der Detektion wird auch durch eine Vielzahl an Literaturstellen, unabhängig von dem Messverfahren belegt.^[153–156] Es wurde versucht die Empfindlichkeit der Detektierbarkeit von *Drug 139* in der LC-MS/MS zu verbessern. Es gibt eine gängige Methode, die in der LC-MS/MS oder *Gas chromatography–mass spectrometry* (GC-MS) und vielen anderen Verfahren angewendet wird, falls die notwendige Signalstärke am Detektor nicht erreicht werden kann. Es handelt es sich dabei um eine Derivatisierung, wobei durch ein sog. Derivatisierungsreagenz eine Substanz erhalten wird, die sich besser nachweisen lässt. In meinem Fall war angedacht, die

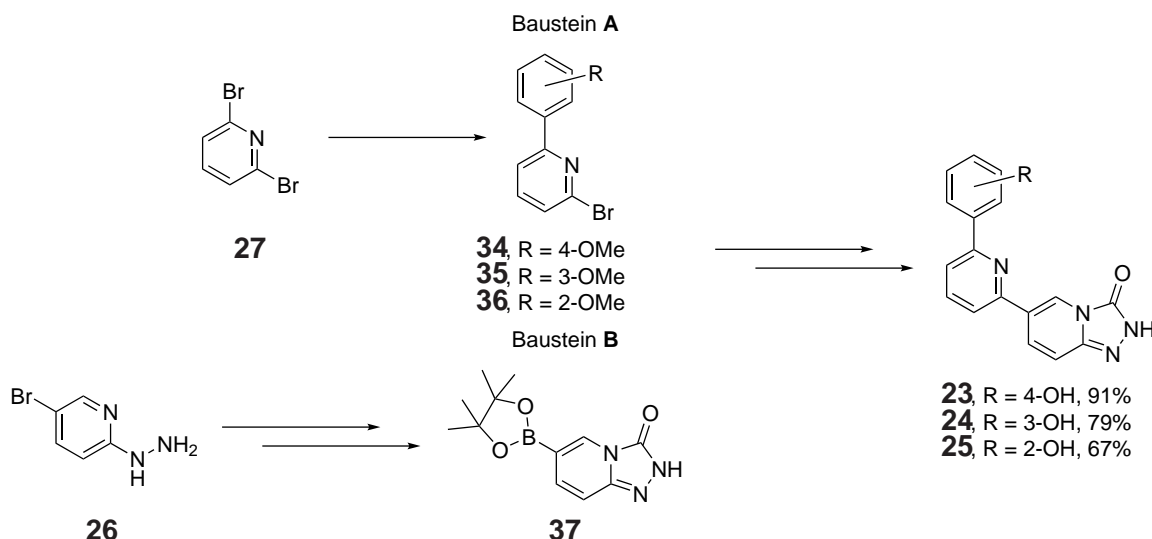
Säuregruppen als Methylester chemisch zu modifizieren. Speziell bei den Phosphonsäuren bietet sich eine Modifizierung mit Trimethylsilyldiazomethan (TMS-DAM) an. TMS-DAM wird im Vergleich zu Diazomethan als ungefährliches, nicht explosionsfähiges, Derivatisierungsreagenz eingesetzt, um freie Alkohole, Carbon- und Phosphonsäuren zu methylieren. Die Reaktion wurde als Testansatz mit verschiedenen Äquivalenten an TMS-DAM (1-100 eq) durchgeführt und die Reaktion bis zu 24 h beobachtet (Schema 40). In mehreren Reaktionskontrollen wurde überprüft, ob eine Abnahme der Konzentration an *Drug 139* in der Reaktionslösung stattfindet. Gleichzeitig wurde analysiert, ob sich ein neuer Produktpeak bildet, der ggf. auf das Derivat **150** zurückzuführen ist. In beiden Fällen konnte kein positives Ergebnis erzielt werden.



Schema 40: Derivatisierung der freien Phosphonsäuren aus *Drug 139* mit TMS-DAM.

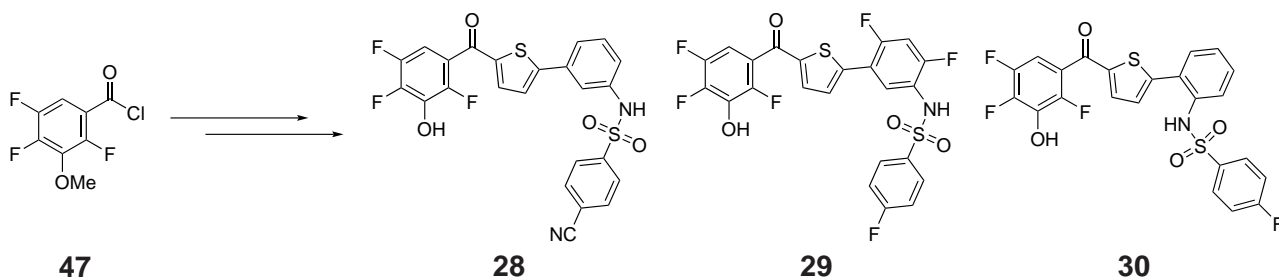
5 Zusammenfassung

Diese wissenschaftliche Arbeit befasste sich mit der Entwicklung einer Synthesestrategie für die Darstellung von nichtsteroidalen potentiellen selektiven 17 β -HSD14 Inhibitoren. Die 17 β -HSD14 Inhibitoren **23**, **24** und **25**, gezeigt in Abbildung 12, konnten erfolgreich synthetisiert und aufgereinigt werden. Der lineare Ansatz führte zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis, so dass die Zielmoleküle in einer konvergenten Synthese aus jeweils zwei Bausteinen dargestellt werden mussten (Schema 41). Baustein **A** konnte in einer einstufigen Synthese ausgehend von Dibrompyridin **27** in exzellenten Ausbeuten in einer klassischen Palladium katalysierten Kreuzkupplung nach SUZUKI und MIYAUURA dargestellt werden. Baustein **B** konnte ebenfalls in sehr guten Ausbeuten in einer zweistufigen Synthese ausgehend von Hydrazin **26** zum Pinakolboran **37** umgesetzt werden. In einer weiteren SUZUKI MIYAUURA Kupplung konnten die Bausteine **A** und **B** miteinander verknüpft und im letzten Schritt zu den 17 β -HSD14 Inhibitoren **23**, **24** und **25** umgesetzt werden. Diese Verbindungen wurden der Arbeitsgruppe AG KOLB für weitere Untersuchungen zur Verfügung gestellt.



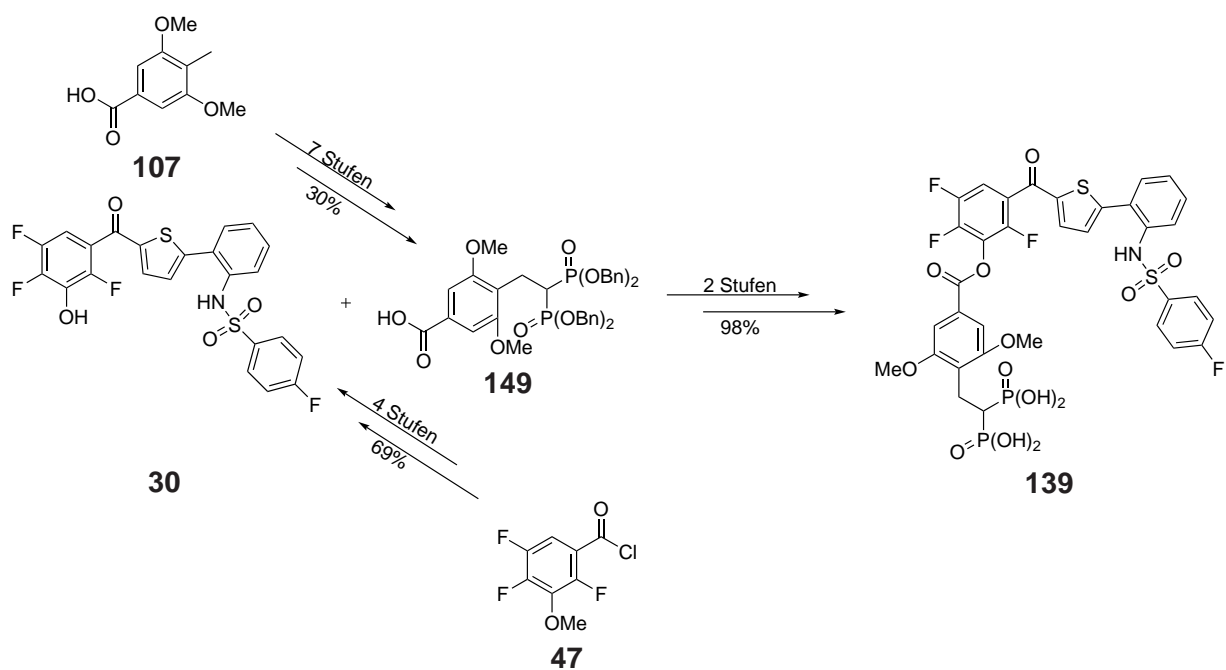
Schema 41: Darstellung potentiell nichtsteroidaler selektiver 17 β -HSD14 Inhibitoren.

Der zweite Teil dieser Arbeit befasste sich mit der Darstellung selektiver 17 β -HSD2 Inhibitoren und der Überführung der vielversprechendsten Verbindungen in ein *Drug* mit einer hohen Affinität zur Knochenstruktur. Dieses Ziel wurde ebenfalls erreicht. Dabei wurde eine lineare Synthesesequenz angewandt, bei welcher ausgehend von Trifluorbenzoylchlorid **47** drei Zielverbindungen in einer vierstufigen Synthese dargestellt werden konnten (Schema 42). In einem *in vivo* Experiment wurden diese gegenüber 17 β -HSD2 und 17 β -HSD1 getestet. Dabei hat sich 17 β -HSD2 Inhibitor **30** als Favorit durchgesetzt und wurde im Anschluss in einem Tiermodell in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe AG VOLLMER (TU Dresden) an Wistar-Hannover Ratten getestet. Für diese Studie wurden > 45 g von 17 β -HSD2 Inhibitor **30** benötigt, so dass alle Reaktionen in diesem Zusammenhang außerhalb des herkömmlichen Labormaßstab durchgeführt werden mussten. Dabei wurden die Reaktionsparameter in einem *Upscaling* angepasst und die Aufreinigungsmethoden verfeinert. Es konnte in dieser Studie demonstriert werden, dass eine Verabreichung von 17 β -HSD2 Inhibitor **30**, einen positiven Effekt auf eine durch Ovariectomie induzierte Osteoporose aufweist. Dies äußerte sich in einem Aufbau der trabekulären Struktur.



Schema 42: Darstellung potentiell nichtsteroidaler selektiver 17 β -HSD2 Inhibitoren. Die Inhibitoren wurden in einer Gesamtausbeute von 63% (**28**), 73% (**29**) und 69% (**30**) in einer vierstufigen Synthese dargestellt.

Basierend auf den erzielten Ergebnissen wurde der 17β -HSD2 Inhibitor **30** ausgewählt um weitere Studien durchzuführen. Es konnte erfolgreich eine konvergente Synthese des *Drugs* **139** ausgehend vom 17β -HSD2 Inhibitor **30** und Benzoesäure **149** entwickelt und angewandt werden (Schema 43). Die Synthesesequenz beinhaltet eine siebenstufige Synthese für Baustein **149** ausgehend von Benzoesäure **107** in einer Gesamtausbeute von 30%. Der 17β -HSD2 Inhibitor **30** wurde analog zu der bereits beschriebenen Prozedur nachsynthetisiert. Beide Segmente konnten in einer DCC-Kupplung in herausragender Ausbeute verknüpft werden. Die Synthese des *Drugs* **139** wurde nach einigen Entwicklungsarbeiten erfolgreich durchgeführt. Der Einsatz von 1,4-CHD hat dabei eine bedeutende Rolle eingenommen und hat zum Erfolg dieser Synthese maßgeblich beigetragen. Durch eine Optimierung des Verfahrensprozesses konnte in einem *Upscaling* die Ansatzgröße und der Produktumsatz verbessert werden, so dass final eine Menge von > 15 g von *Drug* **139**, in einer Gesamtausbeute von 20% über dreizehn Stufen dargestellt werden konnte.



Schema 43: Darstellung eines *Drug* **139** das in einer konvergenten Synthese aus 17β -HSD2 Inhibitor **30** und Benzoesäure **149** dargestellt wurde.

Die Bioverfügbarkeit von *Drug* **139** wurde in einem Tiermodell in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe AG VOLLMER (TU Dresden) an Wistar-Hannover Ratten getestet. Die finale Quantifizierung von *Drug* **139** in den Plasmaproben konnte nicht erfolgreich durchgeführt werden. Jedoch wurde in diesem *in vivo* Experiment demonstriert, dass das *Drug* **139** bioverfügbar ist. Dies äußerte sich in einem hohen Plasmaspiegel an 17β -HSD2 Inhibitor **30** und bestätigt somit unsere Strategie mit der Verstoffwechslung von *Drug* **139**. Nachdem die ausstehenden pharmakologischen Untersuchungen durchgeführt wurden, wird entschieden ob dieses Konzept eine geeignete Strategie darstellt.

6 Experimenteller Teil

6.1 Vorbemerkung zum experimentellen Teil

6.1.1 Materialien und Methoden

Alle eingesetzten Lösungsmittel wurden destillativ von höher siedenden Verunreinigungen befreit. Wasser wurde durch einen Ionenaustauscher entionisiert. Alle Reaktionen die mit sauerstoff- oder hydrolyseempfindlichen Substanzen, sowie bei Reaktionen, die bei tiefen Temperaturen durchgeführt worden sind, wurden in ausgeheizten Apparaturen unter Schutzgasatmosphäre (Argon) durchgeführt. Es wurde eine Wechselhahnanlage mit einer Drehschiebervakuumpumpe (*vacuubrand* RZ2, Nenndruck $4 \cdot 10^{-4}$ bar oder *vacuubrand* RZ26, Nenndruck $4 \cdot 10^{-4}$ bar) verwendet. Spritzen und Kanülen wurden vor der Verwendung mit Argon gespült. Bei Reaktionen unter Schutzgasatmosphäre wurden die Schläuche mehrfach evakuiert und mit Argon geflutet. Das Entgasen von Lösungsmitteln erfolgte mittels *Freeze-Pump-Thaw*-Methode. Die Lagerung von hydrolyse- und sauerstoffempfindlichen Substanzen erfolgte in zuvor ausgeheizten Schlenk-Apparaturen unter Argon. Alle kommerziell erhältlichen Reagenzien wurden, soweit nicht anders angegeben, ohne weitere Reinigung verwendet.

Aceton: Wurde von höher siedenden Verunreinigungen am Rotationsverdampfer entfernt. Anschließende Trocknung über Molekularsieb (4 Å, 0.4 nm, Perlform) der Firma CARL ROTH.

Benzol: Wurde von höher siedenden Verunreinigungen am Rotationsverdampfer entfernt. Anschließende Trocknung über Molekularsieb (4 Å, 0.4 nm, Perlform) der Firma CARL ROTH.

Chloroform: Stabilisiert, 99.8 % der Firma ACROS ORGANICS. Verwendet ohne weitere Reinigung.

Deuterowasserstoff-d₂: wurde von der Firma SIGMA ALDRICH erworben, über Molekularsieb (4 Å, 0.4 nm, Perlform) der Firma CARL ROTH gelagert und ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Deuteroaceton-d₆: wurde von der Firma SIGMA ALDRICH erworben, über Molekularsieb (4 Å, 0.4 nm, Perlform) der Firma CARL ROTH gelagert und ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Deuteroaceton-d₆: wurde von der Firma SIGMA ALDRICH erworben, über Molekularsieb (4 Å, 0.4 nm, Perlform) der Firma CARL ROTH gelagert und ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Deuterobenzol-d₆: wurde von der Firma SIGMA ALDRICH erworben, über Molekularsieb (4 Å, 0.4 nm, Perlform) der Firma CARL ROTH gelagert und ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Deuterodimethylsulfoxid-d₆: wurde von der Firma EURISO TOP erworben, über Molekularsieb (4 Å, 0.4 nm, Perlform) der Firma CARL ROTH unter Argon gelagert und ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Dichlormethan: HPLC grade Qualität der Firma VWR wurde unter Rückfluss mit Calciumhydrid erhitzt und anschließend unter Argon destilliert.

Diethylether: HPLC grade Qualität der Firma VWR wurde unter Rückfluss mit Solvona[®]-Kugeln der Firma DR. BILGER UMWELTCONSULTING erhitzt und anschließend unter Argon destilliert.

Methanol HPLC grade Qualität der Firma VWR wurde über Magnesiumspäne getrocknet und unter Argon destilliert.

Tetrahydrofuran: HPLC grade Qualität der Firma VWR wurde mit Solvona[®]-Kugeln der Firma DR. BILGER UMWELTCONSULTING und Benzophenon als Feuchtigkeits- und Sauerstoffindikator unter Rückfluss erhitzt und anschließend unter Argon destilliert.

Toluol wurde von der Firma SIGMA ALDRICH erworben, über Natrium getrocknet und unter Argon destilliert.

6.1.2 Chromatographie

Dünnschichtchromatographie

Es wurden DC-Fertigplatten Kieselgel 60 auf Glas mit Fluoreszenzindikator F₂₅₄ der Firma MERCK verwendet. Neben der Detektion der Fluoreszenzauslöschung mit einer UV-Lampe ($\lambda = 254$ nm) wurden Platten durch Eintauchen in eine der folgenden Lösungen und anschließendem Erwärmen mit einem Heißluftföhn angefärbt.

Cer(IV)-sulfat/Molybdatophosphorsäure-Tauchlösung: 10.0 g Ammoniummolybdat-Hexahydrat, 0.40 g Cer(IV)sulfat, 10 mL konz. Schwefelsäure und 90 mL Wasser.

Kaliumpermanganat-Tauchlösung: 3.00 g Kaliumpermanganat, 20.0 g Natriumcarbonat, 240 mL Wasser und 1 Plättchen Natriumhydroxid.

Anisaldehyd-Tauchlösung: 2.00 g Anisaldehyd, 200 mL Eisessig, 4 mL konzentrierte Schwefelsäure.

Flashchromatographie

Für die präparative säulenchromatographische Trennung wurde zum einen Kieselgel 60 (Korngrößenverteilung 40-63 μm , 70%) der Firma MERCK als stationäre Phase verwendet. Zum anderen wurde basisches und neutrales Aluminiumoxid (Korngrößenverteilung 63-200 μm , 70%) mit der Aktivitätsstufe I von der Firma MACHERY-NAGEL verwendet, wobei letzteres vorher mit Wasser versetzt wurde um Aktivitätsstufe III zu erhalten. Kieselgel wurde im jeweiligen Laufmittel, als Suspension in die Säule gefüllt und verdichtet. Bei Verwendung von Aluminiumoxid, wurde die Säule mit Pentan gefüllt und anschließend die stationäre Phase hinzugegeben. Das Rohprodukt wurde in wenig Laufmittel gelöst und entweder direkt, oder als *Dry Load*, gebunden an Kieselgel auf die

Säule aufgetragen. Druck wurde mit Hilfe eines Stickstoffanschlusses mit Druckregler aufgebaut. Die Säulengröße, Kieselgelmenge und Fraktionsgröße wurde in Anlehnung an die Empfehlung von W. C. STILL *et al.* gewählt.^[157] Die verwendeten Lösungsmittel wurden vor dem Gebrauch am Rotationsverdampfer destilliert. Die automatisierte Flashchromatographie wurde entweder mit einem TELEDYNE ISCO *Combiflash Rf+ 150* oder einem TELEDYNE ISCO *NEXTGEN 300+* mit vorgefertigten Kieselgelsäulen von REDISEPRF durchgeführt.

Präparative HPLC

Präparative HPLC wurde mit einer *Prepstar 218* von VARIAN durchgeführt. Ein *ProStar 320* Detektor von VARIAN wurde eingesetzt und die Detektion bei einer Wellenlänge von $\lambda = 254$ nm überwacht. Eine ProntoSIL[®] C₁₈-Säule (5.0 μm , 120 Å, 250-32 mm) wurde als stationär Phase verwendet. Als mobile Phase wurde ein Gradient bestehend aus Acetonitril und Wasser (0.1% TFA), bei einer Flussrate von 20 mL/min verwendet. Lösungsmittel wurde nur mit HPLC grade Reinheit eingesetzt.

Liquid chromatography mass spectrometry (LC MS)

Die Spektren wurden an einer *DIONEX UltiMate3000*, bestehend aus Dioden Array Detektor (DAD), Säule, Autosampler und Pumpe, von THERMO SCIENTIFIC verwendet. Eine NUCLEODUR[®] C₁₈-Säule (3.0 μm , 120 Å, 100-5 mm) wurde als stationär Phase verwendet. Als mobile Phase wurde ein Gradient bestehend aus Acetonitril und Wasser (0.1% TFA), bei einer Flussrate von 0.8 mL/min verwendet. Lösungsmittel wurde nur mit HPLC grade Reinheit eingesetzt. Massenspektrometrie wurde an einem TSQ Quantum (Triple Quadrupole) THERMO FISHER durchgeführt.

High resolution mass (HRMS) Die Spektren wurden an einer *DIONEX UltiMate3000*, bestehend aus Dioden Array Detektor (DAD), Säule, Autosampler und Pumpe, von THERMO SCIENTIFIC verwendet. Eine NUCLEODUR[®] C₁₈-Säule (3.0 μm , 120 Å, 100-5 mm) wurde als stationär Phase verwendet. Als mobile Phase wurde ein Gradient bestehend aus Acetonitril und Wasser (0.1% TFA), bei einer Flussrate von 0.8 mL/min verwendet. Lösungsmittel wurde nur mit HPLC grade Reinheit eingesetzt. Die hochauflösenden Massen wurden an einem SpectraSystems-MSQ (THERMO SCIENTIFIC) aufgenommen.

6.1.3 Physikalische Daten

Alle physikalisch relevanten Daten sind in Tabellen aufgeführt. Alle Einheiten befinden sich hinter den physikalischen Größen in eckigen Klammern.

Kernresonanzspektroskopie

Die NMR-Spektren wurden an *AV-300* und *UltraShield Plus 500* Spektrometern der Firma BRUKER oder *ECX-400* und *ECA-500* Spektrometern der Firma JEOL, sofern nicht anders angegeben,

bei Raumtemperatur gemessen. Messungen am *AV-300*, *ECX-400*, *ECA-500* Spektrometern wurden in der Analytikabteilung des Fachbereiches Pharmazeutische Chemie der Philipps-Universität Marburg von Dipl.-Ing. Nina Zitzer und Dr. Regina Ortmann durchgeführt. Die Messungen am *UltraShield Plus 500* Spektrometer der Firma BRUKER wurden von mir am Helmholtz-Institut für Pharmazeutische Forschung Saarland (HIPS) in Saarbrücken aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen sind auf der δ -Skala in ppm (parts per million) angegeben und beziehen sich relativ zu Tetramethylsilan. Die Zuordnung der ^1H - und ^{13}C -Signale erfolgte mittels 2D-Experimenten (COSY, HMQC, HSQC, HMBC), wobei Standardpulssequenzen verwendet wurden. Aus den aufgelösten Kopplungsmustern der ^1H -Spektren wurden die Kopplungskonstanten (J) aus den Multipletts ermittelt und werden in Hertz (Hz) angegeben. Dabei sind folgende Multiplizitäten von Relevanz: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett), quin (Quintett), sext (Sextett), sept (Septett), dd (Dublett vom Dublett), ddd (Dublett vom Dublett vom Dublett), dt (Dublett vom Triplet). Bei nicht aufgelösten Multipletts (m) erfolgt die Angabe der chemischen Verschiebung (δ) als Mittelwert. Die Signale der ^{19}F - und ^{31}P -NMR-Spektren sind jeweils relativ zu CFCl_3 und konzentrierter Phosphorsäure als externer Standard angegeben. Für die Aufnahme der ^1H -, ^{13}C -, ^{19}F - und ^{31}P -NMR-Spektren wurden folgende Lösungsmittel verwendet.

^1H -NMR (ppm): $(\text{CD}_3)_2\text{CO} = 2.05$, $\text{CDCl}_3 = 7.26$, $\text{DMSO-d}_6 = 2.50$, $\text{C}_6\text{D}_6 = 7.16$.

^{13}C -NMR (ppm): $(\text{CD}_3)_2\text{CO} = 29.84$, $\text{CDCl}_3 = 77.16$, $\text{DMSO-d}_6 = 39.52$, $\text{C}_6\text{D}_6 = 128.06$.

Infrarotspektroskopie

Die IR-Spektren wurden mit einem ALPHA FT-IR Interferometer der Firma BRUKER aufgenommen. Die Lage der Absorptionsbanden ist in Wellenzahlen ν (cm^{-1}), die Intensität mit br (breit), s (stark), m (mittel) und w (schwach) angegeben.

Massenspektrometrie

Die Aufnahme der Massenspektren von leicht ionisierbaren Verbindungen erfolgte mit einem Finnigan LTQ-FT mit einer ESI-Quelle der Firma THERMO FISHER SCIENTIFIC. Bei schwer ionisierbaren Verbindungen erfolgte die Aufnahme mit einem AccuTOF-GCv der Firma JOEL. Dabei wurden EI- und LIFDI-Quellen verwendet. Sind hochauflösende Massenspektren erhalten worden, sind diese separat gekennzeichnet (HRMS). Alle Messungen sind durch Mitarbeiter der analytischen Abteilung des Fachbereiches der Pharmazeutischen Chemie der Philipps-Universität Marburg und mir am Helmholtz-Institut für Pharmazeutische Forschung Saarland (HIPS) in Saarbrücken durchgeführt worden.

Schmelzpunkte

Alle Schmelzpunkte wurden mit einem MP70 der Firma METTLER TOLEDO in einer einseitig offenen

Kapillare bestimmt und wurden nicht korrigiert.

6.1.4 Physikochemische Daten

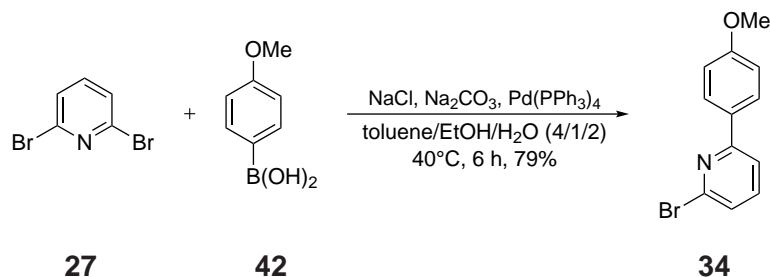
Die Bestimmung der cLogP- und cLogD-Werte wurde mit ACD/PERCEPTA (2012 Version) bestimmt. Der cLogP-Wert wurde mit der „GALAS“ (*Global Adjusted Locally According to Similarity*). Dabei werden cLogP-Werte von bereits Literatur bekannten Verbindungen für eine Vorhersage verwendet.

6.1.5 Sprache

Um eine spätere Publikation bislang unveröffentlichter Ergebnisse in den gängigen englischsprachigen Fachzeitschriften zu erleichtern, wurden die Versuchsbeschreibungen in englischer Sprache verfasst.

6.2 Versuchsbeschreibung zur synthetischen Darstellung von nichtsteroidalen selektiven 17 β -HSD14 Inhibitoren

6.2.1 2-Bromo-6-(4-methoxyphenyl)pyridine



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|------------------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Pyridine 27 | 236.89 | 1.00 | 0.51 | 2.15 | - | - |
| Boronic acid 42 | 151.96 | 1.00 | 0.33 | 2.15 | - | - |
| NaCl | 58.44 | 0.50 | 0.06 | 1.08 | - | - |
| Na ₂ CO ₃ | 105.99 | 4.00 | 0.91 | 8.61 | - | - |
| Pd(PPh ₃) ₄ | 1155.6 | 0.05 | 0.12 | 0.11 | - | - |

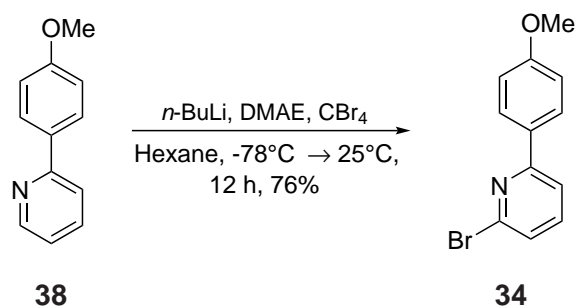
A solution of toluene, EtOH and H₂O (4/1/2, 25.0 mL) was degassed with argon for 30 min. Afterwards dibromopyridine **27** (0.51 g, 2.15 mmol, 1.00 eq), boronic acid **42** (0.33 g, 2.15 mmol, 1.00 eq), NaCl (0.06 g, 1.08 mmol, 0.50 eq), Na₂CO₃ (0.91 g, 8.61 mmol, 4.00 eq) and Pd(PPh₃)₄ (0.12 g, 0.11 mmol, 5mol%). The mixture was heated to 40 °C and left stirring for 6 h under argon atmosphere. After the mixture cooled down to rt, it was extracted with EtOAc and washed with H₂O, brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash column chromatography on silica using cyclohexane/EtOAc (5/1) giving bromopyridine **34** (0.45 g, 1.70 mmol, 79%) as a white solid.

¹H-NMR: 400 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 8.01 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.94 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.78 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.51 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.06 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 3.83 (s, 3H).

¹³C-NMR: 101 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 161.1, 158.4, 142.2, 139.0, 128.5, 125.6, 118.3, 114.3, 55.5.

MS-ESI⁺: *m/z* calcd. for C₁₂H₁₀BrNO [M+H]⁺: 262.99; found: 264.11.

6.2.2 2-Bromo-6-(4-methoxyphenyl)pyridine



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|----------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Pyridine 38 | 185.23 | 1.00 | 0.49 | 2.66 | - | - |
| <i>n</i> -BuLi 2.5 M | 64.06 | 6.00 | - | 15.9 | 6.37 | - |
| DMAE | 89.14 | 3.00 | - | 7.97 | 0.80 | 0.89 |
| CBr ₄ | 331.63 | 3.50 | 3.08 | 9.30 | - | - |

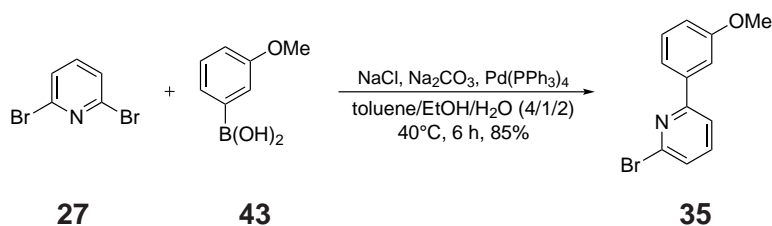
Under argon atmosphere, *n*-BuLi (6.37 mL, 15.9 mmol, 6.00 eq) was added dropwise at 0 °C to a solution of DMAE (0.80 mL, 7.97 mmol, 3.00eq) in hexane (3.00 mL) and left stirring for 30 min. A solution of pyridine **38** (0.49 g, 2.66 mmol, 1.00 eq) in hexane (3.00 mL) was added dropwise to the first prepared solution and left stirring for 1 h. The mixture was cooled to -78 °C and a solution of CBr₄ (3.08 g, 9.30 mmol, 3.50 eq) in hexane (3.00 mL) was added dropwise and left stirring for over night at rt. The mixture was cooled to 0 °C and H₂O was added to quench the reaction. The mixture was extracted with EtOAc and the combined organic layers were washed with H₂O, brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash column chromatography on silica using cyclohexane/EtOAc (5/1) giving bromopyridine **34** (0.57 g, 2.14 mmol, 76%) as a yellow solid.

¹H-NMR: 400 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 8.01 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.93 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.77 (td, *J* = 7.8, 0.6 Hz, 1H), 7.51 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.05 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 3.82 (s, 3H).

¹³C-NMR: 101 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 160.7, 157.3, 141.3, 140.4, 129.3, 128.1, 125.7, 118.6, 114.3, 55.3.

MS-ESI⁺: *m/z* calcd. for C₁₂H₁₀BrNO [M+H]⁺: 262.99; found: 264.03.

6.2.3 2-Bromo-6-(3-methoxyphenyl)pyridine



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|------------------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Pyridine 27 | 236.89 | 1.00 | 0.50 | 2.11 | - | - |
| Boronic acid 43 | 151.96 | 1.00 | 0.32 | 2.11 | - | - |
| NaCl | 58.44 | 0.50 | 0.06 | 1.06 | - | - |
| Na ₂ CO ₃ | 105.99 | 4.00 | 0.89 | 8.44 | - | - |
| Pd(PPh ₃) ₄ | 1155.6 | 0.05 | 0.12 | 0.11 | - | - |

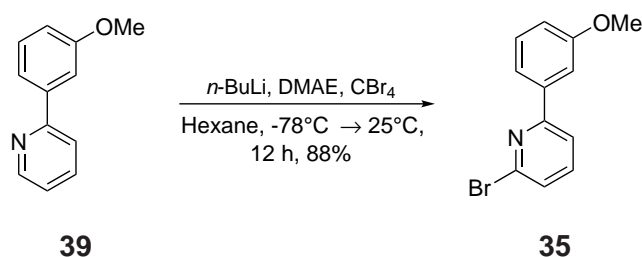
A solution of toluene, EtOH and H₂O (4/1/2, 25.0 mL) was degassed with argon for 30 min. Afterwards dibromopyridine **27** (0.50 g, 2.11 mmol, 1.00 eq), boronic acid **43** (0.32 g, 2.11 mmol, 1.00 eq), NaCl (0.06 g, 1.06 mmol, 0.50 eq), Na₂CO₃ (0.89 g, 8.44 mmol, 4.00 eq) and Pd(PPh₃)₄ (0.12 g, 0.11 mmol, 5mol%). The mixture was heated to 40 °C and left stirring for 6 h under argon atmosphere. After the mixture cooled down to rt, it was extracted with EtOAc and washed with H₂O, brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash column chromatography on silica using cyclohexane/EtOAc (5/1) giving bromopyridine **35** (0.47 g, 1.78 mmol, 85%) as a white solid.

¹H-NMR: 400 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 8.03 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.83 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.62 (dd, J = 10.8, 4.3 Hz, 2H), 7.57 (m, 1H), 7.43 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 7.06 (m, 1H), 3.84 (s, 3H).

¹³C-NMR: 101 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 160.2, 158.5, 142.2, 139.2, 139.1, 129.9, 126.6, 119.5, 119.3, 115.7, 112.4, 55.6.

MS-ESI⁺: m/z calcd. for C₁₂H₁₀BrNO [M+H]⁺: 262.99; found: 264.11.

6.2.4 2-Bromo-6-(3-methoxyphenyl)pyridine



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|----------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Pyridine 39 | 185.23 | 1.00 | 0.33 | 1.79 | - | - |
| <i>n</i> -BuLi 2.5 M | 64.06 | 6.00 | - | 10.7 | 4.29 | - |
| DMAE | 89.14 | 3.00 | - | 5.37 | 0.54 | 0.89 |
| CBr ₄ | 331.63 | 3.50 | 2.08 | 6.26 | - | - |

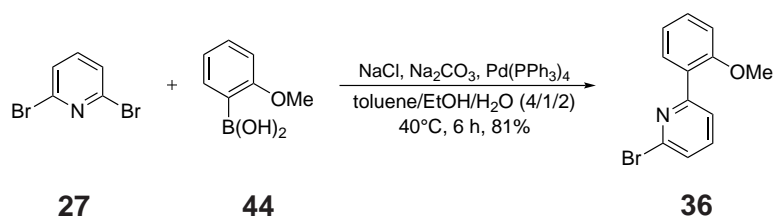
Under argon atmosphere, *n*-BuLi (4.29 mL, 10.7 mmol, 6.00 eq) was added dropwise at 0 °C to a solution of DMAE (0.54 mL, 5.37 mmol, 3.00eq) in hexane (3.00 mL) and left stirring for 30 min. A solution of pyridine **39** (0.33 g, 1.79 mmol, 1.00 eq) in hexane (3.00 mL) was added dropwise to the first prepared solution and left stirring for 1 h. The mixture was cooled to -78 °C and a solution of CBr₄ (2.08 g, 6.26 mmol, 3.50 eq) in hexane (3.00 mL) was added dropwise and left stirring for over night at rt. The mixture was cooled to 0 °C and H₂O was added to quench the reaction. The mixture was extracted with EtOAc and the combined organic layers were washed with H₂O, brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash column chromatography on silica using cyclohexane/EtOAc (5/1) giving bromopyridine **35** (0.42 g, 1.57 mmol, 88%) as a yellow solid.

¹H-NMR: 400 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 8.02 (dd, *J* = 7.8, 1.2 Hz, 1H), 7.82 (td, *J* = 7.8, 1.3 Hz, 1H), 7.59 (m, 3H), 7.42 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.05 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 3.84 (s, 3H).

