

**Strukturbasiertes Design und Synthese von Pyrrolidinen als
Inhibitoren der HIV-1-Protease**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Andreas Blum

aus Hannover

Marburg, 2007

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg
als Dissertation angenommen am:

14.11.2007

Erstgutachter: Hochschuldozentin Dr. W. E. Diederich

Zweitgutachter: Prof. Dr. G. Klebe

Tag der mündlichen Prüfung am:

14.11.2007

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden auf Anregung von Frau Hochschuldozentin Dr. Wibke E. Diederich und Prof. Dr. G. Klebe am Institut für Pharmazeutische Chemie des Fachbereichs Pharmazie der Philipps-Universität Marburg in der Zeit von September 2004 bis August 2007 durchgeführt.

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	<i>Strukturbasiertes Wirkstoffdesign</i>	1
1.2	<i>AIDS</i>	2
1.3	<i>Die HIV-Protease als molekulares Target</i>	3
1.4	<i>Inhibitoren der HIV-Protease</i>	7
1.5	<i>Antiretrovirale Therapie</i>	12
1.6	<i>Mutationen des HI-Virus</i>	14
2	Aufgabenstellung	17
2.1	<i>Ausgangspunkt</i>	17
2.2	<i>Aufgabenstellung der Arbeit</i>	23
3	Ergebnisse und Diskussion	24
3.1	<i>Möglichkeiten zur stereoselektiven Synthese von Pyrrolidinen des Typs 22</i>	24
3.2	<i>Variation der Struktur des Pyrrolidins 22</i>	24
3.3	<i>Alternative Zugangswege zum Inhibitorgrundgerüst</i>	30
3.4	<i>Zugang zu chiralen Pyrrolidinen aus Weinsäuren</i>	34
3.5	<i>Primäre Struktur-Aktivitäts-Beziehung von Pyrrolidin-diestern</i>	35
3.6	<i>Mitsunobu-Reaktionen am 3,4-Dihydroxy-pyrrolidin-System</i>	39
3.7	<i>Aktivierung des 3,4-Dihydroxy-pyrrolidin-Systems als Sulfonsäureester</i>	43
3.8	<i>Synthese N-alkylierter Sulfonamide</i>	46
3.9	<i>Kristallstruktur des Inhibitors 78 und strukturbasiertes Design</i>	51
3.10	<i>Synthese von aus der Struktur des Inhibitors 78 abgeleiteter Inhibitoren</i>	61
3.11	<i>Struktur-Aktivitäts-Beziehung der Inhibitoren der 2. Generation</i>	65
3.12	<i>Bindungsmodi der verbesserten Inhibitoren</i>	68
3.13	<i>Variation der N-Benzylgruppe von 78</i>	78
3.14	<i>Weitere Variation der Inhibitoren</i>	81
3.15	<i>Aktivität der Inhibitoren gegenüber Mutanten der HIV-Protease</i>	82
3.16	<i>Kombination von Substituenten</i>	87
3.17	<i>Interpretation und Bewertung der beobachteten Bindungsmodi</i>	95
4	Zusammenfassung und Ausblick	98
4.1	<i>Pyrrolidin-diester</i>	99
4.2	<i>Sulfonamide</i>	99
4.3	<i>Ausblick Desymmetrisierung</i>	102
4.4	<i>Abgeleitete Ringsysteme als alternative Grundgerüste</i>	106

5	Experimenteller Teil	109
5.1	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>109</i>
5.2	<i>Allgemeine Anmerkungen.....</i>	<i>110</i>
5.3	<i>Allgemeine Arbeitsvorschriften</i>	<i>112</i>
6	Literatur	183

1 Einleitung

1.1 Strukturbasiertes Wirkstoffdesign

Die Entwicklung innovativer Wirkstoffe bedient sich zunehmend des so genannten strukturbasierten Wirkstoffdesigns. Dabei liegt der Entwicklung die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur des biologischen *Targets* zugrunde. In den letzten Jahren ist die Zahl der experimentell bestimmten dreidimensionalen Strukturen von biologischen Makromolekülen stark gewachsen. Die *Protein Data Bank* (PDB)^[1] macht solche Strukturen frei zugänglich. Ihr Wachstum kann als repräsentativ für diese Zunahme angesehen werden, obwohl die Anzahl der Strukturen weit höher anzusetzen ist, da die in industriellen Projekten bestimmten Strukturen zumeist nicht veröffentlicht werden.

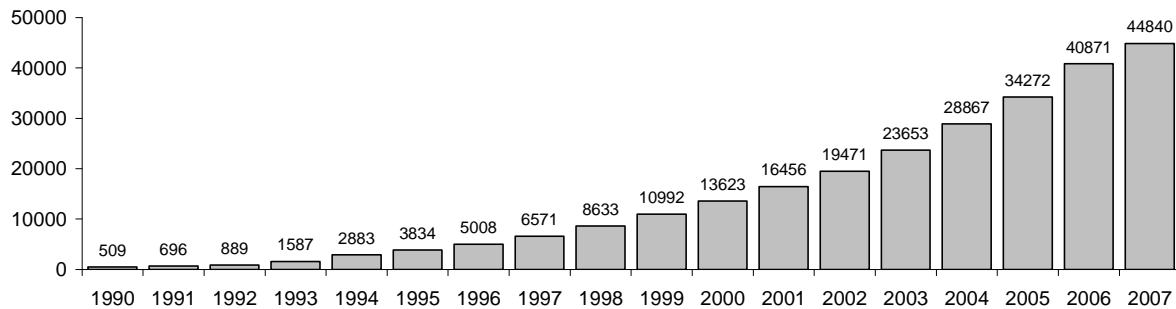


Diagramm 1: Anzahl der in der Protein Data Bank (PDB)^[1] hinterlegten Strukturen seit 1990; Quelle: <http://www.rcsb.org>, Stand Juli 2007

Zu Beginn der Wirkstoffentwicklung wird eine initiale Leitstruktur entweder durch Hochdurchsatzdurchmusterung (*HTS: High Throughput Screening*) oder Variation bekannter Liganden gefunden oder bei bekannter Struktur des *Targets* mittels *de novo*-Design entworfen. Nach Validierung der Leitstruktur durch Bestimmung seiner Aktivität in einem funktionellen Assay kann der Ligand weiter optimiert werden. Die Bestimmung der Struktur des *Targets* im Komplex mit dem Liganden ermöglicht das strukturbasierte Design. Durch Analyse der Wechselwirkungen können mögliche Variationen vorgeschlagen werden, um den Liganden zu modifizieren, beispielsweise eine Vereinfachung der Struktur und eine Optimierung von Affinität und Selektivität. Diese Vorschläge werden für die Synthese neuer Liganden verwendet, und durch Bestimmung der Affinität wird die den Vorschlägen zugrunde liegende Hypothese überprüft. Aus diesen Molekülen werden die vielversprechendsten Vertreter ausgewählt, die nach diesem Verfahren schrittweise weiter optimiert werden, bis ein Ligand mit dem gewünschten Profil gefunden ist.

1.2 AIDS

Die bis heute noch immer unheilbare Immunschwächekrankheit AIDS (*Acquired Immune Deficiency Syndrom*) stellt die Menschheit in zunehmendem Maße auch zu Beginn des 21. Jahrhunderts vor bisher unlösbare medizinische und gesundheitspolitische Probleme. In ihrem jüngsten Bericht^[2] beziffert die WHO die Zahl der mit dem HI-Virus infizierten Personen auf ca. 40 Millionen Menschen weltweit. Die Anzahl an Neuinfektionen im Jahr 2006 wird auf etwa 5 Millionen Menschen, die der AIDS-Toten für den gleichen Zeitraum auf 3 Millionen geschätzt. Die Zahl der Neuinfektionen ist somit höher als jemals zuvor, und eine Eindämmung der Krankheit nicht in Sicht.

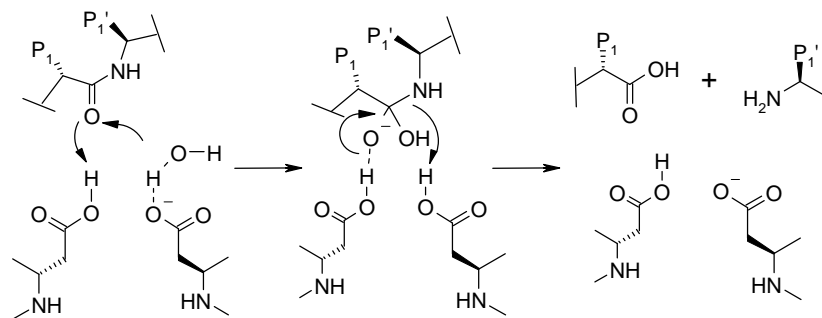
Als Ursache für AIDS wurde ein Retrovirus, das HI-Virus (*Human Immunodeficiency Virus*), identifiziert.^[3] Bis heute konnten zwei Virusstämme charakterisiert werden: HIV-1, das hauptsächlich in Europa und den Vereinigten Staaten auftritt und HIV-2, welches überwiegend in Zentral- und Ostafrika vorkommt.^[4] Das Virus infiziert T-Zellen, die ein CD4 Antigen an ihrer Oberfläche tragen, wie z.B. Lymphozyten. Die viruseigene Reverse-Transkriptase übersetzt die virale RNA in virale DNA und ermöglicht somit den Einbau dieser in die DNA der Wirtszelle durch die ebenfalls viruseigene Integrase. Nach erfolgter Aktivierung der Wirtszelle werden durch Transkription und Translation in der infizierten Zelle sowohl virale RNA als auch Polyprotein-Vorläufer produziert. Diese Vorläuferproteine werden durch die ebenfalls viruseigene HIV-Protease in funktionelle Enzyme gespalten. An der Zelloberfläche bilden sich neue Viren, die nach Knospung und Reifung neue Zellen befallen können. Wird dieser Kreislauf der Virusvermehrung nicht unterbrochen, so kommt es zu einer Verbreitung des Virus über den gesamten Körper und letztendlich zum Zusammenbruch des körpereigenen Immunsystems.^[5] In dieser Arbeit wird ausschließlich der HIV-1 Subtyp behandelt.

Neben weiteren Angriffspunkten hat sich die Forschung der letzten Jahre vor allem auf die Hemmung der für die Virusreplikation essentiellen Enzyme wie z.B. die Reverse-Transkriptase, die HIV-Protease oder die Integrase durch antiretrovirale Chemotherapeutika konzentriert. Bis heute ist jedoch keine Therapie bekannt, die zu einer vollständigen Eradikation des Virus führt. Als Chemotherapeutika finden zurzeit sowohl Hemmstoffe der Reverse-Transkriptase (Nukleosid- und Nichtnukleosid-Analoga) als auch der HIV-Protease, meistens in Kombination, Anwendung. Im Jahre 2003 wurde das synthetische Peptid Enfuvirtid zugelassen, welches das Eindringen des Virus in die Zelle verhindert. Eine Hemmung der HIV-Integrase kommt prinzipiell ebenfalls in Frage, doch ist bisher noch kein entsprechendes Medikament in den Markt eingeführt worden. In den letzten Jahren ist vor

allein in den Industrieländern durch die so genannte *HAAR*-Therapie (*HAART: Highly Active Anti-Retroviral Therapy*) ein Unterdrücken der Virusreplikation und eine damit einhergehende Senkung der Viruslast über einen längeren Zeitraum und somit ein längeres Leben mit der Krankheit möglich. Zu den wesentlichen Problemen der antiretroviralen Therapie gehört - neben den unerwünschten Wirkungen der Medikamente - jedoch vor allem die Bildung resistenter Virusmutanten, die die Therapie erschweren oder sogar unmöglich machen. In zunehmendem Maße treten Kreuzresistenzen zwischen den verschiedenen Medikamenten auf, und es besteht daher ein hoher Bedarf an neuen Inhibitoren insbesondere mit neuartigen Wirkungsmechanismen und/oder geänderten Wirkungsprofilen.^[6]

1.3 Die HIV-Protease als molekulares Target

Nach der Entdeckung des HI-Virus^[7, 8] im Jahr 1983 wurde zwei Jahre später die Existenz einer viruseigenen Protease postuliert und 1988 experimentell bestätigt, die die zunächst funktionslosen viralen Polyproteine *gag* und *pol* in funktionelle virale Proteine umwandelt, eine Voraussetzung für die Entstehung neuer infektiöser Viruspartikel. Ferner wurde bewiesen, dass Virus-Partikel, deren Protease deaktiviert ist, zu keiner Vermehrung fähig sind.^[9] Im Jahre 1989 wurde die Struktur der HIV-Protease mittels Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt.^[10, 11] Es zeigte sich, dass es sich bei der HIV-1-Protease um einen weiteren Vertreter aus der Familie der Aspartat-Proteasen handelt. In der Klasse der Aspartat-Proteasen wird die Spaltung der Peptidbindung des Substrates durch zwei Aspartylreste katalysiert (Schema 1).^[12] Es wird allgemein angenommen, dass zu Beginn der Enzym-Reaktion ein Aspartat deprotoniert, das andere jedoch protoniert vorliegt. Durch die Wechselwirkung mit dem Carboxylat-Anion wird ein Wassermolekül für den nukleophilen Angriff auf das Carbonylkohlenstoffatom des Substrates aktiviert. Das entstehende Intermediat wird durch den protonierten Aspartylrest stabilisiert und zerfällt schließlich durch die Spaltung der peptidischen C-N-Bindung in die entsprechende Carbonsäure und das Amin.



Schema 1: Katalytischer Mechanismus der Aspartat-Proteasen

Die HIV-Protease ist ein Homodimer aus zwei identischen, zueinander C_2 -symmetrischen Ketten, die jeweils aus 99 Aminosäuren bestehen. Abbildung 1 zeigt die Struktur der HIV-Protease im Komplex mit einem Substrat-Decapeptid. Um eine Spaltung des Substrates zu verhindern, wurden hier die katalytischen Aspartate 25 und 25' durch isostere Asparagine ersetzt. Der C_2 -symmetrische Aufbau ist durch die farbliche Codierung der Untereinheiten hervorgehoben. Die beiden „katalytischen“ Asparagine 25 und 25' sind gelb eingefärbt.

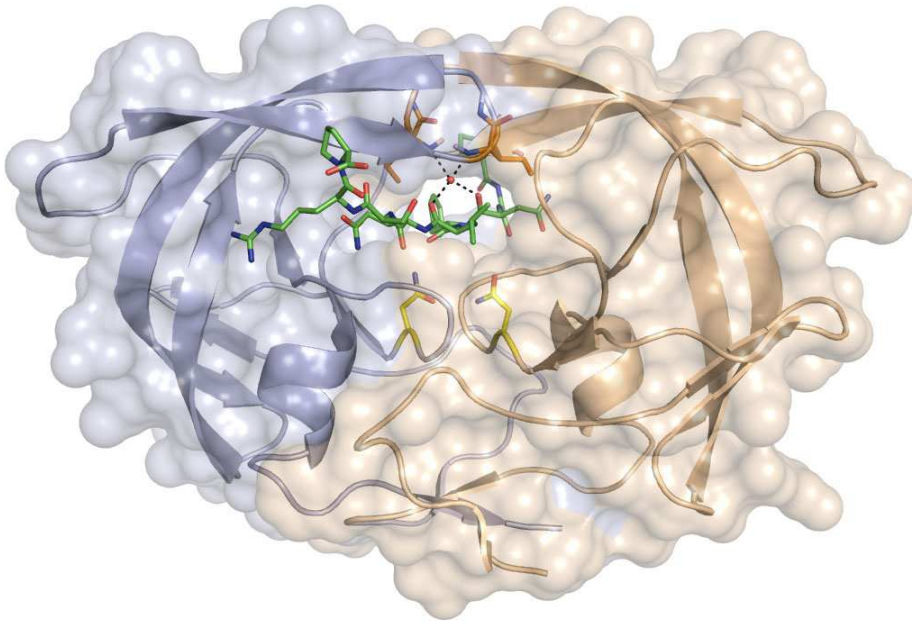


Abbildung 1: Räumliche Struktur der HIV-1-Protease im Komplex mit einem Substrat-Oligodecapeptid (Sequenz: RPGNFLQSRP, grün); um die Spaltung des Peptids zu verhindern, sind die katalytischen Aspartate 25 und 25' durch isostere Asparagine ausgetauscht (gelb); PDB-Code 1MT9.^[13]

Oberhalb der Bindungsstelle des Substrates sind zwei Glycin-reiche Schleifen („Flaps“) zu erkennen, denen die Funktion eines „Deckels“ zukommt und die eine wichtige Rolle bei der Bindung und Fixierung des Substrates (grün) spielen. Die Wechselwirkung zwischen zwei Carbonylgruppen des Substrates und dem Enzym wird über ein Wassermolekül („Flap-Water“) vermittelt, das von den zwei Hauptketten-NHs der Isoleucine 50 und 50' (orange eingefärbt) in seiner räumlichen Position fixiert wird.

Die HIV-Protease spaltet ihre Substrat-Peptide an neun verschiedenen Stellen, die jeweils unterschiedliche Sequenzen aufweisen (Tabelle 1), wobei an der Spaltstelle hauptsächlich hydrophobe Aminosäuren auftreten. Das symmetrische Enzym zeigt dabei eine große Flexibilität in Bezug auf die Art der Seitenketten, die in den Subtaschen des Enzyms erkannt werden. Für die Benennung der Aminosäuren des Substrates hat sich folgende Nomenklatur durchgesetzt: Ausgehend von der Spaltstelle werden die Aminosäuren in Richtung des N-Terminus des Substrates mit P_1 , P_2 , P_3 etc. benannt, in Richtung des C-Terminus mit P_1' , P_2'

P₃' etc. Im Enzym werden die entsprechenden Subtaschen, in denen die Seitenketten zum Liegen kommen, mit S₁, S₂, S₃ etc. bzw. S₁', S₂' S₃' etc. bezeichnet.