¹³C-NMR: 101 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 159.7, 157.2, 141.3, 140.5, 138.3, 130.1, 126.9, 119.8, 119.0, 115.5, 111.8, 55.3.

MS-ESI⁺: *m/z* calcd. for C₁₂H₁₀BrNO [M+H]⁺: 262.99; found: 264.04.

6.2.5 2-Bromo-6-(2-methoxyphenyl)pyridine



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|------------------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Pyridine 27 | 236.89 | 1.00 | 0.51 | 2.15 | - | - |
| Boronic acid 44 | 151.96 | 1.00 | 0.33 | 2.15 | - | - |
| NaCl | 58.44 | 0.50 | 0.06 | 1.08 | - | - |
| Na ₂ CO ₃ | 105.99 | 4.00 | 0.91 | 8.61 | - | - |
| Pd(PPh ₃) ₄ | 1155.6 | 0.05 | 0.12 | 0.11 | - | - |

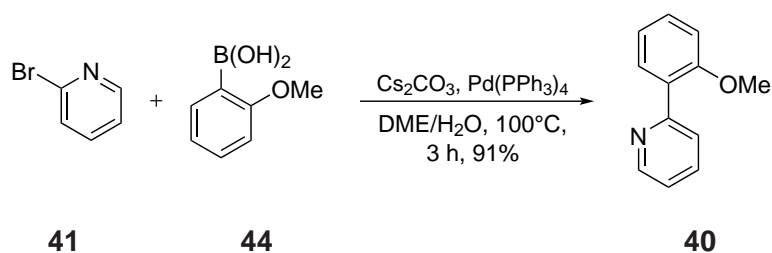
A solution of toluene, EtOH and H₂O (4/1/2, 25.0 mL) was degassed with argon for 30 min. Afterwards dibromopyridine **27** (0.51 g, 2.15 mmol, 1.00 eq), boronic acid **44** (0.33 g, 2.15 mmol, 1.00 eq), NaCl (0.06 g, 1.08 mmol, 0.50 eq), Na₂CO₃ (0.91 g, 8.61 mmol, 4.00 eq) and Pd(PPh₃)₄ (0.12 g, 0.11 mmol, 5mol%). The mixture was heated to 40 °C and left stirring for 6 h under argon atmosphere. After the mixture cooled down to rt, it was extracted with EtOAc and washed with H₂O, brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash column chromatography on silica using cyclohexane/EtOAc (5/1) giving bromopyridine **36** (0.46 g, 1.74 mmol, 81%) as a white solid.

¹H-NMR: 400 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 7.45 (dd, J = 7.7, 0.8 Hz, 1H), 7.32 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.26 (dd, J = 7.9, 2.0 Hz, 1H), 7.11 (dd, J = 7.8, 0.8 Hz, 1H), 6.99 (ddd, J = 8.3, 7.4, 1.8 Hz, 1H), 6.72 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 6.63 (td, J = 7.5, 1.0 Hz, 1H), 3.40 (s, 3H).

¹³C-NMR: 101 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 156.9, 156.3, 140.8, 139.4, 130.9, 130.6, 127.7, 126.1, 124.1, 120.7, 112.1, 55.7.

MS-ESI⁺: m/z calcd. for C₁₂H₁₀BrNO [M+H]⁺: 262.99; found: 264.09.

6.2.6 2-(2-methoxyphenyl)pyridine



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|------------------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Pyridine 41 | 158.00 | 1.00 | - | 3.24 | 0.32 | 1.62 |
| Boronic acid 44 | 151.96 | 1.10 | 0.54 | 3.57 | - | - |
| Cs ₂ CO ₃ | 325.82 | 2.00 | 2.11 | 6.48 | - | - |
| Pd(PPh ₃) ₄ | 1155.6 | 0.05 | 0.19 | 0.16 | - | - |

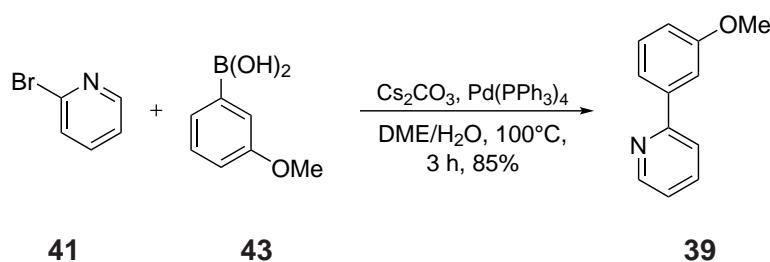
A DME/H₂O (15.0 mL, 1/1) mixture was prepared and degassed for 1 h with argon. Bromide **41** (0.32 mL, 3.24 mmol, 1.00 eq), boronic acid **44** (0.54 g, 3.57 mmol, 1.10 eq), Cs₂CO₃ (2.11 g, 6.48 mmol, 2.00 eq) and Pd(PPh₃)₄ (0.19 g, 0.16 mmol, 5mol%) were suspended in the solution. The mixture was heated to 100 °C and left stirring for 3 h under argon atmosphere. After the mixture cooled down to rt, the aqueous layer was extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with H₂O, brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash column chromatography on silica using cyclohexane/EtOAc (10/1) giving pyridine **40** (0.55 g, 2.96 mmol, 91%) as a pale oil.

¹H-NMR: 400 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 8.65 (d, *J* = 4.7 Hz, 1H), 7.80 (m, 2H), 7.73 (dd, *J* = 7.6, 1.1 Hz, 1H), 7.40 (dd, *J* = 7.8, 1.4 Hz, 1H), 7.30 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 7.15 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.06 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 3.83 (s, 3H).

¹³C-NMR: 101 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 156.7, 155.2, 149.3, 135.9, 130.7, 130.1, 128.4, 124.8, 122.0, 120.6, 111.9, 55.6.

MS-ESI⁺: *m/z* calcd. for C₁₂H₁₁NO [M+H]⁺: 185.08; found: 186.12.

6.2.7 2-(3-methoxyphenyl)pyridine



| | M [$\frac{\text{g}}{\text{mol}}$] | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | ρ [$\frac{\text{g}}{\text{mL}}$] |
|------------------------------------|-------------------------------------|------|-------|----------|--------|---|
| Pyridine 41 | 158.00 | 1.00 | - | 3.22 | 0.31 | 1.62 |
| Boronic acid 43 | 151.96 | 1.10 | 0.54 | 3.54 | - | - |
| Cs ₂ CO ₃ | 325.82 | 2.00 | 2.10 | 6.43 | - | - |
| Pd(PPh ₃) ₄ | 1155.6 | 0.05 | 0.19 | 0.16 | - | - |

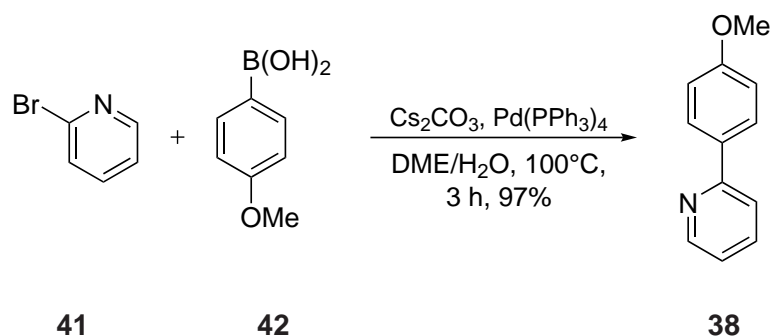
A DME/H₂O (15.0 mL, 1/1) mixture was prepared and degassed for 1 h with argon. Bromide **41** (0.31 mL, 3.22 mmol, 1.00 eq), boronic acid **43** (0.54 g, 3.54 mmol, 1.10 eq), Cs₂CO₃ (2.10 g, 6.43 mmol, 2.00 eq) and Pd(PPh₃)₄ (0.19 g, 0.16 mmol, 5mol%) were suspended in the solution. The mixture was heated to 100 °C and left stirring for 3 h under argon atmosphere. After the mixture cooled down to rt, the aqueous layer was extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with H₂O, brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash column chromatography on silica using cyclohexane/EtOAc (10/1) giving pyridine **39** (0.51 g, 2.74 mmol, 85%) as a pale oil.

¹H-NMR: 400 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 8.67 (d, *J* = 4.7 Hz, 1H), 7.96 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.87 (td, *J* = 7.7, 1.7 Hz, 1H), 7.65 (m, 2H), 7.40 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.35 (dd, *J* = 7.4, 4.8 Hz, 1H), 7.01 (dd, *J* = 8.2, 2.5 Hz, 1H), 3.83 (s, 3H).

¹³C-NMR: 101 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 159.7, 155.7, 149.4, 140.1, 137.1, 129.8, 122.7, 120.4, 118.8, 114.8, 111.6, 55.1.

MS-ESI⁺: *m/z* calcd. for C₁₂H₁₁NO [2M+H]⁺: 185.08; found: 371.22.

6.2.8 2-(4-methoxyphenyl)pyridine



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|-----------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Pyridine 41 | 158.00 | 1.00 | - | 3.17 | 0.31 | 1.62 |
| Boronic acid 42 | 151.96 | 1.10 | 0.53 | 3.49 | - | - |
| Cs_2CO_3 | 325.82 | 2.00 | 2.07 | 6.34 | - | - |
| $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ | 1155.6 | 0.05 | 0.18 | 0.16 | - | - |

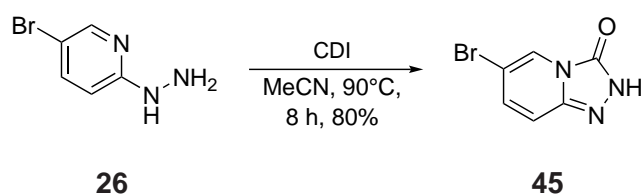
A DME/H₂O (15.0 mL, 1/1) mixture was prepared and degassed for 1 h with argon. Bromide **41** (0.31 mL, 3.22 mmol, 1.00 eq), boronic acid **42** (0.53 g, 3.49 mmol, 1.10 eq), Cs_2CO_3 (2.07 g, 6.34 mmol, 2.00 eq) and $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0.18 g, 0.16 mmol, 5mol%) were suspended in the solution. The mixture was heated to 100 °C and left stirring for 3 h under argon atmosphere. After the mixture cooled down to rt, the aqueous layer was extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with H₂O, brine, dried over MgSO_4 , filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash column chromatography on silica using cyclohexane/EtOAc (10/1) giving pyridine **38** (0.57 g, 3.07 mmol, 97%) as a pale solid.

¹H-NMR: 400 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 8.61 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 8.04 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.87 (dd, J = 8.0, 0.9 Hz, 1H), 7.81 (td, J = 7.7, 1.8 Hz, 1H), 7.27 (m, 1H), 7.04 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 3.81 (s, 3H).

¹³C-NMR: 101 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 160.1, 155.8, 149.4, 137.1, 131.2, 127.9, 121.8, 119.4, 114.1, 55.2.

MS-ESI⁺: m/z calcd. for C₁₂H₁₁NO $[\text{M}+\text{H}]^+$: 185.08; found: 186.01.

6.2.9 6-Bromo-[1,2,4]triazolo[4,3-a]pyridin-3(2H)-one



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|---------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Hydrazine 26 | 188.03 | 1.00 | 4.08 | 21.7 | - | - |
| CDI | 162.15 | 1.10 | 3.87 | 23.9 | - | - |

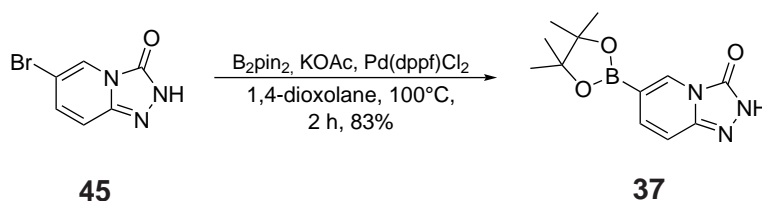
To a suspension of hydrazine **26** (4.08 g, 21.7 mmol, 1.00 eq) in MeCN (50.0 mL), CDI (3.87 g, 23.9 mmol, 1.10 eq) was added. The reaction mixture was stirred for 1 h and then allowed to warm up to rt. The mixture was heated to 90 °C and left stirring for 2 h under argon atmosphere. After the mixture cooled down to rt, the precipitate was filtered, washed with cold MeCN and dried *in vacuo* to give triazole **45** (3.71 g, 17.3 mmol, 80%) as a slightly yellow solid

¹H-NMR: 400 MHz, DMSO-*d*₆; δ (ppm) = 2.58 (s, 1H), 8.05 (s, 1H), 7.22 (dd, *J* = 4.2, 1.3 Hz, 2H).

¹³C-NMR: 101 MHz, DMSO-*d*₆; δ (ppm) = 149.1, 140.8, 133.2, 123.9, 117.2, 104.5.

MS-ESI⁺: *m/z* calcd. for C₆H₄BrN₃O [M+H]⁺: 212.95; found: 213.90.

6.2.10 6-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-[1,2,4]triazolo[4,3-a]pyridin-3(2H)-one



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|---------------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Triazole 45 | 214.02 | 1.00 | 0.20 | 0.92 | - | - |
| B ₂ pin ₂ | 253.94 | 1.10 | 0.26 | 1.10 | - | - |
| KOAc | 98.15 | 3.00 | 0.27 | 2.76 | - | - |
| Pd(dppf) ₂ | 731.70 | 0.03 | 0.02 | 0.03 | - | - |

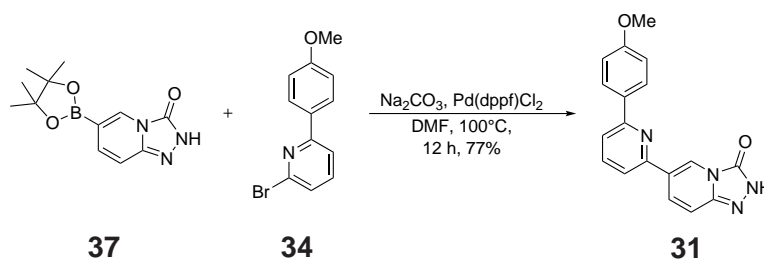
To a suspension of triazole **45** (0.20 g, 0.93 mmol, 1.00 eq) in 1,4-dioxane (7.50 mL), B₂pin₂ (0.26 g, 1.03 mmol, 1.10 eq) and KOAc (0.28 g, 2.80 mmol, 3.00 eq) were added. After the mixture has been degassed for 30 min with argon, Pd(dppf)₂ (0.02 mg, 0.03 mmol, 3mol%) was added. The mixture was heated to 100 °C and left stirring for 12 h under argon atmosphere. After the mixture cooled down to rt, it was diluted with EtOAc and washed with H₂O, brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo* to give oxoborolane **37** (0.20 g, 0.78 mmol, 83%) was obtained as a pink solid.

¹H-NMR: 400 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 12.50 (s, 1H), 7.87 (s, 1H), 7.17 (q, $J = 9.4$ Hz, 2H), 1.29 (s, 12H).

¹³C-NMR: 101 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 149.4, 142.2, 132.3, 130.8, 115.2, 109.3, 84.2, 24.5.

MS-ESI⁻: m/z calcd. for C₁₂H₁₆BN₃O₃ [M-H]⁻: 261.13; found: 260.10.

6.2.11 6-(6-(4-Methoxyphenyl)pyridin-2-yl)-[1,2,4]triazolo[4,3-a]pyridin-3(2H)-one



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|---------------------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Oxoborolane 37 | 261.09 | 1.00 | 0.25 | 0.96 | - | - |
| Bromopyridine 34 | 264.12 | 1.50 | 0.38 | 1.45 | - | - |
| Na ₂ CO ₃ , 2 M | 105.99 | 3.00 | - | 2.89 | 1.45 | - |
| Pd(dppf)Cl ₂ | 731.70 | 0.03 | 0.02 | 0.03 | - | - |

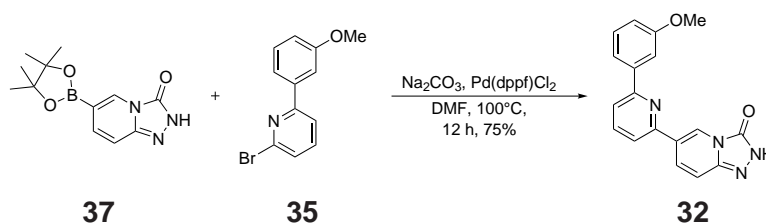
To a suspension of oxoborolane **37** (0.25 g, 0.96 mmol, 1.00 eq) in DMF (4.00 mL), bromopyridine **34** (0.38 g, 1.45 mmol, 1.50 eq) and Na₂CO₃ (1.45 mL, 2.89 mmol, 2 M, 3.00 eq) were added. After the mixture has been degassed for 30 min with argon, Pd(dppf)₂ (0.02 g, 0.03 mmol, 3mol%) was added. The mixture was heated to 100 °C and left stirring for 3 h under argon atmosphere. After the mixture cooled down to rt, it was diluted with EtOAc and washed with H₂O, brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash column chromatography on silica using cyclohexane/EtOAc (1/1) giving pyridinone **31** (0.24 g, 0.74 mmol, 77%) as a white solid.

¹H-NMR: 500 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 12.56 (s, 1H), 8.57 (s, 1H), 8.14 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 8.07 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H), 7.91 (d, *J* = 4.7 Hz, 2H), 7.86 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H), 7.37 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H), 7.08 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 3.83 (s, 3H).

¹³C-NMR: 126 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 160.4, 155.4, 151.8, 150.1, 142.1, 138.4, 130.9, 129.2, 128.0, 122.6, 121.9, 118.4, 117.6, 115.7, 114.2, 55.3.

MS-ESI⁺: *m/z* calcd. for C₁₈H₁₄N₄O₂ [M+H]⁺: 318.11; found: 319.29.

6.2.12 6-(6-(3-Methoxyphenyl)pyridin-2-yl)-[1,2,4]triazolo[4,3-a]pyridin-3(2H)-one



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|---------------------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Oxoborolane 37 | 261.09 | 1.00 | 0.23 | 0.89 | - | - |
| Bromopyridine 35 | 264.12 | 1.50 | 0.35 | 1.33 | - | - |
| Na ₂ CO ₃ , 2 M | 105.99 | 3.00 | - | 2.67 | 1.34 | - |
| Pd(dppf)Cl ₂ | 731.70 | 0.03 | 0.02 | 0.03 | - | - |

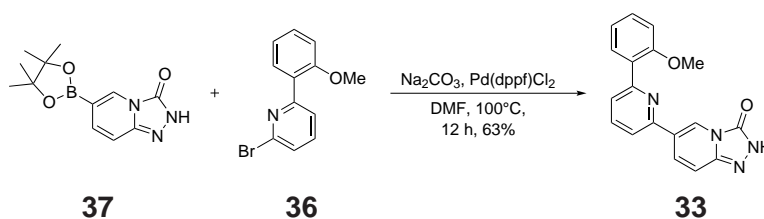
To a suspension of oxoborolane **37** (0.23 g, 0.89 mmol) in DMF (4.00 mL), bromopyridine **35** (0.35 g, 1.33 mmol) and Na₂CO₃ (1.34 mL, 2.67 mmol, 2 M, 3.00 eq) were added. After the mixture has been degassed for 30 min with argon, Pd(dppf)₂ (0.02 g, 0.03 mmol, 3mol%) was added. The mixture was heated to 100 °C and left stirring for 3 h under argon atmosphere. After the mixture cooled down to rt, it was diluted with EtOAc and washed with H₂O, brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash column chromatography on silica using cyclohexane/EtOAc (1/1) giving pyridinone **32** (0.22 g, 0.67 mmol, 75%) as a white solid.

¹H-NMR: 500 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 12.56 (s, 1H), 8.58 (m, 1H), 8.08 (dd, J = 9.7, 1.7 Hz, 1H), 7.99 (dd, J = 6.9, 2.0 Hz, 1H), 7.95 (dd, J = 11.3, 4.4 Hz, 2H), 7.75 (dd, J = 7.7, 0.9 Hz, 1H), 7.71 (m, 1H), 7.45 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 7.37 (dd, J = 9.9, 1.0 Hz, 1H), 7.05 (m, 1H), 3.86 (s, 3H).

¹³C-NMR: 126 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 159.7, 155.4, 151.9, 150.0, 142.1, 139.8, 138.4, 130.1, 129.9, 129.0, 123.7, 122.4, 122.0, 119.3, 118.9, 118.5, 115.7, 115.5, 114.6, 112.2, 110.4, 55.2.

MS-ESI⁺: m/z calcd. for C₁₈H₁₄N₄O₂ [M+H]⁺: 318.11; found: 319.21.

6.2.13 6-(6-(2-Methoxyphenyl)pyridin-2-yl)-[1,2,4]triazolo[4,3-a]pyridin-3(2H)-one



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|---------------------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Oxoborolane 37 | 261.09 | 1.00 | 0.24 | 0.94 | - | - |
| Bromopyridine 36 | 264.12 | 1.50 | 0.37 | 1.41 | - | - |
| Na ₂ CO ₃ , 2 M | 105.99 | 3.00 | - | 2.81 | 1.41 | - |
| Pd(dppf)Cl ₂ | 731.70 | 0.03 | 0.02 | 0.03 | - | - |

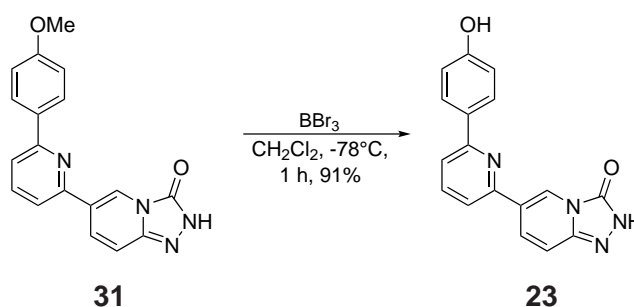
To a suspension of oxoborolane **37** (0.24 g, 0.94 mmol, 1.00 eq) in DMF (4.00 mL), bromopyridine **36** (0.37 g, 1.41 mmol, 1.50 eq) and Na₂CO₃ (1.41 mL, 2.81 mmol, 2 M, 3.00 eq) were added. After the mixture has been degassed for 30 min with argon, Pd(dppf)₂ (0.02 g, 0.03 mmol, 3mol%) was added. The mixture was heated to 100 °C and left stirring for 3 h under argon atmosphere. After the mixture cooled down to rt, it was diluted with EtOAc and washed with H₂O, brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash column chromatography on silica using cyclohexane/EtOAc (1/1) giving pyridinone **33** (0.19 g, 0.67 mmol, 63%) as a white solid.

¹H-NMR: 500 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 12.55 (s, 1H), 8.54 (m, 1H), 8.03 (dd, J = 10.0, 1.7 Hz, 1H), 7.95 (dd, J = 7.7, 0.9 Hz, 2H), 7.90 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.86 (dd, J = 7.6, 1.9 Hz, 1H), 7.82 (dd, J = 7.7, 0.9 Hz, 1H), 3.86 (s, 3H).

¹³C-NMR: 126 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 162.2, 156.9, 154.8, 151.8, 150.0, 142.1, 137.2, 130.6, 130.3, 129.1, 128.1, 123.7, 123.7, 122.6, 121.8, 120.7, 117.8, 115.6, 115.5, 112.0, 55.6, 35.7, 30.7.

MS-ESI⁺: m/z calcd. for C₁₈H₁₄N₄O₂ [M+H]⁺: 318.11; found: 319.24.

6.2.14 6-(6-(4-Hydroxyphenyl)pyridin-2-yl)-[1,2,4]triazolo[4,3-a]pyridin-3(2H)-one



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Pyridinone 31 | 318.34 | 1.00 | 0.14 | 0.45 | - | - |
| BBr ₃ , 1 M | 250.52 | 3.30 | - | 1.49 | 1.49 | 1.33 |

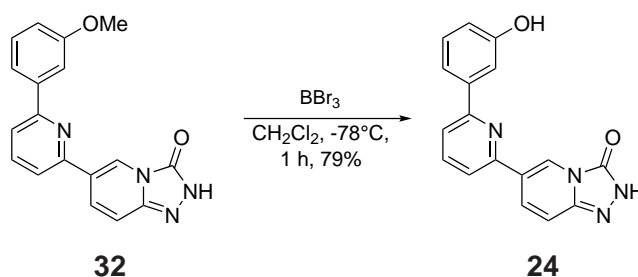
To a solution of pyridinone **31** (0.14 g, 0.45 mmol, 1.00 eq) in anhydrous CH₂Cl₂ (13.0 mL), BBr₃ (1.58 mL, 1.58 mmol, 1.00 M, 3.30 eq) was added dropwise at -78°C . The reaction mixture was stirred for 1 h and then allowed to warm up to rt. The mixture was cooled to 0°C and H₂O was added to quench the reaction. The mixture was extracted with EtOAc and the combined organic layers were washed with H₂O, brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash column chromatography on silica using cyclohexane/EtOAc (1/1) giving phenole **23** (0.13 g, 0.41 mmol, 91%) as a white solid.

¹H-NMR: 500 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 12.55 (s, 1H), 9.76 (s, 1H), 8.56 (s, 1H), 8.06 (dd, $J = 9.7, 1.7$ Hz, 1H), 8.03 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.93-7.84 (m, 2H), 7.80 (dd, $J = 6.6, 2.0$ Hz, 1H), 7.36 (dd, $J = 9.7, 1.1$ Hz, 1H), 6.91 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H).

¹³C-NMR: 126 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 158.7, 155.8, 151.6, 150.0, 142.1, 138.2, 129.3, 129.1, 128.0, 122.6, 121.7, 118.0, 117.1, 115.6.

MS-ESI⁺: m/z calcd. for C₁₇H₁₂N₄O₂ [M+H]⁺: 304.10; found: 305.18.

6.2.15 6-(6-(3-Hydroxyphenyl)pyridin-2-yl)-[1,2,4]triazolo[4,3-a]pyridin-3(2H)-one



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Pyridinone 32 | 318.34 | 1.00 | 0.14 | 0.46 | - | - |
| BBr ₃ , 1 M | 250.52 | 3.30 | - | 1.51 | 1.51 | 1.33 |

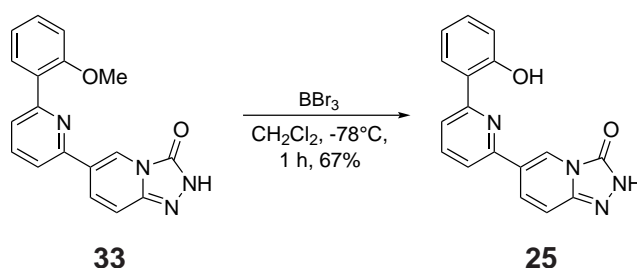
To a solution of pyridinone **32** (0.14 g, 0.46 mmol, 1.00 eq) in anhydrous CH₂Cl₂ (13.0 mL), BBr₃ (1.51 mL, 1.51 mmol, 1.00 M, 3.30 eq) was added dropwise at -78°C . The reaction mixture was stirred for 1 h and then allowed to warm up to rt. The mixture was cooled to 0°C and H₂O was added to quench the reaction. The mixture was extracted with EtOAc and the combined organic layers were washed with H₂O, brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash column chromatography on silica using cyclohexane/EtOAc (1/1) giving phenole **24** (0.11 g, 0.36 mmol, 79%) as a white solid.

¹H-NMR: 500 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 12.57 (s, 1H), 9.61 (s, 1H), 8.58 (m, 2H), 8.07 (dd, $J = 9.9, 1.7$ Hz, 1H), 7.96 (m, 3H), 7.85 (dd, $J = 7.3, 1.1$ Hz, 2H), 7.62 (m, 2H), 7.56 (d, $J = 7.7$ Hz, 0H), 7.39 (dd, $J = 9.9$ Hz, 1.0, 1H), 7.32 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 6.87 (dd, $J = 8.0$ Hz, 2.5, 1H).

¹³C-NMR: 126 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 157.8, 155.7, 151.8, 150.0, 142.1, 139.7, 138.4, 129.8, 129.0, 122.5, 121.9, 119.1, 118.4, 117.3, 116.3, 115.7, 113.3.

MS-ESI⁺: m/z calcd. for C₁₇H₁₂N₄O₂ [M+H]⁺: 304.10; found: 305.21.

6.2.16 6-(6-(2-Hydroxyphenyl)pyridin-2-yl)-[1,2,4]triazolo[4,3-a]pyridin-3(2H)-one



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Pyridinone 33 | 318.34 | 1.00 | 0.15 | 0.47 | - | - |
| BBr ₃ , 1 M | 250.52 | 3.30 | - | 1.55 | 1.55 | 1.33 |

To a solution of pyridinone **33** (0.15 g, 0.47 mmol, 1.00 eq) in anhydrous CH₂Cl₂ (13.0 mL), BBr₃ (1.55 mL, 1.55 mmol, 1.00 M, 3.30 eq) was added dropwise at -78°C . The reaction mixture was stirred for 1 h and then allowed to warm up to rt. The mixture was cooled to 0°C and H₂O was added to quench the reaction. The mixture was extracted with EtOAc and the combined organic layers were washed with H₂O, brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash column chromatography on silica using cyclohexane/EtOAc (1/1) giving phenole **25** (0.10 g, 0.31 mmol, 67%) as a white solid.

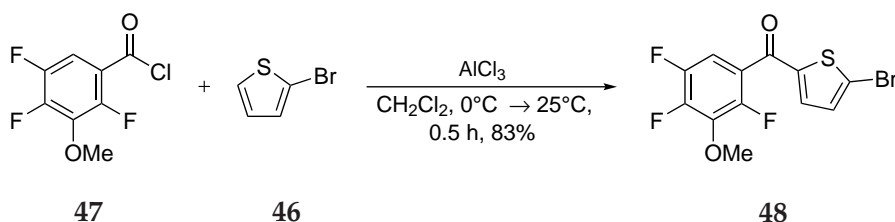
¹H-NMR: 500 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 13.35 (s, 1H), 12.61 (s, 1H), 8.43 (s, 1H), 8.16 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.04 (m, 3H), 7.81 (dd, J = 9.9, 1.6 Hz, 1H), 7.43 (d, J = 9.9 Hz, 1H), 7.34 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 6.97 (d, J = 7.8 Hz, 2H).

¹³C-NMR: 126 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 158.7, 155.8, 151.6, 150.0, 142.1, 138.2, 129.3, 129.1, 128.0, 122.6, 121.7, 118.0, 117.1, 115.6.

MS-ESI⁺: m/z calcd. for C₁₇H₁₂N₄O₂ [M+H]⁺: 304.10; found: 305.24.

6.3 Versuchsbeschreibung nichtsteroidalen selektiven 17 β -HSD2 Inhibitoren

6.3.1 (5-bromothiophen-2-yl)(2,4,5-trifluoro-3-methoxyphenyl)methanone



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|-------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Acid chloride 47 | 224.56 | 1.00 | 50.0 | 212 | - | - |
| Thiophen 46 | 163,03 | 1.50 | - | 317 | 33.2 | 1.59 |
| AlCl ₃ | 133.33 | 1.10 | 32.7 | 233 | - | - |

A mixture of acid chloride **47** (50.0 g, 212 mmol, 1.00 eq), thiophene **46** (33.2 mL, 317 mmol, 1.50 eq) and AlCl₃ (32.7 g, 233 mmol, 1.10 eq) in anhydrous CH₂Cl₂ (1.18 L) was stirred at 0 °C for 30 min under argon atmosphere. The reaction mixture was warmed to rt and left stirring for 1 h before being quenched dropwise with HCl (1M). The mixture was washed with H₂O and brine, dried over MgSO₄ filtered and concentrated *in vacuo*. After recrystallization from MeOH, bromide **48** (61.6 g, 175 mmol, 83%) was obtained as yellow crystals.

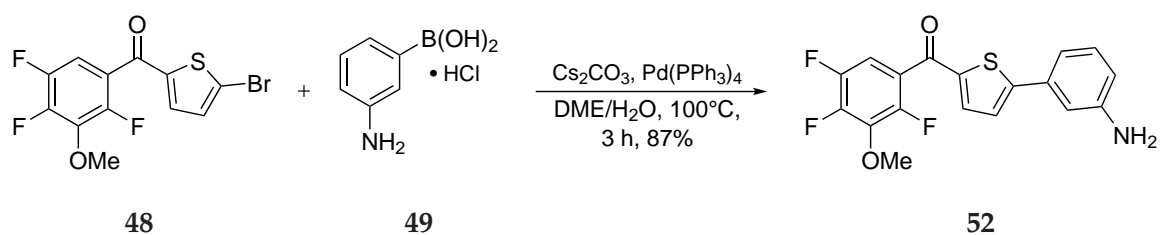
¹H-NMR: 400 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 7.58 (m, 1H), 7.54 (m, 1H), 7.46 (dd, J = 4.1, 1.1 Hz, 1H), 4.05 (s, 3H).

¹³C-NMR: 101 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 181.8, 151.3, 149.2, 148.1 (ddd, J = 246.2, 11.6, 3.3 Hz), 147.0 (ddd, J = 253.4, 15.0, 5.5 Hz), 145.5, 139.2 (ddd, J = 15.5, 11.1, 2.3 Hz), 137.8 (d, J = 2.4 Hz), 133.3, 124.9, 122.9 (ddd, J = 15.9, 6.4, 4.0 Hz), 62.7 (t, J = 3.5 Hz).

¹⁹F-NMR: 376 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = -133.7 (s, 1F), -139.7 (m, 1F), -146.8 (m, 1F).

MS-ESI⁺: m/z calcd. for C₁₂H₆BrF₃O₂S [M+H]⁺: 349.92; found: 350.98.

6.3.2 ((5-(3-aminophenyl)thiophen-2-yl)(2,4,5-trifluoro-3-methoxyphenyl)methanone



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|-----------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Bromide 48 | 351.14 | 1.00 | 0.57 | 1.62 | - | - |
| Boronic acid 49 | 173.04 | 1.20 | 0.34 | 1.95 | - | - |
| Cs_2CO_3 | 325.82 | 4.00 | 2.12 | 6.49 | - | - |
| $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ | 1155.6 | 0.05 | 0.09 | 0.08 | - | - |

A DME/ H_2O (17 mL, 1/1) mixture was prepared and degassed for 1 h with argon. Bromide **48** (0.57 g, 1.62 mmol, 1.00 eq), boronic acid **49** (0.34 g, 1.95 mmol, 1.20 eq), Cs_2CO_3 (2.12 g, 6.49 mmol, 4.00 eq) and $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0.09 g, 0.08 mmol, 5mol%) were suspended in the solution. The mixture was heated to 100°C and left stirring for 3 h under argon atmosphere. After the mixture cooled down to rt, the aqueous layer was extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with H_2O , brine, dried over MgSO_4 , filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash column chromatography on silica using cyclohexane/EtOAc (10/1) giving amine **52** (0.47 g, 1.30 mmol, 87%) as a yellow solid.

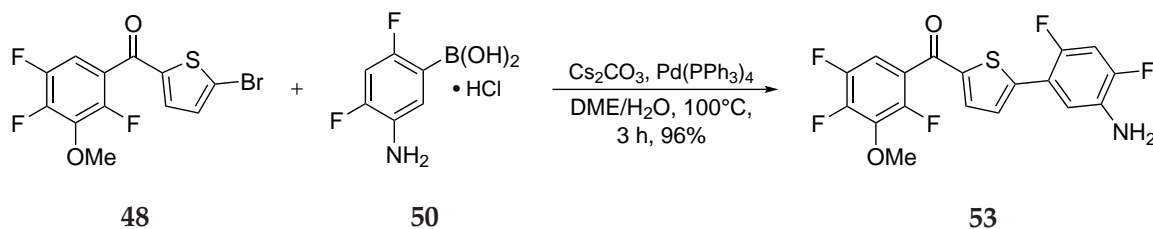
$^1\text{H-NMR}$: 400 MHz, DMSO-d_6 ; δ (ppm) = 7.68 (dd, $J = 4.1, 1.6$ Hz, 1H), 7.57 (ddd, $J = 9.9, 8.4, 5.8$ Hz, 1H), 7.52 (d, $J = 4.1$ Hz, 1H), 7.13 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 6.95 (m, 2H), 6.65 (m, 1H), 5.33 (s, 2H), 4.06 (s, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$: 101 MHz, DMSO-d_6 ; δ (ppm) = 181.8, 151.3, 149.2, 148.1 (ddd, $J = 246.2, 11.6, 3.3$ Hz), 147.0 (ddd, $J = 253.4, 15.0, 5.5$ Hz), 145.5, 139.2 (ddd, $J = 15.5, 11.1, 2.3$ Hz), 137.8 (d, $J = 2.4$ Hz), 133.3, 124.9, 122.9 (ddd, $J = 15.9, 6.4, 4.0$ Hz), 62.7 (t, $J = 3.5$ Hz).

$^{19}\text{F-NMR}$: 376 MHz, DMSO-d_6 ; δ (ppm) = -133.6 (s, 1F), -139.6 (m, 1F), -146.9 (m, 1F).

MS-ESI $^+$: m/z calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{F}_3\text{NO}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 363.05; found: 364.11.

6.3.3 (5-(5-amino-2,4-difluorophenyl)thiophen-2-yl)(2,4,5-trifluoro-3-methoxyphenyl)methanone



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|------------------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Bromide 48 | 351.14 | 1.00 | 0.57 | 1.62 | - | - |
| Boronic acid 50 | 209.38 | 1.20 | 0.42 | 1.95 | - | - |
| Cs ₂ CO ₃ | 325.82 | 4.00 | 2.12 | 6.49 | - | - |
| Pd(PPh ₃) ₄ | 1155.6 | 0.05 | 0.09 | 0.08 | - | - |

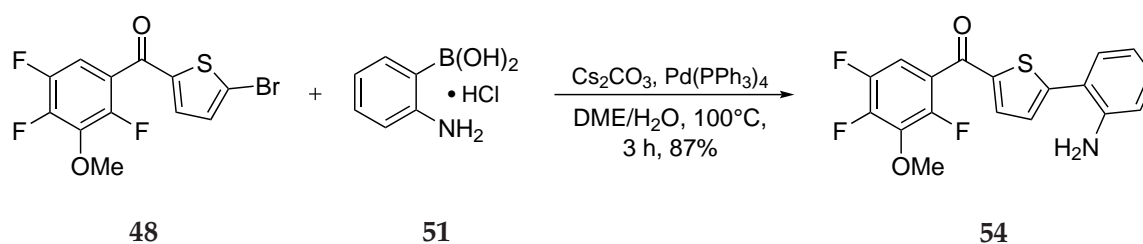
A DME/H₂O (17 mL, 1/1) mixture was prepared and degassed for 1 h with argon. Bromide **48** (0.57 g, 1.62 mmol, 1.00 eq), boronic acid **50** (0.42 g, 1.95 mmol, 1.20 eq), Cs₂CO₃ (2.12 g, 6.49 mmol, 4.00 eq) and Pd(PPh₃)₄ (0.09 g, 0.08 mmol, 5mol%) were suspended in the solution. The mixture was heated to 100 °C and left stirring for 3 h under argon atmosphere. After the mixture cooled down to rt, the aqueous layer was extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with H₂O, brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash column chromatography on silica using cyclohexane/EtOAc (10/1) giving amine **53** (0.62 g, 1.56 mmol, 96%) as a yellow solid.

¹H-NMR: 400 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 7.72 (m, 1H), 7.58 (m, 1H), 7.51 (m, 1H), 7.25 (m, 2H), 5.26 (s, 2H), 4.06 (s, 3H).

¹³C-NMR: 101 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 183.0-157.9 (dd, J = 253.1, 11.1 Hz), 157.2 (dd, J = 254.2, 12.6 Hz), 148.1 (ddd, J = 244.1, 11.0, 3.0 Hz), 147.1 (ddd, J = 244.3, 4.2, 2.9 Hz), 143.7 (ddd, J = 248.7, 15.8, 5.8 Hz), 137.4 (d, J = 1.9 Hz), 136.9 (d, J = 3.1 Hz), 131.0 (d, J = 9.6 Hz), 128.8 (d, J = 4.9 Hz), 127.7 (dd, J = 4.2, 2.0 Hz), 122.8 (dd, J = 13.7, 3.6 Hz), 118.6 (dd, J = 13.8, 4.2 Hz), 117.2 (d, J = 23.0 Hz), 107.0 (dd, J = 21.1, 3.0 Hz), 106.4 (dd, J = 27.8, 24.7 Hz).

MS-ESI⁺: m/z calcd. for C₁₈H₁₀F₅O₂S [M+H]⁺: 399.04; found: 400.03.

6.3.4 (5-(2-aminophenyl)thiophen-2-yl)(2,4,5-trifluoro-3-methoxyphenyl)methanone



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|------------------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Bromide 48 | 351.14 | 1.00 | 42.5 | 121 | - | - |
| Boronic acid 51 | 173.04 | 1.20 | 25.2 | 145 | - | - |
| Cs ₂ CO ₃ | 325.82 | 4.00 | 158 | 484 | - | - |
| Pd(PPh ₃) ₄ | 1155.6 | 0.05 | 6.99 | 6.05 | - | - |

A DME/H₂O (1.3 L, 1/1) mixture was prepared and degassed for 1 h with argon. Bromide **48** (42.5 g, 121 mmol, 1.00 eq), boronic acid **51** (25.2 g, 145 mmol, 1.20 eq), Cs₂CO₃ (158 g, 484 mmol, 4.00 eq) and Pd(PPh₃)₄ (6.99 g, 6.05 mmol, 5mol%) were suspended in the solution. The mixture was heated to 100 °C and left stirring for 3 h under argon atmosphere. After the mixture cooled down to rt, the aqueous layer was extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with H₂O, brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. After recrystallization from cyclohexane, amine **54** (44.0 g, 121 mmol, 99%) was obtained as yellow crystals.

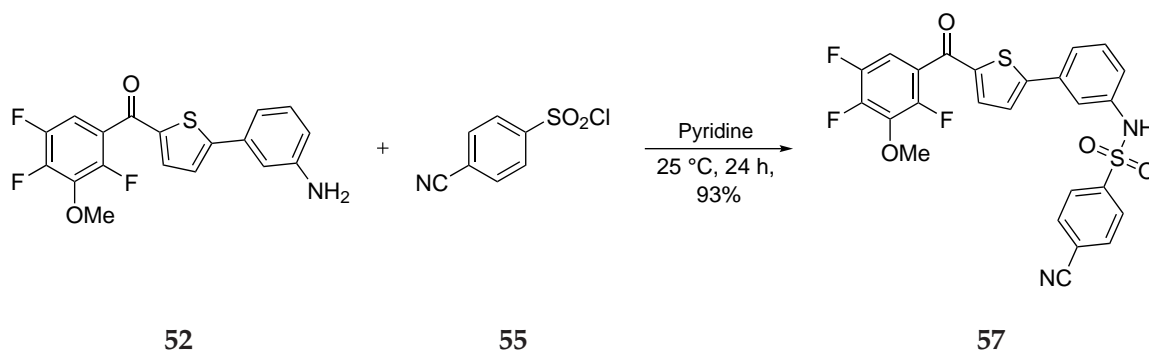
¹H-NMR: 400 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 7.70 (dd, J = 4.0, 1.5 Hz, 1H), 7.58 (ddd, J = 9.9, 8.4, 5.8 Hz, 1H), 7.45 (d, J = 4.1 Hz, 1H), 7.31-7.29 (dd, J = 7.8, 1.4 Hz, 1H), 7.14 (m, 1H), 6.85 (d, J = 7.9 Hz), 6.67 (ddd, J = 7.8, 7.4, 0.8 Hz), 5.35 (s, 2H), 4.06 (s, 3H).

¹³C-NMR: 101 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 148.5 (d, J = 248.4), 147.8 (d, J = 14.3 Hz), 146.4 (dd, J = 15.5, 5.8 Hz), 145.4 (d, J = 11.3 Hz), 143.9 (dd, J = 15.7, 4.8 Hz), 137.6 (dd, J = 16.8, 11.2 Hz), 122.2 (m), 110.2 (dd, J = 20.8, 3.0 Hz).

¹⁹F-NMR: 376 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = -134.0 (s, 1F), -139.8 (m, 1F), -147.6 (m, 1F).

MS-ESI⁺: m/z calcd. for C₁₈H₁₂F₃NO₂S [M+H]⁺: 363.05; found: 364.12.

6.3.5 4-cyano-*N*-(3-(5-(2,4,5-trifluoro-3-methoxybenzoyl)thiophen-2-yl)phenyl)benzenesulfonamide



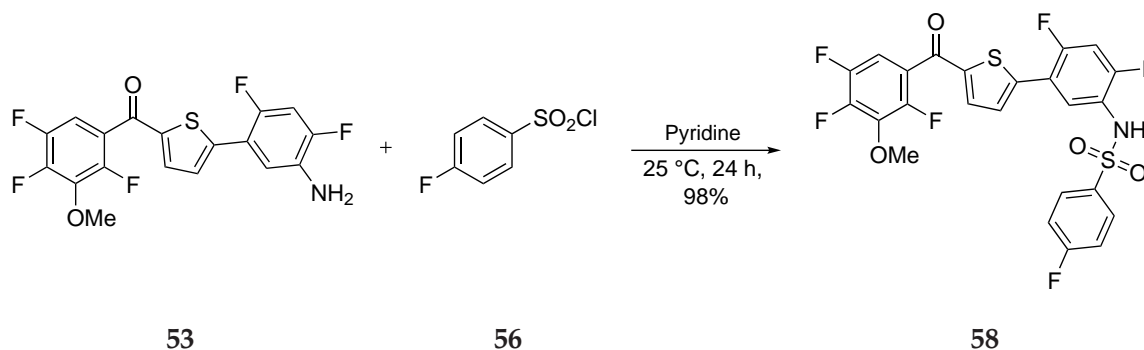
| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|-----------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Amine 52 | 363.35 | 1.00 | 0.31 | 0.85 | - | - |
| Sulfonyl chloride 55 | 201.62 | 1.50 | 0.27 | 1.28 | - | - |

Under argon atmosphere, amine **52** (0.31 g, 0.85 mmol, 1.00 eq) was dissolved in pyridine (5.84 mL) and spiked with sulfonyl chloride **55** (0.27 g, 1.28 mmol, 1.50 eq). The mixture was left stirring overnight at rt and was quenched by adding HCl (6 M). The mixture was extracted with EtOAc and the combined organic layers were washed with sat. NaHCO₃, brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash column chromatography on silica using cyclohexane/EtOAc (2/1) giving amide **57** (0.42 g, 0.79 mmol, 93%) as a yellow solid.

¹H-NMR: 400 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 10.94 (s, 1H), 8.06 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.95 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.66 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 7.55 (dd, *J* = 11.8, 5.9 Hz, 2H), 7.47 (s, 1H), 7.38 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.19 (m, 2H), 4.05 (s, 3H).

¹³C-NMR: 101 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 82.8, 153.7, 148.1 (ddd, *J* = 244.4, 10.9, 3.2 Hz), 148.1-145.96 (m), 144.5-142.4 (m), 143.1-138.2 (d, *J* = 2.1 Hz), 137.0 (ddd, *J* = 17.9, 12.9, 2.9 Hz), 135.0, 134.1, 131.4, 128.8, 126.2, 123.7, 123.0 (ddd, *J* = 15.2, 6.6, 3.9 Hz), 122.6, 119.3, 118.0, 117.3, 106.9 (dd, *J* = 21.1, 3.0 Hz).

6.3.6 *N*-(2,4-difluoro-5-(5-(2,4,5-trifluoro-3-methoxybenzoyl)thiophen-2-yl)phenyl)-4-fluorobenzenesulfonamide



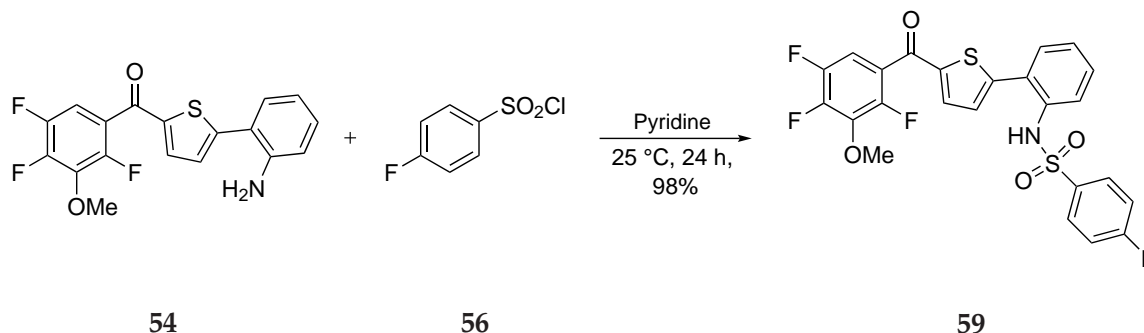
| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|-----------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Amine 53 | 399.34 | 1.00 | 0.35 | 0.88 | - | - |
| Sulfonyl chloride 56 | 194.60 | 1.50 | 0.26 | 1.31 | - | - |

Under argon atmosphere, amine **53** (0.35 g, 0.88 mmol, 1.00 eq) was dissolved in pyridine (6.01 mL) and spiked with sulfonyl chloride **56** (0.26 g, 1.31 mmol, 1.50 eq). The mixture was left stirring overnight at rt and was quenched by adding HCl (6 M). The mixture was extracted with EtOAc and the combined organic layers were washed with sat. NaHCO₃, brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash column chromatography on silica using cyclohexane/EtOAc (2/1) giving amide **58** (0.46 g, 0.82 mmol, 94%) as a yellow solid.

¹H-NMR: 400 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 10.39 (s, 1H), 7.80 (dd, J = 8.7, 5.2 Hz, 2H), 7.70 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 7.65 (t, J = 8.2 Hz, 1H), 7.58 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 7.51 (t, J = 10.4 Hz, 1H), 7.42 (t, J = 8.8 Hz, 2H), 7.22 (dt, J = 13.9, 6.9 Hz, 1H), 4.05 (s, 3H).

¹³C-NMR: 101 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 183.0-157.9 (dd, J = 253.1, 11.1 Hz), 157.2 (dd, J = 254.2, 12.6 Hz), 148.1 (ddd, J = 244.1, 11.0, 3.0 Hz), 147.1 (ddd, J = 244.3, 4.2, 2.9 Hz), 144.7 (m), 143.7 (ddd, J = 248.7, 15.8, 5.8 Hz), 137.4 (d, J = 1.9 Hz), 137.1 (m), 136.9 (d, J = 3.1 Hz), 131.0 (d, J = 9.6 Hz), 128.8 (d, J = 4.9 Hz), 127.7 (dd, J = 4.2, 2.0 Hz), 123.0 (m), 122.8 (dd, J = 13.7, 3.6 Hz), 118.6 (dd, J = 13.8, 4.2 Hz), 117.2 (d, J = 23.0 Hz), 107.0 (dd, J = 21.1, 3.0 Hz), 106.4 (dd, J = 27.8, 24.7 Hz).

6.3.7 4-fluoro-*N*-(2-(5-(2,4,5-trifluoro-3-methoxybenzoyl)thiophen-2-yl)phenyl)benzenesulfonamide



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|-----------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Amine 54 | 363.35 | 1.00 | 35.7 | 98.1 | - | - |
| Sulfonyl chloride 56 | 194.60 | 1.50 | 29.2 | 147 | - | - |

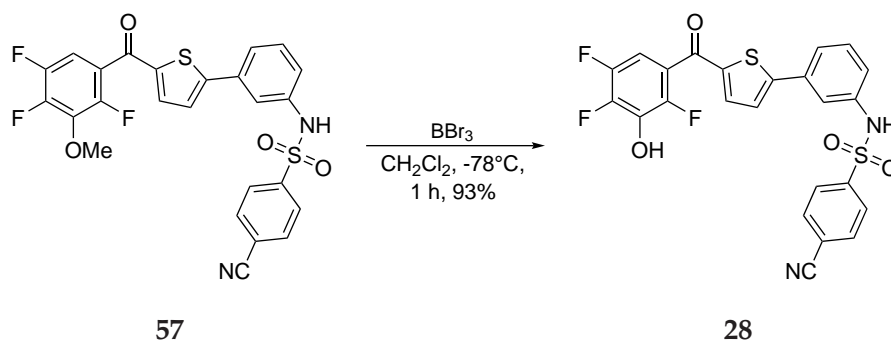
Under argon atmosphere, amine **54** (35.7 g, 98.1 mmol, 1.00 eq) was dissolved in pyridine (700 mL) and spiked with sulfonyl chloride **56** (29.2 g, 147 mmol, 1.50 eq). The mixture was left stirring overnight at rt and was quenched by adding HCl (6 M). The mixture was extracted with EtOAc and the combined organic layers were washed with sat. NaHCO₃, brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. After recrystallization from MeOH, amide **59** (50.2 g, 96.3 mmol, 98%) was obtained as yellow crystals.

¹H-NMR: 400 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 10.03 (s, 1H), 7.79 (m, 4H), 7.53 (m, 2H), 7.36 (m, 4H), 6.85 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 4.08 (s, 3H).

¹³C-NMR: 101 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 182.0, 165.6, 163.1, 150.5, 148.5 (dd, J = 248.6, 2.5 Hz), 146.8 (ddd, J = 245.7, 11.4, 2.7 Hz), 146.5 (m), 144.0 (m), 142.1, 137.6 (m), 137.1, 136.5 (d, J = 2.1 Hz), 132.9, 131.5, 130.2, 129., 129.8, 129.7, 128.6, 128.1, 122.5 (m), 116.5, 116.3, 110.3 (dd, J = 3.8, 2.9 Hz), 62.3.

¹⁹F-NMR: 376 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = -103.5 (s, 1F), -131.8 (s, 1F), -138.5 (s, 1F), -145.1 (s, 1F).

6.3.8 4-cyano-*N*-(3-(5-(2,4,5-trifluoro-3-hydroxybenzoyl)thiophen-2-yl)phenyl)benzenesulfonamide



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Amide 57 | 528.52 | 1.00 | 0.25 | 0.48 | - | - |
| BBr ₃ , 1 M | 250.52 | 3.30 | - | 1.58 | 1.58 | 1.33 |

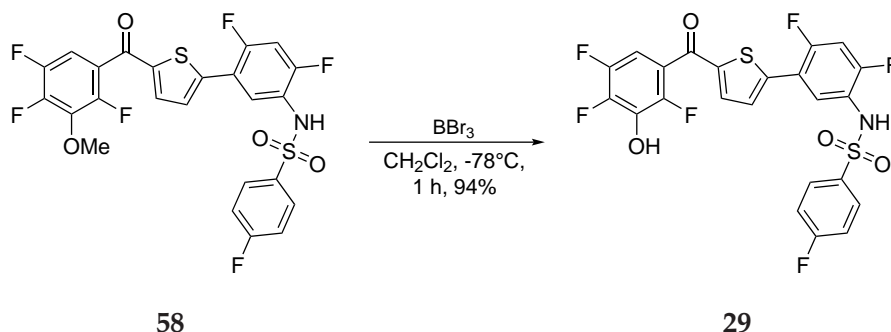
To a solution of methoxybenzene **57** (0.25 g, 0.48 mmol, 1.00 eq) in anhydrous CH₂Cl₂ (1.26 mL), BBr₃ (1.58 mL, 1.58 mmol, 1.00 M, 3.30 eq) was added dropwise at -78°C . The reaction mixture was stirred for 1 h and then allowed to warm up to rt. The mixture was cooled to 0°C and H₂O was added to quench the reaction. The mixture was extracted with EtOAc and the combined organic layers were washed with H₂O, brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash column chromatography on silica using cyclohexane/EtOAc (2/1) giving phenol **28** (0.23 g, 0.45 mmol, 93%) as a orange solid.

¹H-NMR: 400 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 10.94 (s, 2H), 8.06 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.95 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.66 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 7.55 (dd, J = 11.8, 5.9 Hz, 2H), 7.47 (s, 1H), 7.38 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.19 (m, 2H).

¹³C-NMR: 101 MHz, acetone-d₆; δ (ppm) = 82.8, 153.7, 148.1 (ddd, J = 244.4, 10.9, 3.2 Hz), 148.1-145.96 (m), 144.5-142.4 (m), 143.1-138.2 (d, J = 2.1 Hz), 137.0 (ddd, J = 17.9, 12.9, 2.9 Hz), 135.0, 134.1, 131.4, 128.8, 126.2, 123.7, 123.0 (ddd, J = 15.2, 6.6, 3.9 Hz), 122.6, 119.3, 118.0, 117.3, 106.9 (dd, J = 21.1, 3.0 Hz).

MS-ESI⁺: m/z calcd. for C₂₃H₁₃F₄NO₄S₂ [M+NH₄]⁺: 514.03; found: 532.15.

6.3.9 *N*-(2,4-difluoro-5-(5-(2,4,5-trifluoro-3-hydroxybenzoyl)thiophen-2-yl)phen-yl)phen-yl)-4-fluorobenzenesulfonamide



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Amide 58 | 557.48 | 1.00 | 0.25 | 0.45 | - | - |
| BBr ₃ , 1 M | 250.52 | 3.30 | - | 1.50 | 1.50 | 1.33 |

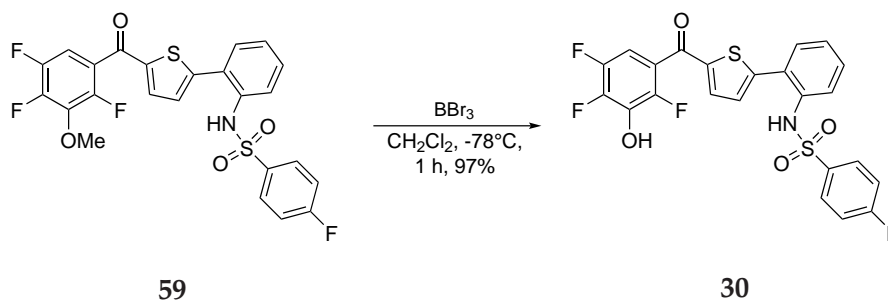
To a solution of methoxybenzene **58** (0.25 g, 0.45 mmol, 1.00 eq) in anhydrous CH₂Cl₂ (1.19 mL), BBr₃ (1.50 mL, 1.50 mmol, 1.00 M, 3.30 eq) was added dropwise at -78°C . The reaction mixture was stirred for 1 h and then allowed to warm up to rt. The mixture was cooled to 0°C and H₂O was added to quench the reaction. The mixture was extracted with EtOAc and the combined organic layers were washed with H₂O, brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash column chromatography on silica using cyclohexane/EtOAc (2/1) giving phenol **29** (0.23 g, 0.43 mmol, 94%) as a orange solid.

¹H-NMR: 400 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 11.27 (s, 1H), 10.39 (s, 1H), 7.80 (dd, $J = 8.7, 5.2$ Hz, 2H), 7.70 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H), 7.65 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.58 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H), 7.51 (t, $J = 10.4$ Hz, 1H), 7.42 (t, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.22 (dt, $J = 13.9, 6.9$ Hz, 1H).

¹³C-NMR: 101 MHz, acetone-d₆; δ (ppm) = 183.0-157.9 (dd, $J = 253.1, 11.1$ Hz), 157.2 (dd, $J = 254.2, 12.6$ Hz), 148.1 (ddd, $J = 244.1, 11.0, 3.0$ Hz), 147.1 (ddd, $J = 244.3, 4.2, 2.9$ Hz), 145.7-143.7 (m), 143.7 (ddd, $J = 248.7, 15.8, 5.8$ Hz), 137.4 (d, $J = 1.9$ Hz), 137.2-137.0 (m), 136.9 (d, $J = 3.1$ Hz), 131.0 (d, $J = 9.6$ Hz), 128.8 (d, $J = 4.9$ Hz), 127.7 (dd, $J = 4.2, 2.0$ Hz), 123.1-122.8 (m), 122.8 (dd, $J = 13.7, 3.6$ Hz), 118.6 (dd, $J = 13.8, 4.2$ Hz), 117.2 (d, $J = 23.0$ Hz), 107.0 (dd, $J = 21.1, 3.0$ Hz), 106.4 (dd, $J = 27.8, 24.7$ Hz).

MS-ESI⁺: m/z calcd. for C₂₃H₁₁F₆NO₄S₂ [M+H]⁺: 543.00; found: 544.20.

6.3.10 4-fluoro-*N*-(2-(5-(2,4,5-trifluoro-3-hydroxybenzoyl)thiophen-2-yl)phenyl)benzenesulfonamide



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Amide 59 | 521.50 | 1.00 | 20.2 | 38.7 | - | - |
| BBr ₃ , 1 M | 250.52 | 3.30 | - | 128 | 128 | 1.33 |

To a solution of methoxybenzene **58** (20.2 g, 38.7 mmol, 1.00 eq) in anhydrous CH₂Cl₂ (101 mL), BBr₃ (128 mL, 128 mmol, 1.00 M, 3.30 eq) was added dropwise at -78°C . The reaction mixture was stirred for 1 h and then allowed to warm up to rt. The mixture was cooled to 0°C and H₂O was added to quench the reaction. The mixture was extracted with EtOAc and the combined organic layers were washed with H₂O, brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. After recrystallization from toluene, phenol **30** (19.3 g, 37.7 mmol, 97%) was obtained as orange crystals.

¹H-NMR: 400 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 11.31 (s, 1H), 10.04 (s, 1H), 7.69 (m, 3H), 7.62 (m, 1H), 7.53 (m, 1H), 7.36 (m, 4H), 7.20 (dd, $J = 14.2, 8.6$ Hz, 1H), 6.88 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H).

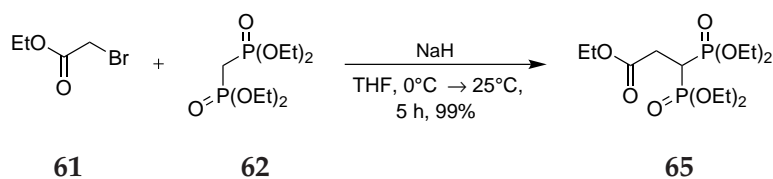
¹³C-NMR: 101 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 150.2, 142.3, 136.8, 136.6-136.2 (m), 133.1-132.9 (m), 131.6, 130.2, 129.8, 129.8, 128.6, 128.1, 122.5-121.5 (m), 116.4 (d, $J = 22.9$ Hz), 105.49 (dd, $J = 21.3, 2.5$ Hz).

¹⁹F-NMR: 376 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = -106.09 (s, 1F), -137.14 (s, 1F), -140.96 (s, 1F), -151.27 (s, 1F).

MS-ESI⁺: m/z calcd. for C₂₃H₁₃F₄NO₄S₂ [M+H]⁺: 507.02; found: 508.40.

6.4 Versuchsbeschreibung zur synthetischen Darstellung eines *Drugs*

6.4.1 ethyl 3,3-bis(diethoxyphosphoryl)propanoate



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Phosphonate 62 | 282.22 | 1.00 | 1.00 | 3.40 | - | - |
| Bromoacetate 61 | 167.00 | 1.20 | - | 4.08 | 0.46 | 1.51 |
| NaH, 57% in min. oil | 23.99 | 1.60 | 0.16 | 3.74 | - | - |

Under argon atmosphere, phosphonate **62** (1.00 g, 3.40 mmol, 1.00 eq) was dissolved in anhydrous THF (3.00 mL) and the solution was cooled to 0 °C. Sodium hydride (0.16 g, 3.74 mmol, 1.10 eq) was added to the solution and the mixture was left stirring for 30 min. The solution was allowed to warm up to rt and it was left stirring for 1 h. The suspension was cooled to 0 °C and a solution of bromoacetate **61** (0.46 mL, 4.08 mmol, 1.20 eq) in THF (2 mL) was added dropwise. The mixture was left stirring over night and the reaction was quenched by adding H₂O at 0 °C the next day. The mixture was diluted with EtOAc and washed with H₂O. The aqueous layer was extracted with EtOAc and the combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash column chromatography on silica using cyclohexane/EtOAc (1/1) giving phosphonate **65** (1.26 g, 3.37 mmol, 99%) as a yellow viscous oil.

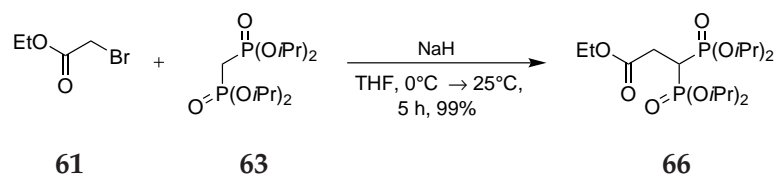
¹H-NMR: 400 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 4.07 (m, 10H), 2.88 (tt, J = 23.4, 6.3 Hz, 1H), 2.67 (td, J = 15.8, 6.3 Hz, 2H), 1.21 (m, 15H).

¹³C-NMR: 101 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 170.3 (t, J = 9.2 Hz), 62.2 (dd, J = 14.4, 6.4 Hz), 60.7, 33.9 (t, J = 134.6 Hz), 30.2 (t, J = 3.7 Hz), 16.1 (d, J = 5.7 Hz), 13.9.

³¹P-NMR: 202 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 22.5 (s, 2P).

MS-ESI⁺: m/z calcd. for C₁₃H₂₈O₈P₂ [M+H]⁺: 374.13; found: 375.13.

6.4.2 ethyl 3,3-bis(diisopropoxyphosphoryl)propanoate



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Phosphonate 63 | 344.32 | 1.00 | 1.00 | 2.85 | - | - |
| Bromoacetate 61 | 167.00 | 1.20 | - | 3.42 | 0.39 | 1.51 |
| NaH, 57% in min. oil | 23.99 | 1.60 | 0.13 | 3.13 | - | - |

Under argon atmosphere, phosphonate **63** (1.00 g, 2.85 mmol, 1.00 eq) was dissolved in anhydrous THF (3.00 mL) and the solution was cooled to 0 °C. Sodium hydride (0.13 g, 3.13 mmol, 1.10 eq) was added to the solution and the mixture was left stirring for 30 min. The solution was allowed to warm up to rt and it was left stirring for 1 h. The suspension was cooled to 0 °C and a solution of bromoacetate **61** (0.39 mL, 3.42 mmol, 1.20 eq) in THF (3.00 mL) was added dropwise. The mixture was left stirring over night and the reaction was quenched by adding H₂O at 0 °C the next day. The mixture was diluted with EtOAc and washed with H₂O. The aqueous layer was extracted with EtOAc and the combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash column chromatography on silica using cyclohexane/EtOAc (1/1) giving phosphonate **66** (1.22 g, 2.84 mmol, 99%) as a white solid.

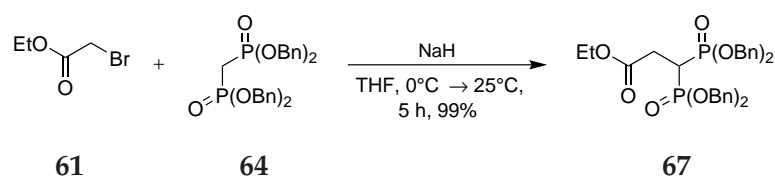
¹H-NMR: 500 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 4.64 (m, 4H), 4.09 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 2.73 (tt, J = 23.5, 5.9 Hz, 1H), 2.60 (td, J = 15.9, 6.0 Hz, 2H), 1.25 (m, 24H), 1.20 (t, J = 7.0 Hz, 4H).

¹³C-NMR: 126 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 170.3 (t, J = 9.0 Hz), 70.8 (d, J = 6.0 Hz), 70.6 (d, J = 7.2 Hz), 60.7, 33.9 (t, J = 136.2 Hz), 30.6 (t, J = 4.2 Hz), 23.7 (dd, J = 9.0, 3.0 Hz), 23.4 (dd, J = 4.8, 2.4 Hz), 13.9.

³¹P-NMR: 202 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 20.6 (s, 2P).

MS-ESI⁺: m/z calcd. for C₁₇H₃₆O₈P₂ [M+H]⁺: 430.19; found: 431.33.

6.4.3 ethyl 3-bis(bis(benzyloxy)phosphoryl)propanoate



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Phosphonate 64 | 536.50 | 1.00 | 1.00 | 1.83 | - | - |
| Bromoacetate 61 | 167.00 | 1.20 | - | 3.42 | 0.39 | 1.51 |
| NaH, 57% in min. oil | 23.99 | 1.60 | 0.13 | 3.13 | - | - |

Under argon atmosphere, phosphonate **64** (1.00 g, 1.83 mmol, 1.00 eq) was dissolved in anhydrous THF (4.00 mL) and the solution was cooled to 0 °C. Sodium hydride (0.13 g, 3.13 mmol, 1.10 eq) was added to the solution and the mixture was left stirring for 30 min. The solution was allowed to warm up to rt and it was left stirring for 1 h. The suspension was cooled to 0 °C and a solution of bromoacetate **61** (0.39 mL, 3.42 mmol, 1.20 eq) in THF (3.00 mL) was added dropwise. The mixture was left stirring over night and the reaction was quenched by adding H₂O at 0 °C the next day. The mixture was diluted with EtOAc and washed with H₂O. The aqueous layer was extracted with EtOAc and the combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash column chromatography on silica using cyclohexane/EtOAc (1/1) giving phosphonate **67** (1.13 g, 1.82 mmol, 99%) as a yellow viscous oil.

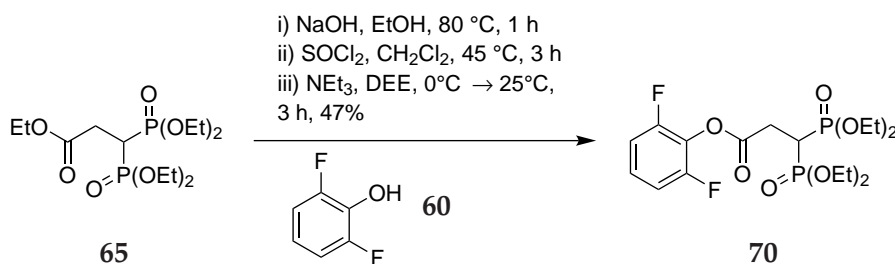
¹H-NMR: 500 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 7.30 (m, 20H), 5.02 (m, 8H), 3.93 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.30 (tt, $J = 23.8, 6.3$ Hz, 1H), 2.86 (td, $J = 16.2, 6.3$ Hz, 2H), 1.11 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H).

¹³C-NMR: 126 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 170.7 (t, $J = 9.1$ Hz), 136.1 (d, $J = 5.5$ Hz), 128.7, 128.5 (d, $J = 1.8$ Hz), 128.2 (d, $J = 6.9$ Hz), 68.5 (d, $J = 6.3$ Hz), 68.3 (d, $J = 6.2$ Hz), 61.3, 33.6 (t, $J = 135.7$ Hz), 30.6 (t, $J = 4.1$ Hz), 14.1.

³¹P-NMR: 202 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 23.6 (s, 2P).

MS-ESI⁺: m/z calcd. for C₃₃H₃₆O₈P₂ [M+H]⁺: 622.19; found: 623.29.

6.4.4 2,6-difluorophenyl 3,3-bis(diethoxyphosphoryl)propanoate



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|-----------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Phosphonate 65 | 374.13 | 1.00 | 6.43 | 17.2 | - | - |
| NaOH, 2M | 140.00 | 1.20 | - | 20.6 | 10.3 | 1.00 |
| SOCl ₂ | 118.97 | 4.00 | - | 68.7 | 4.99 | 1.64 |
| NEt ₃ | 101.19 | 1.50 | - | 25.8 | 3.57 | 0.73 |
| 2,6-dfp 60 | 130.09 | 1.50 | 3.42 | 25.8 | - | - |

NaOH (10.3 mL, 20.6 mmol, 1.20 eq, 2 M) was added to a solution of phosphonate **65** (6.43 g, 17.2 mmol, 1.00 eq) in EtOH (23.0 mL) and was left stirring for 1 h at 80 °C. After cooling to rt, the mixture was concentrated *in vacuo* and acidified with HCl (12 M). The aqueous layer was saturated with solid NaCl, extracted with EtOAc and the combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was dissolved in dry CH₂Cl₂ (112 mL) and SOCl₂ (4.99 mL, 68.7 mmol, 4.00 eq) was added to the solution. The mixture was left stirring for 3 h at 45 °C and concentrated *in vacuo*. NEt₃ (3.57 mL, 25.8 mmol, 1.50 eq) was added to a solution of 2,6-dfp **60** (3.42 g, 25.8 mmol, 1.50 eq) in DEE (25 mL). The mixture was added to a solution of the crude acid chloride in DEE (15 mL) at 0 °C and was left stirring at rt for 3 h. The mixture was diluted with DEE (50 mL) and washed with HCl (70 mL, 1 M), NaHCO₃ and brine. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash column chromatography on silica using CH₂Cl₂/MeOH (20/1) giving phenolester **70** (3.73 g, 8.14 mmol, 47%) as a yellow viscous oil.

¹H-NMR: 400 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 7.31 (m, 2H), 7.40 (m, 1H), 4.09 (m, 8H), 3.05 (m, 3H), 1.25 (td, J = 7.0, 2.3 Hz, 12H).