Polyprotein	← N-Terminus				C-Terminus →				Spaltprodukte	
	P ₄	P ₃	P ₂	P ₁	P ₁ '	P ₂ '	P ₃ '	P ₄ '		
<i>gag</i>	S	Q	N	Y	P	I	V	Q	MA	CA
	A	R	V	L	A	E	A	M	CA	p2
	A	T	I	M	M	Q	R	G	p2	NC
	Q	A	N	F	L	G	K	I	NC	p1
	P	G	N	F	L	Q	S	R	p1	p6
<i>pol</i>	S	F	N	F	P	Q	I	T	TF	PR
	T	L	N	F	P	I	S	P	PR	RT
	A	E	T	F	Y	V	D	G	RT	RH
	R	K	I	L	F	L	G	G	RH	IN

Tabelle 1: Spaltstellen der HIV-Protease innerhalb der *gag*- und *pol*-Polyproteine; Spaltprodukte: NC = Nucleocapsid; MA = Matrix; CA = Capsid; TF = *trans frame*-Peptid; PR = Protease; RT = Reverse-Transkriptase; IN = Integrase; RH = RNase H^[14]

Die Substraterkennung erfolgt über ein konserviertes Wasserstoffbrückennetzwerk, wie die Struktur des repräsentativen Oligopeptids RPGNFLQSRP im Komplex mit der D25N-Mutante der Protease veranschaulicht (Abbildung 2).^[13]

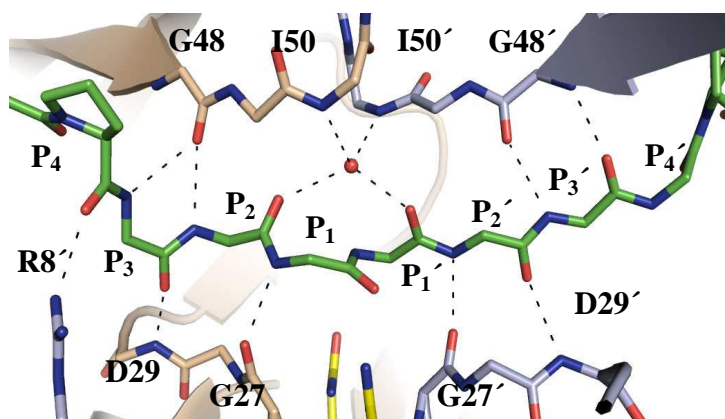


Abbildung 2: Wasserstoffbrückennetzwerk zu den Peptidbindungen bei Bindung eines Substrat-Oligopeptids; die Seitenketten der Aminosäuren (Ausnahme: R8') sind zur besseren Übersicht nicht gezeigt; PDB-Code 1MT9.^[13]

Das Enzym bildet eine parallele β -Faltblatt-Struktur mit dem Substrat aus, wobei Glycin 48 mit seiner Carbonylfunktion jeweils eine Wasserstoffbrücke mit den NH-Gruppen der P₃- und der P₂-Aminosäure ausbildet. Im Fall der P₄-Aminosäure geht die Seitenkette des Arginins 8' eine Wechselwirkung mit der Carbonylgruppe ein, im Fall der P₃-Aminosäure das Hauptketten-NH von Aspartat 29. Die Carbonylgruppe der P₂-Aminosäure bildet eine Wasserstoffbrücke mit dem *Flap*-Wassermolekül aus, und die NH-Funktion geht eine Wechselwirkung mit dem Carbonyl-Sauerstoffatom von Glycin 27 ein. Die gleichen

Wasserstoffbrückennetzwerke finden sich für die P₁'-P₂'-Amidbindung, wobei Glycin 27' der Partner ist, und für die P₂'-P₃'-Amidbindung, mit Aspartat 29' und Glycin 48' als Partner. Das Glycin 48 geht zusätzlich mit seiner NH-Gruppe eine Wasserstoffbrücke mit dem Carbonyl-Sauerstoffatom der P₃'-Aminosäure ein. Auf dieser Seite der Bindetasche bildet das Enzym mit dem *Flap*-Bereich eine antiparallele β -Faltblatt-Struktur mit dem Substrat aus.

Während die Erkennung der Peptidbindungen des Substrates fast ausschließlich durch die Hauptketten-NHs und die Hauptketten-Carbonylgruppen des Enzyms erfolgt, werden die Subtaschen für die Seitenketten des Substrates von den Seitenketten zumeist hydrophober Aminosäuren, ausgebildet (Abbildung 3). Durch die Symmetrie des Enzyms sind die jeweiligen Subtaschen S₁/S₁', S₂/S₂' etc. jeweils identisch. In der S₁-Tasche kommen nur hydrophobe Aminosäuren zum Liegen: Die Tasche wird aus den Seitenketten von Isoleucin 50', Leucin 32 und dem so genannten S₁-Loop (Reste 80-84) gebildet, wobei aus dem S₁-Loop nur die Seitenketten von Prolin 81, Valin 82 und Isoleucin 84 am Aufbau der Tasche beteiligt sind. Die S₂-Tasche vermag ein weites Spektrum an verschiedenen Seitenketten zu binden. Sie wird aus den Seitenketten von Isoleucin 84, Valin 32, Isoleucin 47 sowie den Seitenketten der Aspartate 29 und 30 gebildet. Die letzten beiden Aminosäuren ermöglichen den Aufbau von Wasserstoffbrücken mit polaren Aminosäuren. Die S₃-Tasche ist nicht eindeutig von der S₁-Tasche abgetrennt und wird durch Leucin 23 und Arginin 8' ausgebildet. Da es keine strikte Trennung der beiden Subtaschen gibt, wird im Folgenden die S₃-Tasche zumeist als Teil der S₁-Tasche betrachtet.

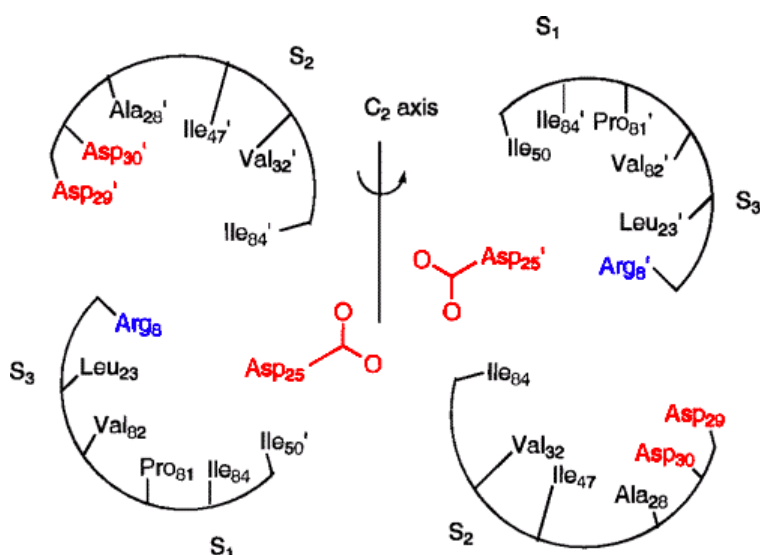


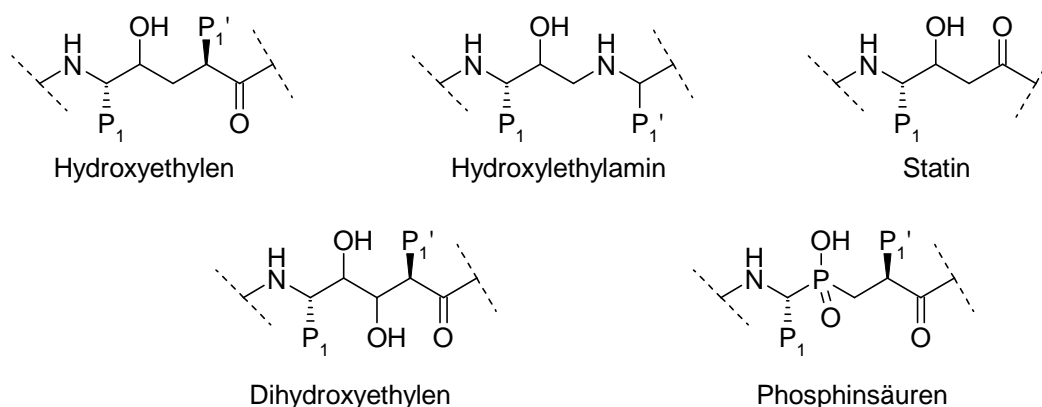
Abbildung 3: Schematische Darstellung der an die Bindetasche grenzenden Aminosäuren^[15]

Um ihrer natürlichen Funktion nachzukommen vermag die HIV-Protease neun verschiedene Spaltsequenzen selektiv zu erkennen. Diese Anpassungsfähigkeit ist auf die hohe Flexibilität der Bindetasche zurückzuführen. Während die Peptidbindungen der Substrate durch

Hauptketten-Atome adressiert werden, werden die Subtaschen nur durch die Seitenketten von Aminosäuren gebildet, was eine deutlich größere Adaptionfähigkeit der Subtaschen zur Folge hat. Zudem werden häufig nur ungerichtete hydrophobe Wechselwirkungen mit den Seitenketten der Substrate ausgebildet.^[14]

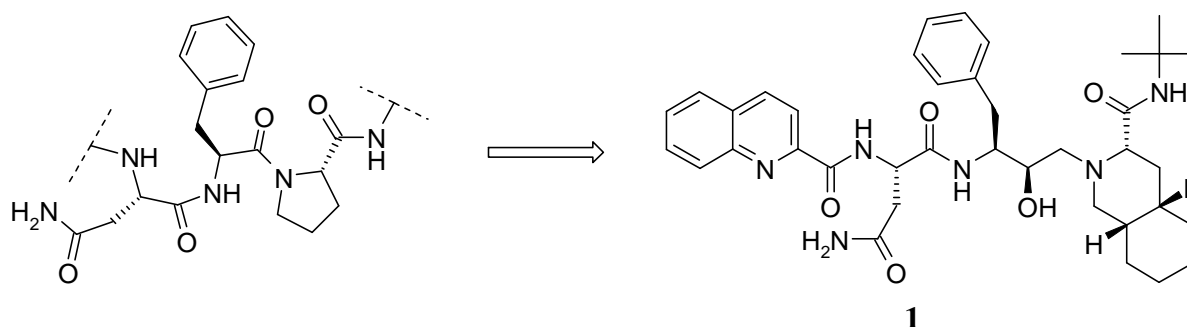
1.4 Inhibitoren der HIV-Protease

Nach der Identifikation der HIV-Protease als *Target* wurde eine Vielzahl von Inhibitoren entwickelt. Da sich zu dieser Zeit viele Pharmafirmen mit der Entwicklung von Inhibitoren für die Aspartat-Protease Renin beschäftigten, konnten diese Verbindungen und die dort gewonnenen Erfahrungen für das Design von HIV-Protease-Inhibitoren verwendet werden. Die ersten Inhibitoren wurden von der Struktur der Substrate abgeleitet, wobei die Peptidbindung an der Spaltstelle durch ein nicht hydrolysierbares Übergangszustandsisoster ausgetauscht wurde (Schema 2). Im Laufe der Zeit wurden auch zunehmend nicht-substrat-analoge Inhibitoren entwickelt.



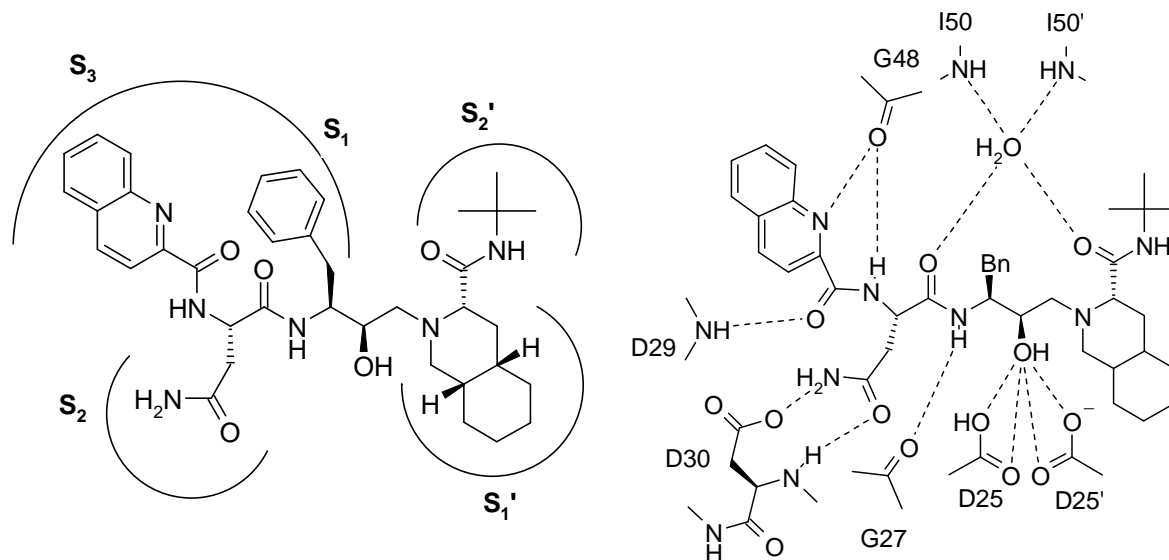
Schema 2: Einige, für Aspartat-Proteasen verwendete Übergangszustandsmimetika

Da eine Vielzahl publizierter Arbeiten auf dem Gebiet der HIV-Protease-Inhibitoren existiert, soll im Folgenden exemplarisch nur auf den Inhibitor Saquinavir, einen Vertreter der peptidomimetischen Inhibitoren, sowie auf Tipranavir und die zyklischen Harnstoffe, zwei Vertreter der nicht-peptidischen Inhibitoren, näher eingegangen werden.



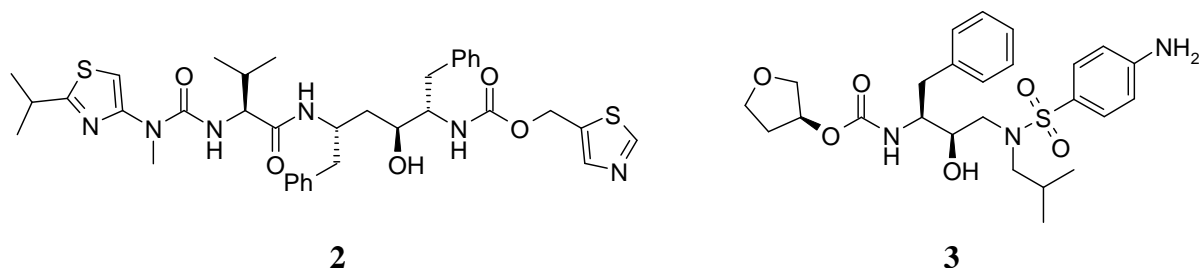
Schema 3: Entwicklung von Saquinavir 1 als Phenylalanin-Prolin-Isoster

Saquinavir **1** war der erste HIV-Protease-Inhibitor und wurde 1995 zugelassen. Bei ihm handelt es sich um eine Entwicklung der *Roche AG*, basierend auf einem Hydroxyethylamin-Übergangszustandsisoster. Der Entwicklung lag die Struktur der Phenylalanin-Prolin-Spaltstelle des Substrates zugrunde. Die Optimierung führte zur Modifikation des Prolin zum Homoprolin und schließlich durch Erweiterung zum Decahydroisochinolin für die S_1' -Tasche. Die S_2' -Tasche wird durch ein *tert*-Butylamid adressiert. In der S_1 -Tasche wurde der Benzylrest des Phenylalanins, für die S_2 -Tasche die Amid-Struktur des Asparagins verwendet, die beide im Substrat zu finden sind. Die S_3 -Tasche wird durch eine Chinolinseitenkette adressiert. In seinem Bindungsmodus, vor allem im Wasserstoffbrückennetzwerk, ist **1** dem Substrat sehr ähnlich. Ein *Flap*-Wasser wird beobachtet und die Peptidbindungen bilden vergleichbare Wasserstoffbrücken mit Glycin 27, Glycin 48 und zu Aspartat 29 aus.



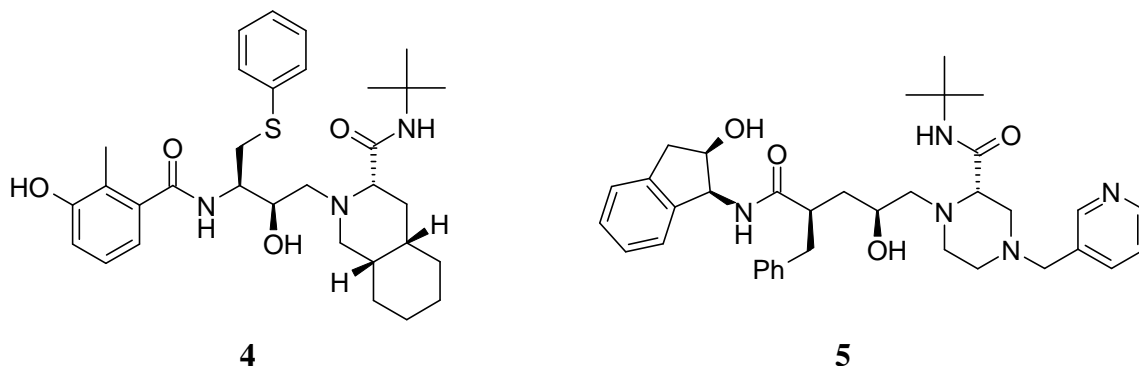
Schema 4: Schematische Darstellung des Bindungsmodus von Saquinavir **1**; Besetzung der Subtaschen (links); ausgebildete Wasserstoffbrücken (rechts)

Saquinavir hat eine sehr hohe Affinität gegenüber der HIV-Protease ($K_i \sim 0.6$ nM), die erste Formulierung besaß jedoch nur eine sehr geringe orale Bioverfügbarkeit (3-5%). Vor allem die Kombinationstherapie mit dem Protease-Inhibitor Ritonavir **2** (*boostern*) führte zu einer deutlichen Verbesserung der Bioverfügbarkeit. Ritonavir ist ein potenter Inhibitor des Cytochrom P450 Systems (Affinität gegenüber CYP3A4 $K_i = 17$ nM) und vermindert so den *first-pass*-Effekt des gleichzeitig applizierten Saquinavirs deutlich. Ritonavir wird nur noch aus diesem pharmakologischen Grund in der Therapie als Zusatz für andere Protease-Inhibitoren verwendet. Die peptidomimetischen Inhibitoren Indinavir (**5**), Lopinavir, Duranavir, Amprenavir (**3**) und Atazanavir besitzen ähnliche Strukturen, aber abweichende pharmakokinetische Profile.^[16]



Schema 5: Struktur der Protease-Inhibitoren Ritonavir 2 und Amprenavir 3

Bei den peptidomimetischen Inhibitoren handelt es sich um sehr komplexe Moleküle, deren stereoselektive Synthese sehr teuer und nur mit großem Aufwand möglich ist.^[17] Ein Beispiel für auftretende mögliche Probleme ist Nelfinavir **4**, eine Entwicklung von Wissenschaftlern von *Agouron Pharmaceuticals* (heute *Pfizer*). Mittels strukturbasierten Designs wurde die Aktivität verbessert, vor allem aber wurden in der Entwicklungsphase die pharmakokinetischen Eigenschaften optimiert. Nelfinavir besitzt eine deutlich höhere orale Bioverfügbarkeit (70-80%) als Saquinavir **1** und Indinavir **5**, mit denen es strukturelle Ähnlichkeit besitzt. Ein *boostern* von Nelfinavir mit Ritonavir ist jedoch aufgrund hepatischer Komplikationen nicht möglich. In der Mono-Therapie mit Nelfinavir sind nur verhältnismäßig geringe Nebenwirkungen zu beobachten.