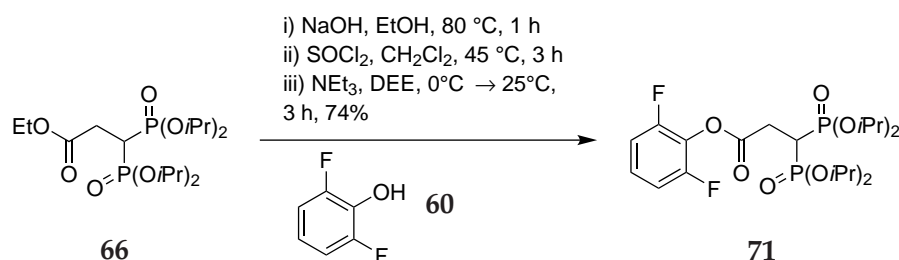
¹³C-NMR: 101 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 167.7 (t, J = 9.4 Hz), 164.7 (t, J = 11.6 Hz), 155.6 (d, J = 3.4 Hz), 153.1 (d, J = 3.5 Hz), 127.7 (t, J = 9.0 Hz), 126.2 (t, J = 16.1 Hz), 112.6 (d, J = 21.1 Hz), 62.5 (dd, J = 13.7, 6.3 Hz), 32.1 (t, J = 134.6 Hz), 29.7, 16.0 (d, J = 5.3 Hz).

³¹P-NMR: 162 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 21.8 (s, 2P).

¹⁹F-NMR: 376 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = -126.5 (s, 2F).

MS-ESI⁺: m/z calcd. for C₁₇H₂₆F₂O₈P₂ [M+H]⁺: 458.11; found: 459.09.

6.4.5 2,6-difluorophenyl 3,3-bis(diisopropoxyphosphoryl)propanoate



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|-----------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Phosphonate 66 | 430.41 | 1.00 | 12.3 | 28.6 | - | - |
| NaOH, 2M | 40.00 | 1.20 | - | 34.3 | 17.1 | 1.00 |
| SOCl ₂ | 118.97 | 4.00 | - | 114 | 8.29 | 1.64 |
| NEt ₃ | 101.19 | 1.50 | - | 57.1 | 7.92 | 0.73 |
| 2,6-dfp 60 | 130.09 | 1.50 | 7.59 | 57.1 | - | - |

NaOH (17.1 mL, 34.3 mmol, 1.20 eq, 2 M) was added to a solution of phosphonate **66** (12.3 g, 28.6 mmol, 1.00 eq) in EtOH (40.0 mL) and was left stirring for 1 h at 80 °C. After cooling to rt, the mixture was concentrated *in vacuo* and acidified with HCl (12 M). The aqueous layer was saturated with solid NaCl, extracted with EtOAc and the combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was dissolved in dry CH₂Cl₂ (180 mL) and SOCl₂ (8.29 mL, 114 mmol, 4.00 eq) was added to the solution. The mixture was left stirring for 3 h at 45 °C and concentrated *in vacuo*. NEt₃ (1.70 mL, 57.1 mmol, 1.50 eq) was added to a solution of 2,6-dfp **60** (7.59 g, 57.1 mmol, 1.50 eq) in DEE (65 mL). The mixture was added to a solution of the crude acid chloride in DEE (15 mL) at 0 °C and was left stirring at rt for 3 h. The mixture was diluted with DEE (50 mL) and washed with HCl (70 mL, 1 M), NaHCO₃ and brine. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash column chromatography on silica using CH₂Cl₂/MeOH (20/1) giving phenolester **71** (10.9 g, 21.2 mmol, 74%) as a yellow viscous oil.

¹H-NMR: 400 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 7.40 (m, 1H), 7.30 (m, 2H), 4.68 (m, 4H), 3.04 (td, J = 15.6, 5.8 Hz, 2H), 2.81 (tt, J = 24.0 Hz, 5.8 Hz, 1H), 1.27 (m, 24H).

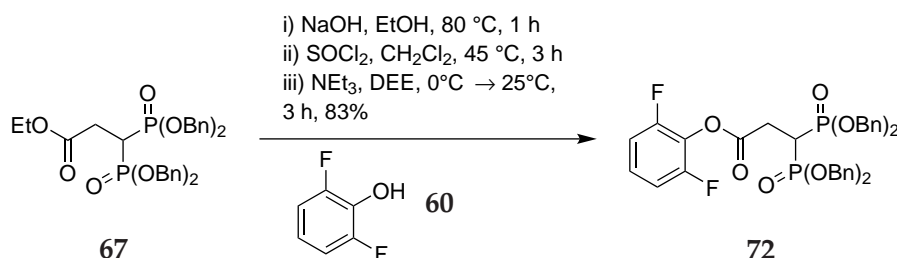
¹³C-NMR: 101 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 23.3 (t, J = 6 Hz), 23.7 (dd, J = 13.2, 3.6 Hz), 30.0, 33.5 (t, J = 136 Hz), 71.0 (dd, J = 27.0, 6.6 Hz), 112.6 (dd, J = 17.4, 4.2 Hz), 126.2 (d, J = 12.6 Hz), 127.7 (t, J = 9.0 Hz), 153.3 (d, J = 3.6 Hz), 155.3 (d, J = 3.6 Hz), 167.8 (t, J = 9.0 Hz).

³¹P-NMR: 202 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 19.8 (s, 2P).

¹⁹F-NMR: 376 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = -126.5 (s, 2F).

MS-ESI⁺: m/z calcd. for C₂₁H₃₄F₂O₈P₂ [M+H]⁺: 514.17; found: 515.30.

6.4.6 2,6-difluorophenyl 3,3-bis(bis(benzyloxy)phosphoryl)propanoate



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|-----------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Phosphonate 67 | 622.59 | 1.00 | 5.10 | 8.19 | - | - |
| NaOH, 2M | 40.00 | 1.20 | - | 9.83 | 4.91 | 1.00 |
| SOCl ₂ | 118.97 | 4.00 | - | 32.8 | 2.63 | 1.64 |
| NEt ₃ | 101.19 | 1.50 | - | 12.3 | 1.70 | 0.73 |
| 2,6-dfp 60 | 130.09 | 1.50 | 1.63 | 12.3 | - | - |

NaOH (4.91 mL, 9.83 mmol, 1.20 eq, 2 M) was added to a solution of phosphonate **67** (5.10 g, 8.19 mmol, 1.00 eq) in EtOH (10.0 mL) and was left stirring for 1 h at 80 °C. After cooling to rt, the mixture was concentrated *in vacuo* and acidified with HCl (12 M). The aqueous layer was saturated with solid NaCl, extracted with EtOAc and the combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was dissolved in dry CH₂Cl₂ (50.0 mL) and SOCl₂ (2.63 mL, 32.8 mmol, 4.00 eq) was added to the solution. The mixture was left stirring for 3 h at 45 °C and concentrated *in vacuo*. NEt₃ (1.70 mL, 12.3 mmol, 1.50 eq) was added to a solution of 2,6-dfp **60** (1.63 g, 12.3 mmol, 1.50 eq) in DEE (65 mL). The mixture was added to a solution of the crude acid chloride in DEE (15 mL) at 0 °C and was left stirring at rt for 3 h. The mixture was diluted with DEE (50 mL) and washed with HCl (70 mL, 1 M), NaHCO₃ and brine. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash column chromatography on silica using CH₂Cl₂/MeOH (20/1) giving phenolester **72** (4.83 g, 6.84 mmol, 83%) as a yellow viscous oil.

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 7.29 (s, 20H), 7.17 (m, 1H), 6.95 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 5.03 (dd, J = 8.7, 2.4 Hz, 8H), 3.24 (m, 3H).

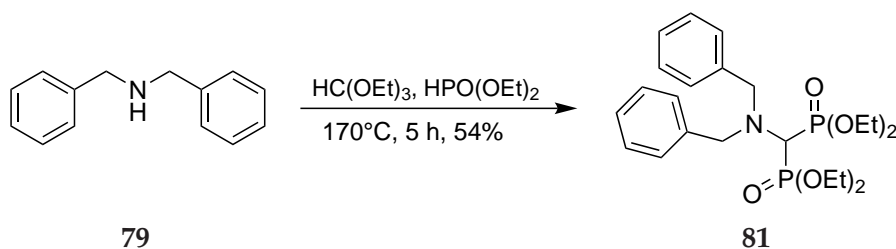
¹³C-NMR: 101 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 167.8 (t, J = 9.6 Hz), 156.5 (d, J = 3.5 Hz), 154.0 (d, J = 4.1 Hz), 136.0 (d, J = 6.0 Hz), 128.7, 128.6, 128.6, 128.3, 128.2, 127.1 (t, J = 5.3 Hz), 126.7 (t, J = 8.9 Hz), 112.3 (d, J = 4.7 Hz), 112.1 (d, J = 4.3 Hz), 68.7 (d, J = 6.3 Hz), 68.5 (d, J = 6.4 Hz), 33.5 (t, J = 135.7 Hz), 30.1 (t, J = 4.0 Hz).

³¹P-NMR: 162 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 22.8 (s, 2P).

¹⁹F-NMR: 376 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = -125.4 (s, 2F).

MS-ESI⁺: m/z calcd. for C₃₇H₃₄F₂O₈P₂ [M+H]⁺: 706.17; found: 707.47.

6.4.7 tetraethyl ((dibenzylamino)methylene)bis(phosphonate)



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|-----------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Benzylamine 79 | 197.28 | 1.00 | - | 50.4 | 10.0 | 1.03 |
| Orthoformate | 148.20 | 1.20 | - | 60.5 | 10.2 | 0.90 |
| Diethyl phosphite | 138.10 | 3.10 | - | 156 | 20.6 | 1.07 |

Under argon atmosphere, a solution of benzylamine **79** (10.0 mL, 50.4 mmol, 1.00 eq), orthoformate (10.2 mL, 60.5 mmol, 1.20 eq) and phosphite (20.6 mL, 156 mmol, 3.1 eq) was prepared and left stirring at 170 °C. The mixture was concentrated *in vacuo* to remove the formed EtOH. The crude was diluted with CHCl₃ and washed with NaOH (2 M) and brine. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash column chromatography on silica using EtOAc giving aminophosphonate **81** (13.2 g, 27.3 mmol, 54%, 3 steps) as a yellow oil.

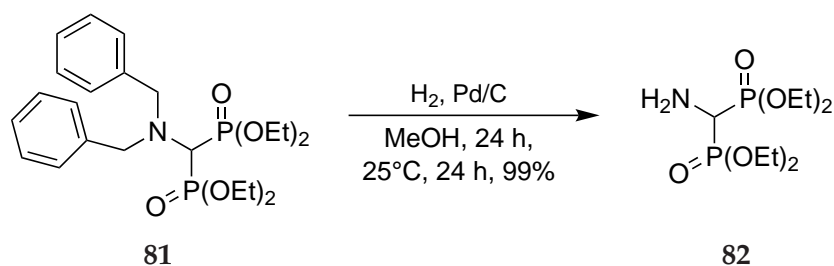
¹H-NMR: 400 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 7.31 (m, 10H), 4.01 (m, 12H), 3.32 (t, J = 24.5 Hz, 1H), 1.23 (td, J = 7.0, 1.2 Hz, 12H).

¹³C-NMR: 126 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 138.8, 128.9, 128.2, 127.2, 61.8 (d, J = 11.2 Hz), 55.7 (d, J = 5.8 Hz), 16.2 .

³¹P-NMR: 162 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 19.9 (s, 2P).

MS-ESI⁺: m/z calcd. for C₂₃H₃₅NO₆P₂ [M+H]⁺: 483.19; found: 484.32.

6.4.8 tetraethyl (aminomethylene)bis(phosphonate)



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|-----------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Phosphonate 65 | 483.48 | 1.00 | 27.3 | 13.2 | - | - |
| Pd on C, 10 wt. % | 106.42 | 0.10 | 2.73 | 2.90 | - | - |

A flask was flushed three times with argon and phosphonate **81** (1.00 g, 2.07 mmol, 1.00 eq) was soluted in MeOH (3.00 mL). Palladium on carbon (0.22 g, 0.21 mmol, 10mol%) was added and the mixture was left stirring for 24 h at rt. The suspension was filtered and concentrated *in vacuo* giving amine **82** (0.62 g, 2.04 mmol, 99%) as a yellow oil.

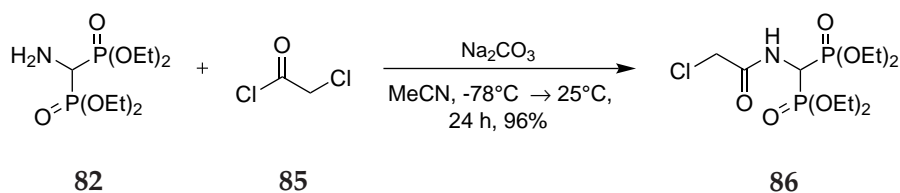
¹H-NMR: 400 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 4.06 (m, 8H), 3.53 (t, J = 21.2 Hz, 1H), 1.83 (s, 2H), 1.24 (td, J = 12.0, 1.3 Hz, 12H).

¹³C-NMR: 126 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 62.2 (d, J = 24.4 Hz), 46.5 (t, J = 142.8 Hz), 16.2.

³¹P-NMR: 162 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 21.4 (s, 2P).

MS-ESI⁺: m/z calcd. for C₉H₂₃NO₆P₂ [M+H]⁺: 303.10; found: 304.25.

6.4.9 tetraethyl ((2-chloroacetamido)methylene)bis(phosphonate)



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|---------------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Phosphonate 82 | 303.23 | 1.00 | 1.00 | 3.30 | - | - |
| Acetyl chloride 85 | 112.49 | 3.50 | - | 11.5 | 0.92 | 1.42 |
| Na ₂ CO ₃ | 105.99 | 6.00 | 2.10 | 19.8 | - | - |

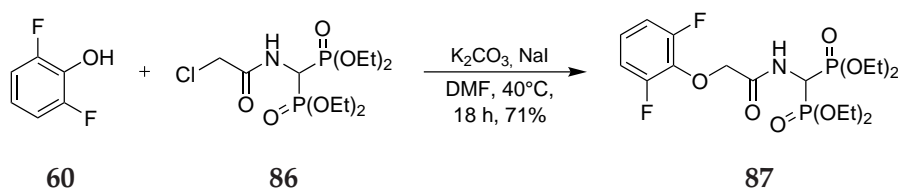
Under argon atmosphere, a solution of amine **82** (1.00 g, 3.30 mmol, 1.00 eq) in MeCN (25 mL) was prepared which was cooled to -78°C . Na₂CO₃ (2.10 g, 19.8 mmol, 6.00 eq) was added in portions and acetyl chloride **85** (0.92 mL, 11.5 mmol, 3.50 eq) was added dropwise. The mixture was allowed to warm up to rt and left stirring over night. EtOAc was added and the mixture was washed with H₂O and brine. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash column chromatography on silica using CH₂Cl₂/MeOH (10/1) giving acetamide **86** (1.20 g, 3.17 mmol, 96%) as a yellow solid.

¹H-NMR: 400 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 9.06 (d, J = 9.9 Hz, 1H), 4.80 (td, J = 22.3, 9.9 Hz, 1H), 4.20 (s, 2H), 4.07 (m, 8H), 1.23 (td, J = 7.0, 3.1 Hz, 12H).

¹³C-NMR: 126 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 166.0 (t, J = 4.4 Hz), 62.9 (d, J = 16.7 Hz), 43.6 (t, J = 146.6 Hz), 41.7, 16.1 (d, J = 9.2 Hz).

³¹P-NMR: 162 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 16.7 (s, 2P).

6.4.10 tetraethyl ((2-(2,6-difluorophenoxy)acetamido)methylene)bis(phosphonate)



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|--------------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| 2,6-dfp 60 | 130.09 | 1.00 | 0.46 | 3.50 | - | - |
| Acetamide 86 | 379.71 | 1.50 | 2.01 | 5.30 | - | - |
| K ₂ CO ₃ | 138.20 | 1.20 | 0.59 | 4.30 | - | - |
| NaI | 149.89 | 1.20 | 0.64 | 4.30 | - | - |

Under argon atmosphere, 2,6-dfp **60** (0.46 g, 3.50 mmol, 1.00 eq), acetamide **86** (2.01 g, 5.30 mmol, 1.50 eq), K₂CO₃ (0.59 g, 4.30 mmol, 1.20 eq) and NaI (0.64 g, 4.30 mmol, 1.20 eq) were suspended in DMF (5.00 mL) and left stirring for 18 h at 40 °C. The mixture was diluted with EtOAc and washed with H₂O, brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash column chromatography on silica using EtOAc giving amide **87** (1.19 g, 2.50 mmol, 71%) as a yellow solid.

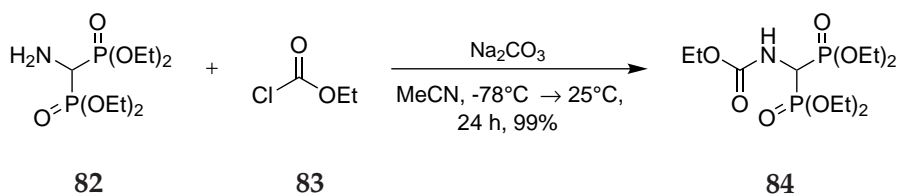
¹H-NMR: 400 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 8.62 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H), 7.11 (m, 3H), 4.83 (m, 3H), 4.04 (m, 8H), 1.21 (td, *J* = 7.0, 2.9 Hz, 12H).

¹³C-NMR: 126 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 166.9 (t, *J* = 3.9 Hz), 155.9 (d, *J* = 5.6 Hz), 153.5 (d, *J* = 5.3 Hz), 134.3, 123.4 (t, *J* = 9.4 Hz), 112.6 (d, *J* = 6.0 Hz), 112.4 (d, *J* = 6.1 Hz), 70.7, 62.8 (dd, *J* = 15.3, 2.7 Hz), 42.9 (t, *J* = 146.8 Hz), 16.1.

³¹P-NMR: 162 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 16.8 (s, 2P).

¹⁹F-NMR: 376 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = -128.0 (s, 2F).

6.4.11 ethyl (bis(diethoxyphosphoryl)methyl)carbamate



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|---------------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Phosphonate 82 | 303.23 | 1.00 | 1.00 | 3.30 | - | - |
| Formate 83 | 108.52 | 3.50 | - | 11.5 | 1.10 | 1.14 |
| Na ₂ CO ₃ | 105.99 | 6.00 | 2.10 | 19.8 | - | - |

Under argon atmosphere, a solution of amine **82** (1.00 g, 3.30 mmol, 1.00 eq) in MeCN (25 mL) was prepared which was cooled to -78°C . Na₂CO₃ (2.10 g, 19.8 mmol, 6.00 eq) was added in portions and formate **83** (1.10 mL, 11.5 mmol, 3.50 eq) was added dropwise. The mixture was allowed to warm up to rt and left stirring over night. EtOAc was added and the mixture was washed with H₂O and brine. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash column chromatography on silica using CH₂Cl₂/MeOH (10/1) giving carbamate **84** (1.20 g, 3.17 mmol, 99%) as a yellow solid.

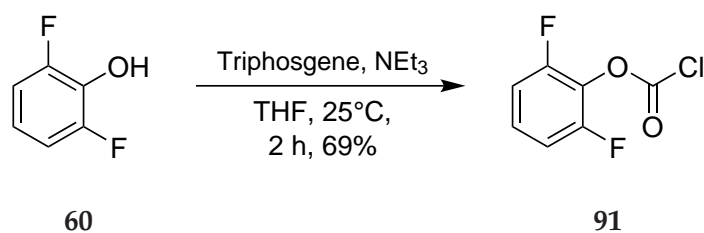
¹H-NMR: 400 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 4.06 (m, 10H), 1.22 (td, $J = 7.0, 2.0$ Hz, 12H), 1.18 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H).

¹³C-NMR: 126 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 156.4 (t, $J = 5.1$ Hz), 62.7 (d, $J = 24.2$ Hz), 60.8, 46.0 (t, 1H, $J = 147.6$ Hz), 16.2, 14.6.

³¹P-NMR: 162 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 24.7 (s, 2P).

MS-ESI⁺: m/z calcd. for C₁₂H₂₇NO₈P₂ [M+Na]⁺: 375.12; found: 398.80.

6.4.12 2,6-difluorophenyl chloroformate



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|-------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| 2,6-dfp 60 | 130.09 | 1.00 | 0.20 | 1.54 | - | - |
| Triphosgene | 296.75 | 0.60 | 0.27 | 0.92 | - | - |
| NEt ₃ | 101.19 | 1.00 | - | 1.54 | 0.21 | 0.73 |

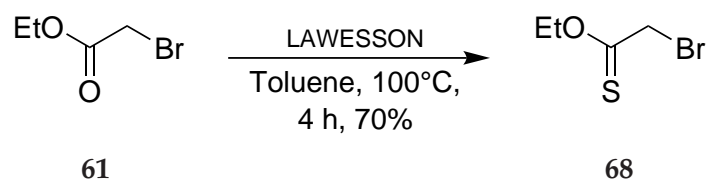
Under argon atmosphere, a solution of 2,6-dfp **60** (0.20 g, 1.54 mmol, 1.00 eq) in anhydrous THF (10 mL) was prepared and cooled to 0 °C. NEt₃ (0.21 ml, 1.54 mmol, 1.00 eq) was added and the mixture was left stirring for 15 min. Triphosgene (0.27 g, 0.92 mmol, 0.60 eq) was added in portions and the mixture was left stirring for 2 h. The crude was concentrated *in vacuo*, dissolved in a small amount of THF and purified by filtration on a small silica plug giving chloroformate **91** (0.20 g, 1.1 mmol, 69%) as a white solid.

¹H-NMR: 400 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 7.50 (m, 1H), 7.40 (m, 2H).

¹³C-NMR: 126 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 155.2 (d, J = 2.4 Hz), 152.8 (d, J = 2.5 Hz), 149.0, 128.9 (t, J = 9.3 Hz), 126.4 (t, J = 15.7 Hz), 113.2, 113.0.

¹⁹F-NMR: 376 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = -128.1 (s, 2F).

6.4.13 O-ethyl 2-bromoethanethioate



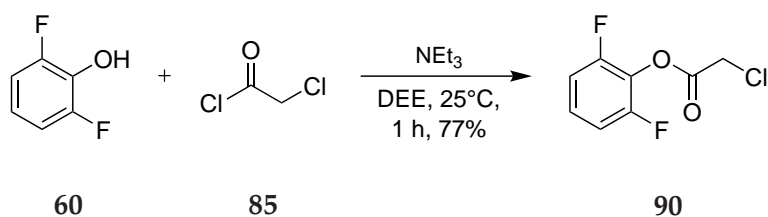
| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Bromoacetate 61 | 167.00 | 1.00 | 2.50 | 14.8 | 1.69 | 1.51 |
| LAWESSON reagent | 404.47 | 1.20 | 7.42 | 17.8 | - | - |

Under argon atmosphere, a solution of bromoacetate **61** (1.69 mL, 14.8 mmol, 1.00 eq) and LAWESSON reagent (7.42 g, 17.8 mmol, 1.20 eq) was prepared. The mixture was left stirring at 100 °C for 4 h. The excess of LAWESSON reagent was filtered and the filtrate was fractionally distilled giving thioester **68** (1.90 g, 10.4 mmol, 70%) as a yellow oil.

¹H-NMR: 400 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 4.14 (m, 4H), 1.21 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H).

¹³C-NMR: 126 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 213.8, 69.8, 37.0, 13.2.

6.4.14 2,6-difluorophenyl 2-chloroacetate



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|---------------------------|--|--------|-------|----------|--------|--|
| 2,6-dfp 60 | 130.09 | 1.00 | 2.07 | 15.6 | - | - |
| Acetyl chloride 85 | 112.94 | 1.50 | - | 23.3 | 1.90 | 1.42 |
| NEt ₃ | 101.19 | 1.1.10 | - | 17.1 | 1.24 | 1.40 |

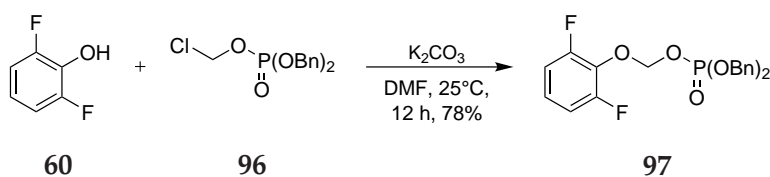
Under argon atmosphere, a solution of 2,6-dfp **60** (2.07 g, 15.6 mmol, 1.00 eq) in anhydrous DEE (15 mL) was prepared. Acetyl chloride **85** (1.90 mL, 23.3 mmol, 1.50 eq) was added dropwise and the mixture was left stirring for 1 h at rt. The mixture was diluted with DEE and washed with HCl (1 M), NaHCO₃, H₂O and brine. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash column chromatography on silica using cyclohexane/EtOAc (10/1) giving chloroacetate **90** (3.15 g, 15.2 mmol, 77%) as pale crystals.

¹H-NMR: 400 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 7.42 (m, 1H), 7.31 (m, 2H), 4.91 (s, 2H).

¹³C-NMR: 126 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 165.1, 155.4 (d, $J = 3.9$ Hz), 152.9 (d, $J = 3.9$ Hz), 128.0 (t, $J = 9.6$ Hz), 125.9 (t, $J = 15.9$ Hz), 112.7 (dd, $J = 17.3, 4.8$ Hz).

MS-ESI⁺: m/z calcd. for C₈H₅ClF₂O₂ [M+H]⁺: 205.99; found: 207.20.

6.4.15 dibenzyl ((2,6-difluorophenoxy)methyl) phosphate



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|--------------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Phosphonate 96 | 326.71 | 1.00 | 0.47 | 1.44 | - | - |
| 2,6-dfp 60 | 130.09 | 1.10 | 0.21 | 1.58 | - | - |
| K ₂ CO ₃ | 138.20 | 2.00 | 0.40 | 2.88 | - | - |

To a suspension of 2,6-dfp **60** (0.21 g, 1.58 mmol, 1.10 eq) and K₂CO₃ (0.40 g, 2.88 mmol, 2.00 eq) in DMF (4.00 mL), phosphonate **96** (0.47 g, 1.44 mmol, 1.00 eq) was added and the mixture was left stirring over night at rt. The suspension was diluted with H₂O and extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash column chromatography on silica using cyclohexane/EtOAc (5/1) giving phenole **97** (0.47 g, 1.11 mmol, 78%) as a colourless oil.

¹H-NMR: 500 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 7.33 (m, 10H), 7.04 (m, 1H), 6.90 (t, *J* = 8.3 Hz, 2H), 5.59 (d, *J* = 12.5 Hz, 2H), 5.04 (dd, *J* = 7.8, 1.4 Hz, 4H).

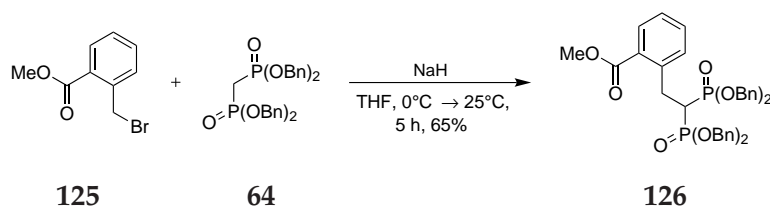
¹³C-NMR: 126 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 157.1 (d, *J* = 4.6 Hz), 155.1 (d, *J* = 4.6 Hz), 135.6 (d, *J* = 7.3 Hz), 132.8 (t, *J* = 14.4 Hz), 124.9 (t, *J* = 9.3 Hz), 112.5 (d, *J* = 5.5 Hz), 112.4 (d, *J* = 5.2 Hz), 92.6 (d, *J* = 3.7 Hz), 69.6 (d, *J* = 5.6 Hz).

³¹P-NMR: 202 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = -2.06 (s, 1P).

¹⁹F-NMR: 376 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = -127.1 (s, 2F).

MS-ESI⁺: *m/z* calcd. for C₂₁H₁₉F₂O₅P [M+H]⁺: 420.09; found: 421.16.

6.4.16 methyl 2-(2,2-bis(bis(benzyloxy)phosphoryl)ethyl)benzoate



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|-----------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Phosphonate 64 | 536.50 | 1.00 | 0.45 | 0.85 | - | - |
| Benzoate 125 | 227.98 | 2.00 | 0.40 | 1.69 | - | - |
| NaH, 57% in min. oil | 23.99 | 1.30 | 0.05 | 1.10 | - | - |

Under argon atmosphere, phosphonate **64** (0.45 g, 0.85 mmol, 1.00 eq) was dissolved in anhydrous THF (3.00 mL) and the solution was cooled to 0 °C. Sodium hydride (0.05 g, 1.10 mmol, 1.30 eq) was added to the solution and the mixture was left stirring for 30 min. The solution was allowed to warm up to rt and it was left stirring for 1 h. The suspension was cooled to 0 °C and a solution of benzoate **125** (0.40 g, 1.69 mmol, 2.00 eq) in THF (3.00 mL) was added dropwise. The mixture was left stirring over night and the reaction was quenched by adding H₂O at 0 °C the next day. The mixture was diluted with EtOAc and washed with H₂O. The aqueous layer was extracted with EtOAc and the combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash column chromatography on silica using cyclohexane/EtOAc (1/1) giving phosphonate **126** (0.38 g, 0.55 mmol, 65%) as a yellow viscous oil.

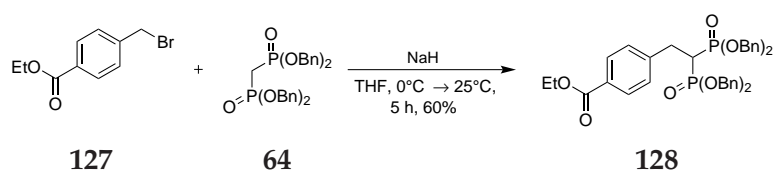
¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 7.84 (dd, J = 7.8, 1.2 Hz, 1H), 7.34 (m, 1H), 7.24 (m, 22H), 4.98 (dd, J = 8.2, 3.8 Hz, 4H), 4.88 (qd, J = 11.9, 8.3 Hz, 4H), 3.77 (s, 2H), 3.65 (ddd, J = 16.6, 13.5, 7.7 Hz, 2H), 3.39 (tt, J = 23.2, 7.6 Hz, 1H).

¹³C-NMR: 101 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 167.6, 140.3 (t, J = 9.6 Hz), 136.4 (d, J = 6.5 Hz), 136.3 (d, J = 6.8 Hz), 133.3, 132.0, 131.0, 129.5, 128.5, 128.3, 128.3, 128.1, 127.0, 68.2 (d, J = 6.4 Hz), 67.7 (d, J = 6.5 Hz), 52.2, 38.7 (t, J = 131.6 Hz), 31.3.

³¹P-NMR: 202 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 24.3 (s, 2P).

MS-ESI⁺: m/z calcd. for C₃₈H₃₈O₈P₂ [M+H]⁺: 684.20; found: 685.30.

6.4.17 ethyl 4-(2,2-bis(bis(benzyloxy)phosphoryl)ethyl)benzoate



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|-----------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Phosphonate 64 | 536.50 | 1.00 | 0.25 | 0.47 | - | - |
| Benzoate 127 | 229.07 | 1.50 | 0.17 | 0.70 | - | - |
| NaH, 57% in min. oil | 23.99 | 1.30 | 0.03 | 0.61 | - | - |

Under argon atmosphere, phosphonate **64** (0.25 g, 0.47 mmol, 1.00 eq) was dissolved in anhydrous THF (1.50 mL) and the solution was cooled to 0 °C. Sodium hydride (0.03 g, 0.61 mmol, 1.30 eq) was added to the solution and the mixture was left stirring for 30 min. The solution was allowed to warm up to rt and it was left stirring for 1 h. The suspension was cooled to 0 °C and a solution of benzoate **127** (0.17 g, 0.70 mmol, 1.50 eq) in THF (1.50 mL) was added dropwise. The mixture was left stirring over night and the reaction was quenched by adding H₂O at 0 °C the next day. The mixture was diluted with EtOAc and washed with H₂O. The aqueous layer was extracted with EtOAc and the combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash column chromatography on silica using cyclohexane/EtOAc (1/1) giving phosphonate **128** (0.20 g, 0.28 mmol, 60%) as a yellow viscous oil.

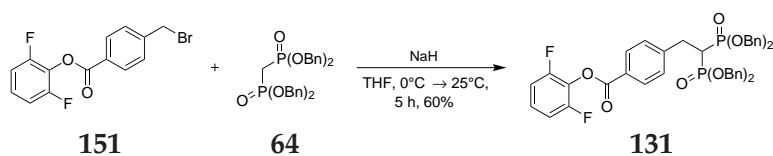
¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 7.79 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.29 (m, 10H), 7.22 (m, 10H), 7.10 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 4.97 (dd, *J* = 8.6, 2.5 Hz, 4H), 4.92 (d, *J* = 8.4 Hz, 4H), 4.35 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.29 (td, *J* = 16.6, 6.6 Hz, 2H), 2.73 (tt, *J* = 23.9, 6.5 Hz, 1H), 1.39 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

¹³C-NMR: 101 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 166.5, 144.3 (t, *J* = 7.4 Hz), 136.0 (t, *J* = 6.9 Hz), 129.6, 129.0, 128.9, 128.7, 128.6, 128.3, 128.3, 68.5 (d, *J* = 6.6 Hz), 68.1 (d, *J* = 6.6 Hz), 61.0, 39.7 (t, *J* = 132.4 Hz), 31.4, 14.5.

³¹P-NMR: 162 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 23.9 (s, 2P).

MS-ESI⁺: *m/z* calcd. for C₃₉H₄₀O₈P₂ [M+H]⁺: 698.22; found: 699.38.

6.4.18 2,6-difluorophenyl 4-(2,2-bis(bis(benzyloxy)phosphoryl)ethyl)benzoate



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|-----------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Phosphonate 64 | 536.50 | 1.00 | 0.40 | 0.75 | - | - |
| Benzoate 151 | 325.98 | 1.50 | 0.44 | 1.12 | - | - |
| NaH, 57% in min. oil | 23.99 | 1.30 | 0.04 | 0.97 | - | - |

Under argon atmosphere, phosphonate **64** (0.40 g, 0.75 mmol, 1.00 eq) was dissolved in anhydrous THF (1.50 mL) and the solution was cooled to 0 °C. Sodium hydride (0.04 g, 0.97 mmol, 1.30 eq) was added to the solution and the mixture was left stirring for 30 min. The solution was allowed to warm up to rt and it was left stirring for 1 h. The suspension was cooled to 0 °C and a solution of benzoate **151** (0.44 g, 1.12 mmol, 1.50 eq) in THF (1.50 mL) was added dropwise. The mixture was left stirring over night and the reaction was quenched by adding H₂O at 0 °C the next day. The mixture was diluted with EtOAc and washed with H₂O. The aqueous layer was extracted with EtOAc and the combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash column chromatography on silica using cyclohexane/EtOAc (1/1) giving phosphonate **131** (0.20 g, 0.28 mmol, 60%) as a yellow viscous oil.

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 7.93 (d, *J* = 8.2, 2H), 7.29 (m, 21H), 7.15 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.03 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 4.98 (m, 8H), 3.32 (td, *J* = 16.5, 6.6 Hz, 2H), 2.74 (tt, *J* = 23.7, 6.5 Hz, 1H).

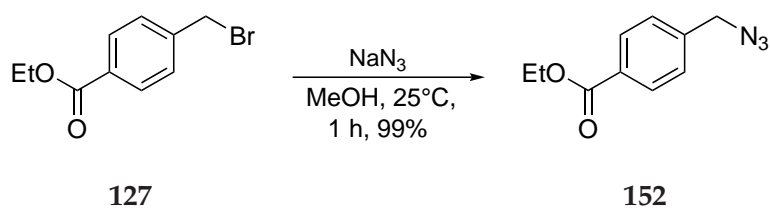
¹³C-NMR: 101 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 163.2 (d, *J* = 4.4 Hz), 156.9 (d, *J* = 3.8 Hz), 154.4 (d, *J* = 3.9 Hz), 145.9, 136.0 (dd, *J* = 8.8, 6.4 Hz), 130.6, 129.4, 128.7, 128.3 (d, *J* = 7.9 Hz), 112.4 (d, *J* = 4.6 Hz), 112.2 (d, *J* = 4.6 Hz), 68.6 (d, *J* = 6.5 Hz), 68.2 (m), 39.6 (t, *J* = 132.7 Hz), 31.5 (t, *J* = 4.6 Hz).

¹⁹F-NMR: 376 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = -125.8 (s, 2F).

³¹P-NMR: 162 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 23.8 (s, 2P).

MS-ESI⁺: *m/z* calcd. for C₄₃H₃₈F₂O₈P₂ [M+H]⁺: 782.20; found: 783.31.

6.4.19 Ethyl-4-(azidomethyl)benzoate



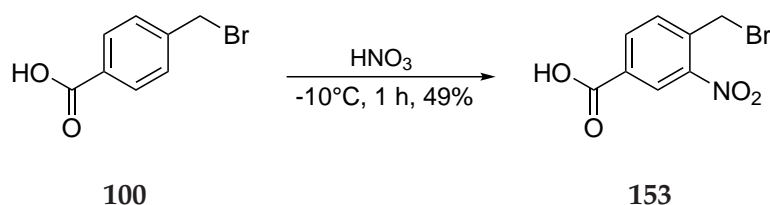
| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|---------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Benzoate 127 | 243.10 | 1.00 | 0.88 | 3.62 | - | - |
| NaN ₃ | 65.01 | 3.00 | 0.71 | 10.9 | - | - |

NaN₃ (0.71 g, 10.9 mmol, 3.00 eq) was added to a solution of benzoate **127** (0.88 g, 3.62 mmol, 1.00 eq) in MeOH (9.00 mL) and was left stirring for 24 h at rt. The resulted suspension was diluted with EtOAc and washed with H₂O. The aqueous layer was extracted with EtOAc and the combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash column chromatography on silica using cyclohexane/EtOAc (15/1) giving azide **152** (0.74 g, 3.61 mmol, 99%) as a yellow solid.