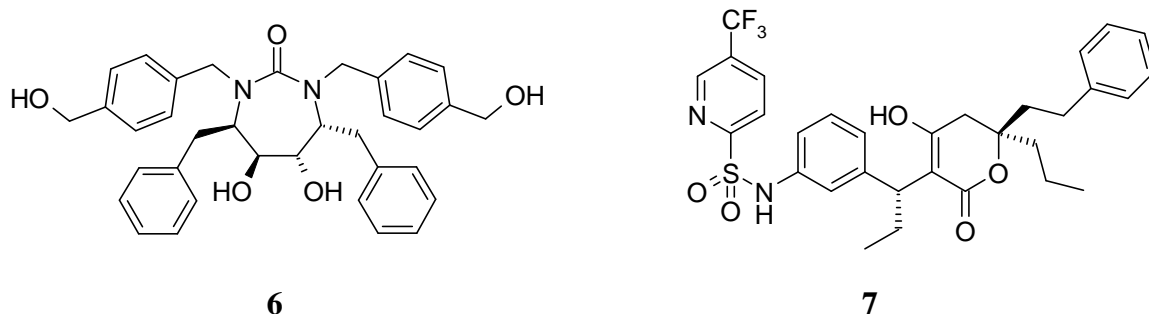


Schema 6: Struktur der Protease-Inhibitoren Nelfinavir 4 und Indinavir 5

Im Juni 2007 wurden Nelfinavir enthaltende Präparate vom europäischen Markt zurückgerufen.^[18] Tabletten, die Nelfinavir enthalten, waren durch einen ungewöhnlichen Geruch aufgefallen; eine Untersuchung ergab eine Verunreinigung mit Ethylmesylat, die aus der Synthese stammte.

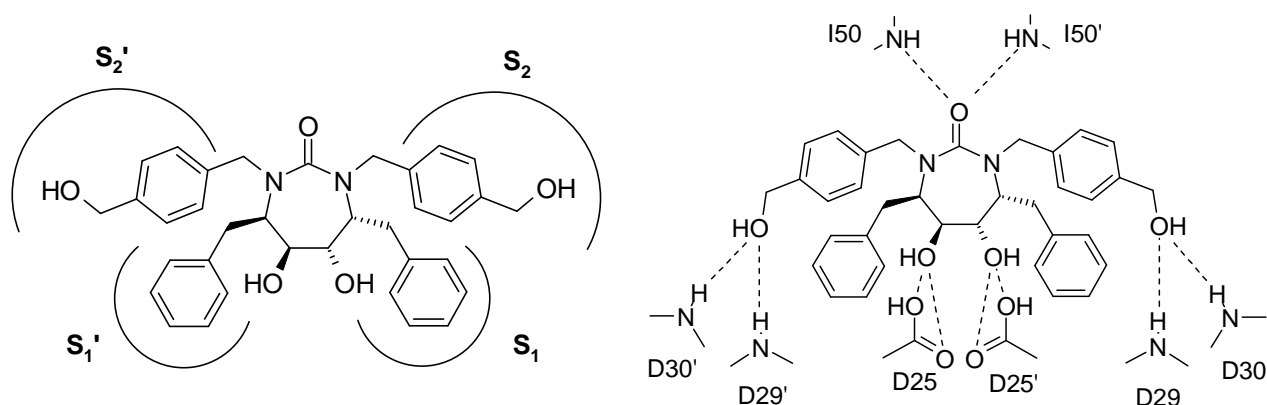
Die peptidomimetischen Protease-Inhibitoren zeigen zwar alle sehr gute Affinitäten, ihre pharmakokinetischen Eigenschaften sind jedoch zumeist nur moderat. Die orale Bioverfügbarkeit ist gering, weshalb es häufig notwendig ist, den Abbau der Inhibitoren durch Cytochrom P450 durch *boostern* mit Ritonavir zu hemmen. Dies führt zu komplizierten Arzneimittelformulierungen und einer Therapie, deren richtige Anwendung sehr teuer und

aufgrund vieler möglicher Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten und notwendiger Abstimmung auf den individuellen Patienten sehr kompliziert ist. Diese komplexe Therapie erschwert die Compliance.



Schema 7: Struktur von zwei nicht-peptidischen Protease-Inhibitoren: DMP-323 (6) war der erste zyklische Harnstoff, der einer klinischen Prüfung unterzogen wurde; Tipranavir 7 war der erste nicht-peptidische Protease-Inhibitor auf dem Markt.

Auf der Suche nach Grundgerüsten, die nicht mehr von den Substraten abgeleitet sind, und von denen man sich bessere pharmakokinetische Eigenschaften versprach, wurden hauptsächlich zwei Substanzklassen erforscht.^[19] Die Beobachtung des *Flap*-Wassermoleküls in Komplexen von Substraten und peptidomimetischen Inhibitoren führte bei *Du Pont Merck* zu einem Pharmakophormodell, dessen Anwendung in Kombination mit Modelling-Studien zur Entwicklung von C_2 -symmetrischen zyklischen Harnstoffen führte.^[20, 21] Diese Verbindungen offenbarten eine sehr gute Affinität, und durch weiteres strukturbasiertes Design konnte der erste klinische Kandidat DMP-323 (6) entwickelt werden.^[22]

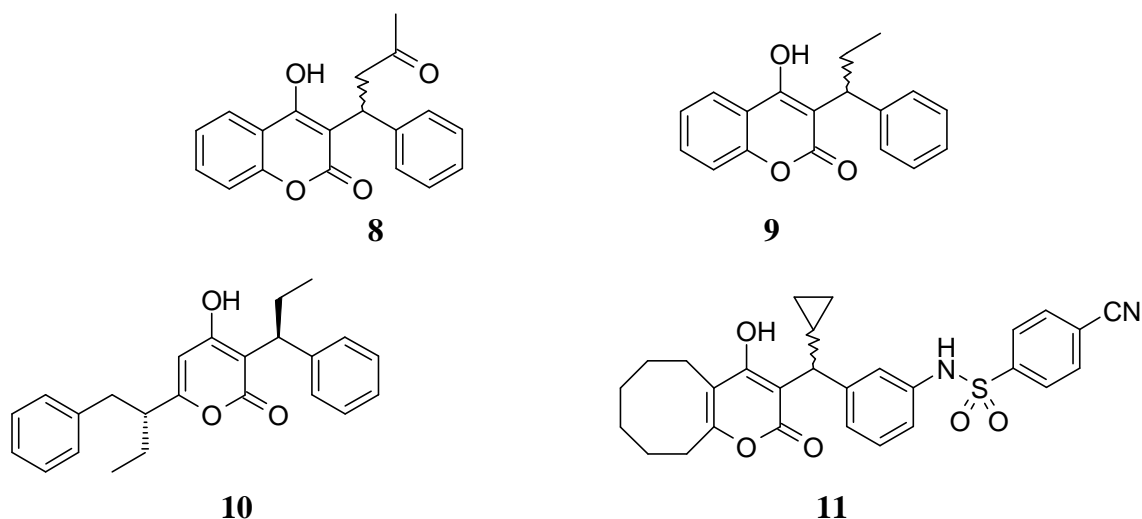


Schema 8: Schematische Darstellung des Bindungsmodus des zyklischen Harnstoffes DMP-323 (6); Besetzung der Subtaschen (links); ausgebildete Wasserstoffbrücken (rechts)

Es konnte gezeigt werden, dass diese Verbindungen ein hohes Maß an Präorganisation besitzen. In einer Kristallstruktur des niedermolekularen Inhibitors zeigt das starre Grundgerüst eine Konformation, die praktisch der im Enzym gefundenen entspricht.^[23] Der Inhibitor adressiert mit seiner Diol-Untereinheit die katalytische Dyade, und das Carbonyl-Sauerstoffatom der Harnstoff-Funktion nimmt die Position des *Flap*-Wassermoleküls ein und

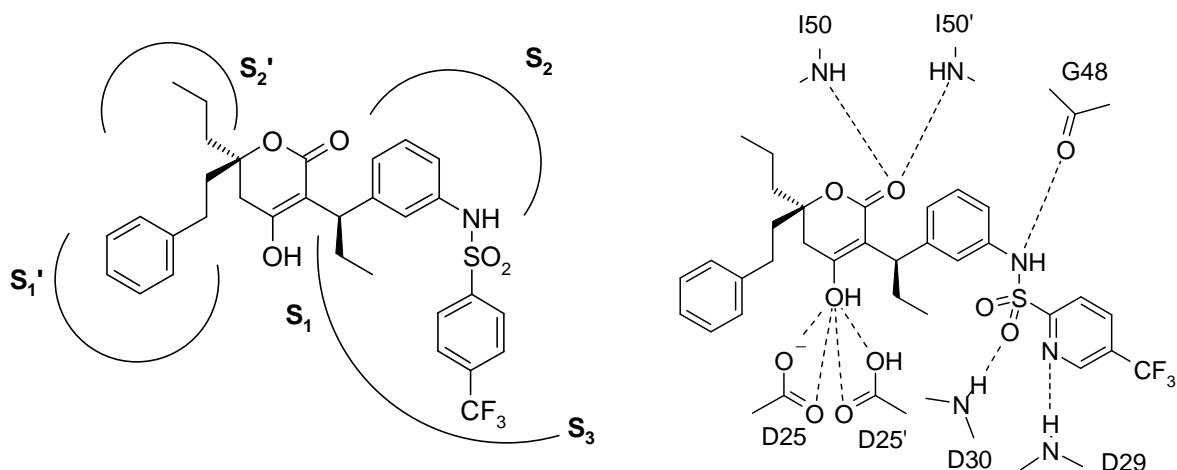
bildet zwei Wasserstoffbrücken zu den Isoleucinen 50 und 50' aus. Die Benzylreste am zentralen Ring adressieren die S_1 - und S_1' -Taschen, während die *N*-Benzylreste die S_2 - und S_2' -Taschen besetzen. Die Benzylalkoholgruppen des Inhibitors bilden Wasserstoffbrücken zu den Aspartaten 29 und 30 bzw. 29' und 30' aus. DMP-323 besitzt jedoch eine geringe Wasserlöslichkeit sowie schlechte Bioverfügbarkeit und wurde deshalb nicht weiter entwickelt. Es wurden sehr viele weitere, auch nicht C_2 -symmetrische Derivate dieser Klasse synthetisiert und untersucht, jedoch konnte bis jetzt aufgrund von schlechten pharmakokinetischen Eigenschaften keines dieser Derivate bis zur Marktreife entwickelt werden.

Die zweite Klasse nicht-peptidischer Inhibitoren sind die Dihydropyrone, die letztendlich auch zur Entwicklung von Tipranavir **7** führten. Bei *Upjohn Co.* (jetzt *Pfizer*) wurde im Hochdurchsatzscreening das 4-Hydroxycoumarin Wafarin (**8**) als schwacher HIV-Protease-Inhibitor entdeckt. Eine weitere Untersuchung der Substanzbibliothek von *Upjohn* auf Verbindungen mit Ähnlichkeit zu Wafarin führte zur Entdeckung von Phenprocoumon (Marcumar[®], **9**), welches eine Affinität von $K_i = 1 \mu\text{M}$ zeigte. In einem strukturbasierten Optimierungsprozess wurden ausgehend von einer Kristallstruktur von Phenprocoumon im Komplex mit der HIV-Protease zwei klinische Kandidaten, PNU-96988 (**10**) und PNU-103017 (**11**), entwickelt.



Schema 9: Strukturen von Wafarin (**8**) und Phenprocoumon (**9**) und die klinischen Kandidaten PNU-96988 (**10**) und PNU-103017 (**11**)

Eine weitere Optimierung beinhaltete die Entfernung der Doppelbindung vom zentralen Pyronring zum 5,6-Dihydropyron, die eine bessere Besetzung der S_1' - und S_2' -Taschen ermöglichte. Dieser Ansatz führte zur Entwicklung von Tipranavir **7**, welches im Jahr 2005 zur Therapie zugelassen wurde.



Schema 10: Schematische Darstellung des Bindungsmodus von Tipranavir **7**; Besetzung der Subtaschen (links); ausgebildete Wasserstoffbrücken (rechts)

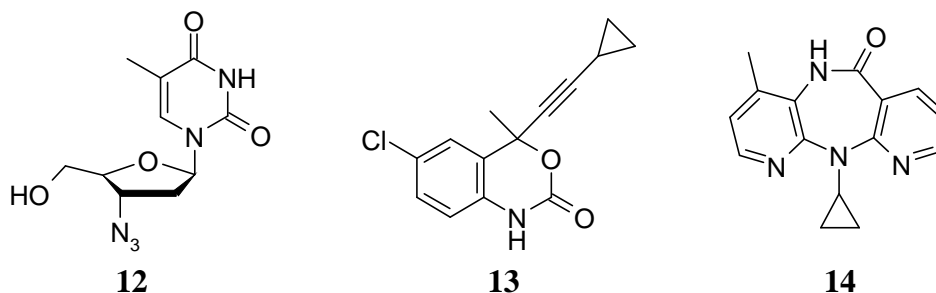
Tipranavir bindet mit der Hydroxylgruppe der Enol-Struktur an die katalytische Dyade, und das Carbonyl-Sauerstoffatom der Lacton-Struktur ersetzt das *Flap*-Wassermolekül und bildet direkte Wasserstoffbrücken zu den Isoleucinen 50 und 50' aus. Die beiden hydrophoben Substituenten am zentralen 5,6-Dihydropyron-Ring adressieren die S₁'- und S₂'-Taschen. Der Substituent an der Doppelbindung besetzt mit der Ethylgruppe die S₁-Tasche, der zentrale Phenylring die S₂-Tasche und der terminale Pyridinring die S₃-Tasche. In diesem Bereich bildet der Inhibitor Wasserstoffbrücken zum Peptid-Erkennungsmotiv (Glycin 48 und Aspartat 29) und zum Aspartat 30 der S₂-Tasche aus.

Zur Zeit der Markteinführung bestand die Hoffnung, dass die neuartige Struktur von Tipranavir auch zu einer guten Aktivität gegenüber Virusvarianten führen würde, die gegen peptidomimetische Inhibitoren Resistenzen entwickelt hatten. Unter der Therapie mit Tipranavir werden jedoch ähnliche Mutationsprofile wie für die peptidomimetischen Protease-Inhibitoren beobachtet.^[24]

1.5 Antiretrovirale Therapie

Nach der Identifikation des HI-Virus als Verursacher für AIDS wurden große Anstrengungen zur Entwicklung geeigneter Medikamente unternommen.^[25] Das Fehlen einer entsprechenden antiretroviralen Therapie in den frühen 80er Jahren, führte zu einer Lebenserwartung der Infizierten von weniger als fünf Jahren. Mit Zidovudin **12** wurde 1987 der erste antiretrovirale Wirkstoff zur Therapie zugelassen. Es handelt sich um ein Analogon des Nucleosids Thymidin und gehört zur Klasse der nukleosidischen Inhibitoren der viralen Reverse-Transkriptase (*NRTI Nucleosidic Reverse Transcriptase Inhibitors*). Die Therapie mit

Zidovudin hatte jedoch nur einen geringen Erfolg, da das Virus schnell durch Mutationen Resistenzen ausbildete.



Schema 11: Strukturen von Inhibitoren der HIV-Reverse-Transkriptase: Zidovudin 12, Efavirenz 13 und Nevirapin 14

Die Entwicklung von weiteren *NRTIs* und von allosterischen Inhibitoren der Reverse-Transkriptase (*NNRTI: non-Nucleosidic Reverse Transcriptase Inhibitors*) wie Efavirenz **13** und Nevirapin **14**, vor allem aber von Inhibitoren der HIV-Protease erweiterte das Spektrum der therapeutischen Möglichkeiten. Eine Kombinationstherapie von mindestens drei verschiedenen antiretroviralen Medikamenten führte zu den besten Ergebnissen. Mit der so genannten *HAAR*-Therapie konnte die Replikation des Virus entscheidend reduziert und die Anzahl der im Blut vorhandenen Viren drastisch gesenkt werden. Durch die Anwendung dieser Therapie kann sogar die Wiederherstellung des Immunsystems erreicht werden. Dies hat die HIV-Infektion zu einer über einen langen Zeitraum kontrollierbaren, chronischen aber letztendlich weiterhin unheilbaren Erkrankung gemacht.

Die Anwendung von *HAART* ist jedoch von zahlreichen Problemen begleitet. Die Protease-Inhibitoren besitzen zahlreiche Nebenwirkungen, und ihre schlechten pharmakokinetischen Eigenschaften erfordern eine hohe Dosierung. Die Kombination von verschiedenen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren mit einem Protease-Inhibitor, der zumeist noch mit Ritonavir *geboostert* ist, führt zu komplexen Wechselwirkungen der Medikamente, und die effektive Anwendung der Therapie erfordert einen sehr hohen Aufwand.

Trotz des großen Erfolges der *HAAR*-Therapie ist es nicht möglich, eine vollständige Eradikation des Virus zu erreichen. Ein großes Problem stellt die Anreicherung des Virus in Kompartimenten des Körpers dar, die durch die Medikamente nicht erreicht werden können. Die meisten Protease-Inhibitoren gelangen nicht in das Zentrale Nervensystem, weil dieses durch die Blut-Hirn Schranke geschützt ist. Die *HAAR*-Therapie greift nur in die Replikation des Virus ein. Infizierte CD4-Zellen, die Viren produzieren, sterben jedoch schnell ab, während infizierte ruhende CD4-Zellen dagegen deutlich langlebiger sind. Sie können auch nach Jahren neue Viren produzieren, wenn sie aktiviert werden. Man schätzt den Zeitraum, in

dem die HIV-Infektion in einzelnen dieser Zellen überdauern kann, auf bis zu 70 Jahre. Ein großes Problem sind infizierte Makrophagen, die zwar nur sehr wenige Viren produzieren, dafür aber auch infiziert eine Lebenszeit von mehreren Jahren erreichen.^[26]

1.6 Mutationen des HI-Virus

RNA-Viren zeigen im Allgemeinen eine hohe Mutationsrate, die unter anderem durch RNA-Vervielfältigung und Transkription in DNA hervorgerufen wird. Im Fall des HI-Virus ist die hohe Replikationsrate ($\sim 10^8$ - 10^9 Viren pro Tag) und die Fehleranfälligkeit der viruseigenen Reverse-Transkriptase (~ 1 Fehler bei 10.000 Basen) für die hohe Mutationsrate verantwortlich. Diese Mutationsrate führt zur Entwicklung von Viruspopulationen, die eine dynamische Verteilung von verschiedenen Genomen besitzen (virale Quasispezies).^[27]

In diesem dynamischen Gleichgewicht induziert die Gabe von antiretroviralen Chemotherapeutika einen zusätzlichen Selektionsdruck, der solche Individuen auswählt, die eine geringere Empfindlichkeit gegenüber den gegebenen Wirkstoffen besitzen. Dies führt zur Entwicklung von Resistenzen. Unter der Kombinationstherapie ist die Replikation des Virus jedoch so weit unterdrückt, dass sich diese Resistenzen nur sehr langsam durchsetzen und eine Unterdrückung der Virusreplikation über Jahre dennoch möglich ist.

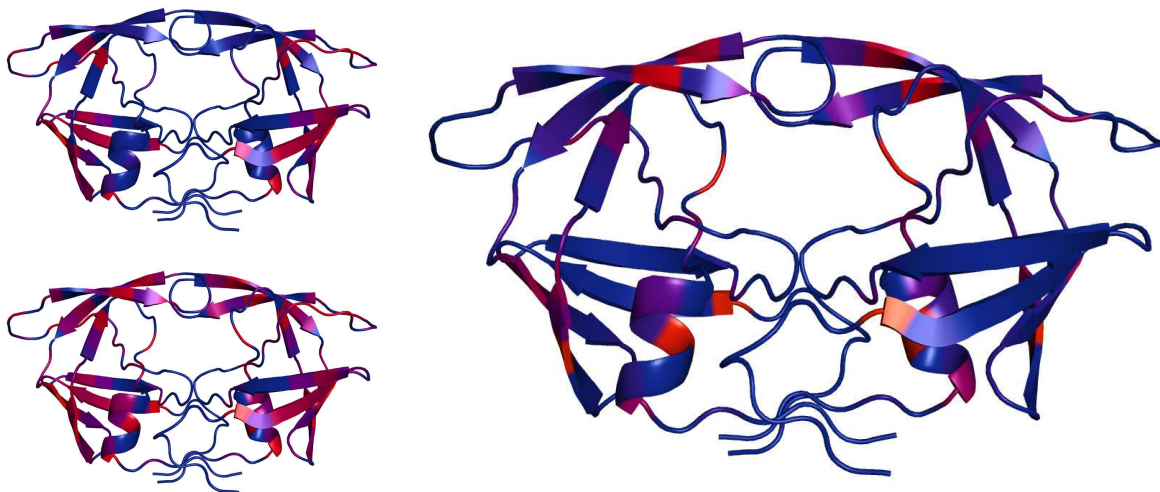


Abbildung 4: Mutationswahrscheinlichkeit der HIV-Protease^[28]; blau: geringe Wahrscheinlichkeit, rot: hohe Wahrscheinlichkeit; unbehandelte Patienten (links oben); Patienten unter HAART (links unten); durch HAART-induzierte Mutationen berechnet als Differenz der Mutationswahrscheinlichkeit mit und ohne HAART (rechts); Struktur: 1QBR^[29]

Es wurde gezeigt, dass das Virus mit verschiedenen Arten von Mutationen auf den zusätzlichen Selektionsdruck reagiert. Im Folgenden wird jedoch nur auf die die HIV-Protease betreffenden Aspekte eingegangen. Durch Sequenzierung des viralen Erbgutes aus HIV-positiven Patienten, die noch nicht mit antiretroviralen Medikamenten therapiert worden

waren, konnte gezeigt werden, dass mindestens 36% der Aminosäuren der Protease variabel sind. Diese Mutationen finden sich hauptsächlich im äußeren Bereich des Enzyms, die Dimer-Kontaktfläche und die Bindetasche sind jedoch konserviert (Abbildung 4 links oben). Unter dem Einfluss von HAART werden noch weitere Mutationen und insgesamt eine größere Wahrscheinlichkeit von Mutationen beobachtet (Abbildung 4, links unten). Diese weiteren Mutationen (Abbildung 4, rechts) befinden sich nun auch in der Bindetasche und im *Flap*-Bereich. Durch eine Mutation direkt in der Bindetasche der HIV-Protease wird die Bindungsaffinität der Inhibitoren gesenkt. Durch Mutationen im *Flap*-Bereich wird wahrscheinlich die Bindungskinetik der Inhibitoren beeinflusst. Ein Austausch von Aminosäuren an den Spaltstellen der *gag*- und *pol*-Polyproteine tritt als sekundäre Mutation auf; wahrscheinlich wird durch sie die katalytische Effizienz der mutierten Protease gesteigert.^[27]

Die Affinität der einzelnen Protease-Inhibitoren kann durch Punktmutationen erheblich gesenkt werden. So konnten Aminosäuren identifiziert werden, deren Austausch bei Therapie mit bestimmten Inhibitoren vermehrt auftritt. Zwischen den unterschiedlichen Protease-Inhibitoren besteht zwar keine generelle Kreuzresistenz, in der Akkumulation von mehreren Mutationen liegt aber eine große Gefahr des Scheiterns der antiretroviralen Therapie.^[6] Abbildung 5 zeigt Mutationen, bei denen die Kombination aus vier ausreicht, um zu einer Resistenz gegenüber allen zugelassenen Inhibitoren zu führen.^[30]

L	M	I	V	I	L
10	46	54	82	84	90
F	I	V	A	V	M
I	L	M	F		
R		L	T		
V			S		

Abbildung 5: Mutationen innerhalb des HIV-Protease-Gens, bei deren Kombination Multiresistenz auftreten kann^[30]

Von diesen Mutationen befinden sich nur Valin 82 und Isoleucin 84 direkt in der Bindetasche. Der Austausch beider Aminosäuren beeinflusst die Größe und Form der Bindetasche entscheidend. Die Seitenkette des Isoleucins 84 bildet die Grenze zwischen der S_1 - und der S_2' -Tasche; eine Mutation zum kleineren Valin führt zu einem deutlichen Zuwachs an Volumen der Bindetasche. Die Protease-Inhibitoren verlieren sowohl in der S_1 - als auch in der S_2' -Tasche und durch die Symmetrie des Enzyms auch in der S_1' - und S_2 -Tasche an *Van der Waals*-Kontakten. Dadurch nimmt die Affinität der Inhibitoren deutlich ab, während die Aktivität der Protease gegenüber ihren Substraten nicht so stark beeinflusst wird. Da die

zugelassenen Inhibitoren alle einen sehr ähnlichen Bindungsmodus zeigen, bewirkt diese Mutation für alle einen Verlust an Aktivität.

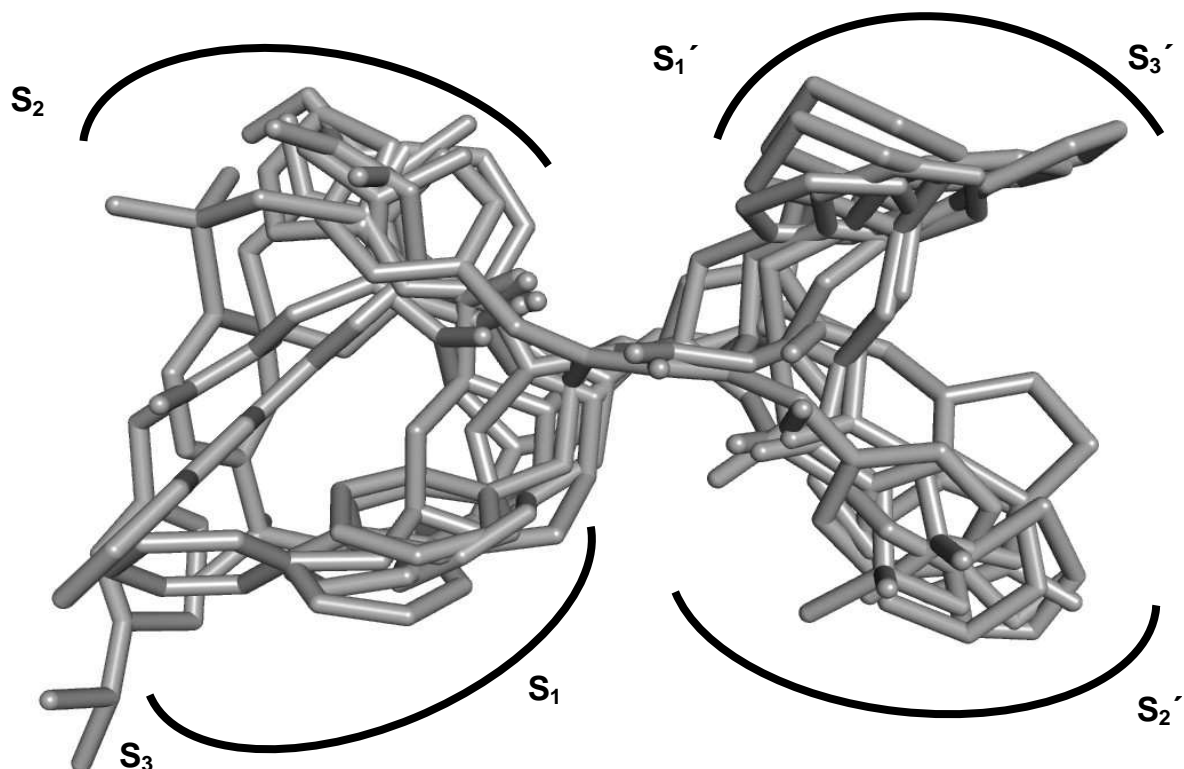


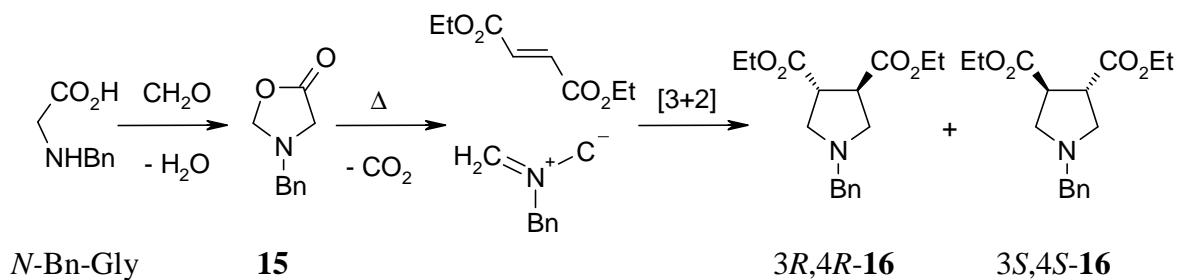
Abbildung 6: Überlagerung der Röntgenstrukturen der HIV-Protease-Inhibitoren Saquinavir (1, 1MTB), Ritonavir (2, 1HXW), Amprenavir (3, 1HPV), Nelfinavir (4, 1OHR), Indinavir (5, 2BPX), DMP-323 (6, 1QBS) und Tipranavir (7, 1D4Y)

Abbildung 6 zeigt eine Überlagerung der Röntgenstrukturen der Protein-Inhibitor-Komplexe einiger HIV-Protease-Inhibitoren. Trotz der strukturellen Diversität lässt sich eine große Ähnlichkeit der Bindungsmodi erkennen. Ausgehend von der katalytischen Dyade erfolgt die Ausrichtung der Reste für die S_1 - und S_1' -Taschen bei allen Inhibitoren auf ähnliche Weise, und danach erfolgt eine Verzweigung in die S_2 - und S_2' -Taschen. Diese große Ähnlichkeit der aktiven Konformation erklärt das Auftreten von Kreuzresistenzen. Der Bereich des Isoleucin 84/84' zwischen der S_1 - und S_2' -Tasche bzw. S_1' - und S_2 -Tasche wird von keinem der Inhibitoren direkt adressiert. Der Verlust an Oberflächenkontakten bei einer Mutation des Isoleucins zu Valin bewirkt daher bei allen Inhibitoren auch einen Verlust an Affinität. Somit ist nach wie vor Bedarf an Inhibitoren vorhanden, die neue Bindungsmodi mit der Protease eingehen.

2 Aufgabenstellung

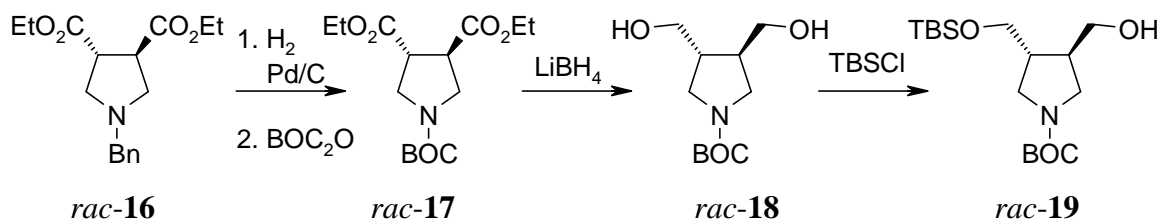
2.1 Ausgangspunkt

In einer Kooperation zwischen der *Bayer AG* und der Arbeitsgruppe *Klebe* wurden 3,4-disubstituierte Pyrrolidine als HIV-Protease-Inhibitoren entwickelt.^[31, 32] Als Startmaterial wurde *N*-Benzylglycin verwendet, welches mit Formaldehyd zunächst zum 3-Benzyl-oxazolidin-5-on **15** kondensiert wurde, das unter den gegebenen Reaktionsbedingungen decarboxylierte. Das dadurch gebildete Azomethin-Ylid reagiert in einer [3+2]-Zykloaddition mit Diethylfumarat zum racemischen Gemisch der *trans*-konfigurierten *N*-Benzyl-Pyrrolidine *rac*-**16** (Schema 12).^[33] Aufgrund des frühen Übergangszustandes verlaufen solche Reaktionen mit guter relativer Stereokontrolle durch die Substrate.^[34] Die Konfiguration der Substituenten am Pyrrolidin-Ring kann so durch die *trans*-konfigurierte Doppelbindung des Dipolarophils erreicht werden.



Schema 12: Darstellung von racemischen *trans*-3,4-disubstituierten Pyrrolidinen *rac*-**16** mittels [3+2] Zykloaddition

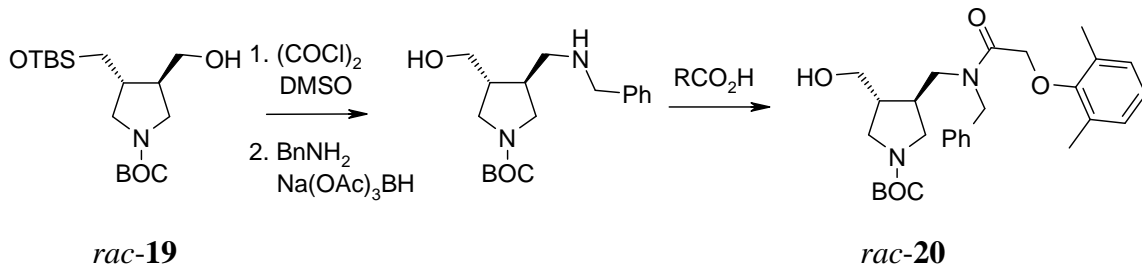
Die Benzyl-Schutzgruppe des Pyrrolidins *rac*-**16** wurde anschließend durch eine BOC-Schutzgruppe ersetzt und der Ester **17** zum Alkohol **18** reduziert. Die Desymmetrisierung des C_2 -symmetrischen Diols erfolgte durch selektive Reaktion einer der beiden symmetrie-äquivalenten Hydroxylfunktionen mit einem Silylchlorid zum Silylether **19** (Schema 13).



Schema 13: Darstellung des mono-silylgeschützten zentralen Synthesebausteins *rac*-**19** (TBS=^tBuMe₂Si)

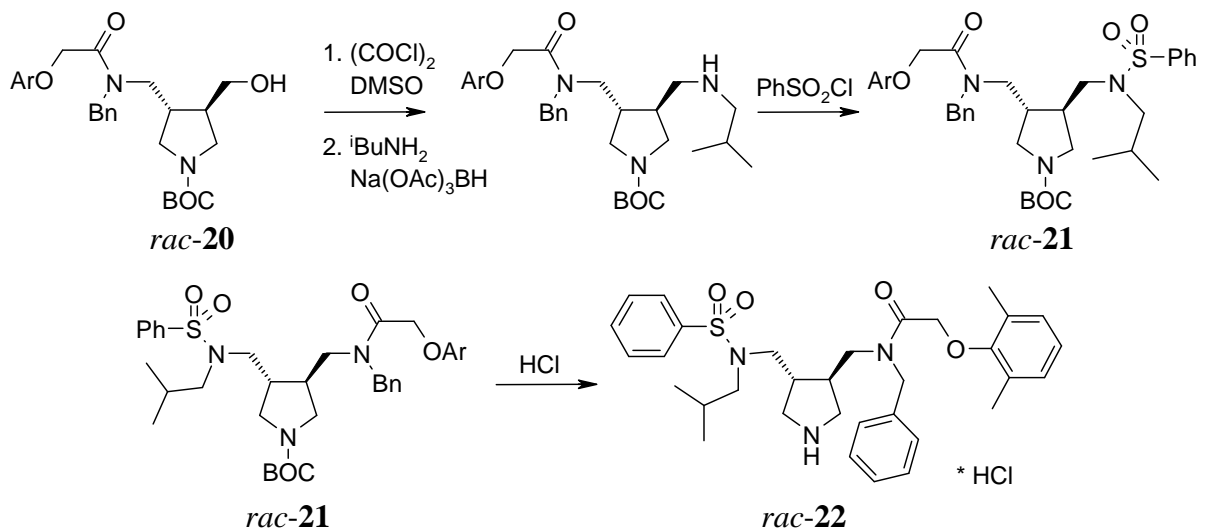
Die verbleibende freie Hydroxylfunktion wurde nun mittels einer *Swern*-Oxidation zum Aldehyd umgesetzt und durch sich anschließende reduktive Aminierung in das Benzylamin überführt. Bei der Aufarbeitung wurde die Silyl-Schutzgruppe unter sauren Bedingungen

entfernt. Die Reaktion mit dem aktivierten Phenoxyessigsäurederivat erfolgte selektiv an der Amino-Gruppe zum Amin **20** (Schema 14).



Schema 14: Dekorierung von *rac*-19 mit Seitenketten zur Adressierung der Subtaschen der HIV-Protease (TBS=^tBuMe₂Si)

Durch erneute *Swern*-Oxidation der Hydroxylgruppe zum Aldehyd und reduktiver Aminierung mit Isobutylamin wurde die zweite Aminofunktion eingeführt, die mit Benzolsulfonsäurechlorid in das Sulfonamid **21** überführt wurde. Nach Abspaltung der Schutzgruppe im Säuren konnte das racemische Gemisch des Inhibitors *rac*-**22** erhalten werden (Schema 15). Die Darstellung erfolgte über 10 Stufen in einer Gesamtausbeute von 17%.



Schema 15: Darstellung des Inhibitors *rac*-22 (Ar = 2,5-Dimethylphenyl)

Aus einer Serie von fünf Verbindungen, die in analoger Weise dargestellt wurden, zeigte das racemische Gemisch des Derivates **22** im Assay gegenüber der HIV-Protease mit einem IC₅₀-Wert von 2.2 μM die höchste Affinität.

Es war möglich, Kristalle des Protein-Inhibitor-Komplexes aus dem racemischen Gemisch des Inhibitors **22** zu erhalten und mittels Röntgenstrukturanalyse die Kristallstruktur mit einer Auflösung von 1.5 Å zu bestimmen. Die Struktur zeigte das *R,R*-Enantiomer des 3,4-disubstituierten Pyrrolidins in der Bindetasche. Die Verbindung zeigt einen neuartigen Bindungsmodus: Die endozyklische Aminofunktion des Pyrrolidins nimmt die zentrale Position zwischen den katalytischen Aspartaten ein, wobei wahrscheinlich in dieser Situation

der Stickstoff protoniert und die katalytische Dyade zweifach deprotoniert vorliegt.^[35] Von den Akzeptor-Funktionen, die mit einem *Flap*-Wassermolekül in Wechselwirkung treten sollten, bildet jedoch nur eines der Sulfonyl-Sauerstoffatome eine direkte Wasserstoffbrücke zum Hauptketten-NH des Isoleucins 50' aus. Das Hauptketten-NH von Isoleucin 50, das in anderen Komplexen entweder direkt oder verbrückt über ein *Flap*-Wasser Wechselwirkungen mit dem Liganden eingeht, stellt hier überraschenderweise eine Wasserstoffbrücke zum Carbonyl-Sauerstoffatom des Isoleucins 50' her (Abbildung 7).