¹H-NMR: 500 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 7.99 (s, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.51 (d, J = 0.6 Hz, 1H), 7.50 (d, J = 0.6 Hz, 1H), 4.57 (s, 2H), 4.32 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 1.32 (t, J = 7.1 Hz, 3H).

¹³C-NMR: 126 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 165.3, 141.0, 129.5, 129.4, 128.4, 60.7, 53.0, 14.1.

6.4.20 4-(bromomethyl)-3-nitrobenzoic acid



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|-------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Benzoic acid 100 | 213.96 | 1.00 | 1.52 | 7.08 | - | - |
| HNO ₃ , 95% | 63.01 | 39.0 | - | 276 | 13.1 | 1.40 |

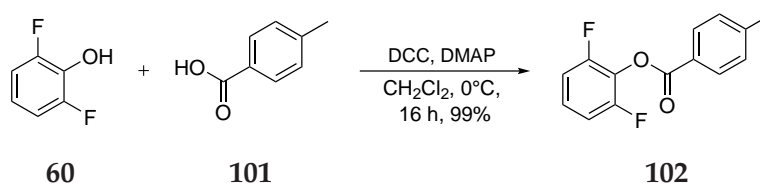
HNO₃ (13.1 mL, 276 mmol, 39.0 eq) was cooled to -10°C and the benzoic acid **100** (1.52 g, 7.08 mmol, 1.00 eq) was added in portions. The mixture was left stirring for 1 h and poured onto crushed ice and the crude was collected via filtration. After recrystallization from CH₂Cl₂/hexane (1/1), benzoic acid **153** (0.90 g, 3.49 mmol, 49%) was obtained as slightly yellow crystals.

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 10.43 (s, 1H), 8.75 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 8.33 (dd, $J = 8.0, 1.7$ Hz, 1H), 7.74 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.87 (s, 2H).

¹³C-NMR: 101 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 169.5, 148.2, 138.3, 134.8, 133.2, 130.8, 127.3, 27.9.

MS-ESI⁻: m/z calcd. for C₈H₆BrNO₄ [M-H]⁻: 258.95; found: 257.93.

6.4.21 2,6-difluorophenyl-4-methylbenzoate



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|-------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Benzoic acid 101 | 136.05 | 1.00 | 0.50 | 3.68 | - | - |
| 2,6-dfp 60 | 130.09 | 2.00 | 0.96 | 7.35 | - | - |
| DCC | 206.33 | 1.50 | 1.14 | 5.51 | - | - |
| DMAP | 122.17 | 0.20 | 0.09 | 0.74 | - | - |

DCC (1.14 g, 5.51 mmol, 1.50 eq) and DMAP (0.09 g, 0.74 mmol, 0.20 eq) were added to a solution of benzoic acid **101** (0.50 g, 3.68 mmol, 1.00 eq) and 2,6-dfp **60** (0.96 g, 7.35 mmol, 2.00 eq) in CH_2Cl_2 (40.0 mL) and the mixture was left stirring for 16 h. The suspension was filtered and the filtrate was concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by flash column chromatography cyclohexane/EtOAc (50/1) to obtain benzoate **102** (0.90 g, 3.63 mmol, 99%) as a white solid.

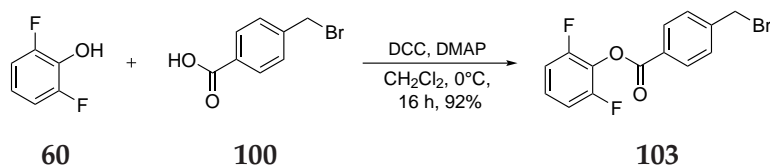
¹H-NMR: 400 MHz, CDCl_3 ; δ (ppm) = 8.12 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.33 (d, J = 8.0 Hz, 3H), 7.20 (m, 1H), 7.02 (m, 3H), 2.46 (s, 3H).

¹³C-NMR: 101 MHz, CDCl_3 ; δ (ppm) = 163.5, 156.9 (d, J = 3.9 Hz), 154.4 (d, J = 3.9 Hz), 145.2, 130.8, 129.6, 127.7 (t, J = 15.8 Hz), 126.4 (t, J = 9.1 Hz), 125.4, 112.3 (d, J = 4.8 Hz), 112.2 (d, J = 4.9 Hz), 22.0.

¹⁹F-NMR: 376 MHz, CDCl_3 ; δ (ppm) = -125.9 (s, 2F)

MS-ESI⁺: m/z calcd. for $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{F}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 248.06; found: 249.14.

6.4.22 2,6-difluorophenyl-4-(bromomethyl)benzoate



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|-------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Benzoic acid 100 | 215.05 | 1.00 | 1.52 | 7.05 | - | - |
| 2,6-dfp 60 | 130.09 | 2.00 | 1.84 | 14.1 | - | - |
| DCC | 206.33 | 1.50 | 2.18 | 10.6 | - | - |
| DMAP | 122.17 | 0.20 | 0.17 | 1.41 | - | - |

DCC (2.18 g, 10.6 mmol, 1.50 eq) and DMAP (0.17 g, 1.41 mmol, 0.20 eq) were added to a solution of benzoic acid **100** (1.52 g, 7.05 mmol, 1.00 eq) and 2,6-dfp **60** (1.84 g, 14.1 mmol, 2.00 eq) in CH_2Cl_2 (80.0 mL) and the mixture was left stirring for 16 h. The suspension was filtered and the filtrate was concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by flash column chromatography cyclohexane/EtOAc (50/1) to obtain benzoate **103** (2.12 g, 6.48 mmol, 92%) as a white solid.

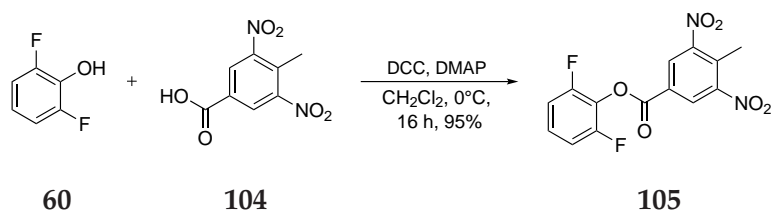
¹H-NMR: 400 MHz, CDCl_3 ; δ (ppm) = 8.21 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.55 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.22 (m, 1H), 7.03 (t, $J = 8.1$ Hz, 2H), 4.54 (s, 2H).

¹³C-NMR: 101 MHz, CDCl_3 ; δ (ppm) = 162.9, 156.8 (d, $J = 3.9$ Hz), 154.3 (d, $J = 3.7$ Hz), 144.1, 131.2, 129.5, 128.0, 127.5 (t, $J = 16.2$ Hz), 126.7 (t, $J = 9.0$ Hz), 112.4 (d, $J = 4.9$ Hz), 112.2 (d, $J = 4.8$ Hz), 32.1.

¹⁹F-NMR: 376 MHz, CDCl_3 ; δ (ppm) = -125.9 (s, 2F)

MS-ESI⁺: m/z calcd. for $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{BrF}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$: 325.96; found: 344.13.

6.4.23 2,6-difluorophenyl-4-methyl-3,5-dinitrobenzoate



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|-------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Benzoic acid 104 | 226.02 | 1.00 | 0.70 | 3.04 | - | - |
| 2,6-dfp 60 | 130.09 | 2.00 | 0.79 | 6.07 | - | - |
| DCC | 206.33 | 1.50 | 0.94 | 4.55 | - | - |
| DMAP | 122.17 | 0.20 | 0.07 | 0.61 | - | - |

DCC (0.94 g, 4.55 mmol, 1.50 eq) and DMAP (0.07 g, 0.61 mmol, 0.20 eq) were added to a solution of benzoic acid **104** (0.70 g, 3.04 mmol, 1.00 eq) and 2,6-dfp **60** (0.79 g, 6.07 mmol, 2.00 eq) in CH_2Cl_2 (30.0 mL) and the mixture was left stirring for 16 h. The suspension was filtered and the filtrate was concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by flash column chromatography cyclohexane/EtOAc (50/1) to obtain benzoate **105** (0.97 g, 2.87 mmol, 95%) as a brown solid.

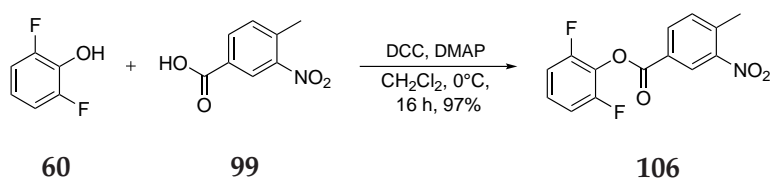
¹H-NMR: 400 MHz, CDCl_3 ; δ (ppm) = 8.78 (s, 2H), 7.29 (tt, $J = 8.2, 5.9$ Hz, 1H), 7.07 (t, $J = 8.2$ Hz, 2H), 2.70 (s, 3H).

¹³C-NMR: 101 MHz, CDCl_3 ; δ (ppm) = 159.7, 156.4 (d, $J = 3.5$ Hz), 153.9 (d, $J = 3.2$ Hz), 152.0, 133.1, 128.8, 128.3, 127.6 (t, $J = 9.0$ Hz), 126.7 (t, $J = 16.0$ Hz), 112.6 (d, $J = 4.5$ Hz), 112.5 (d, $J = 4.4$ Hz).

¹⁹F-NMR: 376 MHz, CDCl_3 ; δ (ppm) = -125.7 (s, 2F)

MS-ESI⁻: m/z calcd. for $\text{C}_{14}\text{H}_8\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_6$ [M-H]⁻: 338.04; found: 337.17.

6.4.24 2,6-difluorophenyl-4-methyl-3-nitrobenzoate



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Benzoic acid 99 | 181.04 | 1.00 | 0.60 | 3.31 | - | - |
| 2,6-dfp 60 | 130.09 | 2.00 | 0.86 | 6.63 | - | - |
| DCC | 206.33 | 1.50 | 1.03 | 4.97 | - | - |
| DMAP | 122.17 | 0.20 | 0.08 | 0.66 | - | - |

DCC (1.03 g, 4.97 mmol, 1.50 eq) and DMAP (0.08 g, 0.66 mmol, 0.20 eq) were added to a solution of benzoic acid **99** (0.60 g, 3.31 mmol, 1.00 eq) and 2,6-dfp **60** (0.86 g, 6.63 mmol, 2.00 eq) in CH_2Cl_2 (36.0 mL) and the mixture was left stirring for 16 h. The suspension was filtered and the filtrate was concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by flash column chromatography cyclohexane/EtOAc (50/1) to obtain benzoate **106** (0.95 g, 3.23 mmol, 97%) as a slightly brown solid.

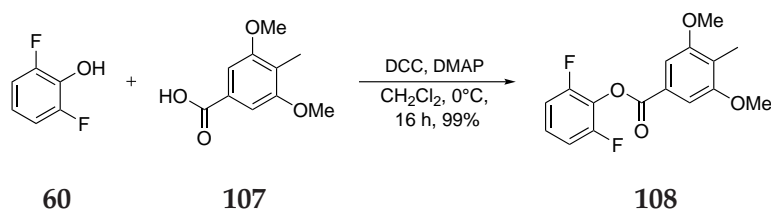
¹H-NMR: 400 MHz, CDCl_3 ; δ (ppm) = 8.80 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 8.32 (dd, J = 8.0, 1.8 Hz, 1H), 7.54 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.24 (m, 1H), 7.05 (m, 1H), 2.72 (s, 3H).

¹³C-NMR: 101 MHz, CDCl_3 ; δ (ppm) = 161.6, 156.6 (d, J = 3.5 Hz), 154.1 (d, J = 3.6 Hz), 149.5, 140.0, 134.3, 133.6, 127.4, 127.0 (t, J = 9.1 Hz), 126.9, 112.5 (d, J = 4.6 Hz), 112.3 (d, J = 4.7 Hz), 20.9.

¹⁹F-NMR: 376 MHz, CDCl_3 ; δ (ppm) = -125.8 (s, 2F)

MS-ESI⁻: m/z calcd. for $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{F}_2\text{NO}_4$ $[\text{M}-\text{H}]^-$: 293.05; found: 292.04.

6.4.25 2,6-difluorophenyl-3,5-dimethoxy-4-methylbenzoate



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|-------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Benzoic acid 107 | 196.07 | 1.00 | 1.00 | 5.10 | - | - |
| 2,6-dfp 60 | 130.09 | 1.10 | 0.73 | 6.63 | - | - |
| DCC | 206.33 | 1.50 | 1.58 | 7.65 | - | - |
| DMAP | 122.17 | 0.20 | 0.12 | 1.02 | - | - |

DCC (1.58 g, 7.65 mmol, 1.50 eq) and DMAP (0.12 g, 1.02 mmol, 0.20 eq) were added to a solution of benzoic acid **107** (1.00 g, 5.10 mmol, 1.00 eq) and 2,6-dfp **60** (0.73 g, 5.61 mmol, 1.10 eq) in CH_2Cl_2 (56.0 mL) and the mixture was left stirring for 16 h. The suspension was filtered and the filtrate was concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by flash column chromatography cyclohexane/EtOAc (50/1) to obtain benzoate **108** (1.56 g, 5.06 mmol, 99%) as a white solid.

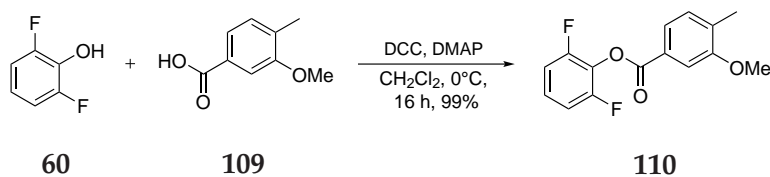
¹H-NMR: 400 MHz, CDCl_3 ; δ (ppm) = 7.39 (s, 2H), 7.21 (m, 1H), 7.02 (t, $J = 8.1$ Hz, 2H), 3.90 (s, 6H), 2.17 (s, 3H).

¹³C-NMR: 101 MHz, CDCl_3 ; δ (ppm) = 163.6, 158.4, 157.0 (d, $J = 3.9$ Hz), 154.5 (d, $J = 3.9$ Hz), 127.8 (t, $J = 15.9$ Hz), 126.5 (t, $J = 9.1$ Hz), 126.1, 122.2, 112.3 (d, $J = 4.9$ Hz), 112.2 (d, $J = 4.9$ Hz), 105.7, 56.1, 9.0.

¹⁹F-NMR: 376 MHz, CDCl_3 ; δ (ppm) = -125.8 (s, 2F)

MS-ESI⁺: m/z calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{F}_2\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 308.09; found: 309.19.

6.4.26 2,6-difluorophenyl-3-methoxy-4-methylbenzoate



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|-------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Benzoic acid 109 | 166.06 | 1.00 | 1.00 | 6.02 | - | - |
| 2,6-dfp 60 | 130.09 | 1.10 | 0.86 | 6.62 | - | - |
| DCC | 206.33 | 1.50 | 1.86 | 9.03 | - | - |
| DMAP | 122.17 | 0.20 | 0.15 | 1.20 | - | - |

DCC (1.86 g, 9.03 mmol, 1.50 eq) and DMAP (0.15 g, 1.20 mmol, 0.20 eq) were added to a solution of benzoic acid **109** (1.00 g, 6.02 mmol, 1.00 eq) and 2,6-dfp **60** (0.86 g, 6.62 mmol, 1.10 eq) in CH_2Cl_2 (66.0 mL) and the mixture was left stirring for 16 h. The suspension was filtered and the filtrate was concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by flash column chromatography cyclohexane/EtOAc (50/1) to obtain benzoate **110** (1.66 g, 5.97 mmol, 99%) as a white solid.

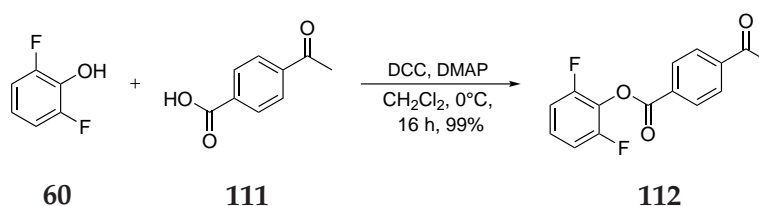
¹H-NMR: 400 MHz, CDCl_3 ; δ (ppm) = 7.77 (dd, $J = 7.7, 1.4$ Hz, 1H), 7.62 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H), 7.27 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.21 (m, 1H), 7.02 (t, $J = 8.2$ Hz, 2H), 3.92 (s, 3H), 2.31 (s, 3H).

¹³C-NMR: 101 MHz, CDCl_3 ; δ (ppm) = 163.6, 157.9, 156.9 (d, $J = 3.9$ Hz), 154.4 (d, $J = 3.9$ Hz), 134.3, 130.8, 127.7 (t, $J = 16.2$ Hz), 126.7, 126.5 (t, $J = 9.1$ Hz), 123.2, 112.3 (d, $J = 5.0$ Hz), 112.2 (d, $J = 5.0$ Hz), 111.2, 55.7, 16.8.

¹⁹F-NMR: 376 MHz, CDCl_3 ; δ (ppm) = -125.9 (s, 2F)

MS-ESI⁺: m/z calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{F}_2\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 278.08; found: 279.20.

6.4.27 2,6-difluorophenyl-4-acetylbenzoate



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|-------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Benzoic acid 111 | 164.16 | 1.00 | 1.04 | 6.33 | - | - |
| 2,6-dfp 60 | 130.09 | 1.10 | 0.91 | 6.96 | - | - |
| DCC | 206.33 | 1.50 | 1.96 | 9.49 | - | - |
| DMAP | 122.17 | 0.20 | 0.15 | 1.27 | - | - |

DCC (1.96 g, 9.49 mmol, 1.50 eq) and DMAP (0.15 g, 1.27 mmol, 0.20 eq) were added to a solution of benzoic acid **111** (1.04 g, 6.33 mmol, 1.00 eq) and 2,6-dfp **60** (0.91 g, 6.96 mmol, 1.10 eq) in CH_2Cl_2 (70.0 mL) and the mixture was left stirring for 16 h. The suspension was filtered and the filtrate was concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by flash column chromatography cyclohexane/EtOAc (50/1) to obtain benzoate **112** (1.74 g, 5.97 mmol, 99%) as a white solid.

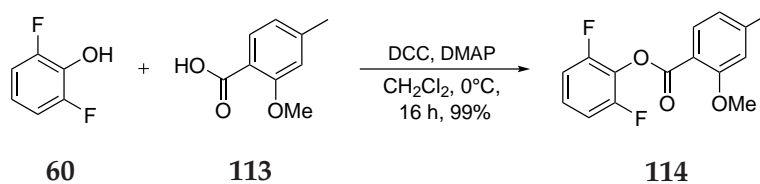
¹H-NMR: 400 MHz, DMSO- d_6 ; δ (ppm) = 8.30 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 8.17 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.45 (m, 1H), 7.35 (m, 2H), 2.67 (s, 3H).

¹³C-NMR: 101 MHz, DMSO- d_6 ; δ (ppm) = 197.6, 162.3, 155.7 (d, J = 3.8 Hz), 153.2 (d, J = 3.7 Hz), 141.3, 130.5, 130.2, 128.8, 127.9 (t, J = 9.2 Hz), 126.3 (t, J = 16.0 Hz), 112.8 (d, J = 4.4 Hz), 112.6 (d, J = 4.3 Hz), 27.1.

¹⁹F-NMR: 376 MHz, DMSO- d_6 ; δ (ppm) = -127.0 (s, 2F)

MS-ESI⁺: m/z calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{F}_2\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 276.06; found: 277.03.

6.4.28 2,6-difluorophenyl-2-methoxy-4-methylbenzoate



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|-------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Benzoic acid 113 | 166.18 | 1.00 | 1.09 | 6.58 | - | - |
| 2,6-dfp 60 | 130.09 | 1.10 | 0.94 | 7.23 | - | - |
| DCC | 206.33 | 1.50 | 2.04 | 9.86 | - | - |
| DMAP | 122.17 | 0.20 | 0.16 | 1.32 | - | - |

DCC (2.04 g, 9.86 mmol, 1.50 eq) and DMAP (0.16 g, 1.32 mmol, 0.20 eq) were added to a solution of benzoic acid **113** (1.09 g, 6.58 mmol, 1.00 eq) and 2,6-dfp **60** (0.94 g, 7.23 mmol, 1.10 eq) in CH_2Cl_2 (55.0 mL) and the mixture was left stirring for 16 h. The suspension was filtered and the filtrate was concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by flash column chromatography cyclohexane/EtOAc (50/1) to obtain benzoate **114** (1.82 g, 6.54 mmol, 99%) as a white solid.

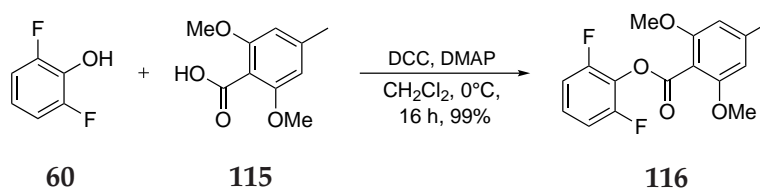
¹H-NMR: 400 MHz, CDCl_3 ; δ (ppm) = 8.03 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.18 (m, 1H), 7.00 (m, 2H), 6.86 (m, 2H), 3.93 (s, 3H), 2.43 (s, 3H).

¹³C-NMR: 101 MHz, CDCl_3 ; δ (ppm) = 161.9, 160.8, 157.0 (d, J = 4.0 Hz), 154.5 (d, J = 4.3 Hz), 146.6, 133.0, 127.7 (t, J = 15.9 Hz), 126.2 (t, J = 9.1 Hz), 121.2, 114.3, 113.1, 112.2 (d, J = 5.0 Hz), 112.0 (d, J = 5.1 Hz), 56.1, 22.3.

¹⁹F-NMR: 376 MHz, CDCl_3 ; δ (ppm) = -125.8 (s, 2F)

MS-ESI⁺: m/z calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{F}_2\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 278.08; found: 279.09.

6.4.29 2,6-difluorophenyl-2,6-dimethoxy-4-methylbenzoate



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|-------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Benzoic acid 115 | 196.20 | 1.00 | 1.31 | 6.69 | - | - |
| 2,6-dfp 60 | 130.09 | 1.10 | 0.96 | 7.36 | - | - |
| DCC | 206.33 | 1.50 | 2.07 | 10.0 | - | - |
| DMAP | 122.17 | 0.20 | 0.16 | 1.34 | - | - |

DCC (2.07 g, 10.0 mmol, 1.50 eq) and DMAP (0.16 g, 1.34 mmol, 0.20 eq) were added to a solution of benzoic acid **115** (1.31 g, 6.69 mmol, 1.00 eq) and 2,6-dfp **60** (0.96 g, 7.36 mmol, 1.10 eq) in CH_2Cl_2 (75.0 mL) and the mixture was left stirring for 16 h. The suspension was filtered and the filtrate was concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by flash column chromatography cyclohexane/EtOAc (50/1) to obtain benzoate **116** (2.05 g, 6.65 mmol, 99%) as a white solid.

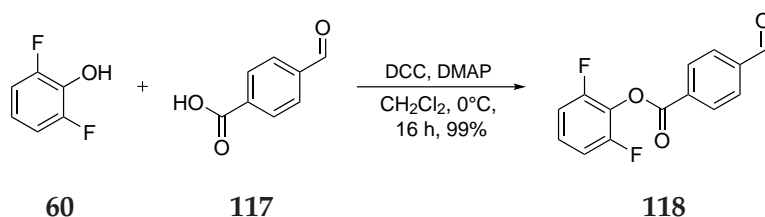
¹H-NMR: 400 MHz, CDCl_3 ; δ (ppm) = 7.17 (m, 1H), 6.99 (m, 2H), 6.43 (s, 2H), 3.87 (s, 6H), 2.38 (s, 3H).

¹³C-NMR: 101 MHz, CDCl_3 ; δ (ppm) = 163.1, 158.3, 156.9 (d, $J = 4.0$ Hz), 154.4 (d, $J = 4.2$ Hz), 143.3, 127.5 (t, $J = 16.0$ Hz), 126.3 (t, $J = 8.9$ Hz), 112.2 (d, $J = 5.0$ Hz), 112.1 (d, $J = 4.9$ Hz), 108.2, 105.0, 56.3, 22.6.

¹⁹F-NMR: 376 MHz, CDCl_3 ; δ (ppm) = -124.8 (s, 2F)

MS-ESI⁺: m/z calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{F}_2\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 308.09; found: 309.13.

6.4.30 2,6-difluorophenyl-4-formylbenzoate



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|-------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Benzoic acid 117 | 150.13 | 1.00 | 1.04 | 6.91 | - | - |
| 2,6-dfp 60 | 130.09 | 1.10 | 0.99 | 7.60 | - | - |
| DCC | 206.33 | 1.50 | 2.14 | 10.4 | - | - |
| DMAP | 122.17 | 0.20 | 0.17 | 1.38 | - | - |

DCC (2.14 g, 10.4 mmol, 1.50 eq) and DMAP (0.17 g, 1.38 mmol, 0.20 eq) were added to a solution of benzoic acid **117** (1.04 g, 6.91 mmol, 1.00 eq) and 2,6-dfp **60** (0.99 g, 7.60 mmol, 1.10 eq) in CH_2Cl_2 (75.0 mL) and the mixture was left stirring for 16 h. The suspension was filtered and the filtrate was concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by flash column chromatography cyclohexane/EtOAc (50/1) to obtain benzoate **118** (1.80 g, 6.87 mmol, 99%) as a white solid.

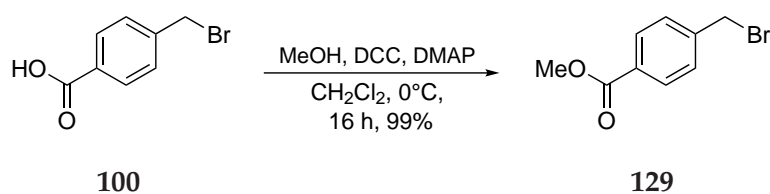
¹H-NMR: 400 MHz, CDCl_3 ; δ (ppm) = 10.16 (s, 1H), 8.39 (m, 2H), 8.05 (m, 2H), 7.26 (m, 1H), 7.05 (m, 2H).

¹³C-NMR: 101 MHz, CDCl_3 ; δ (ppm) = 191.6 (t, $J = 30.0$ Hz), 162.5, 156.7 (d, $J = 3.7$ Hz), 154.2 (d, $J = 3.8$ Hz), 140.0, 133.0, 131.3, 129.8, 127.3 (t, $J = 15.8$ Hz), 126.9 (t, $J = 9.1$ Hz), 112.5 (d, $J = 4.7$ Hz), 112.3 (d, $J = 4.7$ Hz).

¹⁹F-NMR: 376 MHz, CDCl_3 ; δ (ppm) = -125.8 (s, 2F)

MS-ESI⁺: m/z calcd. for $\text{C}_{14}\text{H}_8\text{F}_2\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 262.04; found: 263.03.

6.4.31 Methyl-4-(bromomethyl)benzoate



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|-------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Benzoic acid 100 | 215.05 | 1.00 | 3.02 | 14.0 | - | - |
| MeOH | 32.04 | 1.30 | - | 18.2 | 0.74 | 0.79 |
| DCC | 206.33 | 1.50 | 4.34 | 21.0 | - | - |
| DMAP | 122.17 | 0.20 | 0.34 | 2.81 | - | - |

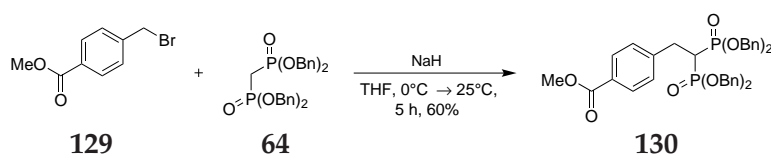
DCC (4.34 g, 21.0 mmol, 1.50 eq) and DMAP (0.34 g, 2.81 mmol, 0.20 eq) were added to a solution of benzoic acid **100** (3.02 g, 14.0 mmol, 1.00 eq) and MeOH (0.74 mL, 18.2 mmol, 1.30 eq) in CH_2Cl_2 (38.0 mL) and the mixture was left stirring for 16 h. The suspension was filtered and the filtrate was concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by flash column chromatography cyclohexane/EtOAc (50/1) to obtain benzoate **129** (3.18 g, 13.9 mmol, 99%) as a white solid.

$^1\text{H-NMR}$: 400 MHz, CDCl_3 ; δ (ppm) = 8.01 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.45 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 4.49 (s, 2H), 3.91 (s, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$: 101 MHz, CDCl_3 ; δ (ppm) = 166.6, 142.7, 130.2, 129.1, 52.3, 32.4.

MS-ESI $^+$: m/z calcd. for $\text{C}_9\text{H}_9\text{BrO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 227.98; found: 228.92.

6.4.32 methyl 4-(2,2-bis(bis(benzyloxy)phosphoryl)ethyl)benzoate



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|-----------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Phosphonate 64 | 536.50 | 1.00 | 1.27 | 2.36 | - | - |
| Benzoate 129 | 229.07 | 1.50 | 0.84 | 3.54 | - | - |
| NaH, 57% in min. oil | 23.99 | 1.30 | 0.13 | 3.07 | - | - |

Under argon atmosphere, phosphonate **64** (1.27 g, 2.36 mmol, 1.00 eq) was dissolved in anhydrous THF (5.00 mL) and the solution was cooled to 0 °C. Sodium hydride (0.13 g, 3.07 mmol, 1.30 eq) was added to the solution and the mixture was left stirring for 30 min. The solution was allowed to warm up to rt and it was left stirring for 1 h. The suspension was cooled to 0 °C and a solution of benzoate **129** (0.84 g, 3.54 mmol, 1.50 eq) in THF (5.00 mL) was added dropwise. The mixture was left stirring over night and the reaction was quenched by adding H₂O at 0 °C the next day. The mixture was diluted with EtOAc and washed with H₂O. The aqueous layer was extracted with EtOAc and the combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash column chromatography on silica using cyclohexane/EtOAc (1/1) giving phosphonate **130** (0.97 g, 1.41 mmol, 60%) as a pale viscous oil.

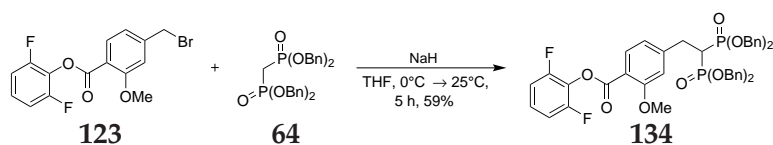
¹H-NMR: 400 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 7.74 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 7.28 (m, 22H), 4.96 (m, 8H), 3.83 (s, 3H), 3.38 (m, 1H), 3.22 (td, *JJ* = 16.1, 6.6 Hz, 2H).

¹³C-NMR: 101 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 166.0, 144.4, 144.3 (t, *J* = 8.1 Hz), 144.2, 136.2 (t, *J* = 6.4 Hz), 129.2, 128.8, 128.5, 128.3, 128.1, 127.7, 127.7, 67.4 (d, *J* = 6.2 Hz), 67.3, 67.1 (d, *J* = 6.0 Hz), 51.9, 38.6, 37.3 (t, *J* = 130.4 Hz), 36.0, 30.9.

³¹P-NMR: 162 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 24.2 (s, 2P).

MS-ESI⁺: *m/z* calcd. for C₃₈H₃₈O₈P₂ [M+H]⁺: 684.66; found: 685.14.

6.4.33 2,6-difluorophenyl 4-(2,2-bis(benzyloxy)phosphoryl)ethyl)-2-methoxybenzoate



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|-----------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Phosphonate 64 | 536.50 | 1.00 | 0.67 | 1.25 | - | - |
| Benzoate 123 | 357.15 | 1.50 | 0.69 | 1.88 | - | - |
| NaH, 57% in min. oil | 23.99 | 1.30 | 0.07 | 1.63 | - | - |

Under argon atmosphere, phosphonate **64** (0.67 g, 1.25 mmol, 1.00 eq) was dissolved in anhydrous THF (2.50 mL) and the solution was cooled to 0 °C. Sodium hydride (0.07 g, 1.63 mmol, 1.30 eq) was added to the solution and the mixture was left stirring for 30 min. The solution was allowed to warm up to rt and it was left stirring for 1 h. The suspension was cooled to 0 °C and a solution of benzoate **123** (0.69 g, 1.88 mmol, 1.50 eq) in THF (2.50 mL) was added dropwise. The mixture was left stirring over night and the reaction was quenched by adding H₂O at 0 °C the next day. The mixture was diluted with EtOAc and washed with H₂O. The aqueous layer was extracted with EtOAc and the combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash column chromatography on silica using cyclohexane/EtOAc (1/1) giving phosphonate **134** (0.60 g, 0.74 mmol, 59%) as a pale solid.

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 7.86 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.28 (m, 22H), 7.00 (m, 2H), 6.71 (m, 2H), 5.00 (m, 8H), 3.61 (s, 3H), 3.29 (td, *J* = 16.6, 6.4 Hz, 2H), 2.75 (tt, *J* = 24.1, 6.6 Hz, 1H).

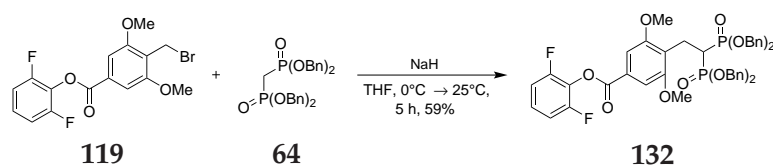
¹³C-NMR: 101 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 161.7, 160.6, 157.0, 157.0 (d, *J* = 3.4 Hz), 154.5 (d, *J* = 3.9 Hz), 154.5, 147.3, 147.2 (t, *J* = 7.2 Hz), 147.1, 136.0 (m), 132.9, 128.7, 128.7, 128.4, 128.3, 126.3 (t, *J* = 9.0 Hz), 120.8, 115.3, 113.1, 112.3 (d, *J* = 4.8 Hz), 112.1 (d, *J* = 4.8 Hz), 68.6 (d, *J* = 6.5 Hz), 68.5, 68.3 (d, *J* = 6.4 Hz), 68.2, 56.0, 40.9, 39.6 (t, *J* = 132.9 Hz), 38.3, 31.8.

¹⁹F-NMR: 376 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = -125.7(s, 2F)

³¹P-NMR: 162 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 23.8 (s, 2P).

MS-ESI⁺: *m/z* calcd. for C₄₄H₄₀F₂O₉P₂ [M+H]⁺: 812.74; found: 813.26.

6.4.34 2,6-difluorophenyl 4-(2,2-bis(bis(benzyloxy)phosphoryl)ethyl)-3,5-dimethoxybenzoate



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|-----------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Phosphonate 64 | 536.50 | 1.00 | 0.38 | 0.71 | - | - |
| Benzoate 119 | 387.18 | 1.50 | 0.42 | 1.06 | - | - |
| NaH, 57% in min. oil | 23.99 | 1.30 | 0.04 | 0.92 | - | - |

Under argon atmosphere, phosphonate **64** (0.38 g, 0.71 mmol, 1.00 eq) was dissolved in anhydrous THF (2.50 mL) and the solution was cooled to 0 °C. Sodium hydride (0.04 g, 0.92 mmol, 1.30 eq) was added to the solution and the mixture was left stirring for 30 min. The solution was allowed to warm up to rt and it was left stirring for 1 h. The suspension was cooled to 0 °C and a solution of benzoate **119** (0.42 g, 1.06 mmol, 1.50 eq) in THF (2.50 mL) was added dropwise. The mixture was left stirring over night and the reaction was quenched by adding H₂O at 0 °C the next day. The mixture was diluted with EtOAc and washed with H₂O. The aqueous layer was extracted with EtOAc and the combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash column chromatography on silica using cyclohexane/EtOAc (1/1) giving phosphonate **132** (0.36 g, 0.42 mmol, 59%) as a pale solid.

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 7.35 (m, 22H), 7.12 (t, J = 7.9 Hz, 2H), 5.08 (m, 8H), 3.73 (s, 6H), 3.52 (m, 3H).