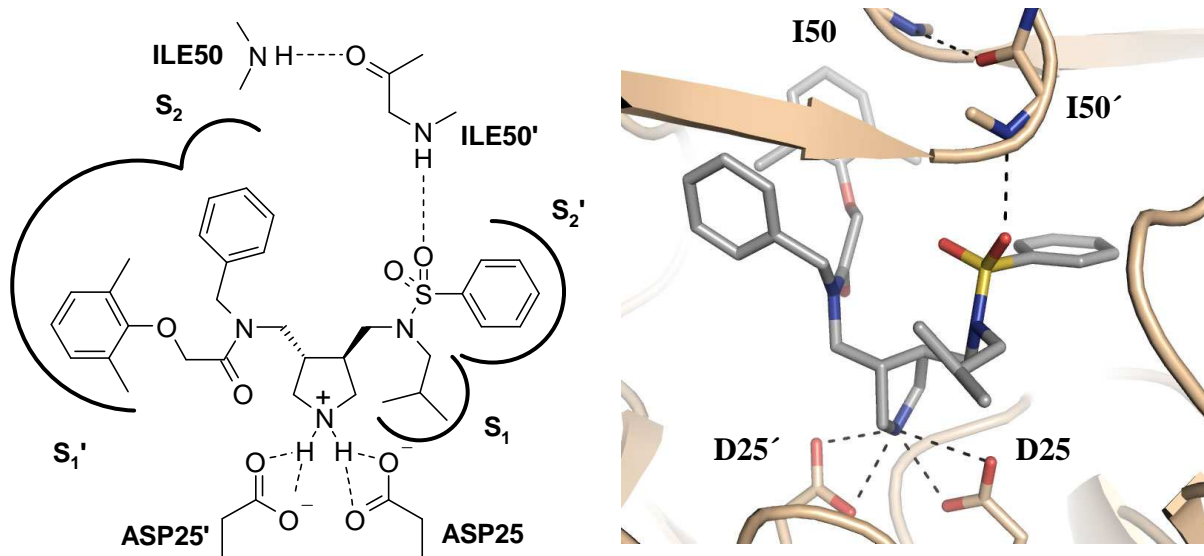
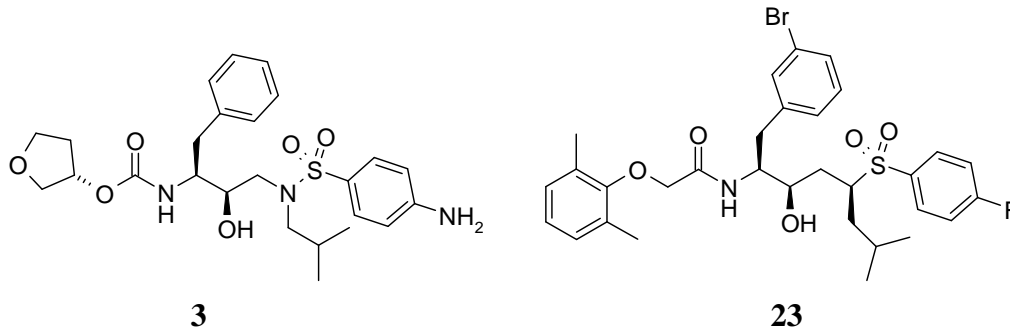


Abbildung 7: Schematische Darstellung des bestimmten Bindungsmodus von *R,R*-22 (links); Röntgenstruktur des Protein-Inhibitor Komplexes (rechts)

Die S_1 -Tasche der Protease wird durch den Isobutylrest, die S_2' -Tasche durch den Phenylrest adressiert. Der *Flap*-Bereich des Enzyms ist stark verschoben und vergrößert so den entsprechenden Teil der Bindetasche. Der Dimethylphenoxyrest besetzt die S_1' -Tasche, ragt aber zu einem Teil ins Solvenz, der *N*-Benzylrest nimmt eine Position zwischen der S_1' - und S_2 -Tasche ein, wobei die S_2 -Tasche praktisch unbesetzt bleibt.

Als primäre und stärkste Wechselwirkung zwischen Liganden und Protein ist vermutlich die Salzbrücke zwischen der katalytischen Dyade und dem endozyklischen Amin anzusehen. Durch das starre Gerüst und den relativ großen Abstand der Akzeptorfunktionen kann nur eine von ihnen direkte Wechselwirkungen mit dem *Flap*-Bereich eingehen. Das Sulfonamid besitzt eine größere Flexibilität und kann so eine Wasserstoffbrücke mit dem Hauptketten-NH eingehen und gleichzeitig den Phenylring in die S_2 -Tasche und den Isobutylrest in die S_1' -Tasche ausrichten. Die Carboxamidgruppe ist durch die aufgrund des partiellen Doppelbindungscharakters der C-N-Bindung bedingte starre Struktur und die abweichende Ausrichtung des Restes am Stickstoff zu einer solchen Wechselwirkung nicht in der Lage und

bleibt somit ohne polaren Wechselwirkungspartner. Der Abstand der Akzeptorfunktionen war ursprünglich gewählt worden, um ein *Flap*-Wassermolekül zu komplexieren.



Schema 16: Strukturen der zum Vergleich verwendeten Liganden: Amprenavir **3**: Struktur 1HPV; Amidhydroxysulfon **23**: Struktur 1XL5

Eine Analyse der Struktur und der Vergleich mit Kristallstrukturen peptidomimetischer Inhibitoren wie einem Amidhydroxysulfon **23** (Struktur 1XL5)^[36] und Amprenavir **3** (Struktur 1HPV)^[37] zeigt deutliche Abweichungen in der Proteinstruktur (Tabelle 2).

Struktur	Alle C _α	<i>Flap A</i>	<i>Flap B</i>	<i>S1-Loop</i>	<i>S1'-Loop</i>
		M46-I54	M46'-I54'	G78-N83	G78'-N83'
1XL2-1XL5	1.01	2.68	1.39	0.93	1.36
1XL2-1HVP	0.94	2.60	0.95	0.50	1.28
1XL5-1HVP	0.78	0.95	0.93	0.68	0.45

Tabelle 2: Mittlerer Abstand der C_α-Atome ausgewählter Bereiche der Kristallstrukturen des Inhibitors **22** (1XL2), des Amidhydroxysulfons **23** (1XL5) und Amprenavir **3** (1HPV) in Å

Betrachtet man die gesamte Proteinkette, so sind sich die Strukturen sehr ähnlich, und der mittlere Abstand der C_α-Atome liegt im Bereich von einem Å. Im Bereich des *Flaps A*, der im Komplex von **22** (1XL2) keine Wechselwirkungen mit dem Liganden eingeht, wird jedoch mit 2.60-2.68 Å ein deutlich größerer Abstand beobachtet. Eine genauere Betrachtung zeigt, dass die Aminosäuren, die die β-Haarnadelstruktur des *Flaps* ausbilden, mit 2.96-4.50 Å die größte Abweichung zeigen (Diagramm 1).

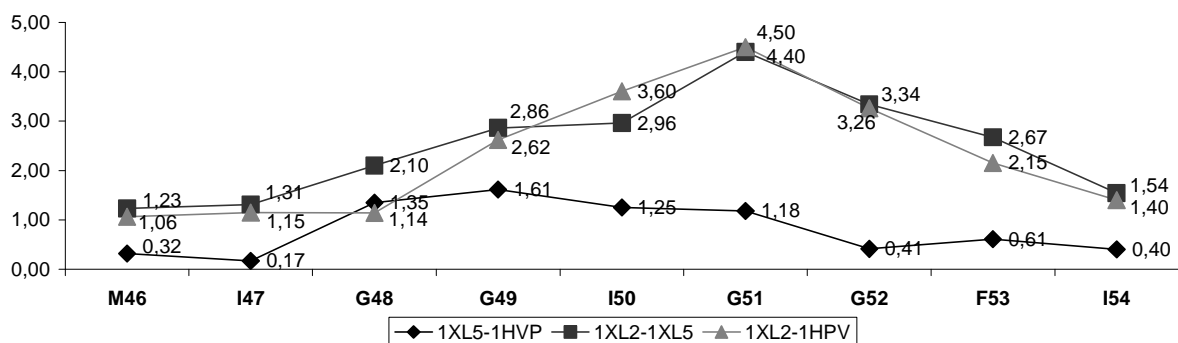


Diagramm 1: Abstand der C_α-Atome des *Flaps A* in den Kristallstrukturen des Inhibitors **22** (1XL2), des Amidhydroxysulfons **23** (1XL5) und Amprenavir **3** (1HPV) in Å

Die *Flap*-Region der Protease wird im Allgemeinen als sehr mobiler Bereich angesehen, doch auch im Bereich des konformativ fixierten S_1' -Loops zeigt sich eine deutliche Abweichung von der Struktur der peptidomimetischen Inhibitoren. Der mittlere Abstand der C_α -Atome beträgt 1.28-1.36 Å. Eine genauere Betrachtung offenbart, dass Prolin 81' die größte räumliche Verschiebung im Vergleich zu den Strukturen der peptidomimetischen Inhibitoren hat (Diagramm 2).

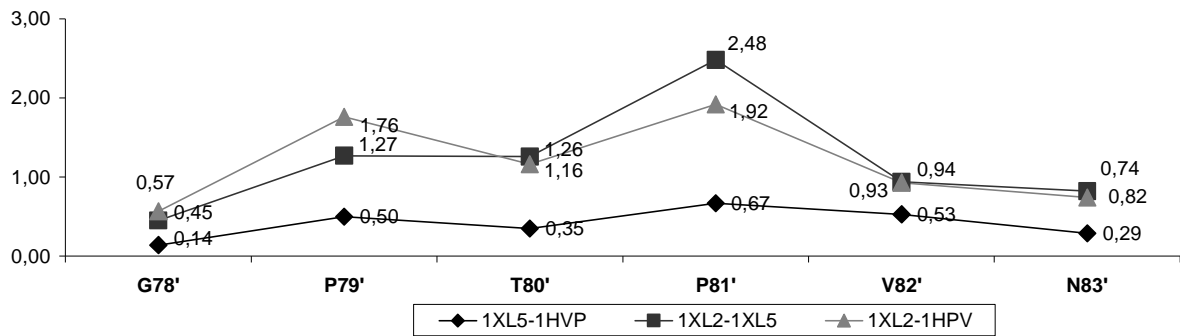


Diagramm 2: Abstand der C_α -Atome des S_1' -Loops in den Kristallstrukturen des Inhibitors 22 (1XL2), des Amidhydroxysulfons 23 (1XL5) und Amprenavir 3 (1HPV) in Å

Die Divergenz in diesen Bereichen des Proteins von der Struktur peptidomimetischer Inhibitoren scheint durch den Liganden induziert zu werden. Der Benzylrest nimmt die Position der Seitenkette von Isoleucin 50 ein, während sich der Dimethylphenoxyrest zwischen den S_1' -Loop und den *Flap* A schiebt (Abbildung 8, links). Dabei werden *Van der Waals*-Kontakte zum C5 des Prolins 81' und zur Seitenkette des Isoleucins 50 ausgebildet. Der Aromat geht eine π -Stacking-Wechselwirkung mit der Carbonylgruppe des Glycins 49 ein (Abbildung 8, rechts).

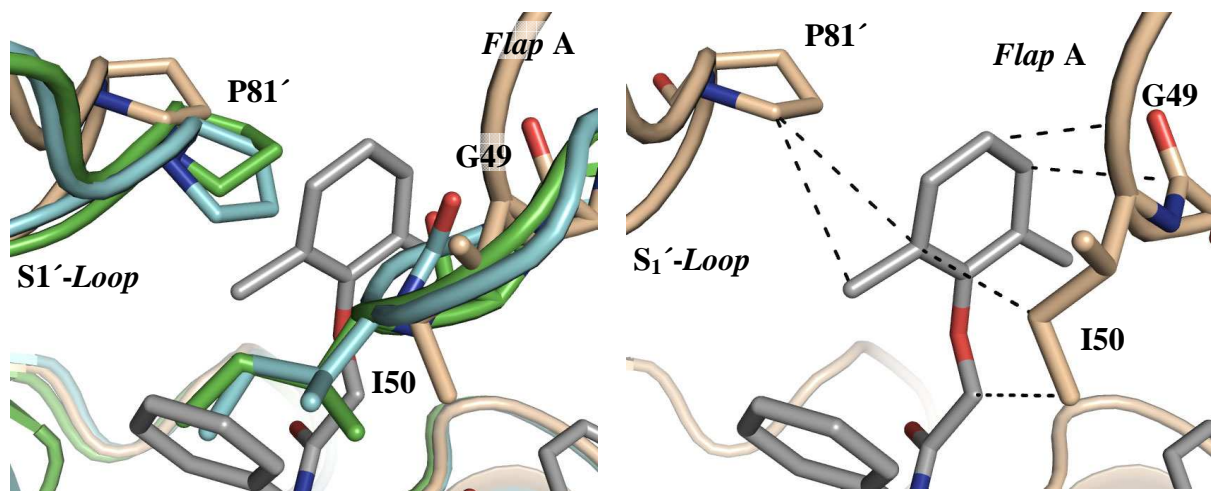


Abbildung 8: Links: Überlagerung mit der Struktur des Liganden 22 (grau) mit der Struktur des Amidhydroxysulfons 23 (1XL5, hellblau) und Amprenavir 3 (1HPV, grün), Liganden 3 und 23 zur besseren Übersicht nicht gezeigt; Abstände bis zu 4 Å zum Liganden in diesem Bereich der Struktur von 22 (rechts)

Auch die Art der Adressierung der S_1 - und S_2' -Taschen weicht beim Pyrrolidin **22** von peptidischen Grundgerüsten ab. Die Protease bindet lineare Peptide und erkennt die Seitenketten der Aminosäuren in den Subtaschen. Somit erfolgt zumeist eine Verzweigung von einem Grundgerüst erst in die S_1 - und dann in die S_2 -Tasche bzw. erst in die S_1' - und dann in die S_2' -Tasche. Das Pyrrolidin **22** zeigt eine neuartige Variante die S_1 -Tasche zu adressieren; der *N*-Isobutylrest des Sulfonamids besetzt diese Tasche aus einer anderen Richtung.

Durch die Aufklärung der Röntgenstruktur des Pyrrolidins **22** im Komplex mit der HIV-Protease konnte der Bindungsmodus aufgeklärt und die vom Enzym bevorzugte Stereochemie am Pyrrolidinring bestimmt werden. Das Enzym zeigt in dieser Struktur eine bisher unbekannt Konformation, die von der anderer Protein-Inhibitor-Komplexstrukturen der HIV-Protease vor allem im Bereich der *Flap*-Region und des S_1' -*Loops*, deutlich abweicht. Aufbauend auf der Analyse dieser Struktur können mögliche Variationen des Inhibitors **22** zur Aufklärung der zugrunde liegenden Prinzipien für diese Art der Bindung vorgeschlagen und eine Strategie zur weiteren Optimierung des Inhibitors erarbeitet werden.

2.2 Aufgabenstellung der Arbeit

In dieser Arbeit sollten ausgehend von der Struktur **22** neuartige Inhibitoren der HIV-Protease unter Beibehaltung des Pyrrolidingrundgerüsts als Leitstruktur entwickelt werden. Die Besetzung der Taschen sowie die Adressierung des *Flap*-Bereiches des Enzyms sollten durch geeignete Strukturvariationen untersucht und möglichst optimiert werden.

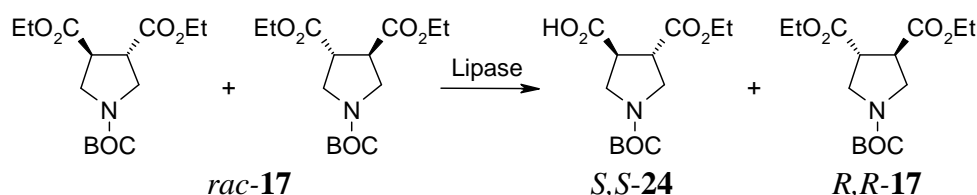
Die Darstellung von **22** erfolgte in zehn linearen Stufen und ermöglichte die Variation aller Seitenketten des Inhibitors. Diese Synthese führte jedoch nur zum racemischen Gemisch der Inhibitoren, das sich auch durch HPLC an einer chiralen Phase nicht trennen ließ. Da zueinander enantiomere Moleküle in biologischen Systemen zumeist unterschiedliche Aktivität zeigen, finden in der Praxis zunehmend nur noch enantiomerenreine Wirkstoffe Anwendung.^[38] Weil zumeist nur ein Stereoisomer für die Wirkung verantwortlich ist, ist dessen Verwendung in vielen Fällen vorteilhaft, da für gleiche Wirkung niedrigere Dosen erforderlich und deshalb geringere Nebenwirkungen zu erwarten sind. Dieser Trend wirkt sich auch auf bereits zugelassene Medikamente aus. In der pharmazeutischen Industrie wird versucht, aus racemischen Präparaten neue, enantiomerenreine Wirkstoffe zu entwickeln (*chiral switch*).^[39] Da die Zulassungsbehörden die toxikologische und pharmakologische Charakterisierung aller Stereoisomere in einem Gemisch verlangen, liegt in der Zulassung von Einzelverbindungen mit definierter Stereochemie gegenüber Gemischen nicht nur der Vorteil des geringeren Forschungsaufwandes, sondern auch der der Minimierung des Risikos von unerwarteten Komplikationen.

Im Zuge dieser Arbeit sollte daher für die Darstellung der neuen Inhibitoren eine enantioselektive Synthese erarbeitet werden. Die dargestellten Inhibitoren sollten in Kooperation mit Jark Böttcher auf ihre biologische Aktivität gegenüber der HIV-Protease untersucht und im Zuge des strukturbasierten Wirkstoffdesigns iterativ verbessert werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Möglichkeiten zur stereoselektiven Synthese von Pyrrolidinen des Typs 22

Die Synthese des Inhibitors **22** konnte unter Kontrolle der relativen Konfiguration der Substituenten am Pyrrolidin-Ring erreicht und das Produkt als racemisches Gemisch erhalten werden. Die Diastereoselektivität wird durch die *trans*-Konfiguration des Dipolarophils während der Zykladdition gesteuert. In der Literatur ist die kinetische Racematspaltung auf Basis solcher Systeme beschrieben, die dann zu enantiomerenreinen Verbindungen führt. Eine Racematspaltung von *N*-Benzyl bzw. ungeschützten Pyrrolin-diestern mittels Schweineleberesterase führte jedoch nur zu einer moderaten Stereoselektivität bei Hydrolyse des *R,R*-Enantiomers.^[40] Die Hydrolyse des Gemisches *rac*-**17** zum Halbester *S,S*-**24** mittels einer Lipase wurde mit hoher Selektivität und Ausbeute beschrieben.^[41]



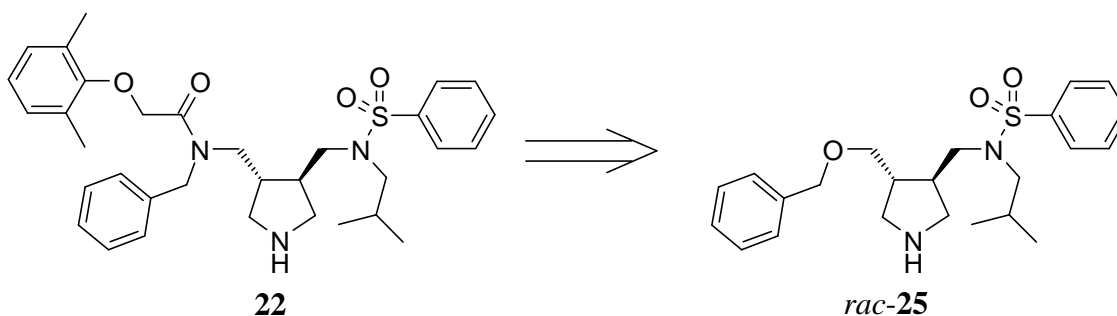
Schema 17: Kinetische Racematspaltung von *rac*-**17** mittels Hydrolyse durch eine Lipase^[41]

Die Trennung des racemischen Gemisches von **17** mittels der beschriebenen enzymatischen Katalyse wurde nicht unternommen, da die entsprechende Ausstattung zum Reproduzieren der publizierten Bedingungen nicht zur Verfügung stand und die beschriebene Lipase nur zu einem sehr hohen Preis kommerziell erhältlich war. Somit musste die Synthese des Inhibitors **22** zur Darstellung analoger Moleküle verwendet werden, die aus diesem Grund nur als racemische Gemische erhalten werden konnten.

3.2 Variation der Struktur des Pyrrolidins 22

Die Analyse des Bindungsmodus des Pyrrolidins **22** zeigte eine starke Verzerrung im Bereich des *Flaps*, der keine Wasserstoffbrücken zum Ligand aufbaut (M46-I54) und im Bereich des *S*₁'-Loops (G78'-N83'). In der Struktur befindet sich der 2,5-Dimethylphenoxyrest zwischen diesen beiden Bereichen und bildet *Van der Waals*-Kontakte zum Prolin 81' des *S*₁'-Loops sowie zu Glycin 49 und Isoleucin 50 des *Flaps A* aus (Abbildung 8). Diese Beobachtung ließ die Vermutung zu, dass der große aromatische Substituent für diese Verzerrung in der Proteinstruktur verantwortlich ist. Da eine Anpassung des Proteins zumeist die Aufwendung von Energie erfordert, sollte der Energiegewinn bei Bindung des Liganden dadurch verringert

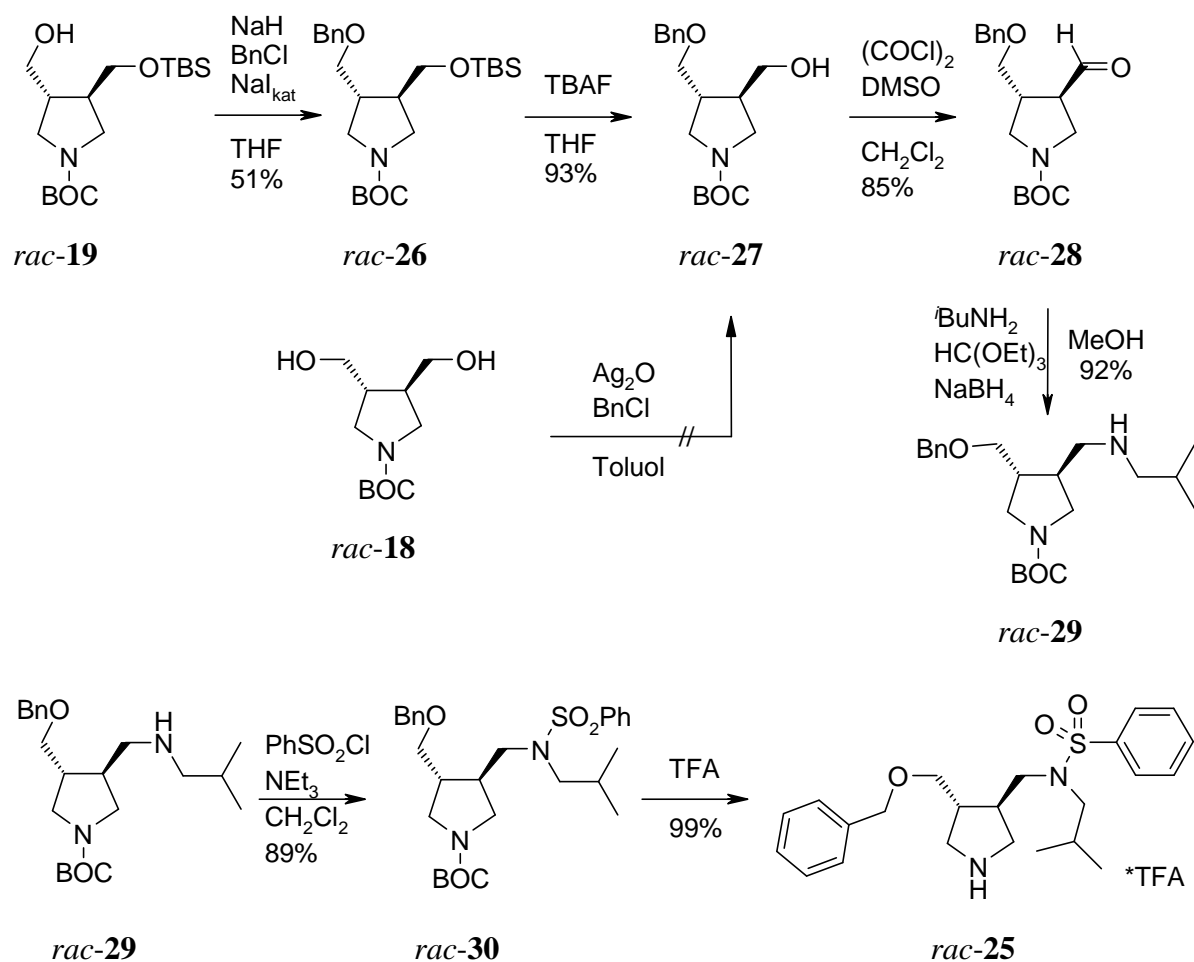
werden. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Struktur des Pyrrolidins **22** variiert und der entsprechende Carbonsäurerest entfernt. Um keinen zusätzlichen Wasserstoffbrückendonator einzuführen und die anderen Veränderungen der Struktur von **22** möglichst gering zu halten, wurde der Benzylamin-Substituent durch einen Benzyletherrest ersetzt. Auf diesem Weg gelangt man zur Zielstruktur **25** (Schema 18).



Schema 18: Variation der Struktur von 22 durch Entfernen des Carboxamids zu 25

Für die Darstellung von **25** sollte der zur Synthese von **22** verwendete Alkohol **18** als Ausgangspunkt dienen. Bei dem Versuch der selektiven Reaktion einer der symmetrieäquivalenten Hydroxylfunktionen mit Benzylchlorid zum Benzylether **27**, bei der Silberoxid als Base verwendet wird, konnte jedoch wider Erwarten nur das Ausgangsmaterial reisoliert werden.^[42]

Aus diesem Grund wurde ein zweistufiges Vorgehen zur Darstellung von **27** verfolgt. Der Silyl-geschützte Alkohol **19** wurde zunächst zum Benzylether **26** alkyliert und die Silylgruppe anschließend abgespalten. Analog der Synthese von **22** wurde der Alkohol nach *Swern* zum Aldehyd **28** oxidiert und eine reduktive Aminierung mit Isobutylamin zu **29** durchgeführt. Das sekundäre Amin **29** wurde mit Benzolsulfonsäurechlorid zum Sulfonamid **30** kondensiert und die BOC-Schutzgruppe im Säuren entfernt (Schema 19).



Schema 19: Darstellung des Inhibitors 25

Der Inhibitor **25** wurde von Jark Böttcher in einem kompetitiven Fluoreszenzassay^[32] auf seine Aktivität gegenüber der HIV-Protease getestet und zeigte einen IC₅₀ von 76 μM. Die Aktivität im Vergleich zur Ausgangsverbindung **22** hatte also um den Faktor 35 abgenommen.

Jark Böttcher gelang es dennoch, aus dem racemischen Gemisch des Inhibitors **25** einen Komplex mit der HIV-Protease zu kristallisieren und die Röntgenstruktur mit einer Auflösung vom 1.73 Å zu bestimmen. Der Bindungsmodus von **25** ist grundsätzlich ähnlich dem bei **22** beobachteten: In der Bindetasche des Komplexes befindet sich wie bei der Struktur von **22** das *R,R*-Enantiomer. Der Pyrrolidin-Stickstoff adressiert die katalytische Dyade, und eines der Sulfonyl-Sauerstoffatome bildet eine Wasserstoffbrücke zum Hauptketten-NH des Isoleucin 50' aus (Abbildung 9). Die Subtaschen des Enzyms werden hier jedoch anders besetzt als in der Struktur von **22**. Nur die S₁-Tasche wird vom Phenylrest des Inhibitors **25** adressiert, während die anderen Taschen unbesetzt bleiben (Abbildung 10, links).

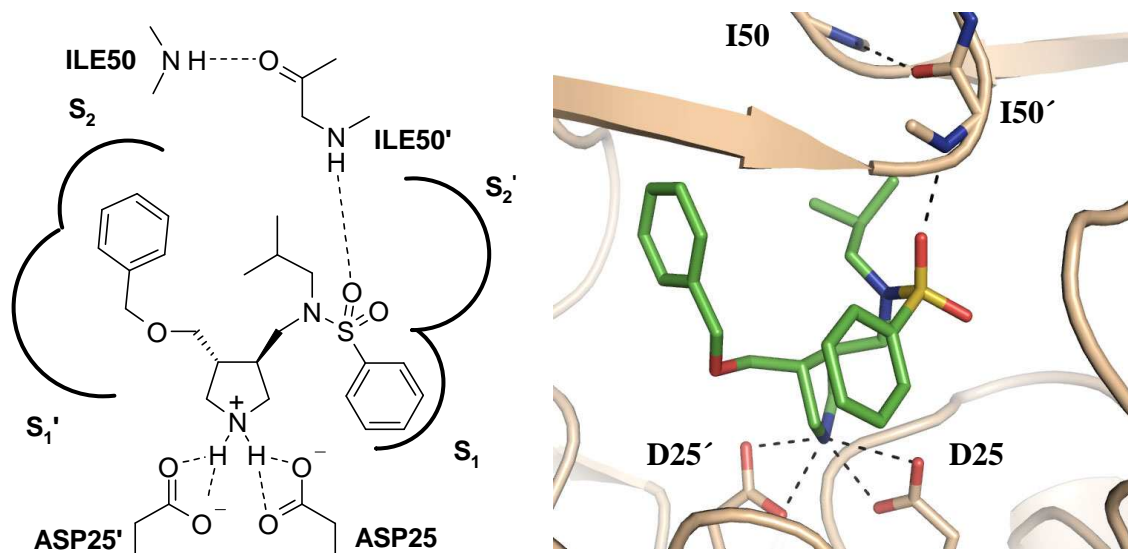


Abbildung 9: Schematische Darstellung des bestimmten Bindungsmodus von **R,R-25** (links); Röntgenstruktur des Protein-Inhibitor Komplexes (rechts)

Die beobachteten polaren Wechselwirkungen, die durch **25** ausgebildet werden, gleichen jedoch dennoch denen von **22**. In der Struktur des Proteins wird außerdem die gleiche Verzerrung im Bereich des *Flaps A* und des *S₁'-Loops* beobachtet, obwohl der 2,5-Dimethylphenoxyrest nicht mehr vorhanden ist (Abbildung 10, rechts).

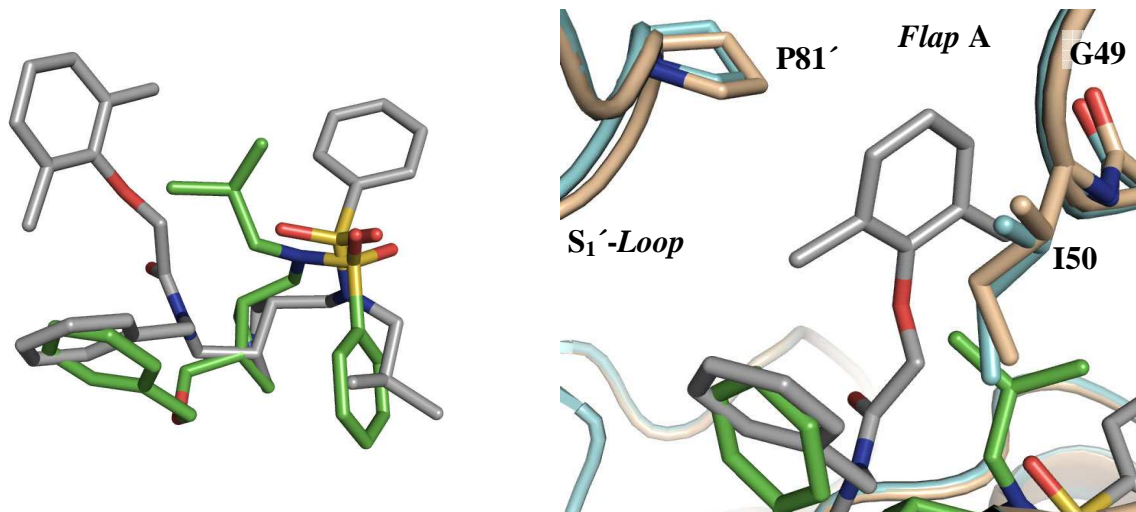


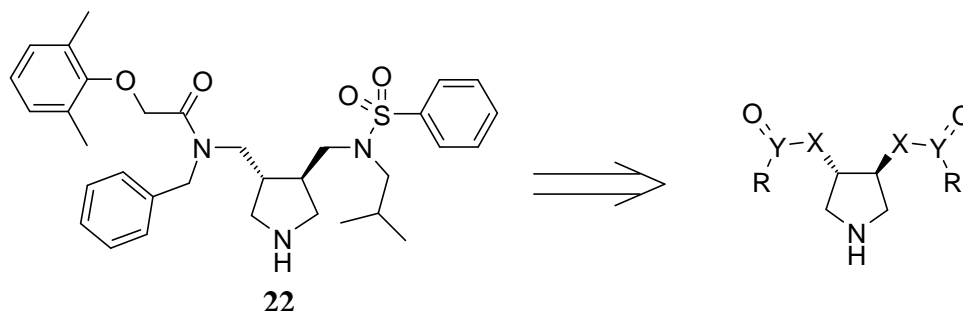
Abbildung 10: Vergleich der Röntgenstrukturen von **22** (grau, Protein braun) und **25** (grün, Protein hellblau); Vergleich der Proteinstruktur im Bereich des *Flap A* und des *S₁'-Loops* (rechts)

Der 2,5-Dimethylphenoxyrest kann somit nicht allein für die Verzerrung in der Struktur des Proteins, die in der Kristallstruktur von **22** beobachtet wird, verantwortlich sein. Es ist anzunehmen, dass nur solche Wechselwirkungen, die bei **22** und **25** gleichermaßen beobachtet werden, dafür ursächlich sind: Die Bindung des Pyrrrolidins an die katalytische Dyade, die Wechselwirkung des Sulfons mit dem Isoleucin 50' und die Position des Benzylrestes. Es ist unwahrscheinlich, dass die zentrale Bindung des Pyrrrolidin-Rings für die Verzerrung

verantwortlich ist, da dieser Bereich des Proteins nicht in direkte Wechselwirkungen einbezogen wird, die signifikant von der Bindung substratanaloger Inhibitoren abweicht. Die Inhibitoren haben durch die frei drehbaren Methylengruppen die Möglichkeit, trotz der Fixierung des zentralen Rings die Seitenketten günstig auszurichten, ohne eine Reorganisation des Proteins erforderlich zu machen. Die Position der Benzylgruppe liegt dem S_1' -Loop am nächsten, ist aber wahrscheinlich ebenfalls nicht für die Verzerrung verantwortlich, da sie bei **25** durch drei frei drehbare Bindungen mit dem Grundgerüst verknüpft ist. Da die Benzylgruppe in **25** an das Stickstoffatom der starren Amidstruktur gebunden ist, ist hier die Ausrichtung geringfügig verschieden. Der Phenyl-Ring nimmt in beiden Strukturen aber trotzdem eine sehr ähnliche Position ein. Somit ist wahrscheinlich die direkte Wasserstoffbrücke der Sulfonylgruppe des Inhibitors zum Hauptketten-NH des Isoleucin 50' für die Verzerrung verantwortlich. Diese Wechselwirkung fixiert den *Flap* B in dieser Position. Die Isoleucin-Seitenkette kann bei **22** *Van der Waals*-Kontakte zum Phenyl-Ring in der S_2' -Tasche ausbilden; im Fall von **25** ist diese Tasche nicht vom Ligand besetzt, sondern von der Seitenkette des Isoleucins ausgefüllt (Siehe Abbildung 10, links). In dieser Konformation kann sie günstige *Van der Waals*-Kontakte zur Isobutylgruppe des Liganden ausbilden. Eine solche Anordnung der Isobutylgruppe kann in der Struktur von **22** nicht eingenommen werden, da sich dort der Carbonsäureamidrest des Liganden befindet. Dies ist wahrscheinlich der Grund für die unterschiedliche Besetzung der S_1 -Tasche in den beiden Strukturen. Die beobachtete Verzerrung im Bereich des *Flap* A ist wahrscheinlich auf die Tatsache zurückzuführen, dass keiner der Liganden die Möglichkeit besitzt, eine Wasserstoffbrücke zum Isoleucin 50 auszubilden. Diese Wechselwirkung wird dann durch das Carbonyl-Sauerstoffatom des Isoleucin 50' unternommen. Da keiner der Liganden die S_1' - und S_2 -Tasche optimal ausfüllt, versucht sich das Protein so anzupassen, dass möglichst wenig hydrophobe Oberfläche dem Solvenz ausgesetzt verbleibt. Das Wechselwirkungsmuster des S_1' -Loops mit dem dahinter liegenden Bereich von Leucin 33 bis hin zum Methionin 36 verändert sich und ist wahrscheinlich für die abweichende Konformation des S_1' -Loops in beiden Strukturen verantwortlich. Der Inhibitor **22** besitzt mit seinem großen 2,5-Dimethylphenoxyrest die Möglichkeit, die Lücke, die durch die Verzerrung ausgebildet wird, gut auszufüllen. Diese zusätzlichen Wechselwirkungen erklären die bessere Affinität von **22** im Vergleich zu **25**. Welche energetischen Konsequenzen die Reorganisation des Proteins hat, lässt sich jedoch mit dem Vergleich der beiden Strukturen nicht beantworten. Da der Inhibitor **22** nur eine mittlere Affinität zeigt und eine weitere Optimierung aufgrund der

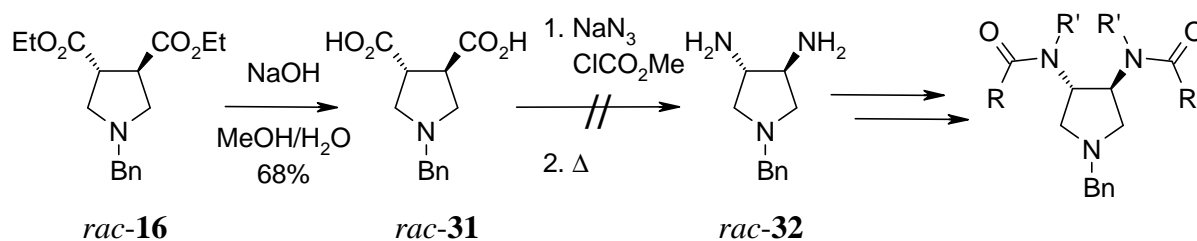
starken Proteinverzerrung wenig Potential zur Verbesserung in sich barg, lag eine Veränderung des Substitutionsmusters des Grundgerüsts nahe.