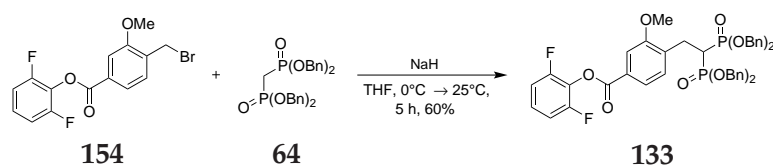
¹³C-NMR: 101 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 163.3, 158.4, 156.9, 156.9 (d, J = 3.2 Hz), 154.4, 154.4 (d, J = 3.7 Hz), 136.6, 136.5 (m), 136.4, 128.6, 128.4, 128.3, 128.1, 127.9, 127.2, 126.7, 126.6 (t, J = 8.9 Hz), 126.5, 122.1, 122.0 (m), 121.9, 112.3 (d, J = 21.8 Hz), 105.7, 68.1 (d, J = 6.1 Hz), 68.0, 67.9, 67.8 (d, J = 6.5 Hz), 55.8, 37.1, 35.8 (t, J = 132.3 Hz), 34.5, 20.2.

¹⁹F-NMR: 376 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = -125.7(s, 2F)

³¹P-NMR: 162 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 24.6 (s, 2P).

MS-ESI⁺: m/z calcd. for C₄₅H₄₂F₂O₁₀P₂ [M+H]⁺: 842.22; found: 843.29.

6.4.35 2,6-difluorophenyl 4-(2,2-bis(benzyloxy)phosphoryl)ethyl)-3-methoxybenzoate



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|-----------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Phosphonate 64 | 536.50 | 1.00 | 0.67 | 1.24 | - | - |
| Benzoate 154 | 357.15 | 1.50 | 0.69 | 1.87 | - | - |
| NaH, 57% in min. oil | 23.99 | 1.30 | 0.07 | 1.62 | - | - |

Under argon atmosphere, phosphonate **64** (0.67 g, 1.24 mmol, 1.00 eq) was dissolved in anhydrous THF (5.00 mL) and the solution was cooled to 0 °C. Sodium hydride (0.07 g, 1.62 mmol, 1.30 eq) was added to the solution and the mixture was left stirring for 30 min. The solution was allowed to warm up to rt and it was left stirring for 1 h. The suspension was cooled to 0 °C and a solution of benzoate **154** (0.69 g, 1.87 mmol, 1.50 eq) in THF (5.00 mL) was added dropwise. The mixture was left stirring over night and the reaction was quenched by adding H₂O at 0 °C the next day. The mixture was diluted with EtOAc and washed with H₂O. The aqueous layer was extracted with EtOAc and the combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash column chromatography on silica using cyclohexane/EtOAc (1/1) giving phosphonate **133** (0.61 g, 0.75 mmol, 59%) as a pale solid.

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 7.59 (dd, J = 7.8, 1.6 Hz, 1H), 7.41 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 7.27 (m, 24H), 7.04 (m, 2H), 4.98 (m, 8H), 3.70 (s, 3H), 3.34 (m, 3H).

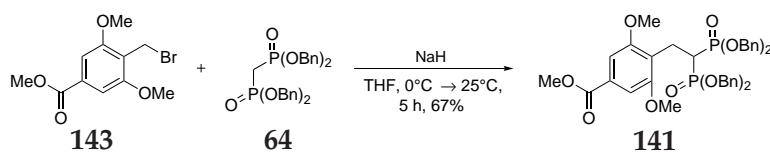
¹³C-NMR: 101 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 163.2, 157.7, 156.9 (d, J = 4.1 Hz), 156.9, 154.4 (d, J = 3.9 Hz), 154.4, 136.2 (m), 133.7, 133.6 (t, J = 8.7 Hz), 133.5, 131.9, 128.6, 128.5, 128.2, 128.1, 127.7, 126.6 (t, J = 9.0 Hz), 122.9, 112.4, (d, J = 4.7 Hz), 112.2 (d, J = 4.5 Hz), 111.4, 68.3, 68.3 (d, J = 6.4 Hz), 68.0, 67.9 (d, J = 6.7 Hz), 55.5, 37.9, 36.6 (t, J = 132.6 Hz), 35.3, 28.4, 28.3, 28.3 (t, J = 4.5 Hz).

¹⁹F-NMR: 376 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = -125.8(s, 2F)

³¹P-NMR: 162 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 24.2 (s, 2P).

MS-ESI⁺: m/z calcd. for C₄₄H₄₀F₂O₉P₂ [M+H]⁺: 812.21; found: 813.23.

6.4.36 methyl 4-(2,2-bis(bis(benzyloxy)phosphoryl)ethyl)-3,5-dimethoxybenzoate



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|-----------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Phosphonate 64 | 536.50 | 1.00 | 26.7 | 49.7 | - | - |
| Benzoate 143 | 229.07 | 1.50 | 22.2 | 74.6 | - | - |
| NaH, 57% in min. oil | 23.99 | 1.30 | 2.72 | 64.6 | - | - |

Under argon atmosphere, phosphonate **64** (26.7 g, 49.7 mmol, 1.00 eq) was dissolved in anhydrous THF (200 mL) and the solution was cooled to 0 °C. Sodium hydride (2.72 g, 64.6 mmol, 1.30 eq) was added to the solution and the mixture was left stirring for 30 min. The solution was allowed to warm up to rt and it was left stirring for 1 h. The suspension was cooled to 0 °C and a solution of benzoate **143** (22.2 g, 74.6 mmol, 1.50 eq) in THF (200 mL) was added dropwise. The mixture was left stirring over night and the reaction was quenched by adding H₂O at 0 °C the next day. The mixture was diluted with EtOAc and washed with H₂O. The aqueous layer was extracted with EtOAc and the combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash column chromatography on silica using cyclohexane/EtOAc (1/1) giving phosphonate **130** (24.9 g, 33.4 mmol, 67%) as a pale viscous oil.

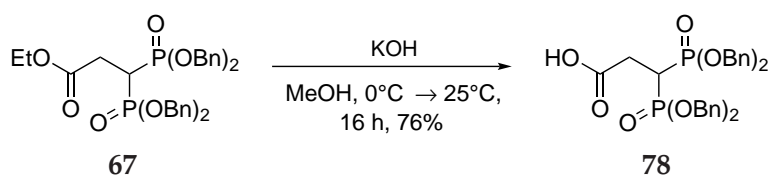
¹H-NMR: 400 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 7.48 (m, 22H), 5.18 (m, 8H), 4.12 (s, 3H), 3.87 (s, 6H), 3.64 (m, 3H).

¹³C-NMR: 101 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 166.0, 144.4, 144.3 (t, J = 8.1 Hz), 144.2, 136.2 (t, J = 6.4 Hz), 129.2, 128.8, 128.5, 128.3, 128.1, 127.7, 127.7, 67.4 (d, J = 6.2 Hz) 67.3, 67.1 (d, J = 6.0 Hz), 55.8, 51.9, 38.6, 37.3 (t, J = 130.4 Hz), 36.0, 30.9.

³¹P-NMR: 162 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 24.0 (s, 2P).

MS-ESI⁺: m/z calcd. for C₄₀H₄₂O₁₀P₂ [M+H]⁺: 744.23; found: 745.19.

6.4.37 3,3-bis(bis(benzyloxy)phosphoryl)propanoic acid



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|--------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Phosphonate 67 | 622.59 | 1.00 | 3.23 | 5.20 | - | - |
| KOH, 0.2 M in MeOH | 56.11 | 1.20 | - | 6.24 | 31.2 | - |

Phosphonate 67 (3.23 g, 5.20 mmol, 1.00 eq) was dissolved in MeOH (10.0 mL) and added to a premixed KOH solution (31.2 mL, 6.24 mmol, 0.2 M, 1.20 eq) at 0 °C. The mixture was allowed to warm up to rt and was left stirring for 16 h. The crude was concentrated *in vacuo* and dissolved in DEE. H₂O was added and the aqueous layer was acidified to pH = 2. The aqueous layer was extracted with EtOAc and the combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo* giving acid 78 (2.35 g, 3.95 mmol, 76%) as a viscous oil.

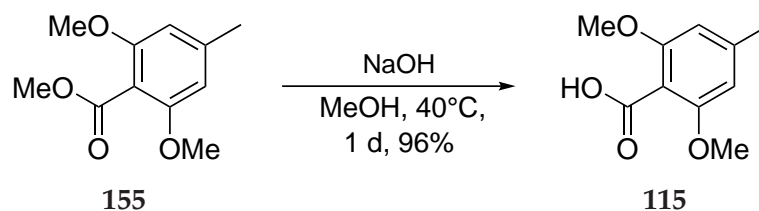
¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 7.26 (m, 20H), 4.98 (dd, J = 8.3, 5.7 Hz, 8H), 3.28 (tt, J = 24.0, 6.3 Hz, 1H), 2.91 (td, J = 16.4, 6.3 Hz, 2H).

¹³C-NMR: 101 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 172.8 (t, J = 9.1 Hz), 135.9 (d, J = 5.9 Hz), 128.4 (m), 68.7 (d, J = 6.6), 68.6 (d, J = 6.6 Hz), 33.4 (t, J = 136.3 Hz), 30.4.

³¹P-NMR: 162 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 24.7 (s, 2P).

MS-ESI⁻: m/z calcd. for C₃₁H₃₂O₈P₂ [M-H]⁻: 594.16; found: 593.28.

6.4.38 2,6-dimethoxy-4-methylbenzoic acid



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|--------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Ester 155 | 210.23 | 1.00 | 1.52 | 7.22 | - | - |
| NaOH, 10 M in MeOH | 40.00 | 30.0 | - | 217 | 21.7 | - |

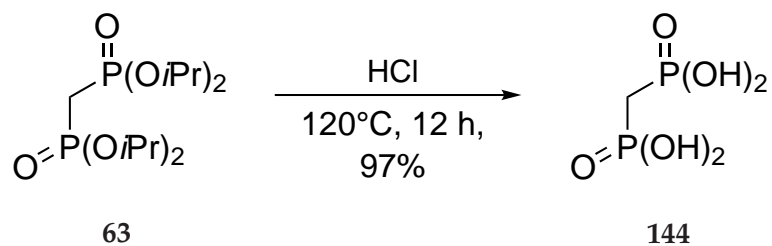
Ester **155** (1.52 g, 7.22 mmol, 1.00 eq) was dissolved in MeOH (75.0 mL) and added to a premixed NaOH solution (21.7 mL, 217 mmol, 10.0 M, 30.0 eq) and left stirring at 40 °C for 24 h. The crude was concentrated *in vacuo* and dissolved in DEE. H₂O was added and the aqueous layer was acidified to pH = 2. The aqueous layer was extracted with EtOAc and the combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo* giving acid **115** (1.35 g, 6.89 mmol, 96%) as a white solid.

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 12.5 (s, 1H), 6.5 (s, 2H), 3.7 (s, 6H), 2.3 (s, 3H).

¹³C-NMR: 101 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 166.8, 156.0, 140.4, 111.7, 104.8, 55.6, 21.7.

MS-ESI⁺: m/z calcd. for C₁₀H₁₀O₄ [M+H]⁺: 196.07; found: 197.04.

6.4.39 methylenebis(phosphonic acid)



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|------------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Phosphonic ester 63 | 344.32 | 1.00 | 5.06 | 14.7 | - | - |
| HCl, 6 M in H ₂ O | 36.46 | 41.0 | - | 602 | 100 | - |

Phosphonic ester **63** (5.07 g, 14.7 mmol, 1.00 eq) was dissolved in 6 M HCl (100 mL, 602 mmol, 41.0 eq) and left stirring at 120 °C for 12 h. The crude was concentrated *in vacuo* giving phosphonic acid **144** (2.50 g, 14.2 mmol, 97%) as a white solid.

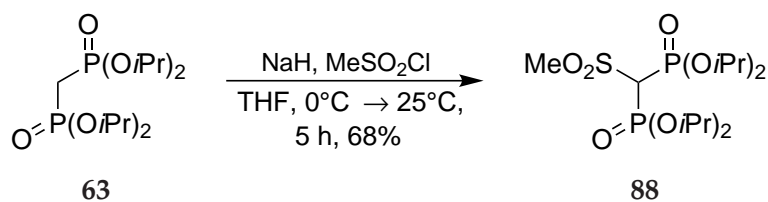
¹H-NMR: 500 MHz, D₂O; δ (ppm) = 2.49 (t, J = 20.8 Hz, 2H).

¹³C-NMR: 126 MHz, D₂O; δ (ppm) = 27.2 (t, J = 129.0 Hz).

³¹P-NMR: 202 MHz, D₂O; δ (ppm) = 18.7 (s, 2P).

MS-ESI⁻: m/z calcd. for CH₆O₆P₂ [M-H]⁻: 175.96; found: 174.86.

6.4.40 tetraisopropyl ((methylsulfonyl)methylene)bis(phosphonate)



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|----------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Phosphonic ester 63 | 344.32 | 1.00 | 2.79 | 7.95 | - | - |
| Mesyl chloride | 114.55 | 1.50 | - | 11.9 | 0.92 | 1.48 |
| NaH | 23.99 | 1.10 | 0.37 | 8.74 | - | - |

Under argon atmosphere, phosphonate **63** (2.79 g, 7.95 mmol, 1.00 eq) was dissolved in anhydrous THF (10.0 mL) and the solution was cooled to 0 °C. Sodium hydride (0.37 g, 8.74 mmol, 1.10 eq) was added to the solution and the mixture was left stirring for 30 min. The solution was allowed to warm up to rt and it was left stirring for 1 h. The suspension was cooled to 0 °C and a solution of mesylchloride (0.92 mL, 11.9 mmol, 1.50 eq) in THF (5.00 mL) was added dropwise. The mixture was left stirring over night and the reaction was quenched by adding H₂O at 0 °C the next day. The mixture was diluted with EtOAc and washed with H₂O. The aqueous layer was extracted with EtOAc and the combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash column chromatography on silica using cyclohexane/EtOAc (1/1) giving phosphonate **88** (2.28 g, 5.40 mmol, 68%) as a pale solid.

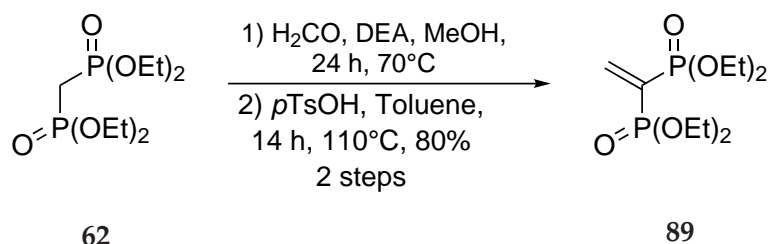
¹H-NMR: 500 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 5.20 (t, *J* = 21.7, 1H), 4.76 (m, 4H), 3.28 (s, 3H), 1.29 (m, 24H).

¹³C-NMR: 126 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 72.1, 71.8, 62.7 (t, *J* = 123.7), 44.0, 24.0, 23.9, 23.4, 23.2.

³¹P-NMR: 202 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 8.5 (s, 2P).

MS-ESI⁺: *m/z* calcd. for C₁₄H₃₂O₈P₂S [M+H]⁺: 422.13; found: 423.39.

6.4.41 tetraethyl ethene-1,1-diylbis(phosphonate)



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|----------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Phosphonic ester 62 | 288.22 | 1.00 | - | 11.7 | 3.00 | 1.16 |
| Paraformaldehyde | 30.03 | 5.00 | 1.95 | 58.6 | - | - |
| DEA | 73.14 | 1.05 | - | 12.3 | 1.27 | 0.71 |
| <i>p</i> TsOH | 172.20 | 0.02 | 0.04 | 0.23 | - | - |

Phosphonate **62** (3.00 mL, 11.7 mmol, 1.00 eq) was added to a premixed solution of paraformaldehyde (1.95 g, 58.6 mmol, 5.00 eq) and DEA (1.27 mL, 12.3 mmol, 1.05 eq) in MeOH (35.0 mL). The mixture was stirred for 24 h at 70 °C and concentrated *in vacuo*. The crude was dissolved in toluene (17 mL) and *p*TsOH (0.04 g, 0.23 mmol, 2mol%) was added. MeOH was removed by collection in a DEAN STARK trap at 140 °C. The crude was concentrated *in vacuo*, dissolved in chloroform and washed with H₂O, brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash column chromatography on silica using DCM/MeOH (60/1) giving phosphonate **89** (2.81 g, 9.36 mmol, 80%) as a pale liquid in 2 steps.

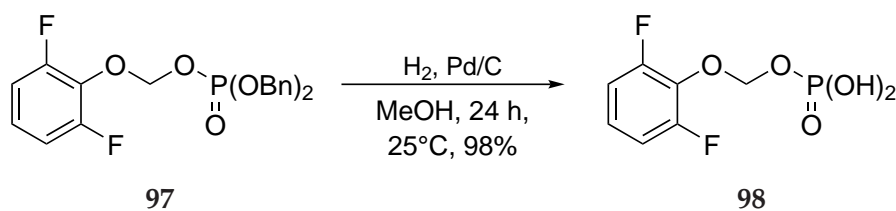
¹H-NMR: 500 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 6.83 (m, 2H), 4.02 (m, 8H), 1.25 (t, *J* = 7.0 Hz, 12H).

¹³C-NMR: 126 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 148.5, 131.9 (t, *J* = 164.0 Hz), 62.1, 16.0.

³¹P-NMR: 202 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 13.4 (s, 2P).

MS-ESI⁺: *m/z* calcd. for C₁₀H₂₂O₆P₂ [M+H]⁺: 300.09; found: 301.28.

6.4.42 (2,6-difluorophenoxy)methyl dihydrogen phosphate



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|-----------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Phosphonate 97 | 420.35 | 1.00 | 0.17 | 0.41 | - | - |
| Pd on C, 10 wt. % | 106.42 | 0.10 | 0.04 | 0.04 | - | - |

A flask was flushed three times with argon and phosphonate **97** (0.17 g, 0.41 mmol, 1.00 eq) was soluted in MeOH (1.00 mL). Palladium on carbon (0.04 g, 0.04 mmol, 10mol%) was added and the mixture was left stirring for 24 h at rt. The suspension was filtered and concentrated *in vacuo* giving phosphate **98** (0.10 g, 0.40 mmol, 98%) as a pale yellow oil.

¹H-NMR: 500 MHz, D₂O; δ (ppm) = 7.21 (m, 1H), 7.08 (m, 2H), 5.57 (d, J = 13.0 Hz, 2H).

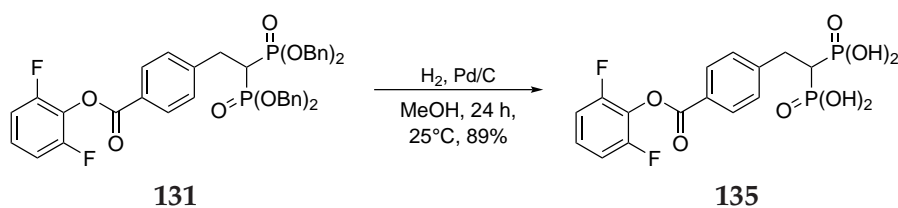
¹³C-NMR: 126 MHz, D₂O; δ (ppm) = 157.1 (d, J = 4.4 Hz), 155.1 (d, J = 4.3 Hz), 132.1 (t, J = 14.7 Hz), 125.6 (t, J = 9.6 Hz), 112.7 (d, J = 4.9 Hz), 112.5 (d, J = 5.0 Hz), 92.4.

¹⁹F-NMR: 471 MHz, D₂O; δ (ppm) = -128.2 (s, 2F)

³¹P-NMR: 202 MHz, D₂O; δ (ppm) = -1.0 (s, 2P).

MS-ESI⁻: m/z calcd. for C₇H₇F₂O₅P [M-H]⁻: 240.00; found: 238.95.

6.4.43 ((2-(4-((2,6-difluorophenoxy)carbonyl)phenyl)ethane-1,1-diyl)bis(phosphonic acid))



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Phosphonate 131 | 782.71 | 1.00 | 0.23 | 0.29 | - | - |
| Pd on C, 10 wt. % | 106.42 | 0.10 | 0.03 | 0.03 | - | - |

A flask was flushed three times with argon and phosphonate **131** (0.23 g, 0.29 mmol, 1.00 eq) was soluted in MeOH (1.00 mL). Palladium on carbon (0.03 g, 0.03 mmol, 10mol%) was added and the mixture was left stirring for 24 h at rt. The suspension was filtered and concentrated *in vacuo* giving bisphosphonic acid **135** (0.11 g, 0.26 mmol, 89%) as a white solid.

¹H-NMR: 400 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 10.66 (s, 4H), 8.07 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.53 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.43 (tt, J = 9.4, 6.2 Hz, 1H), 7.33 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 3.19 (td, J = 16.1, 5.9 Hz, 2H), 2.38 (tt, J = 22.7, 5.8 Hz, 1H).

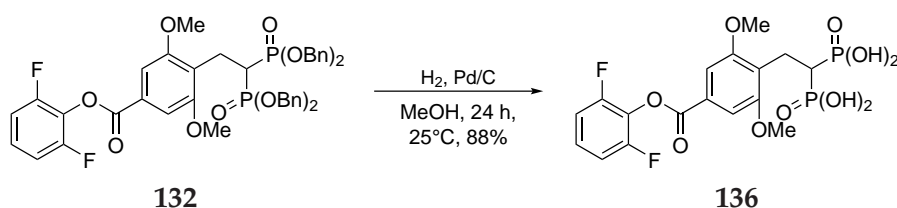
¹³C-NMR: 101 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 162.9, 155.9 (d, J = 3.7 Hz), 153.4 (d, J = 3.6 Hz), 148.6 (t, J = 7.0 Hz), 130.0, 129.7, 127.6 (t, J = 9.1 Hz), 126.5 (t, J = 16.0 Hz), 124.5, 112.7 (d, J = 4.4 Hz), 112.6 (d, J = 3.8 Hz), 41.2, 31.0.

¹⁹F-NMR: 376 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = -127.1 (s, 2F)

³¹P-NMR: 162 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 20.6 (s, 2P).

MS-ESI⁻: m/z calcd. for C₁₅H₁₄F₂O₈P₂ [M-H]⁻: 422.01; found: 421.17.

6.4.44 (2-(4-((2,6-difluorophenoxy)carbonyl)-2,6-dimethoxyphenyl)ethane-1,1-diyl)bis(phosphonic acid)



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Phosphonate 132 | 842.77 | 1.00 | 0.29 | 0.34 | - | - |
| Pd on C, 10 wt. % | 106.42 | 0.10 | 0.04 | 0.03 | - | - |

A flask was flushed three times with argon and phosphonate **132** (0.29 g, 0.34 mmol, 1.00 eq) was soluted in MeOH (1.00 mL). Palladium on carbon (0.04 g, 0.03 mmol, 10mol%) was added and the mixture was left stirring for 24 h at rt. The suspension was filtered and concentrated *in vacuo* giving bisphosphonic acid **136** (0.15 g, 0.30 mmol, 89%) as a white solid.

¹H-NMR: 400 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 10.25 (s, 4H), 7.43 (m, 1H), 7.34 (t, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.31 (s, 2H), 3.86 (s, 6H), 3.18 (m, 2H), 2.69 (tt, $J = 22.3, 7.2$ Hz, 1H).

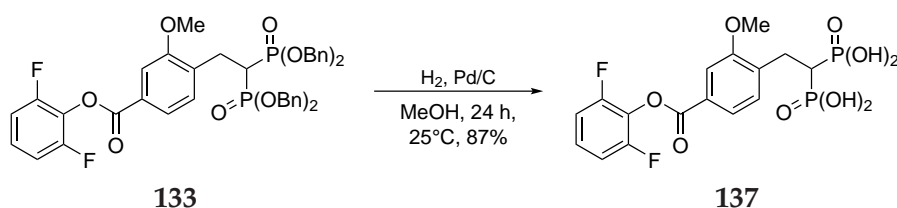
¹³C-NMR: 101 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 163.1, 158.5, 155.9 (d, $J = 3.9$ Hz), 153.4 (d, $J = 3.6$ Hz), 127.7 (t, $J = 8.9$ Hz), 126.6 (t, $J = 15.8$ Hz), 125.7, 123.8 (t, $J = 8.6$ Hz), 105.3, 56.1, 48.6, 36.7 (t, $J = 124.9$ Hz), 19.2.

¹⁹F-NMR: 376 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = -127.0 (s, 2F)

³¹P-NMR: 162 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 21.7 (s, 2P).

MS-ESI⁻: m/z calcd. for C₁₇H₁₈F₂O₁₀P₂ [M-H]⁻: 482.03; found: 481.24.

6.4.45 (2-(4-((2,6-difluorophenoxy)carbonyl)-2-methoxyphenyl)ethane-1,1-diyl)bis(phosphonic acid)



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Phosphonate 133 | 812.74 | 1.00 | 0.31 | 0.37 | - | - |
| Pd on C, 10 wt. % | 106.42 | 0.10 | 0.04 | 0.04 | - | - |

A flask was flushed three times with argon and phosphonate **133** (0.31 g, 0.37 mmol, 1.00 eq) was soluted in MeOH (1.00 mL). Palladium on carbon (0.04 g, 0.04 mmol, 10mol%) was added and the mixture was left stirring for 24 h at rt. The suspension was filtered and concentrated *in vacuo* giving bisphosphonic acid **137** (0.15 g, 0.32 mmol, 87%) as a white solid.

¹H-NMR: 400 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 9.43 (s, 4H), 7.70 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.44 (m, 2H), 7.34 (m, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.14 (td, J = 15.2, 6.9 Hz, 2H), 2.63 (tt, J = 22.4, 6.9 Hz, 1H).

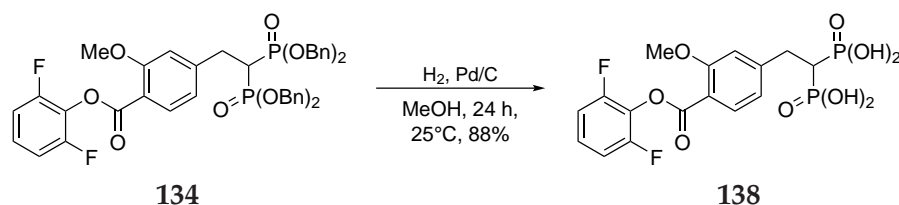
¹³C-NMR: 101 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 163.0, 157.6, 155.9 (d, J = 3.6 Hz), 153.4 (d, J = 3.5 Hz), 135.8 (t, J = 8.4 Hz), 131.3, 127.6 (t, J = 9.2 Hz), 126.5, 125.9, 122.2, 112.7 (d, J = 21.0 Hz), 110.8, 55.7, 48.6, 37.1 (t, J = 122.6 Hz), 26.6.

¹⁹F-NMR: 376 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = -127.1 (s, 2F)

³¹P-NMR: 162 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 21.1 (s, 2P).

MS-ESI⁺: m/z calcd. for C₁₆H₁₆F₂O₉P₂ [M+H]⁺: 452.02; found: 453.01.

6.4.46 (2-(4-((2-(4-((2,6-difluorophenoxy)carbonyl)-3-methoxyphenyl)ethane-1,1-diyl)bis(phosphonic acid)



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Phosphonate 134 | 812.74 | 1.00 | 0.11 | 0.13 | - | - |
| Pd on C, 10 wt. % | 106.42 | 0.10 | 0.01 | 0.01 | - | - |

A flask was flushed three times with argon and phosphonate **134** (0.11 g, 0.13 mmol, 1.00 eq) was soluted in MeOH (1.00 mL). Palladium on carbon (0.01 g, 0.01 mmol, 10mol%) was added and the mixture was left stirring for 24 h at rt. The suspension was filtered and concentrated *in vacuo* giving bisphosphonic acid **138** (0.05 g, 0.11 mmol, 88%) as a white solid.

¹H-NMR: 400 MHz, DMSO-*d*₆; δ (ppm) = 7.94 (s, 4H), 7.89 (d, *J* = 8.0, 1H), 7.40 (m, 1H), 7.30 (m, 2H), 7.19 (s, 1H), 7.02 (dd, *J* = 7.8, 3.8, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.14 (dt, *J* = 16.2, 8.1, 2H), 2.39 (dt, *J* = 22.7, 6.0, 1H).

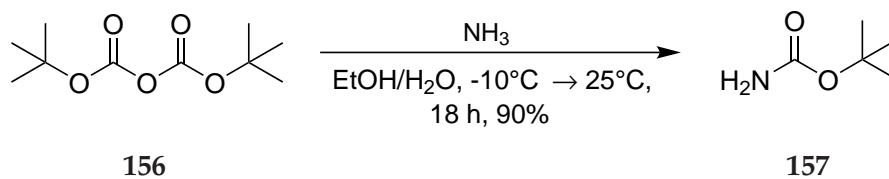
¹³C-NMR: 101 MHz, DMSO-*d*₆; δ (ppm) = 168.1, 159.7, 156.0 (d, *J* = 4.0 Hz), 153.6 (d, *J* = 4.0 Hz), 149.8 (t, *J* = 7.2 Hz), 131.9, 127.4 (m), 126.6 (t, *J* = 16.1 Hz), 120.9, 112.6 (d, *J* = 21.5 Hz), 112.0, 55.9, 41.1, 38.7, 21.3.

¹⁹F-NMR: 376 MHz, DMSO-*d*₆; δ (ppm) = -127.0 (s, 2F)

³¹P-NMR: 162 MHz, DMSO-*d*₆; δ (ppm) = 20.6 (s, 2P).

MS-ESI⁺: *m/z* calcd. for C₁₆H₁₆F₂O₉P₂ [M+H]⁺: 452.02; found: 453.26.

6.4.47 tert-butyl carbamate



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|--|--|------|-------|----------|--------|--|
| Boc ₂ O 156 | 218.25 | 1.00 | 5.00 | 22.9 | - | - |
| NH ₃ , 13.5 M in H ₂ O | 17.03 | 4.00 | - | 91.6 | 6.79 | 0.91 |

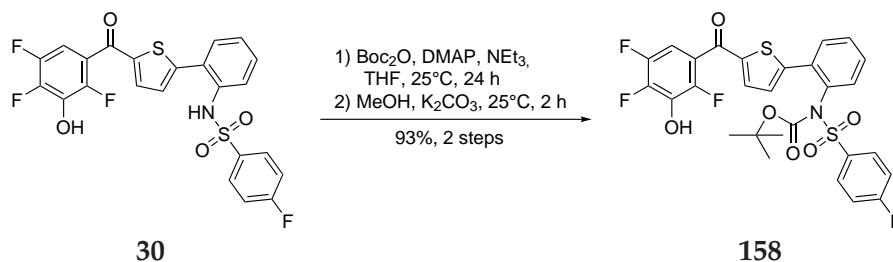
Di-*tert*-butyl dicarbonate **156** (5.00 g, 22.9 mmol, 1.00 eq) was dissolved in EtOH (30.0 mL) at -10°C . NH₃ (6.79 mL, 91.6 mmol, 13.5 M, 4.00 eq) was added and the mixture was left stirring for 18 h at rt. The suspension was concentrated *in vacuo* and suspended in cyclohexane. After recrystallization from cyclohexane, carbamate **157** (2.41 g, 20.6 mmol, 90%) was obtained as white crystals.

¹H-NMR: 400 MHz, DMSO-*d*₆; δ (ppm) = 6.10 (s, 2H), 1.37 (s, 9H).

¹³C-NMR: 101 MHz, DMSO-*d*₆; δ (ppm) = 156.2, 77.0, 28.2.

MS-ESI⁺: *m/z* calcd. for C₅H₁₁NO₂ [M+H]⁺: 117.08; found: 118.80.

6.4.48 *tert*-butyl ((4-fluorophenyl)sulfonyl)(2-(5-(2,4,5-trifluoro-3-hydroxybenzoyl)thiophen-2-yl)phenyl)carbamate



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|-----------------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Phenole 30 | 507.47 | 1.00 | 0.32 | 0.64 | - | - |
| Boc_2O 156 | 218.25 | 2.10 | 0.29 | 1.34 | - | - |
| DMAP | 122.17 | 0.10 | 0.01 | 0.06 | - | - |
| NEt_3 | 101.19 | 2.05 | - | 1.31 | 0.18 | 0.73 |
| K_2CO_3 | 138.20 | 2.00 | 0.18 | 1.28 | - | - |

Under argon atmosphere phenole **30** (0.32 g, 0.64 mmol, 1.00 eq) was dissolved in THF (3.00 mL) and treated with NEt_3 (0.18 mL, 1.31 mmol, 2.05 eq), DMAP (0.01 g, 0.06 mmol, 10mol%) and Boc_2O **156** (0.29 g, 1.34 mmol, 2.10 eq) and left stirring for 24 h at rt. The mixture was diluted with EtOAc and washed with saturated NaHCO_3 aq, brine, dried over MgSO_4 , filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was dissolved in MeOH (4.00 mL) and treated with K_2CO_3 (0.18 g, 1.28 mmol, 2.00 eq) and left stirring for 2 h. The precipitation was filtered off, the filtrate was concentrated *in vacuo* and redissolved in EtOAc and H_2O . The aqueous was extracted with EtOAc and the combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO_4 , filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash column chromatography on silica using cyclohexane/EtOAc (3/1) giving phenole **158** (0.36 g, 0.59 mmol, 93%) as a yellow solid.

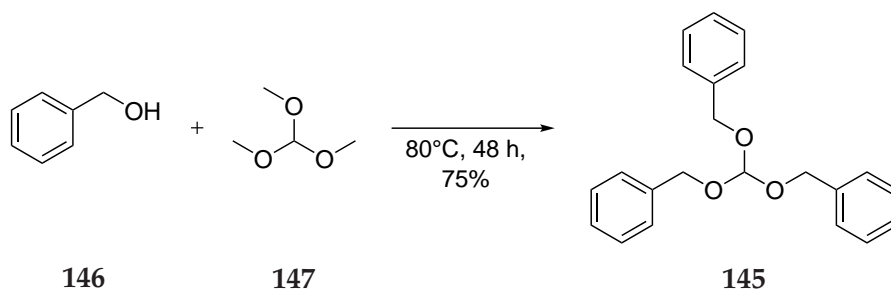
¹H-NMR: 400 MHz, DMSO- d_6 ; δ (ppm) = 11.29 (s, 1H), 7.76 (m, 3H), 7.68 (m, 1H), 7.56 (m, 2H), 7.38 (m, 4H), 7.12 (m, 1H), 1.25 (s, 9H).

¹³C-NMR: 101 MHz, DMSO- d_6 ; δ (ppm) = 182.1, 166.3, 163.8, 149.9, 148.9, 147.8 (m), 147.1 (m), 145.4 (m), 144.7 (m), 143.7 (m), 142.8, 136.8, 136.2 (m), 134.5 (d, $J = 2.4$ Hz), 133.1 (d, $J = 8.5$ Hz), 131.6 (d, $J = 10.0$ Hz), 131.0, 130.8, 130.4, 130.2, 128.9, 121.6 (m), 105.3 (d, $J = 21.6$ Hz), 85.0.

¹⁹F-NMR: 376 MHz, DMSO- d_6 ; δ (ppm) = -103.4 (s, 1F), -137.0 (m, 1F), -140.9 (m, 1F), -151.0 (m, 1F).

MS-ESI⁺: m/z calcd. for $\text{C}_{28}\text{H}_{21}\text{F}_4\text{NO}_6\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 607.07; found: 630.00.

6.4.49 tris(benzyloxy)methane



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|-------------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| <i>ortho</i> ester 147 | 106.12 | 1.00 | - | 94.5 | 10.3 | 0.97 |
| benzyl alcohol 146 | 108.14 | 4.00 | - | 378 | 39.3 | 1.04 |

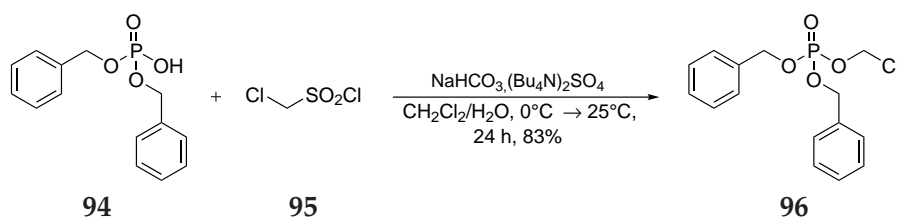
Ortho ester **147** (10.3 mL, 94.5 mmol, 1.00 eq) and benzyl alcohol **146** (39.3 mL, 378 mmol, 4.00 eq) were mixed and stirred for 48 h at 80 °C. The formed MeOH was removed by collection in a DEAN STARK trap. The crude was purified by flash column chromatography on silica using cyclohexane/EtOAc (40/1) giving *ortho* benzyloxy ester **145** (23.6 g, 70.4 mmol, 75%) as a pale liquid.

¹H-NMR: 500 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 7.35 (m, 15H), 5.45 (s, 1H), 4.69 (s, 6H).

¹³C-NMR: 126 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 137.5, 128.6, 128.0, 127.1, 111.6, 66.4.

MS-ESI⁺: m/z calcd. for C₂₂H₂₂O₃ [M+NH₄]⁺: 334.16; found: 352.31.

6.4.51 dibenzyl (chloromethyl) phosphate



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|----------------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Phosphate 94 | 278.24 | 1.00 | 0.52 | 1.86 | - | - |
| Sulfonyl chloride 95 | 148.99 | 1.20 | - | 2.23 | 0.20 | 1.63 |
| Sulfate, 50% in H ₂ O | 580.99 | 0.10 | - | 0.19 | 0.21 | 1.01 |
| NaHCO ₃ | 84.01 | 4.00 | 0.62 | 7.42 | - | - |

Phosphate **94** (0.52 g, 1.86 mmol, 1.00 eq), NaHCO₃ (0.62 g, 7.42 mmol, 4.00 eq) and (Bu₄N)₂SO₄ (0.21 mL, 0.19 mmol, 10mol%) were dissolved in H₂O (15.0 mL). DCM (8.00 mL) was added and the mixture was vigorously stirred at 0 °C for 10 min, followed by the addition of chlorosulfate **95** (0.20 mL, 2.23 mmol, 1.20 eq) in DCM (2.00 mL) with continuous vigorous stirring overnight at rt. The organic layer was separated, washed with brine, dried and evaporated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica using cyclohexane/EtOAc (5/1) giving phosphate **96** (0.50 g, 1.53 mmol, 83%) as a pale oil.

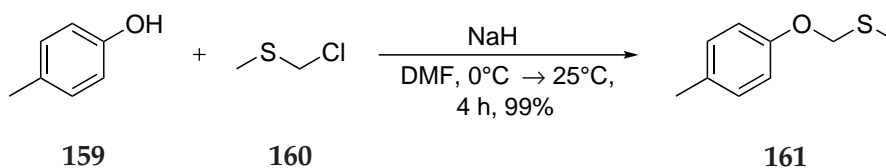
¹H-NMR: 500 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 7.36 (m, 10H), 5.62 (d, *J* = 15.7 Hz, 2H), 5.10 (d, *J* = 8.0 Hz, 4H).

¹³C-NMR: 126 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 135.3 (d, *J* = 7.2 Hz), 128.9, 128.8, 128.2, 73.6 (d, *J* = 6.8 Hz), 70.0 (d, *J* = 5.8 Hz).

³¹P-NMR: 162 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = -1.7 (s, 1P).

MS-ESI⁺: *m/z* calcd. for C₁₅H₁₆ClO₄P [M+H]⁺: 326.05; found: 327.17.

6.4.52 methyl((p-tolyloxy)methyl)sulfane



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|---------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Cresol 159 | 108.14 | 1.00 | 3.36 | 31.0 | - | - |
| Methyl sulfide 160 | 96.57 | 1.30 | - | 40.3 | 3.38 | 1.15 |
| NaH, 57% in min. oil | 23.99 | 2.00 | 2.65 | 63.0 | - | - |

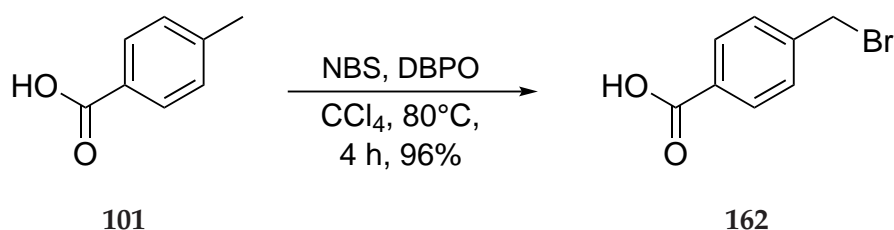
Under argon atmosphere textitpara cresol **159** (3.36 g, 31.0 mmol, 1.00 eq) was dissolved in DMF (60.0 mL). The mixture was cooled to 0 °C and NaH (2.65 g, 63.0 mmol, 2.00 eq) was added slowly. Methyl sulfide **160** (3.38 mL, 40.3 mmol, 1.30 eq) was added and the mixture was left stirring for 4 h at rt. The mixture was poured onto crushed ice and extracted with EtOAc. The combined organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica using cyclohexane/EtOAc (60/1) giving cresol **161** (5.15 g, 30.6 mmol, 99%) as a pale oil.

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 7.11 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 6.87 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 5.13 (s, 2H), 2.30 (s, 3H), 2.25 (s, 3H).

¹³C-NMR: 101 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 154.9, 131.3, 130.0, 116.1, 72.7, 20.7, 14.7.

MS-ESI⁺: *m/z* calcd. for C₉H₁₂O₄S [M+H]⁺: 168.06; found: 169.07.

6.4.53 4-(bromomethyl)benzoic acid



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|-------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Benzoic acid 101 | 136.05 | 1.00 | 5.00 | 36.8 | - | - |
| NBS | 177.99 | 1.10 | 7.20 | 40.4 | - | - |
| DBPO | 242.23 | 0.01 | 0.09 | 0.37 | - | - |

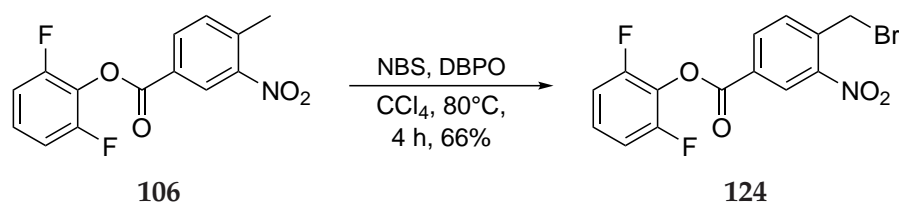
Benzoic acid **101** (5.00 g, 36.8 mmol, 1.00 eq), NBS (7.20 g, 40.4 mmol, 1.10 eq) and DBPO (0.09 g, 0.37 mmol, 1mol%) were dissolved in CCl_4 (60 mL) and the mixture was left stirring for 4 h at 80°C . The reaction was quenched by addition of H_2O and the aqueous layer was extracted with DCM. The combined organic layer were washed with H_2O , brine, dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo* giving bromide **162** (7.54 g, 35.3 mmol, 96%) as a yellow solid.

$^1\text{H-NMR}$: 400 MHz, DMSO-d_6 ; δ (ppm) = 7.92 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.56 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 4.74 (s, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$: 101 MHz, DMSO-d_6 ; δ (ppm) = 167.0, 142.9, 130.6, 129.8, 129.5, 33.4.

MS-ESI $^-$: m/z calcd. for $\text{C}_8\text{H}_7\text{BrO}_2$ $[\text{M-H}]^-$: 213.96; found: 213.03.

6.4.54 2,6-difluorophenyl 4-(bromomethyl)-3-nitrobenzoate



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Benzoate ? | 293.05 | 1.00 | 0.55 | 1.88 | - | - |
| NBS | 177.99 | 1.10 | 0.37 | 2.07 | - | - |
| DBPO | 242.23 | 0.01 | 0.01 | 0.02 | - | - |

Benzoate **106** (0.55 g, 1.88 mmol, 1.00 eq), NBS (0.37 g, 2.07 mmol, 1.10 eq) and DBPO (0.01 g, 0.02 mmol, 1mol%) were dissolved in CCl_4 (5.00 mL) and the mixture was left stirring for 4 h at 80°C . The reaction was quenched by addition of H_2O and the aqueous layer was extracted with DCM. The combined organic layer were washed with H_2O , brine, dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica using cyclohexane/EtOAc (40/1) giving bromide **124** (0.46 g, 1.24 mmol, 66%) as a yellow solid.

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl_3 ; δ (ppm) = 8.86 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 8.42 (dd, $J = 8.0$ Hz, 1.8, 1H), 7.78 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.27 (m, 1H), 7.06 (m, 1H), 4.89 (s, 2H).

¹³C-NMR: 101 MHz, CDCl_3 ; δ (ppm) = 161.0, 156.5 (d, $J = 3.6$ Hz), 154.0 (d, $J = 3.5$ Hz), 148.3, 138.5, 135.1, 133.4, 129.7, 127.6, 127.2 (t, $J = 8.9$ Hz), 112.5 (d, $J = 4.6$ Hz), 112.4 (d, $J = 4.4$ Hz), 27.9.

¹⁹F-NMR: 376 MHz, CDCl_3 ; δ (ppm) = -125.7 (s, 2F).

MS-ESI⁺: m/z calcd. for $\text{C}_8\text{H}_7\text{BrO}_2$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$: 370.96; found: 390.68.

6.4.55 2,6-difluorophenyl 4-(bromomethyl)-3,5-dimethoxybenzoate



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Benzoate ? | 308.09 | 1.00 | 0.55 | 1.79 | - | - |
| NBS | 177.99 | 1.10 | 0.35 | 1.97 | - | - |
| DBPO | 242.23 | 0.01 | 0.02 | 0.07 | - | - |

Benzoate **119** (0.55 g, 1.79 mmol, 1.00 eq), NBS (0.35 g, 1.97 mmol, 1.10 eq) and DBPO (0.02 g, 0.07 mmol, 1mol%) were dissolved in CCl_4 (2.50 mL) and the mixture was left stirring for 4 h at 80°C . The reaction was quenched by addition of H_2O and the aqueous layer was extracted with DCM. The combined organic layer were washed with H_2O , brine, dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica using cyclohexane/EtOAc (50/1) giving bromide **120** (0.61 g, 1.57 mmol, 88%) as a white solid.

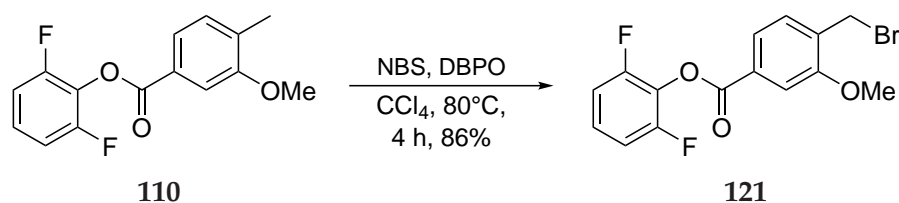
$^1\text{H-NMR}$: 400 MHz, CDCl_3 ; δ (ppm) = 7.40 (s, 2H), 7.23 (m, 1H), 7.04 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H), 4.67 (s, 2H), 3.98 (s, 6H).

$^{13}\text{C-NMR}$: 101 MHz, CDCl_3 ; δ (ppm) = 163.1, 158.4, 156.8 (d, $J = 3.7$ Hz), 154.3 (d, $J = 3.7$ Hz), 129.3, 127.5 (t, $J = 15.8$ Hz), 126.7 (t, $J = 9.0$ Hz), 120.8, 112.4 (d, $J = 4.7$ Hz), 112.2 (d, $J = 4.8$ Hz), 105.9, 56.4, 22.0.

$^{19}\text{F-NMR}$: 376 MHz, CDCl_3 ; δ (ppm) = -125.8 (s, 2F).

MS-ESI $^+$: m/z calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{BrF}_2\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 386.00; found: 387.00.

6.4.56 2,6-difluorophenyl 4-(bromomethyl)-3-methoxybenzoate



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Benzoate ? | 278.08 | 1.00 | 0.70 | 2.52 | - | - |
| NBS | 177.99 | 1.10 | 0.49 | 2.77 | - | - |
| DBPO | 242.23 | 0.01 | 0.01 | 0.03 | - | - |

Benzoate **119** (0.70 g, 2.52 mmol, 1.00 eq), NBS (0.49 g, 2.77 mmol, 1.10 eq) and DBPO (0.01 g, 0.03 mmol, 1mol%) were dissolved in CCl_4 (2.50 mL) and the mixture was left stirring for 4 h at 80°C . The reaction was quenched by addition of H_2O and the aqueous layer was extracted with DCM. The combined organic layer were washed with H_2O , brine, dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica using cyclohexane/EtOAc (70/1) giving bromide **121** (0.77 g, 2.16 mmol, 86%) as a white solid.

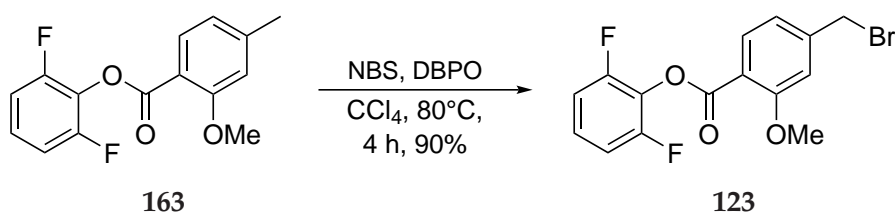
$^1\text{H-NMR}$: 400 MHz, CDCl_3 ; δ (ppm) = 7.79 (dd, $J = 7.8, 1.6$ Hz, 1H), 7.68 (m, 2H), 7.44 (m, 1H), 7.34 (m, 2H), 4.71 (s, 2H), 3.98 (s, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$: 101 MHz, CDCl_3 ; δ (ppm) = 163.6, 157.9, 156.9 (d, $J = 3.9$ Hz), 154.4 (d, $J = 3.9$ Hz), 134.3, 130.8, 127.7 (t, $J = 16.2$ Hz), 126.7, 126.5 (t, $J = 9.1$ Hz), 123.2, 112.3 (d, $J = 5.0$ Hz), 112.2 (d, $J = 5.0$ Hz), 111.2, 55.7, 28.1.

$^{19}\text{F-NMR}$: 376 MHz, CDCl_3 ; δ (ppm) = -127.0 (s, 2F)

MS-ESI $^+$: m/z calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{BrF}_2\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 355.99; found: 356.96.

6.4.57 2,6-difluorophenyl 4-(bromomethyl)-2-methoxybenzoate



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|---------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Benzoate 163 | 278.08 | 1.00 | 1.48 | 5.32 | - | - |
| NBS | 177.99 | 1.10 | 1.04 | 5.85 | - | - |
| DBPO | 242.23 | 0.01 | 0.01 | 0.05 | - | - |

Benzoate **163** (1.48 g, 5.32 mmol, 1.00 eq), NBS (1.04 g, 5.85 mmol, 1.10 eq) and DBPO (0.01 g, 0.05 mmol, 1mol%) were dissolved in CCl_4 (5.00 mL) and the mixture was left stirring for 4 h at 80°C . The reaction was quenched by addition of H_2O and the aqueous layer was extracted with DCM. The combined organic layer were washed with H_2O , brine, dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica using cyclohexane/EtOAc (15/1) giving bromide **123** (1.70 g, 4.76 mmol, 90%) as a white solid.

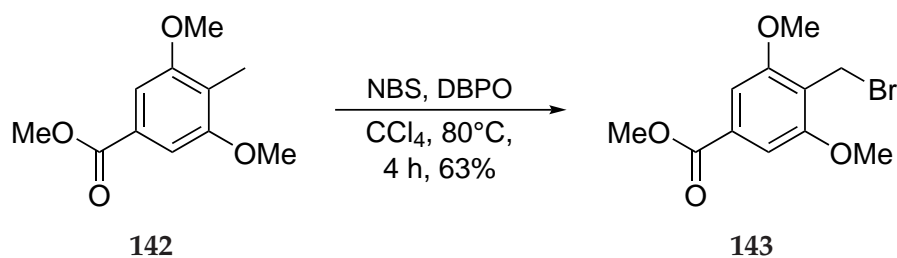
$^1\text{H-NMR}$: 500 MHz, CDCl_3 ; δ (ppm) = 8.08 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.20 (m, 1H), 7.08 (dd, $J = 7.9$, 1.5 Hz, 1H), 7.06 (d, $J = 1.3$ Hz, 1H), 7.00 (m, 2H), 4.49 (s, 2H), 3.97 (s, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$: 101 MHz, CDCl_3 ; δ (ppm) = 161.6, 160.7, 156.7 (d, $J = 4.2$ Hz), 154.7 (d, $J = 4.0$ Hz), 145.1, 133.4, 127.5 (t, $J = 16.0$ Hz), 126.4 (t, $J = 9.0$ Hz), 120.9, 117.2, 112.9, 112.2 (dd, $J = 18.0$, 4.6 Hz), 56.3, 32.3.

$^{19}\text{F-NMR}$: 471 MHz, CDCl_3 ; δ (ppm) = -125.7 (s, 2F)

MS-ESI $^+$: m/z calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{BrF}_2\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 355.99; found: 357.02.

6.4.58 methyl 4-(bromomethyl)-3,5-dimethoxybenzoate



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|---------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Benzoate 142 | 210.23 | 1.00 | 1.43 | 6.77 | - | - |
| NBS | 177.99 | 1.10 | 1.33 | 7.45 | - | - |
| DBPO | 242.23 | 0.01 | 0.02 | 0.07 | - | - |

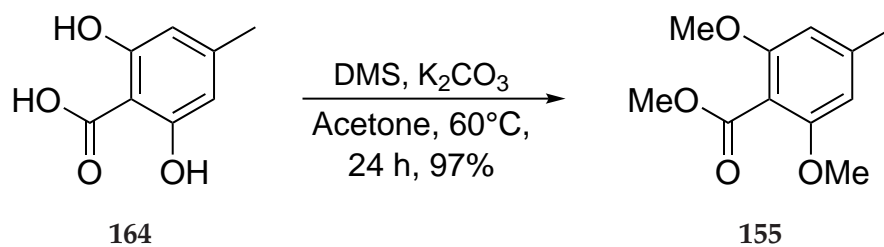
Benzoate **142** (1.43 g, 6.77 mmol, 1.00 eq), NBS (1.33 g, 7.45 mmol, 1.10 eq) and DBPO (0.02 g, 0.07 mmol, 1mol%) were dissolved in CCl_4 (7.00 mL) and the mixture was left stirring for 4 h at 80°C . The reaction was quenched by addition of H_2O and the aqueous layer was extracted with DCM. The combined organic layer were washed with H_2O , brine, dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica using cyclohexane/EtOAc (50/1) giving bromide **143** (1.23 g, 4.25 mmol, 63%) as a white solid.

$^1\text{H-NMR}$: 400 MHz, CDCl_3 ; δ (ppm) = 7.22 (s, 2H), 4.64 (s, 2H), 3.94 (s, 6H), 3.92 (s, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$: 101 MHz, CDCl_3 ; δ (ppm) = 166.8, 158.3, 131.6, 119.4, 105.0, 56.3, 52.5, 22.4.

MS-ESI $^+$: m/z calcd. for $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{BrO}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 288.00; found: 289.15.

6.4.59 methyl 2,6-dimethoxy-4-methylbenzoate



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|--------------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Benzoic acid 164 | 168.15 | 1.00 | 2.23 | 13.3 | - | - |
| DMS | 126.13 | 4.00 | - | 53.1 | 5.04 | 1.33 |
| K ₂ CO ₃ | 138.20 | 4.00 | 7.34 | 53.1 | - | - |

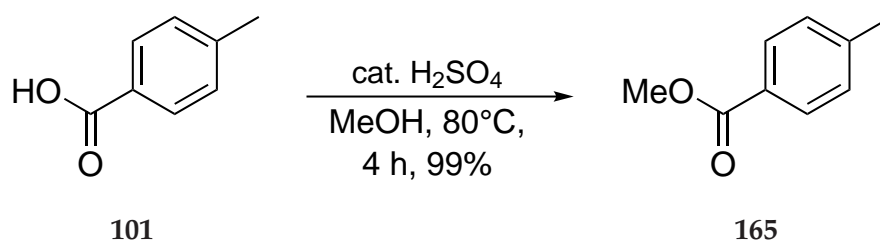
A solution of benzoic acid **164** (2.23 g, 13.3 mmol, 1.00 eq) and K₂CO₃ (7.34 g, 53.1 mmol, 4.00 eq) in acetone (30.0 mL) was treated with DMS (5.04 mL, 53.1 mmol, 4.00 eq). The mixture was left stirring for 4 h at 60 °C. The precipitation was filtered off and washed with acetone. The organic layer was concentrated *in vacuo* and the residue was dissolved in acetone. The crude was washed with NaHCO₃ and the aqueous layer was extracted with EtOAc. The combined organic layer were washed with H₂O, brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica using cyclohexane/EtOAc (10/1) giving benzoate **155** (2.71 g, 12.9 mmol, 97%) as a white solid.

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 6.37 (s, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.80 (s, 6H), 2.34 (s, 3H).

¹³C-NMR: 101 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 167.4, 157.3, 141.9, 110.3, 104.8, 56.1, 52.5, 22.5.

MS-ESI⁺: m/z calcd. for C₁₁H₁₄O₄ [M+H]⁺: 210.09; found: 211.04.

6.4.60 methyl 4-methylbenzoate



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|-------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Benzoic acid 101 | 136.15 | 1.00 | 5.01 | 36.8 | - | - |

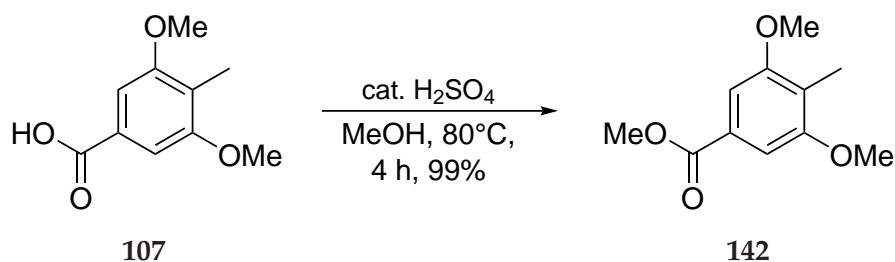
A solution of benzoic acid **101** (5.01 g, 36.8 mmol, 1.00 eq) in MeOH (40.0 mL) was treated with a catalytic amount of H₂SO₄ and left stirring for 4 h at 80 °C. The crude was washed with NaHCO₃ and the aqueous layer was extracted with EtOAc. The combined organic layer were washed with H₂O, brine, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo* giving benzoate **165** (5.49 g, 36.6 mmol, 99%) as a white solid.

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 7.93 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.23 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 3.90 (s, 3H), 2.41 (s, 3H).

¹³C-NMR: 101 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 167.3, 143.7, 129.7, 129.2, 127.5, 52.1, 21.8.

MS-ESI⁺: *m/z* calcd. for C₉H₁₀O₂ [M+H]⁺: 150.07; found: 151.03.

6.4.61 methyl 3,5-dimethoxy-4-methylbenzoate



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|-------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Benzoic acid 107 | 196.20 | 1.00 | 1.42 | 7.23 | - | - |

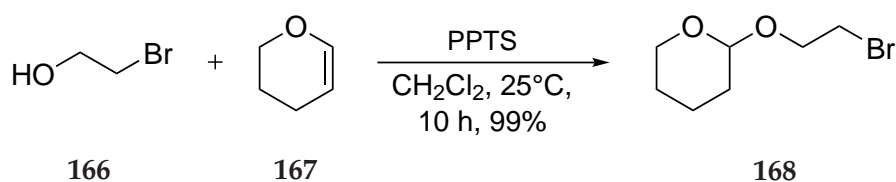
A solution of benzoic acid **107** (1.42 g, 7.23 mmol, 1.00 eq) in MeOH (7.00 mL) was treated with a catalytic amount of H₂SO₄ and left stirring for 4 h at 80 °C. The crude was washed with NaHCO₃ and the aqueous layer was extracted with EtOAc. The combined organic layer were washed with H₂O, brine, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo* giving benzoate **142** (1.51 g, 7.20 mmol, 99%) as a white solid.

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 7.22 (s, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.87 (s, 6H), 2.13 (s, 3H).

¹³C-NMR: 101 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 167.4, 158.2, 128.3, 120.4, 104.8, 56.0, 52.3, 8.8.

MS-ESI⁺: *m/z* calcd. for C₁₁H₁₄O₄ [M+H]⁺: 210.09; found: 211.09.

6.4.62 2-(2-bromoethoxy)tetrahydro-2H-pyran



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|-------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Bromoethanol 166 | 124.97 | 1.00 | - | 7.84 | 0.56 | 1.76 |
| Pyrane 167 | 84.12 | 1.50 | - | 11.8 | 1.06 | 0.93 |
| PPTS | 148.99 | 0.10 | 0.12 | 0.78 | - | - |

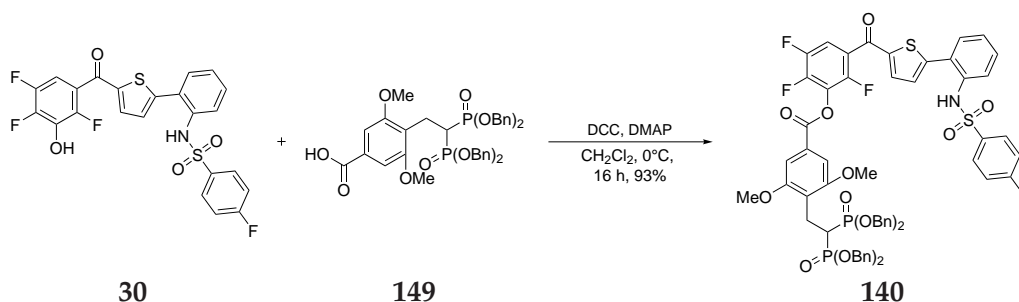
A solution of Dihydropyran **167** (1.06 mL, 11.8 mmol, 1.50 eq) in DCM (19.0 mL) was treated with PPTS (0.12 g, 0.78 mmol, 10mol%) and left stirring at rt. After 15 min. Bromoethanol **166** (0.56 mL, 7.84 mmol, 1.00 eq) and the mixture was left stirring for 10 h at rt. The solvent was removed *in vacuo* and the crude was dissolved in EtOAc, washed with NaHCO₃ brine, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo* giving pyrane **168** (1.63 g, 7.80 mmol, 99%) as colourless liquid.

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 4.67 (m, 1H), 4.01 (dt, $J = 11.3, 6.2$ Hz, 1H), 3.89 (ddd, $J = 11.4, 8.4, 3.4$ Hz, 1H), 3.77 (dt, $J = 11.3, 6.4$ Hz, 3H), 3.50 (m, 3H), 1.64 (m, 7H).

¹³C-NMR: 101 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 99.1, 67.7, 62.4, 31.0, 30.6, 25.5, 19.4.

MS-ESI⁺: m/z calcd. for C₇H₁₃BrO₂ [M+H]⁺: 208.01; found: 209.15.

6.4.63 2,3,6-trifluoro-5-(5-(2-((4-fluorophenyl)sulfonamido)phenyl)thiophene-2-carbonyl)phenyl
4-(2,2-bis(benzyloxy)phosphoryl)ethyl)-3,5-dimethoxybenzoate



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|-------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Benzoic acid 149 | 730.69 | 1.00 | 6.00 | 8.21 | - | - |
| Phenol 30 | 507.47 | 1.10 | 4.58 | 9.03 | - | - |
| DCC | 206.33 | 1.50 | 2.54 | 12.3 | - | - |
| DMAP | 122.17 | 0.20 | 0.20 | 1.64 | - | - |

DCC (2.54 g, 12.3 mmol, 1.50 eq) and DMAP (0.20 g, 1.64 mmol, 0.20 eq) were added to a solution of benzoic acid **149** (6.00 g, 8.21 mmol, 1.00 eq) and phenol **30** (4.58 g, 9.03 mmol, 1.10 eq) in CH_2Cl_2 (100 mL) and the mixture was left stirring for 16 h. The suspension was filtered and the filtrate was concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by flash column chromatography cyclohexane/EtOAc (50/1) to obtain benzoate **140** (10.0 g, 8.20 mmol, 99%) as a yellow solid.

¹H-NMR: 400 MHz, DMSO- d_6 ; δ (ppm) = 10.09 (s, 1H), 7.97 (q, J = 8.7 Hz, 1H), 7.74 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.68 (m, 3H), 7.61 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 7.29 (m, 29H), 6.83 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 4.97 (m, 8H), 3.72 (s, 6H).

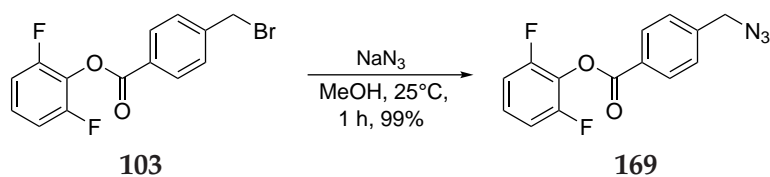
¹³C-NMR: 126 MHz, DMSO- d_6 ; δ (ppm) = 181.2, 170.4, 165.4, 163.4, 162.4, 158.2, 150.9, 149.2, 147.4 (dd, J = 10.9 Hz, 2.6), 147.2, 146.0 (dd, J = 16.1, 3.7 Hz), 145.4 (d, J = 10.2 Hz), 143.9 (dd, J = 15.8, 4.1 Hz), 141.9, 137.2, 136.4 (m), 132.9, 132.1 (d, J = 10.5 Hz), 131.6, 130.2, 130.0, 129.9, 129.8, 128.8, 128.3 (d, J = 2.5 Hz), 128.2, 128.1 (d, J = 2.8 Hz), 127.7, 127.7, 127.6, 125.6, 122.6 (dt, J = 15.8, 5.4, 4.1 Hz), 122.2 (t, J = 8.4 Hz), 116.9, 116.7, 116.5, 116.3, 115.0 (d, J = 20.3 Hz), 105.5, 67.3 (d, J = 5.8 Hz), 67.1 (d, J = 6.5 Hz), 59.8, 56.0, 34.7 (t, J = 130.6 Hz), 19.7.

¹⁹F-NMR: 470 MHz, DMSO- d_6 ; δ (ppm) = -106.1 (s, 1F), -131.1 (s, 1F), -138.7 (m, 1F), -143.5 (s, 1F).

³¹P-NMR: 202 MHz, DMSO- d_6 ; δ (ppm) = 23.4 (s, 2P).

MS-ESI⁺: m/z calcd. for $\text{C}_{62}\text{H}_{51}\text{F}_4\text{NO}_{13}\text{P}_2\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1219.22; found: 1220.18.

6.4.64 2,6-difluorophenyl 4-(azidomethyl)benzoate



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|--------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Bromide 103 | 327.12 | 1.00 | 0.54 | 1.67 | - | - |
| NaN ₃ | 65.01 | 2.00 | 0.22 | 3.33 | - | - |

NaN₃ (0.22 g, 3.33 mmol, 2.00 eq) was added to a solution of bromide **103** (0.54 g, 1.67 mmol, 1.00 eq) in MeOH (9.00 mL) and was left stirring for 24 h at rt. The resulted suspension was diluted with EtOAc and washed with H₂O. The aqueous layer was extracted with EtOAc and the combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash column chromatography on silica using cyclohexane/EtOAc (15/1) giving azide **169** (0.48 g, 1.64 mmol, 99%) as a white solid.

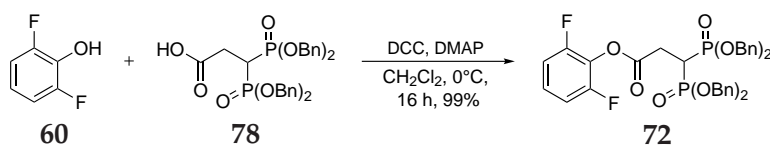
¹H-NMR: 400 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 8.17 (d, *J* = 8.0, 2H), 7.60 (d, *J* = 7.9, 2H), 7.41 (t, m, 1H), 7.31 (m, 2H), 4.62 (s, 2H).

¹³C-NMR: 101 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = 163.2, 156.4 (d, *J* = 4.0 Hz), 153.9 (d, *J* = 4.0 Hz), 143.6, 131.2, 128.3, 126.6 (t, *J* = 9.1 Hz), 112.2 (d, *J* = 4.8 Hz), 112.3 (d, *J* = 4.9 Hz), 53.44.

¹⁹F-NMR: 376 MHz, DMSO-d₆; δ (ppm) = -125.9 (s, 2F).

MS-ESI⁺: *m/z* calcd. for C₁₄H₉F₂N₃O₂ [M+H]⁺: 289.07; found: 290.13.

6.4.65 2,6-difluorophenyl 3,3-bis(bis(benzyloxy)phosphoryl)propanoate



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|-----------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Phosphonate 78 | 594.54 | 1.00 | 0.91 | 1.53 | - | - |
| 2,6-dfp 60 | 130.09 | 1.10 | 0.22 | 1.68 | - | - |
| DCC | 206.33 | 1.50 | 0.47 | 2.29 | - | - |
| DMAP | 122.17 | 0.20 | 0.04 | 0.31 | - | - |

DCC (0.47 g, 2.29 mmol, 1.50 eq) and DMAP (0.04 g, 0.31 mmol, 0.20 eq) were added to a solution of phosphonate **78** (0.91 g, 1.53 mmol, 1.00 eq) and 2,6-dfp **60** (0.22 g, 1.68 mmol, 1.10 eq) in CH₂Cl₂ (40.0 mL) and the mixture was left stirring for 16 h. The suspension was filtered and the filtrate was concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by flash column chromatography cyclohexane/EtOAc (50/1) to obtain benzoate **72** (1.07 g, 1.51 mmol, 99%) as a white solid.

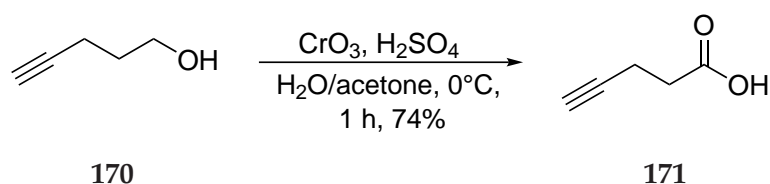
¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 8.12 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.33 (d, *J* = 8.0 Hz, 3H), 7.20 (m, 1H), 7.02 (m, 3H), 2.46 (s, 3H).

¹³C-NMR: 101 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 163.5, 156.9 (d, *J* = 3.9 Hz), 154.4 (d, *J* = 3.9 Hz), 145.2, 130.8, 129.6, 127.7 (t, *J* = 15.8 Hz), 126.4 (t, *J* = 9.1 Hz), 125.4, 112.3 (d, *J* = 4.8 Hz), 112.2 (d, *J* = 4.9 Hz), 22.0.

¹⁹F-NMR: 376 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = -125.9 (s, 2F)

MS-ESI⁺: *m/z* calcd. for C₁₄H₁₀F₂O₂ [M+H]⁺: 248.06; found: 249.14.

6.4.66 pent-4-ynoic acid



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|--|--|------|-------|----------|--------|--|
| Pentynol 170 | 84.12 | 1.00 | - | 53.7 | 5.00 | 0.904 |
| CrO ₂ | 83.99 | 2.40 | 10.8 | 129 | - | - |
| H ₂ SO ₄ , w = 97% | 98.08 | 3.80 | - | 204 | 10.9 | 1.84 |

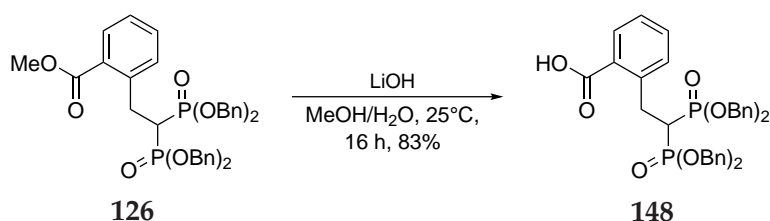
CrO₂ (10.8 g, 129 mmol, 2.40 eq) was premixed in H₂SO₄ (10.9 mL, 204 mmol, 3.80 eq) H₂O (32.0 mL) was cooled to 0 °C followed by slow addition of the previous created mixture. Pentynol (5.00 mL, 53.7 mmol, 1.00 eq) was soluted in acetone (540 mL) and cooled to 0 °C. Under vigorously stirring, the JONES reagent was added until the mixture became orange. The mixture was allowed to warm up to rt by followed addition of the JONES reagent. The mixture was diluted with H₂O und extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash column chromatography on silica using cyclohexane/EtOAc (7/1) giving acid **171** (3.90 g, 39.7 mmol, 74%) as a colourless solid.

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 12.23 (s, 1H), 2.75 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 2.38 (m, 4H)

¹³C-NMR: 101 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 178.2, 82.2, 69.4, 33.2, 14.1.

MS-ESI⁻: *m/z* calcd. for C₅H₆O₂ [M-H]⁻: 98.04; found: 97.01.

6.4.67 2-(2,2-bis(benzyloxy)phosphoryl)ethyl)benzoic acid



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|-----------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Phosphonate 64 | 536.50 | 1.00 | 26.7 | 49.7 | - | - |
| Benzoate 143 | 229.07 | 1.50 | 22.2 | 74.6 | - | - |
| NaH, 57% in min. oil | 23.99 | 1.30 | 2.72 | 64.6 | - | - |

Under argon atmosphere, phosphonate **64** (26.7 g, 49.7 mmol, 1.00 eq) was dissolved in anhydrous THF (200 mL) and the solution was cooled to 0 °C. Sodium hydride (2.72 g, 64.6 mmol, 1.30 eq) was added to the solution and the mixture was left stirring for 30 min. The solution was allowed to warm up to rt and it was left stirring for 1 h. The suspension was cooled to 0 °C and a solution of benzoate **143** (22.2 g, 74.6 mmol, 1.50 eq) in THF (200 mL) was added dropwise. The mixture was left stirring over night and the reaction was quenched by adding H₂O at 0 °C the next day. The mixture was diluted with EtOAc and washed with H₂O. The aqueous layer was extracted with EtOAc and the combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash column chromatography on silica using cyclohexane/EtOAc (1/1) giving phosphonate **130** (24.9 g, 33.4 mmol, 67%) as a pale viscous oil.