Die starke Verzerrung des *Flap*-Bereichs der Protease sowie die Konformation des Inhibitors ließen den Schluss zu, dass die Verzweigung zur Adressierung der Subtaschen des Enzyms zu weit entfernt vom Ring erfolgte. Die Akzeptorfunktionen waren zur Adressierung der beiden Hauptketten-NHs der Isoleucine 50/50' wahrscheinlich ebenfalls zu weit entfernt, um für beide eine gute Wechselwirkung zu ermöglichen.



Schema 20: Strategie für mögliche Strukturvariationen ausgehend von 22; X: O, NR, CR; Y: C, SO

Somit wurden als modifizierte Grundgerüste 3,4-*trans*-disubstituierte Pyrrolidine ausgewählt, die keine direkt am Ring befindliche Methylengruppen mehr in der Seitenkette tragen. Die Verbindungen sollten also möglichst die Verzweigung zur Adressierung der Subtaschen in Nachbarposition zum Pyrrolidin-Ring ermöglichen und die Akzeptorfunktionen sich in einer Position befinden, die näher zum Ring als bei **22** liegt, um günstigere Wechselwirkungen mit der *Flap*-Region des Enzyms zu erlauben (Schema 20). Aufgrund der besseren synthetischen Zugänglichkeit und der C_2 -Symmetrie der HIV-Protease wurden gezielt symmetrische Inhibitoren dargestellt.



Schema 21: Synthese von *trans*-3,4-Diamino-Pyrrolidinen mittels Curtius-Umlagerung

Eine Möglichkeit, ein solches System darzustellen, führt über das 3,4-Diaminopyrrolidin (*rac*-**32**), welches *N*-alkyliert und acyliert werden kann (Schema 21). Das Diamin **32** sollte aus dem Synthesewechselprodukt **16** durch eine Curtius-Umlagerung zugänglich sein. Der Ester wurde daher zunächst basisch verseift und die resultierende Dicarbonsäure **31** nach Aktivierung mit Chlorameisensäuremethylester in das Acylazid überführt und anschließend

erwärmt, um eine *Curtius*-Umlagerung durchzuführen.^[43] Es konnte jedoch kein gewünschtes Umlagerungsprodukt isoliert werden. Auch eine analoge Eintopfreaktion mit BOC-Azid führte nicht zur Bildung des angestrebten Umlagerungsproduktes.^[44]

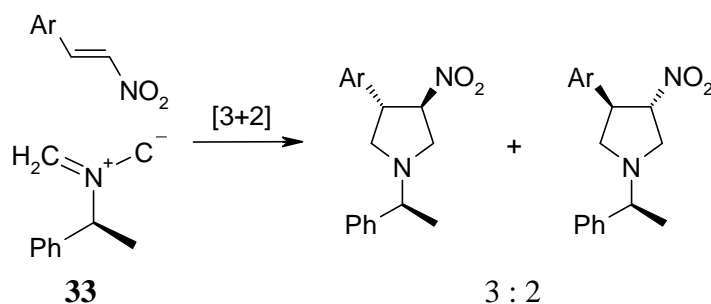
3.3 Alternative Zugangswege zum Inhibitorgrundgerüst

Da die angestrebte Funktionalisierung des Grundgerüsts und eine stereoselektive Reaktionsführung aufbauend auf der Synthese des Inhibitors **22** nicht durchführbar waren, mussten andere Möglichkeiten gefunden werden, um die gewünschten Verbindungen zu erhalten. Mögliche synthetische Zugangswege zu Pyrrolidinen werden im Folgenden kurz diskutiert.

3.3.1 Zugang zu Pyrrolidinen über [3+2] Zykladditionen

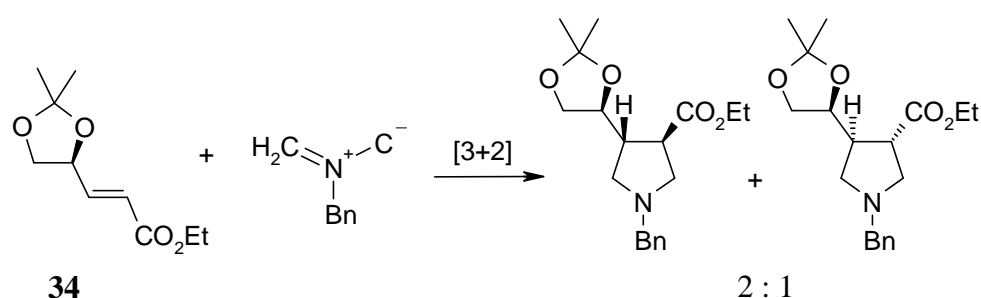
Zur Darstellung von Pyrrolidinen wird zumeist die [3+2]-Zykladdition von Azomethinyliden an aktivierte Doppelbindungen verwendet. Neuere Entwicklungen ermöglichen auch eine enantioselektive Reaktionsführung.^[34, 45] Die bisherigen Entwicklungen konzentrierten sich hierbei jedoch zumeist auf die Synthese von Prolinderivaten. Bei 3,4-disubstituierten Systemen lässt sich die relative Ausrichtung der Substituenten durch die Wahl des Dipolarophils bestimmen, die enantioselektive Reaktion ist jedoch schwierig. Zur Stereokontrolle wurde in der Literatur die Verwendung chiraler Dipole und Dipolarophile beschrieben, die eine diastereoselektive Reaktionsführung ermöglichen, sowie die Verwendung chiraler Katalysatoren.

Alle bis dato veröffentlichten Versuche, chirale Azomethinylide zu verwenden, führten jedoch nur zu einer geringen Stereokontrolle. Ein repräsentatives Beispiel aus der Literatur ist die Reaktion des von *S*-Phenylethylamin abgeleiteten Azomethinylids **33**, welches nur mit moderater Stereoselektivität reagiert. Durch eine weitere Substitution an der Methylgruppe des *N*-Alkylrestes konnte die Selektivität bis zu einem Diastereomerenverhältnis von 4:1 verbessert werden.^[46]



Schema 22: [3+2] Zykladdition des chiralen Azomethinylids **33**

Die Zahl der publizierten Arbeiten, mittels chiraler Dipolarophile eine gute Stereokontrolle bei solchen Zykoadditionen zu erreichen, ist deutlich größer als die Zahl der Arbeiten für chirale Dipole. Häufig wurden komplexe chirale Dipolarophile verwendet, und es konnten dabei gute Selektivitäten erreicht werden. Für diese Arbeit wurden jedoch nur Systeme betrachtet, die eine spätere Funktionalisierung zu den gewünschten Zielstrukturen und deren Variation ermöglichen. Ein Beispiel hierfür ist die Reaktion eines chiralen Acrylsäureesters **34** mit einem Azomethinylid, welches nur mit geringer Stereoselektivität erfolgt (Schema 23).^[47] Diese Strategie wurde von Wissenschaftlern bei *Novartis* zur stereoselektiven Synthese von Inhibitoren der Aspartat-Protease β -Secretase verwendet.^[48]



Schema 23: [3+2] Zykoaddition eines Azomethinylids an das chirale Dipolarophil **34**^[47]

Der Ansatz, chirale Katalysatoren zum stereoselektiven Aufbau von Pyrrolidinen über Zykoadditionsreaktionen zu verwenden, wurde bisher nur für 2-substituierte oder 2,5-disubstituierte Derivate beschrieben.^[34]

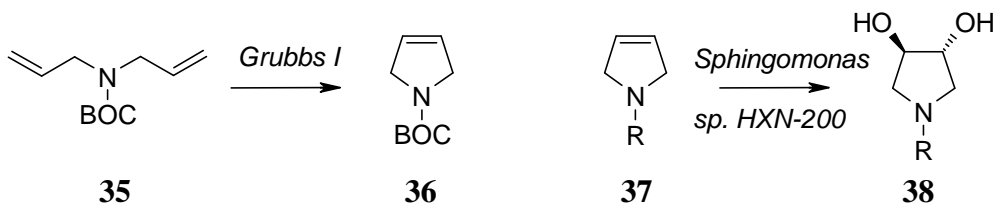
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die [3+2]-Zykoaddition von Azomethinyliden an Dipolarophile zum enantioselektiven Aufbau des 3,4-disubstituierten Pyrrolidinsystems der entworfenen Inhibitoren keine geeignete Reaktion darstellt. Die Stereoselektivität ist zumeist nur gering und die weitere Funktionalisierung mit verschiedenen Seitenketten sowie der gewünschte Abstand der Akzeptorfunktionen zum Ring nur schwer zu realisieren.

3.3.2 Funktionalisierung von 3-Pyrrolin

Das *N*-BOC-geschützte 3-Pyrrolin **36** ist in der Literatur beschrieben und kann in großem Maßstab durch Ringschlußmetathese des kommerziell erhältlichen *N*-BOC-Diallylamins **35** dargestellt werden (Schema 24).^[49] Die Doppelbindung des Pyrrolins kann dann zur Einführung weiterer Substituenten Verwendung finden.

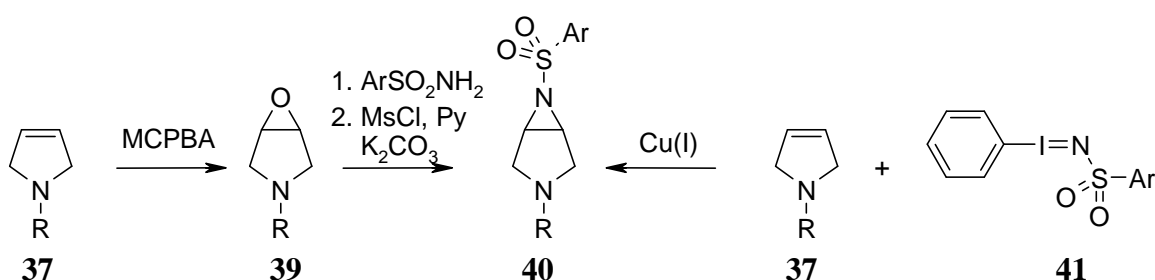
Die direkte stereoselektive Reaktion von 3-Pyrrolinen **37** zu Diolen des Typs **38** kann durch eine Biotransformation mittels des Bakteriums *Sphingomonas sp. HXN-200* erreicht werden.^[50] Der Mikroorganismus besitzt eine Monooxygenase, die das 3-Pyrrolin in das

entsprechende *meso*-Epoxid überführt, welches durch eine Epoxidhydrolase anschließend stereoselektiv zum Diol **38** geöffnet wird.



Schema 24: Darstellung von *N*-BOC-3-Pyrrolin (**36**) durch Ringschlußmetathese^[49]; Funktionalisierung von Pyrrolinen durch Biotransformation (R: Bzl; Cbz)^[50]

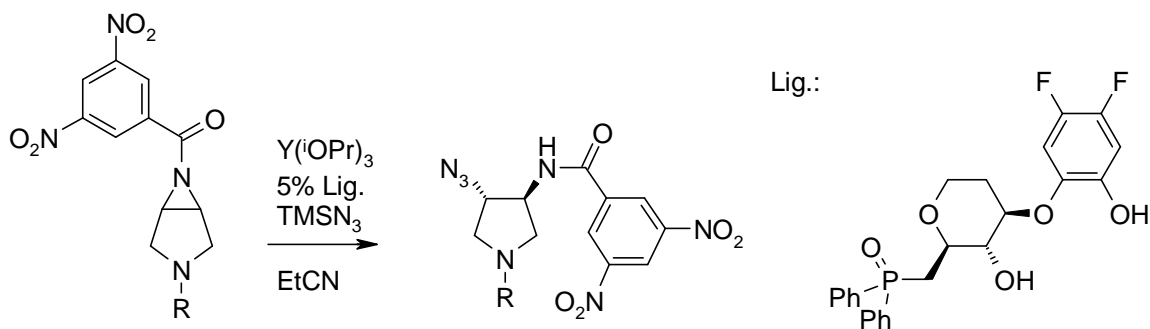
Die stereoselektive Öffnung von solchen bityklischen *meso*-Epoxiden kann auch durch andere Epoxid-Hydrolasen erreicht werden, jedoch ist die Anzahl der bekannten Beispiele gering. Eine weitere Möglichkeit, derartige Systeme enantioselektiv aufzubauen, liegt in der Verwendung von *meso*-Aziridinen.^[51] Diese sind nicht so reaktiv wie Epoxide, können aber durch eine Vielzahl von Nukleophilen geöffnet werden, wenn sie durch eine Sulfonyl-, Carbamat- oder Amidgruppe am Stickstoff aktiviert werden.^[52]



Schema 25: Zugang zu *meso*-Aziridinen aus 3-Pyrrolin **37** (R: Ts, Boc)^[53, 54]

Derartige bityklische *meso*-Aziridine **40** sind in drei Stufen aus geschützten 3-Pyrrolinen **37** zugänglich. Durch die Öffnung des *meso*-Epoxids **39** mit Sulfonamiden gelangt man zum entsprechenden Aminoalkohol, der anschließend zum *meso*-Aziridin **40** zyklisiert wird.^[53]

Eine elegante Möglichkeit der direkten Darstellung solcher Systeme ist die Kupferkatalysierte Reaktion von Nitren-Äquivalenten **41** mit 3-Pyrrolinen **37**. Diese Reaktion verläuft jedoch zumeist nur mit moderaten Ausbeuten und erfordert einen Überschuss an Alken.^[54]



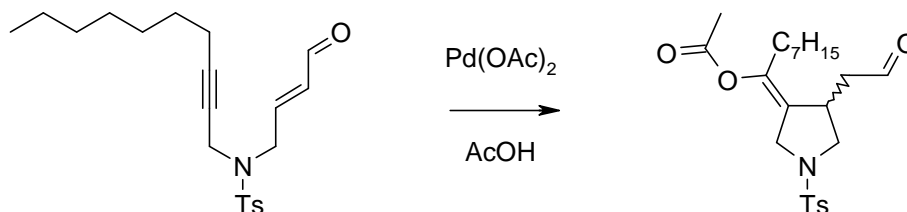
Schema 26: Stereoselektive Ringöffnung von *meso*-Aziridinen^[55]

Die stereoselektive Ringöffnung von *meso*-Aziridinen mit Cyanid oder Azid als Nukleophil ist durch Verwendung eines chiralen Katalysators in Anwesenheit von Yttrium möglich.^[55]

Die Funktionalisierung von 3-Pyrrolinen an der Doppelbindung ist ein möglicher Zugangsweg zum 3,4-disubstituierten Pyrrolidinsystem der entworfenen Inhibitoren. Für die Synthese unsymmetrischer racemischer Inhibitoren ist dieses Vorgehen zweckmäßig. Eine enantioselective Reaktionsführung erfordert jedoch einen komplexen Katalysator, der nicht kommerziell erhältlich ist. Zur Darstellung symmetrischer und vor allem enantiomerenreiner Verbindungen ist ein solcher Zugangsweg deshalb weniger geeignet.

3.3.3 Weitere Strategien zur Darstellung von Pyrrolidinen

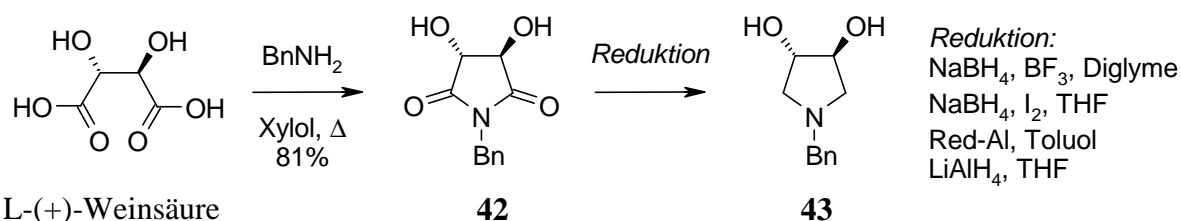
Eine große Zahl anderer möglicher Zugangswege zu Pyrrolidinen wie Palladium- oder Ruthenium-katalysierte Zyklisierungsreaktionen von En-In-Systemen, radikalische Zyklisierungen und reduktive Zyklisierungen sind bekannt. Häufig ist die Synthese der Ausgangsmaterialien jedoch komplex. Zudem ist oft keine Möglichkeit der stereoselektiven Reaktionsführung bekannt oder die erreichte Stereokontrolle gering. In vielen Fällen gibt es Einschränkungen in Bezug auf Lage und Art der Substituenten am Ring, die eine spätere Dekoration der Inhibitoren mit adäquaten Seitenketten unmöglich machen würden. Ein Beispiel aus der Literatur ist die Palladium-katalysierte Zyklisierung eines En-In-Systems, die die Darstellung eines 3,4-disubstituierten Pyrrolidins erlaubt. Die Verwendung von chiralen Liganden in dieser Reaktion führte jedoch nur zu geringer Stereoselektivität.^[56]



Schema 27: Zyklisierung eines En-In-Systems zu einem 3,4-disubstituierten Pyrrolidin^[56]

3.4 Zugang zu chiralen Pyrrolidinen aus Weinsäuren

Als Alternative wurde aufgrund der in Kapitel 3.3 genannten Gründe daher ein *Chiral-Pool* Ansatz gewählt.^[57] Die Synthese von enantiomerenreinen 3,4-disubstituierten Pyrrolidinen ausgehend von Weinsäure wurde erstmals von *Nagel et al.* als Zugang zu chiralen Phosphinliganden beschrieben.^[58, 59]



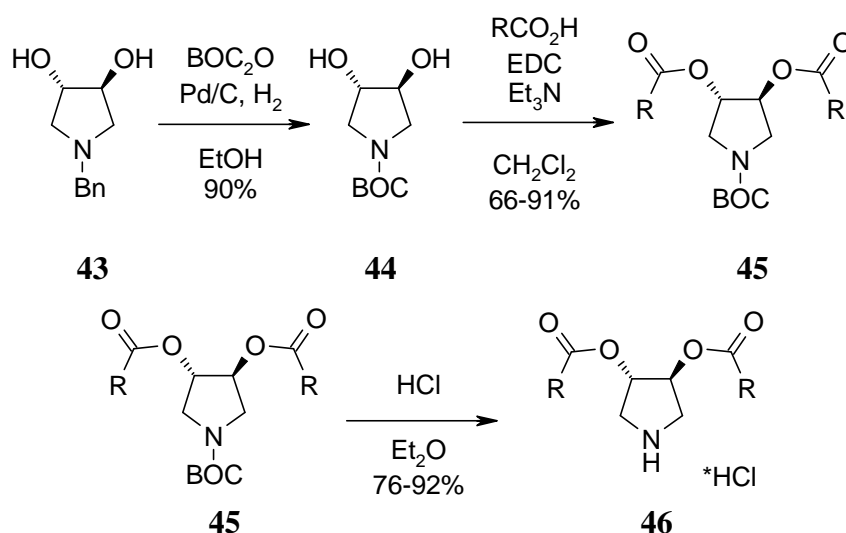
Schema 28: Synthese von (3*S*,4*S*)-Pyrrolidin-3,4-diol (**43**) aus L-(+)-Weinsäure.