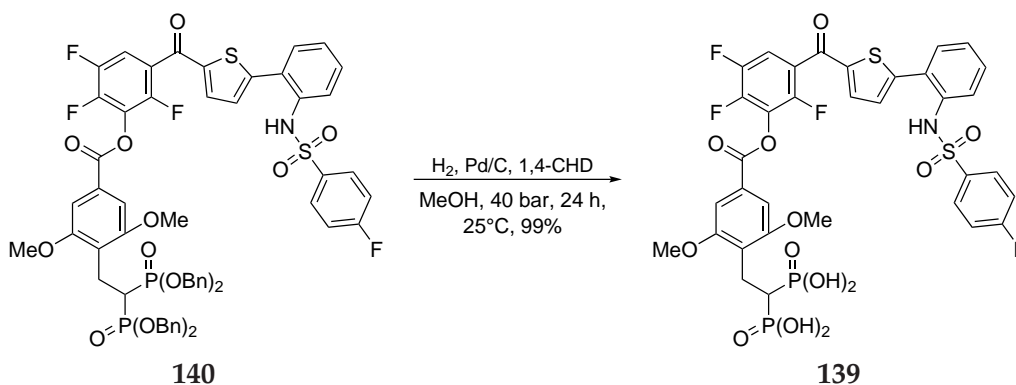
¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 7.93 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.24 (m, 24H), 5.00 (m, 4H), 4.88 (m, 2H), 4.78 (m, 2H), 3.72 (m, 3H).

¹³C-NMR: 101 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 169.6, 139.6 (t, J = 10.1 Hz), 136.1 (d, J = 6.8 Hz), 136.0 (d, J = 6.6 Hz), 132.7, 131.9, 131.5, 130.3, 128.4 (m), 127.2, 68.4 (d, J = 6.4 Hz), 68.0 (d, J = 6.5 Hz), 38.2 (t, J = 131.4 Hz), 31.1.

³¹P-NMR: 162 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 24.6 (s, 2P).

MS-ESI⁺: m/z calcd. for C₃₇H₃₆O₈P₂ [M+H]⁺: 670.19; found: 671.35.

6.4.68 (2-(2,6-dimethoxy-4-((2,3,6-trifluoro-5-(5-(2-((4-fluorophenyl)sulfonamido)phenyl)thiophene-2-carbonyl)phenoxy)carbonyl)phenyl)ethane-1,1-diyl)bis(phosphonic acid)



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Phosphonate 140 | 1220.15 | 1.00 | 10.3 | 8.44 | - | - |
| Pd on C, 10 wt. % | 106.42 | 0.20 | 1.80 | 1.69 | - | - |
| 1,4-CHD | 80.12 | 5.00 | - | 42.2 | 3.99 | 0.847 |

An autoclave was filled with phosphonate **140** (10.3 g, 8.44 mmol, 1.00 eq), Palladium on carbon (1.80 g, 1.69 mmol, 20mol%), 1,4-CHD (3.99 mL, 42.2 mmol, 5.00 eq) and MeOH (50.0 mL). The system was closed and flushed several times with hydrogen. After flushing, the autoclave was charged with 40 bar of hydrogen and the mixture was left stirring for 24 h at rt. The suspension was filtered and concentrated *in vacuo* giving bisphosphonic acid **139** (7.16 g, 8.33 mmol, 99%) as a white solid.

¹H-NMR: 500 MHz, DMSO-*d*₆; δ (ppm) = 10.08 (s, 1H), 8.28 (s, 4H), 7.97 (ddd, *J* = 9.9, 8.3, 5.7 Hz, 1H), 7.74 (dd, *J* = 7.8, 1.6 Hz, 1H), 7.68 (m, 3H), 7.60 (d, *J* = 4.1, 1H), 7.36 (m, 6H), 6.81 (dd, *J* = 7.8, 1.4 Hz, 1H), 3.87 (s, 6H), 3.18 (ddd, *J* = 21.0, 14.2, 7.0 Hz, 2H), 2.69 (tt, *J* = 22.2, 7.2 Hz, 1H).

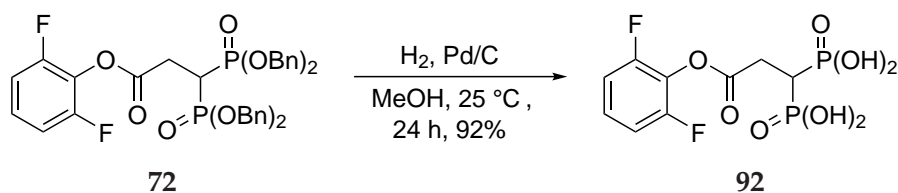
¹³C-NMR: 126 MHz, DMSO-*d*₆; δ (ppm) = 206.6, 181.2, 165.4, 163.4, 162.6, 158.5, 147.4 (m), 146.4 (ddd, *J* = 247.0, 11.1, 2.3 Hz), 144.9 (ddd, *J* = 255.7, 15.6, 3.3 Hz), 141.9, 137.2, 136.5 (d, *J* = 3.2 Hz), 132.9, 131.6, 130.2, 130.0, 129.9 (d, *J* = 9.4 Hz), 128.7 (d, *J* = 9.9 Hz), 128.2, 125.0, 124.3 (t, *J* = 8.4 Hz), 122.6 (dt, *J* = 16.0, 4.7 Hz), 116.4 (d, *J* = 22.9 Hz), 115.0 (d, *J* = 20.4 Hz), 105.5, 56.2, 36.7 (t, *J* = 125.1 Hz), 30.7.

¹⁹F-NMR: 470 MHz, DMSO-*d*₆; δ (ppm) = -106.1 (s, 1F), -131.3 (m, 1F), -138.8 (m, 1F), -143.5 (m, 1F).

³¹P-NMR: 202 MHz, DMSO-*d*₆; δ (ppm) = 21.1 (s, 2P)

MS-ESI⁺: *m/z* calcd. for C₃₄H₂₇F₄NO₁₃P₂S₂ [M+H]⁺: 859.03; found: 860.09.

6.4.69 (3-(2,6-difluorophenoxy)-3-oxopropane-1,1-diyl)bis(phosphonic acid)



| | M $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$ | eq | m [g] | n [mmol] | V [mL] | $\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$ |
|------------------------|--|------|-------|----------|--------|--|
| Phosphonate 134 | 706.17 | 1.00 | 0.20 | 0.28 | - | - |
| Pd on C, 10 wt. % | 106.42 | 0.10 | 0.03 | 0.03 | - | - |

A flask was flushed three times with argon and phosphonate **72** (0.20 g, 0.28 mmol, 1.00 eq) was soluted in MeOH (1.0 mL). Palladium on carbon (0.03 g, 0.03 mmol, 10mol%) was added and the mixture was left stirring for 24 h at rt. The suspension was filtered and concentrated *in vacuo* giving bisphosphonic acid **92** (0.09 g, 0.26 mmol, 92%) as a white solid.

¹H-NMR: 400 MHz, D₂O; δ (ppm) = 6.91 (m, 2H), 6.81 (m, 1H), 3.27 (s, 2H), 2.82 (s, 1H).

¹³C-NMR: 101 MHz, D₂O; δ (ppm) = 174.2 (t, J = 9.8 Hz), 153.6 (d, J = 5.8 Hz), 151.2 (d, J = 6.0 Hz), 119.4 (t, J = 8.8 Hz), 111.8 (d, J = 6.9 Hz), 111.6 (d, J = 6.7 Hz), 34.7 (t, J = 127.8 Hz), 30.8 (t, J = 3.1 Hz).

¹⁹F-NMR: 376 MHz, D₂O; δ (ppm) = -134.5 (s, 2F)

³¹P-NMR: 162 MHz, D₂O; δ (ppm) = 20.3 (s, 2P).

MS-ESI⁺: m/z calcd. for C₉H₁₀F₂O₈P₂ [M+H]⁺: 345.98; found: 347.09.

7 Literaturverzeichnis

- [1] F. Leidenberger, T. Strowitzki, O. Ortmann, *Klinische Endokrinologie für Frauenärzte*, Springer Medizin, Heidelberg, **2009**.
- [2] S. Nussey, S. Whitehead, *Endocrinology : an integrated approach*, Bios NCBI, Oxford, UK Bethesda, Md, **2001**.
- [3] F. Labrie, V. Luu-The, S.-X. Lin, J. Simard, C. Labrie, *Trends Endocrinol. Metab.* **2000**, *11*, 421–427.
- [4] M. C. Carr, *J Clin Endocrinol Metab.* **2003**, *88*, 2404–2411.
- [5] M. N. Weitzmann, R. Pacifici, *J. Clin. Invest.* **2006**, *116*, 1186–1194.
- [6] B. Husen, K. Huhtinen, M. Poutanen, L. Kangas, J. Messinger, H. Thole, *Mol Cell Endocrinol* **2006**, *248*, 109–113.
- [7] D. Poirier, *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 453–477.
- [8] T. M. Penning, *Endocr Rev* **1997**, *18*, 281–305.
- [9] F. Labrie, *Mol. Cell. Endocrinol.* **1991**, *78*, C113–C118.
- [10] E. M. Gargano, Diss., Universität des Saarlandes, **2015**.
- [11] P. Lukacik, K. L. Kavanagh, U. Oppermann, *Mol. Cell. Endocrinol.* **2006**, *248*, 61–71.
- [12] G. Möller, J. Adamski, *Mol. Cell. Endocrinol.* **2009**, *301*, 7–19.
- [13] M. Meier, G. Möller, J. Adamski, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2009**, *1155*, 15–24.
- [14] O. Mäentausta, R. Sormunen, V. Isomaa, V. P. Lehto, P. Jouppila, R. Vihko, *Lab. Investig.* **1991**, *65*, 582–587.
- [15] T. Puranen, M. Poutanen, D. Ghosh, P. Vihko, R. Vihko, *Mol. Endocrinol.* **1997**, *11*, 77–86.
- [16] M. Dumont, V. Luu-The, Y. de Launoit, F. Labrie, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1992**, *41*, 605–608.
- [17] S. A. Ghersevich, M. H. Poutanen, H. K. Martikainen, R. K. Vihko, *J. Endocrinol.* **1994**, *143*, 139–150.
- [18] V. Luu-The, C. Labrie, J. Simard, Y. Lachance, H.-F. Zhao, J. Couët, G. Leblanc, F. Labrie, *Mol. Endocrinol.* **1990**, *4*, 268–275.
- [19] L. Wu, M. Einstein, W. Geissler, K. Chan, K. Elliston, S. Andersson, *J Biol Chem.* **1993**, *268*, 12964–12969.
- [20] T. Suzuki, H. Sasano, S. Andersson, J. I. Mason, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2000**, 3669–3672.

-
- [21] M. L. Casey, P. C. MacDonald, S. Andersson, *J. Clin. Invest.* **1994**, *94*, 2135–2141.
- [22] M. M. Miettinen, M. V. J. Mustonen, M. H. Poutanen, V. V. Isomaa, R. K. Vihko, *Biochemical Journal* **1996**, *314*, 839–845.
- [23] R Mindnich, F Haller, F Halbach, G Möller, M. H. de Angelis, J Adamski, *J. Mol. Endocrinol.* **2005**, *35*, 305–316.
- [24] W. M. Geissler, D. L. Davis, L. Wu, K. D. Bradshaw, S. Patel, B. B. Mendonca, K. O. Elliston, J. D. Wilson, D. W. Russell, S. Andersson, *Nat. Genet.* **1994**, *7*, 34–39.
- [25] U. Hoppe, P. M. Holterhus, L. Wünsch, D. Jocham, T. Drechsler, S. Thiele, C. Marschke, O. Hiort, *J. Mol. Med.* **2006**, *84*, 651–659.
- [26] M. Markus, B. Husen, F. Leenders, P. W. Jungblut, P. F. Hall, J. Adamski, *Eur. J. Cell Biol* **1995**, *68*, 263–267.
- [27] E. G. van Grunsven, P. A. W. Mooijer, P. Aubourg, R. J. A. Wanders, *Hum. Mol. Genet.* **1999**, *8*, 1509–1516.
- [28] J Adamski, B Husen, F Marks, P. W. Jungblut, *Biochem. J.* **1992**, *288*, 375–381.
- [29] J Adamski, T Normand, F Leenders, D Monté, A Begue, D Stéhelin, P. W. Jungblut, Y de Launoit, *Biochem. J.* **1995**, *311*, 437–443.
- [30] K. M. Fung, E. N. S. Samara, C Wong, A Metwalli, R Krlin, B Bane, C. Z. Liu, J. T. Yang, J. V. Pitha, D. J. Culkun, B. P. Kropp, T. M. Penning, H. K. Lin, *Endocr.-Relat. Cancer* **2006**, 169–180.
- [31] T. M. Penning, M. E. Burcynski, J. M. Jez, C. F. Hung, H. K. Lin, H. Ma, M. Moore, N. Palackal, K. Ratnam, *Biochem. J.* **2000**, *351*, 67.
- [32] O. V. Belyaeva, S. V. Chetyrkin, A. L. Clark, N. V. Kostereva, K. S. SantaCruz, B. M. Chronwall, N. Y. Kedishvili, *Endocrinology* **2007**, *148*, 2148–2156.
- [33] M. Quinkler, B. Sinha, J. W. Tomlinson, I. J. Bujalska, P. M. Stewart, W. Arlt, *J. Endocrinol.* **2004**, *183*, 331–342.
- [34] Z. Marijanovic, D. Laubner, G. Möller, C. Gege, B. Husen, J. Adamski, R. Breitling, *Mol. Endocrinol.* **2003**, *17*, 1715–1725.
- [35] S. Törn, P. Nokelainen, R. Kurkela, A. Pulkka, M. Menjivar, S. Ghosh, M. Coca-Prados, H. Peltoketo, V. Isomaa, P. Vihko, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *305*, 37–45.
- [36] A. Krazeisen, R. Breitling, K. Imai, S. Fritz, G. Möller, J. Adamski, *FEBS Letters* **1999**, *460*, 373–379.
- [37] S. M. MacKenzie, S. S. Huda, N. Sattar, R. Fraser, J. M. C. Connell, E. Davies, *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* **2008**, *69*, 848–854.

-
- [38] S. Ohno, K. Nishikawa, Y. Honda, S. Nakajin, *Mol. Cell. Biochem.* **2007**, 309, 209–215.
- [39] X. Y. He, G. Merz, P. Mehta, H. Schulz, S. Y. Yang, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 15014–15019.
- [40] R. Ofman, P. J. Ruiter, M. Feenstra, M. Duran, T. B. Poll-The, J. Zschocke, R. Ensenauer, W. Lehnert, J. O. Sass, W. Sperl, J. R. Wanders, *Am. J. Hum. Genet.* **2003**, 72, 1300–1307.
- [41] N. Shafqat, H.-U. Marschall, C. Filling, E. Nordling, X.-Q. Wu, L. Björk, J. Thyberg, E. Mårtensson, S. Salim, H. Jörnvall, U. Oppermann, *Biochem. J.* **2003**, 376, 49–60.
- [42] X.-Y. He, G. Merz, Y.-Z. Yang, R. Pullakart, P. Mehta, H. Schulz, S.-Y. Yang, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Biol. Lipids* **2000**, 1484, 267–277.
- [43] X.-Y. He, G. Merz, Y.-Z. Yang, P. Mehta, H. Schulz, S.-Y. Yang, *Eur. J. Biochem.* **2001**, 268, 4899–4907.
- [44] Y. Yokoi, Y. Horiguchi, M. Araki, K. Motojima, *FEBS Journal* **2007**, 274, 4837–4847.
- [45] R. Breton, D. Housset, C. Mazza, J. C. Fontecilla-Camps, *Structure* **1996**, 4, 905–915.
- [46] K. X. Z. Li, R. E. Smith, Z. S. Krozowski, *Endocr. Res.* **1998**, 24, 663–667.
- [47] Z. Chai, P. Brereton, T. Suzuki, H. Sasano, V. Obeyesekere, G. Escher, R. Saffery, P. Fuller, C. Enriquez, Z. Krozowski, *Endocrinology* **2003**, 144, 2084–2091.
- [48] Y. A. Moon, J. D. Horton, *J. Biol. Chem.* **2002**, 278, 7335–7343.
- [49] E. V. Entchev, D. Schwudke, V. Zagoriy, V. Matyash, A. Bogdanova, B. Habermann, L. Zhu, A. Shevchenko, T. V. Kurzchalia, *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 17550–17560.
- [50] V. Luu-The, P. Tremblay, F. Labrie, *Mol. Endocrinol.* **2006**, 20, 437–443.
- [51] P.-G. Blanchard, V. Luu-The, *J. Endocrinol.* **2007**, 194, 449–455.
- [52] N. Sakurai, Y. Miki, T. Suzuki, K. Watanabe, T. Narita, K. Ando, C. Y. Tetsu M, D. Aoki, H. Sasano, H. Handa, *J. Steroid. Biochem.* **2006**, 99, 174–181.
- [53] Y. Horiguchi, M. Araki, K. Motojima, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, 370, 235–238.
- [54] S. Liu, C. Huang, D. Li, W. Ren, H. Zhang, M. Qi, X. Li, L. Yu, *Acta Biochim. Pol.* **2007**, 54, 213–218.
- [55] P. Lukacik, B. Keller, G. Bunkoczi, K. Kavanagh, W. H. Lee, J. Adamski, U. Oppermann, *Biochem. J.* **2007**, 402, 419–427.
- [56] A. K. Jansson, C. Gunnarsson, M. Cohen, T. Sivik, O. Stal, *Cancer Res.* **2006**, 66, 11471–11477.
- [57] S. Marchais-Oberwinkler, C. Henn, G. Möller, T. Klein, M. Negri, A. Oster, A. Spadaro, R. Werth, M. Wetzels, K. Xu, M. Frotscher, R. W. Hartmann, J. Adamski, *J. Steroid Biochem. Mol.* **2011**, 125, 66–82.

- [58] V. Luu-The, *J. Steroid Biochem Mol Biol* **2001**, *76*, 143–151.
- [59] A. K. Agarwal, R. J. Auchus, *Endocrinology* **2005**, *146*, 2531–2538.
- [60] D. P. Sherbet, M. Papari-Zareei, N. Khan, K. K. Sharma, A. Brandmaier, S. Rambally, A. Chattopadhyay, S. Andersson, A. K. Agarwal, R. J. Auchus, *Mol. Cell. Endocrinol.* **2007**, *265-266*, 83–88.
- [61] J.-Z. Jin, S.-X. Lin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *259*, 489–493.
- [62] D. P. Sherbet, O. L. Guryev, M. Papari-Zareei, D. Mizrachi, S. Rambally, S. Akbar, R. J. Auchus, *Endocrinology* **2009**, *150*, 4154–4162.
- [63] Y.-W. Huang, I. Pineau, H.-J. Chang, A. Azzi, V. Bellemare, S. Laberge, S.-X. Lin, *Mol. Endocrinol.* **2001**, *15*, 2010–2020.
- [64] C. P. Sager, S. Weber, M. Negri, P. Banachowicz, G. Möller, J. Adamski, R. W. Hartmann, S. Marchais-Oberwinkler, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2021**, *206*, 105790.
- [65] Z. Chen, I. Tsigelny, W. R. Lee, M. E. Baker, S. H. Chang, *FEBS Letters* **1994**, *356*, 81–85.
- [66] N. S. Scrutton, A. Berry, R. N. Perham, *Nature* **1990**, *343*, 38–43.
- [67] D. Ghosh, P. Vihko, *Chem. Biol. Interact.* **2001**, *130-132*, 637–650.
- [68] T. J. Puranen, M. H. Poutanen, H. E. Peltoketo, P. T. Vihko, R. K. Vihko, *Biochem. J.* **1994**, *304*, 289–293.
- [69] D. Ghosh, V. Z. Pletnev, D.-W. Zhu, Z. Wawrzak, W. L. Duax, W. Pangborn, F. Labrie, S.-X. Lin, *Structure* **1995**, *3*, 503–513.
- [70] M. Negri, M. Recanatini, R. W. Hartmann, *PLoS ONE* **2010**, *5*, (Hrsg.: F. Romesberg), e12026.
- [71] Y. Dong, Q. Q. Qiu, J. Debear, W. F. Lathrop, D. R. Bertolini, P. P. Tamburini, *J. Bone Miner. Res.* **1998**, *13*, 1539–1546.
- [72] M. Feix, L. Wolf, H.-U. Schweikert, *Mol. Cell. Endocrinol.* **2001**, *171*, 163–164.
- [73] J. Janssen, R. Bland, M. Hewison, M. Coughtrie, S. Sharp, J. Arts, H. Pols, J. van Leeuwen, *J. Cell. Biochem.* **1999**, *75*, 528–537.
- [74] B. van der Eerden, C. Lowik, J. Wit, M Karperien, *J. Endocrinol.* **2004**, *180*, 457–467.
- [75] C. H. Blomquist, N. J. Lindemann, E. Y. Hakanson, *Arch. Biochem. Biophys.* **1985**, *239*, 206–215.
- [76] M.-L. Lu, Y.-W. Huang, S.-X. Lin, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 22123–22130.
- [77] W. L. Duax, J Thomas, V Pletnev, A Addlagatta, R Huether, L Habegger, C. M. Weeks, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2005**, *1061*, 135–148.

-
- [78] E. L. Sonnhammer, G von Heijne, A Krogh, *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* **1998**, 6, 175–182.
- [79] J. Soubhye, I. C. Alard, P. van Antwerpen, F. Dufrasne, *Future Med Chem* **2015**, 7, 1431–1456.
- [80] T. M. Penning, *J Steroid Biochem Mol Biol* **2011**, 125, 46–56.
- [81] J. M. Day, P. A. Foster, H. J. Tutill, M. F. Parsons, S. P. Newman, S. K. Chander, G. M. Allan, H. R. Lawrence, N. Vicker, B. V. Potter, M. J. Reed, A. Purohit, *Int. J. Cancer* **2008**, 122, 1931–1940.
- [82] A. Vuorinen, R. T. Engeli, S. Leugger, F. Bachmann, M. Akram, A. G. Atanasov, B. Waltenberger, V. Temml, H. Stuppner, L. Krenn, S. B. Ateba, D. Njamen, R. A. Davis, A. Odermatt, D. Schuster, *J. Nat. Prod.* **2017**, 80, 965–974.
- [83] M. Tsachaki, J. Birk, A. Egert, A. Odermatt, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Res.* **2015**, 1853, 1672–1682.
- [84] R. T. Engeli, B. B. Rhouma, C. P. Sager, M. Tsachaki, J. Birk, F. Fakhfakh, L. Keskes, N. Belguith, A. Odermatt, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2016**, 155, 147–154.
- [85] R. T. Engeli, M. Tsachaki, H. A. Hassan, C. P. Sager, M. L. Essawi, Y. Z. Gad, A. K. Kamel, I. Mazen, A. Odermatt, *J. Sex. Med.* **2017**, 14, 1165–1174.
- [86] M. Cree, C. L. Soskolne, E. Belseck, J. Hornig, J. E. McElhaney, R. Brant, M. Suarez-Almazor, *J. Am. Geriatr. Soc.* **2000**, 48, 283–288.
- [87] J. A. Kanis, *Diagnosis and Clinical Aspects of Osteoporosis*, Springer International Publishing, **2018**, S. 11–20.
- [88] D Stupphann, P Pietschmann, *J. Miner. Stoffwechs. Muskuloskelet. Erkrank.* **2008**, 15, 2–5.
- [89] B. L. Riggs, S. Khosla, L. J. Melton, *Endocr. Rev.* **2002**, 23, 279–302.
- [90] E. Neumann, G. Schett, *Zeitschrift für Rheumatologie* **2007**, 66, 286–289.
- [91] S. C. Manolagas, *Endocr. Rev.* **2000**, 21, 115–137.
- [92] F. B. Farrell, A. Karpeisky, D. H. Thamm, S. Zinnen, *Bone Reports* **2018**, 9, 47–60.
- [93] M. Troeltzsch, S. Kriegelstein, U. Hanf, M. Troeltzsch, *Die Quintessenz* **2016**, 67, 83–93.
- [94] W. J. Boyle, W. S. Simonet, D. L. Lacey, *Nature* **2003**, 423, 337–342.
- [95] S. L. Teitelbaum, *Science* **2000**, 289, 1504–1508.
- [96] M. R. Allen, D. B. Burr in *Basic and Applied Bone Biology*, Elsevier, **2019**, S. 85–100.
- [97] P. V. Bodine, B. S. Komm in *Vitamins & Hormones*, Elsevier, **2002**, S. 101–151.

- [98] S. Bord, D. C. Ireland, S. R. Beavan, J. E. Compston, *Bone* **2003**, *32*, 136–141.
- [99] D. Vanderschueren, J. Gaytant, S. Boonen, K. Venken, *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* **2008**, *15*, 250–254.
- [100] F. Labrie, V. Luu-The, C. Labrie, A. Belanger, J. Simard, S.-X. Lin, G. Pelletier, *Endocr. Rev.* **2003**, *24*, 152–182.
- [101] C. Bagi, J. Wood, D. Wilkie, B. Dixon, *J. Musculoskelet. Neuronal. Interact.* **2008**, *8*, 267–280.
- [102] A. S. Abdelsamie, S. Herath, Y. Biskupek, C. Börger, L. Siebenbürger, M. Salah, C. Scheuer, S. Marchais-Oberwinkler, M. Frotscher, T. Pohlemann, M. D. Menger, R. W. Hartmann, M. W. Laschke, C. J. van Koppen, *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 1362–1372.
- [103] S. T. Müller, S. Pählig, A. Merabet, A. S. Abdelsamie, C. J. van Koppen, S. Marchais-Oberwinkler, R. W. Hartmann, O. Zierau, G. Vollmer, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2019**, *192*, 105405.
- [104] J.-J. Body, P. Bergmann, S. Boonen, Y. Boutsen, O. Bruyere, J.-P. Devogelaer, S. Goemaere, N. Hollevoet, J.-M. Kaufman, K. Milisen, S. Rozenberg, J.-Y. Reginster, *Osteoporos. Int.* **2011**, *22*, 2769–2788.
- [105] D. Bonaiuti, B. Shea, R. Iovine, S. Negrini, V. Welch, H. H. Kemper, G. A. Wells, P. Tugwell, A. Cranney, *Cochrane Database Syst. Rev.* **2002**, *1*, 1–37.
- [106] R. Eastell, C. J. Rosen, D. M. Black, A. M. Cheung, M. H. Murad, D. Shoback, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2019**, *104*, 1595–1622.
- [107] M. Kawai, U. I. Mödder, S. Khosla, C. J. Rosen, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2011**, *10*, 141–156.
- [108] J. E. Rossouw, G. L. Anderson, R. L. Prentice, A. Z. LaCroix, C. Kooperberg, M. L. Stefanick, R. D. Jackson, S. A. Beresford, B. V. Howard, K. C. Johnson, J. M. Kotchen, J. Ockene, *JAMA* **2002**, *288*, 321–333.
- [109] D. T. Felson, Y. Zhang, M. T. Hannan, D. P. Kiel, P. Wilson, J. J. Anderson, *N. Engl. J. Med.* **1993**, *329*, 1141–1146.
- [110] C.-L. Chen, *JAMA* **2002**, *287*, 734.
- [111] B. Ettinger, *JAMA* **1999**, *282*, 637.
- [112] V. G. Vogel, *JAMA* **2006**, *295*, 2727.
- [113] R. Marcus, M. Wong, H. Heath, J. L. Stock, *Endocr. Rev.* **2002**, *23*, 16–37.
- [114] J. Kanis, C. Cooper, R. Rizzoli, J.-Y. Reginster, *Osteoporos. Int.* **2018**, *30*, 3–44.
- [115] A. J. Ellis, V. M. Hendrick, R. Williams, B. S. Komm, *Expert Opin. Drug Saf.* **2015**, *14*, 921–934.

-
- [116] E. Barrett-Connor, L. Mosca, P. Collins, M. J. Geiger, D. Grady, M. Kornitzer, M. A. McNabb, N. K. Wenger, *N. Engl. J. Med.* **2006**, *355*, 125–137.
- [117] K. Naylor, J. Clowes, J. Finigan, M. Paggiosi, N. Peel, R. Eastell, *Bone* **2010**, *46*, 592–597.
- [118] D. Lacey, E Timms, H.-L Tan, M. Kelley, C. Dunstan, T Burgess, R Elliott, A Colombero, G Elliott, S Scully, H Hsu, J Sullivan, N Hawkins, E Davy, C Capparelli, A Eli, Y.-X Qian, S Kaufman, I Sarosi, V Shalhoub, G Senaldi, J Guo, J Delaney, W. Boyle, *Cell* **1998**, *93*, 165–176.
- [119] H. Hsu, D. L. Lacey, C. R. Dunstan, I. Solovyev, A. Colombero, E. Timms, H.-L. Tan, G. Elliott, M. J. Kelley, I. Sarosi, L. Wang, X.-Z. Xia, R. Elliott, L. Chiu, T. Black, S. Scully, C. Capparelli, S. Morony, G. Shimamoto, M. B. Bass, W. J. Boyle, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96*, 3540–3545.
- [120] C Muschitz, *J. Miner. Stoffwechs. Muskuloskelet. Erkrank.* **2011**, *18*, 69–71.
- [121] P. J. Kostenuik, H. Q. Nguyen, J. McCabe, K. S. Warmington, C. Kurahara, N. Sun, C. Chen, L. Li, R. C. Cattley, G. Van, S. Scully, R. Elliott, M. Grisanti, S. Morony, H. L. Tan, F. Asuncion, X. Li, M. S. Ominsky, M. Stolina, D. Dwyer, W. C. Dougall, N. Hawkins, W. J. Boyle, W. S. Simonet, J. K. Sullivan, *J. Bone Miner. Res.* **2009**, *24*, 182–195.
- [122] W. S Simonet, D. L Lacey, C. R Dunstan, M Kelley, M.-S Chang, R Lüthy, H. Q Nguyen, S Wooden, L Bennett, T Boone, G Shimamoto, M DeRose, R Elliott, A Colombero, H.-L Tan, G Trail, J Sullivan, E Davy, N Bucay, L Renshaw-Gegg, T. M Hughes, D Hill, W Pattison, P Campbell, S Sander, G Van, J Tarpley, P Derby, R Lee, W. Boyle, *Cell* **1997**, *89*, 309–319.
- [123] L. C. Hofbauer, S. Khosla, C. R. Dunstan, D. L. Lacey, W. J. Boyle, B. L. Riggs, *J. Bone Miner. Res.* **2000**, *15*, 2–12.
- [124] N. Bucay, I. Sarosi, C. R. Dunstan, S. Morony, J. Tarpley, C. Capparelli, S. Scully, H. L. Tan, W. Xu, D. L. Lacey, W. J. Boyle, W. S. Simonet, *Genes and Dev.* **1998**, *12*, 1260–1268.
- [125] J. E. Compston, M. R. McClung, W. D. Leslie, *The Lancet* **2019**, *393*, 364–376.
- [126] K. Schulz, H. Lehnert, *Der Internist* **2019**, *61*, 51–63.
- [127] R. G. G. Russell, N. B. Watts, F. H. Ebetino, M. J. Rogers, *Osteoporos. Int.* **2008**, *19*, 733–759.
- [128] D. M. Black, C. J. Rosen, *N. Engl. J. Med.* **2016**, *374*, (Hrsg.: C. G. Solomon), 254–262.
- [129] C. J. Crandall, S. J. Newberry, A. Diamant, Y.-W. Lim, W. F. Gellad, M. J. Booth, A. Motala, P. G. Shekelle, *Ann. Intern. Med.* **2014**, *161*, 711.
- [130] S. Khosla, J. P. Bilezikian, D. W. Dempster, E. M. Lewiecki, P. D. Miller, R. M. Neer, R. R. Recker, E. Shane, D. Shoback, J. T. Potts, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2012**, *97*, 2272–2282.

- [131] D. M. Black, A. V. Schwartz, K. E. Ensrud, J. A. Cauley, S. Levis, S. A. Quandt, S. Satterfield, R. B. Wallace, D. C. Bauer, L. Palermo, L. E. Wehren, A. Lombardi, A. C. Santora, S. R. Cummings, for the FLEX Research Group, *JAMA* **2006**, *296*, 2927.
- [132] D. M. Black, I. R. Reid, S. Boonen, C. Bucci-Rechtweg, J. A. Cauley, F. Cosman, S. R. Cummings, T. F. Hue, K. Lippuner, P. Lakatos, P. C. Leung, Z. Man, R. L. M. Martinez, M. Tan, M. E. Ruzicky, G. Su, R. Eastell, *J. Bone Miner. Res.* **2012**, *27*, 243–254.
- [133] S. Kotha, K. Lahiri, D. Kashinath, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 9633–9695.
- [134] J. B. Arterburn, B. K. Bryant, D. Chen, *Chem. Commun.* **2003**, 1890–1891.
- [135] N. Miyaura, A. Suzuki, *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2457–2483.
- [136] J. K. Kim, Y. H. Kim, H. T. Nam, B. T. Kim, J.-N. Heo, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3543–3546.
- [137] T. Kaminski, P. Gros, Y. Fort, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, *2003*, 3855–3860.
- [138] P. Gros, S. Choppin, J. Mathieu, Y. Fort, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 234–237.
- [139] C. Minard, C. Palacio, K. Cariou, R. H. Dodd, *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *2014*, 2942–2955.
- [140] L. Schwink, C. Buning, H. Glombik, M. Gossel, D. Kadereit, N. Halland, M. Lohmann, C. Pöverlein, K. Ritter, *Pat.*, WO 2015/150564, **2015**.
- [141] A. Giroux, Y. Han, P. Prasit, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 3841–3844.
- [142] T. Ishiyama, M. Murata, N. Miyaura, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 7508–7510.
- [143] C. Franc, F. Denonne, C. Cuisinier, L. Ghose, *Tetrahedron Lett* **1999**, *40*, 4555–4558.
- [144] C. Coudret, V. Mazenc, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 5293–5296.
- [145] B. I. Alo, A. Kandil, P. A. Patil, M. J. Sharp, M. A. Siddiqui, V. Snieckus, P. D. Josephy, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 3763–3768.
- [146] L. Siebenbürger, V. Hernandez-Olmos, A. S. Abdelsamie, M. Frotscher, C. J. van Koppen, S. Marchais-Oberwinkler, C. Scheuer, M. W. Laschke, M. D. Menger, C. Boerger, R. W. Hartmann, *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 10724–10738.
- [147] A. S. Abdelsamie, M. Salah, L. Siebenbürger, A. Merabet, C. Scheuer, M. Frotscher, S. T. Müller, O. Zierau, G. Vollmer, M. D. Menger, M. W. Laschke, C. J. van Koppen, S. Marchais-Oberwinkler, R. W. Hartmann, *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 7289–7301.
- [148] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, *46*, 3–26.
- [149] A. S. Abdelsamie, C. J. van Koppen, E. Bey, M. Salah, C. Börger, L. Siebenbürger, M. W. Laschke, M. D. Menger, M. Frotscher, *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *127*, 944–957.

-
- [150] M. Salah, A. S. Abdelsamie, M. Frotscher, *Mol. Cell. Endocrinol.* **2019**, *489*, 66–81.
- [151] R. Cailleau, R. Young, M. Olivé, W. J. Reeves, *J. Natl. Cancer Inst.* **1974**, *53*, 661–674.
- [152] M. K. Walker, J. R. Boberg, M. T. Walsh, V. Wolf, A. Trujillo, M. S. Duke, R. Palme, L. A. Felton, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2012**, *260*, 65–69.
- [153] I. Tarcomnicu, M. C. Gheorghe, L. Silvestro, S. R. Savu, I. Boaru, A. Tudoroni, *J. Chromatogr. B* **2009**, *877*, 3159–3168.
- [154] L. S. Zhu, V. N. Lapko, J. W. Lee, Y. J. Basir, C. Kafonek, R. Olsen, C. Briscoe, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 3421–3426.
- [155] I. Tarcomnicu, L. Silvestro, S. R. Savu, A. Gherase, C. Dulea, *J. Chromatogr. A* **2007**, *1160*, 21–33.
- [156] A. S. Wong, E. N. Ho, T. S. Wan, K. K. Lam, B. D. Stewart, *J. Chromatogr. B* **2015**, *998-999*, 1–7.
- [157] W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J Org Chem* **1978**, *43*, 2923–2925.

8 Supplementary

8.1 Permission of reprint of publications

J. Med. Chem., **2019**, *62*, 7289-7301.

Referring to American Chemical Society, permission is granted for my request in both print and electronic formats, and translations, at no charge. Figures and tables may be modified. Requests for up to 4 figures require only this record. Five or more figures will generate a printout of additional terms and conditions.