L-(+)-Weinsäure wurde in guter Ausbeute (71%) mit Benzylamin in Xylol unter Rückfluss am Wasserabscheider zum Imid **42** kondensiert. In der Literatur sind zwar verschiedene Bedingungen zur Reduktion des Imids **42** zum Pyrrolidin **43** oder analoger Systeme bekannt (Schema 28), doch hier erwies sie sich als problematisch. So kamen die Reduktion mit einer Kombination aus Bortrifluorid und Natriumborhydrid in Diglykoldimethylether^[59], Diboran, das *in situ* aus Natriumborhydrid und Iod gebildet wird^[60] und Lithiumaluminiumhydrid^[61] oder Red-Al[®] [Natrium bis-(2-methoxyethoxy)-aluminiumhydrid]^[62] in Toluol zum Einsatz. Die Verwendung der Boranreduktion führte zu schlecht reproduzierbaren Ergebnissen, da sich die Aufarbeitung aufgrund des intermediär gebildeten stabilen Boran-Amin-Komplexes äußerst schwierig gestaltete. Im Falle der Verwendung von Natriumborhydrid und Iod war das überschüssige Iod nur schwer zu entfernen, und es bildeten sich Nebenprodukte, die beim Umkristallisieren ölige, stark gefärbte Verunreinigungen bildeten, welche nur schlecht abzutrennen waren. Auch Red-Al[®] führte zu keinem befriedigenden Umsatz. Die publizierten Bedingungen zur Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid^[61] mussten, wie sich herausstellte, noch weiter optimiert werden. So führte die Verwendung des in Tablettenform erhältlichen Hydrids nur zu einer sehr langsamen und unvollständigen Umsetzung. Durch Einsatz von LAH-Pulver in THF-löslichen Polymerbeuteln konnte zwar eine schnellere Reaktion erreicht werden, das gelöste Polymer erschwerte jedoch die Aufreinigung durch Umkristallisieren. Als Alternative fand schließlich eine kommerziell verfügbare Lösung von Lithiumaluminiumhydrid in THF Verwendung, was zu den besten Ergebnissen nicht nur in Bezug auf die Aufarbeitung, sondern auch auf die Reproduzierbarkeit der Ausbeute (69%) führte.

3.5 Primäre Struktur-Aktivitäts-Beziehung von Pyrrolidin-diestern

Das Pyrrolidin-diol **43** wurde nun mit verschiedenen Säurechloriden oder aktivierten Carbonsäuren zu den entsprechenden Diestern umgesetzt und anschließend die *N*-Benzylgruppe durch katalytische Hydrierung in Methanol abgespalten. Es zeigte sich jedoch, dass die Entschützung bei Estern mit großen aromatischen Resten wie Naphthylessigsäure oder *p*-Methylthio-phenylessigsäure auch unter erhöhtem Druck und höherer Reaktions-temperatur nicht möglich war.

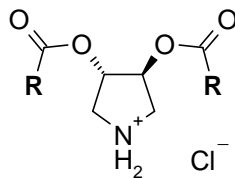
Daher wurde im Weiteren zunächst die Benzyl-Schutzgruppe mittels katalytischer Hydrierung in Ethanol in Anwesenheit von BOC-Anhydrid durch eine BOC-Schutzgruppe ersetzt und so das entsprechende BOC-geschützte Diol **44** in sehr guter Ausbeute (91%) erhalten.^[41] Aus diesem konnten von Stefanie Dörr eine Reihe von Estern synthetisiert werden, die sich unter milden, sauren Bedingung entschützen ließen und die erste Serie von Inhibitoren des Typs **46** lieferten.



Schema 29: Synthese der Pyrrolidin-diester vom Typ **46**

Das Diol **43** wurde hierzu zunächst mit Säurechloriden oder aktivierten Carbonsäuren in Dichlormethan in guten Ausbeuten verestert. Die auf diesem Weg gewonnenen Ester **45** wurden unter milden sauren Bedingungen mit HCl in Diethylether in guten Ausbeuten entschützt (Schema 29). Ein *meta*-Methoxyderivat sollte zunächst als Vorstufe für das entsprechende Phenolderivat dienen, die Entschützung mit Bortribromid^[63] führte jedoch zu einem komplexen Produktgemisch, welches wahrscheinlich durch zumindest partielle Abspaltung der BOC-Gruppe und gleichzeitige Esterspaltung zu Stande kam. Auch unter milderer Bedingungen mit der Kombination von Bortrichlorid und Tetrabutylammonium-iodid^[64] konnte das gewünschte Phenolderivat nicht erhalten werden. Als Synthon für ein *para*-Anilinderivat sollte die entsprechende Nitroverbindung verwendet werden, die

hydrogenolytisch reduziert wurde. Das resultierende Anilinderivat zeigte jedoch eine Tendenz zur Zersetzung. Nachdem die vollständig entschützte Verbindung keine Inhibition zeigte, wurden keine weiteren Versuche unternommen, diese Verbindung vollständig zu charakterisieren.



	R	A	B	K _i WT	K _i I84V	K _i I50V
47b		88	85	k.I	280	k.I
48b		91 ^[a]	87	k.I	33	k.I
49b		77 ^[a]	76	k.I	29	k.I
50b		84 ^[a]	79	k.I	167	k.I
51b		66 ^[a]	91	18	3.0	22
52b		78	92	21	4.5	13
53b		74	89	20	15	35

Tabelle 3: Synthese und Aktivität in μM der Pyrrolidin-diester gegenüber der HIV-1-Protease und den Mutanten I84V und I50V; k.I: keine Inhibition; A: Ausbeute Veresterung in %; B: Ausbeute Entschützung in %. ^[a] Säurechlorid zur Veresterung verwendet.

Basierend auf der Annahme, dass von diesen Inhibitoren nur die hydrophobe S₁- oder die S₂-Tasche adressiert werden kann, wurden als Seitenketten hauptsächlich einfache Alkylderivate und Aromaten verwendet, die keine weiteren polaren funktionellen Gruppen tragen. Um weitere Aussagen über den Bindungsmodus machen zu können, wurden zusätzlich zwei Derivate synthetisiert, die weitere, gerichtete Wechselwirkungen eingehen können. Für den Fall der Bindung des Aromaten in die S₁-Tasche sollte die Hydroxylgruppe eines Phenolderivates eine Wasserstoffbrücke zum Sauerstoffatom des Glycin 48 der *Flap*-Region des Enzyms ausbilden können. Für den Fall der Bindung in die S₂-Tasche sollte die Aminogruppe eines Anilinderivates geeignet sein, polare Wechselwirkungen mit den

Aspartaten 29 und 30 in der S₂-Tasche einzugehen. Die synthetisierten Verbindungen **46** wurden von Jark Böttcher in einem fluoreszenzbasierten kompetitiven Assay auf ihre Affinität gegenüber der HIV-Protease und den Mutanten I84V und I50V getestet (Tabelle 3).^[32]

Für den Wild-Typ der Protease und die I50V Mutante ergab sich eine vergleichbare Struktur-Aktivitäts-Beziehung: Die Alkylderivate **47b**, **48b** und **49b** sowie das Phenylderivat **50b** zeigten nur schwache Aktivität gegenüber dem Enzym. Die beste Inhibition zeigte der Ester der Phenyllessigsäure **51b**. Die Annelierung eines weiteren Phenylrings zu den Naphthylderivaten **52b** und **53b** hatte hingegen ebenfalls eine gute Affinität zu Folge. Alle diese Verbindungen erwiesen sich jedoch gegenüber der I84V Mutante um den Faktor drei affiner, womit sich auch für die schwach bindenden Inhibitoren eine Bindungsaffinität mit guter Genauigkeit bestimmen ließ. Aus diesen Werten lässt sich folglich auch eine bessere Struktur-Aktivitäts-Beziehung ableiten. Da die beobachteten Trends ähnlich zu denen des Wild-Typs sind, ist anzunehmen, dass sich diese Beziehung auch für den Wild-Typ und die I50V-Mutante verallgemeinern lässt. Der Ester der 3-Methylbuttersäure (**47b**) zeigt eine Inhibition von 280 µM; das Hinzufügen einer weiteren Methylgruppe zum Neopentylderivat (**48b**) steigert die Affinität um mehr als den Faktor acht. Obwohl der Cyclohexylrest etwas größer als der Neopentylrest ist, bleibt die Affinität für **49b** etwa gleich. Die Substitution des Zyκλοalkans gegen einen Aromaten führt zu einer starken Verringerung der Affinität, etwa um den Faktor sechs. Eine Homologisierung zum Ester der Phenyllessigsäure (**51b**) führte zum besten Inhibitor der Serie mit einer Affinität von 3 µM. Aus diesen Werten lässt sich als Trend erkennen, dass eine Verzweigung direkt neben dem Ester-Carbonylkohlenstoffatom ungünstig ist. Ist keine direkte Verzweigung vorhanden, so werden auch größere Reste akzeptiert. Das Benzoesäurederivat **50b** besitzt aufgrund der Vorzugsorientierung der Carbonylgruppe parallel zum π-System des Aromaten eine starrere Struktur als die anderen Derivate. Die geringere Affinität lässt darüber spekulieren, dass fehlende konformative Adaptionsfähigkeit des Inhibitors keinen optimalen Bindungsmodus in dem Protein erlaubt. Der Benzylrest der Verbindung **51b** scheint die Tasche am besten zu adressieren. Durch die Erweiterung des Phenylrings zu einem Naphthyl-Ringsystem (**53b** und **52b**) sinkt die Affinität um den Faktor 1.5 bzw. fünf, der Benzylrest scheint die adressierte Tasche also bereits sehr gut auszufüllen. Kleine Substituenten führen zu einer deutlichen Verschlechterung der Affinität, während Naphthylderivate keinen so großen Aktivitätsverlust aufweisen. Wahrscheinlich kann dort eine ungünstigere Bindungssituation teilweise durch die deutlich größer vergrabene hydrophobe Oberfläche kompensiert werden.

Unter der Voraussetzung, dass die sekundäre Aminofunktion des Pyrrolidin-Rings die katalytische Dyade adressiert, sind für diese Klasse von Liganden theoretisch verschiedene Bindungsmodi denkbar:

Bindung über ein *Flap*-Wasser oder direkt an die Isoleucine 50, wobei die beiden hydrophoben Reste symmetrisch die S_1 - oder S_2 -Taschen besetzen oder unsymmetrisch, wobei ein Rest die S_1 -, der andere die S_2' -Tasche besetzt (Abbildung 11).

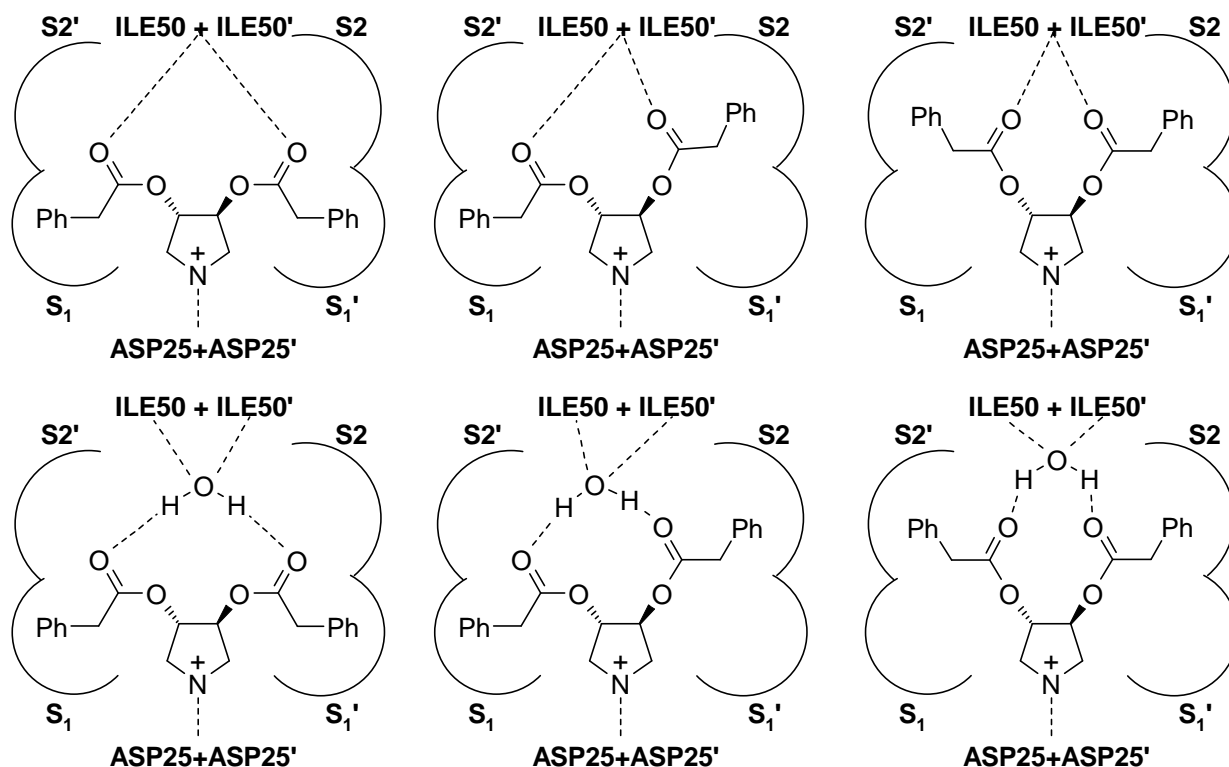


Abbildung 11: Mögliche Bindungsmodi des Diesters 51b

Eine Bindung über ein verbrückendes *Flap*-Wassermolekül erscheint unwahrscheinlich (Abbildung 11 unten). Ein Wassermolekül, welches Wasserstoffbrücken mit den Hauptketten NHs der Isoleucine 50/50' ausbildet, erwartet die beiden Akzeptoren in einem Abstand von etwa 5 Å. Die beiden Carbonylgruppen können zwar eine Konformation einnehmen, in der sie ein solches Wassermolekül komplexieren, die dabei ausgebildeten Winkel sind jedoch für eine tetraedrische Koordination des Wassers ungünstig. Im Fall der Bindung über ein *Flap*-Wasser liegt der Inhibitor in einer gestreckten Konformation in der Bindetasche und die Alkylreste könnten nur die S_2 - und S_2' -Tasche besetzen. Da sich jedoch eine deutlich bessere Affinität gegenüber der I84V-Mutante zeigte, liegt die Vermutung nahe, dass der Inhibitor diesen Bereich der Protease adressiert. Da das Isoleucin 84 die S_1 von der S_2' -Tasche trennt und in einer gestreckten Konformation weit von den Alkylresten des Inhibitors entfernt wäre, ist dieser Bindungsmodus unwahrscheinlich.

Von den möglichen Varianten einer direkten Wechselwirkung der Ester-Carbonylgruppen mit dem *Flap*-Bereich der Protease erscheint ein symmetrischer Bindungsmodus am wahrscheinlichsten. In diesem Fall würden die Carbonylgruppen jeweils direkt die Hauptketten-Stickstoffatome der Isoleucine 50 adressieren und die Alkylreste die S_1/S_1' -Taschen besetzen. Der starke Affinitätsgewinn gegenüber der I84V-Mutante und die Struktur-Aktivitäts-Beziehung weisen auf eine Besetzung der kleineren S_1 -Tasche hin. Allerdings könnte auch durch eine einfache Konformationsänderung einer der Alkylreste die S_2 -Tasche besetzen. Aufgrund der vorliegenden SAR-Daten ist es nicht möglich, eine eindeutige Unterscheidung zwischen dem unsymmetrischen und dem symmetrischen Bindungsmodus zu treffen.

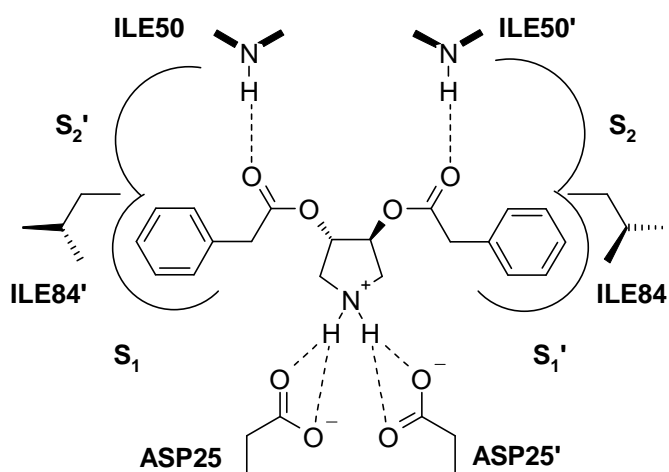
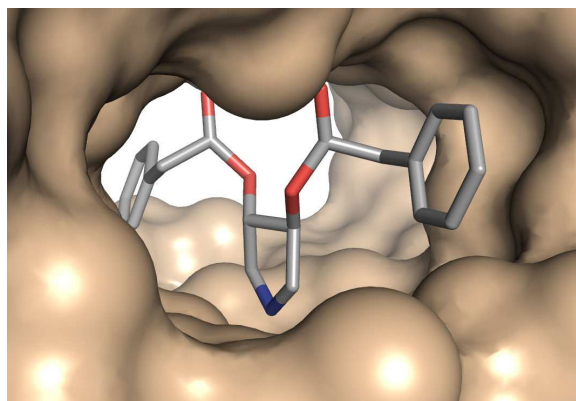
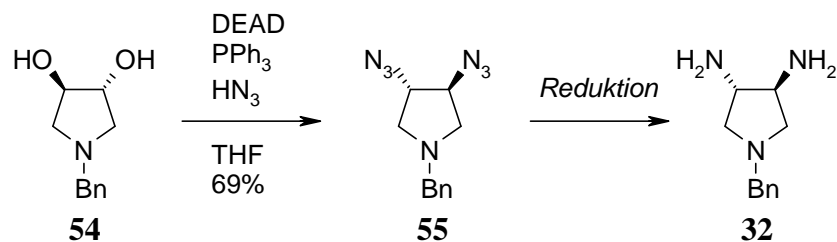


Abbildung 12: Postulierter Bindungsmodus des Diesters 51b nach Minimierung mit dem Programm Moloc (Proteinstruktur 1QBR)

3.6 Mitsunobu-Reaktionen am 3,4-Dihydroxy-pyrrolidin-System

Die Struktur-Aktivitäts-Beziehung der Esterderivate ließ den Schluss zu, dass sich durch die Adressierung von nur zwei Subtaschen keine ausreichende Affinität der Inhibitoren erreichen lässt. Ausgehend von der Kristallstruktur des Pyrrolidins **22** war die beste Stelle zur Verzweigung jene zwischen dem Ring und der Akzeptorposition. Um weitere Stereozentren im Molekül zu vermeiden, sollten die Hydroxylgruppen durch Aminogruppen ersetzt werden. Die Synthese des entsprechenden Diamins **32** aus dem Diol **54** in zwei Schritten über eine *Mitsunobu*-Reaktion zum Azid **55** und anschließender Reduktion zum Diamin **32** ist literaturbekannt (Schema 30).^[60]



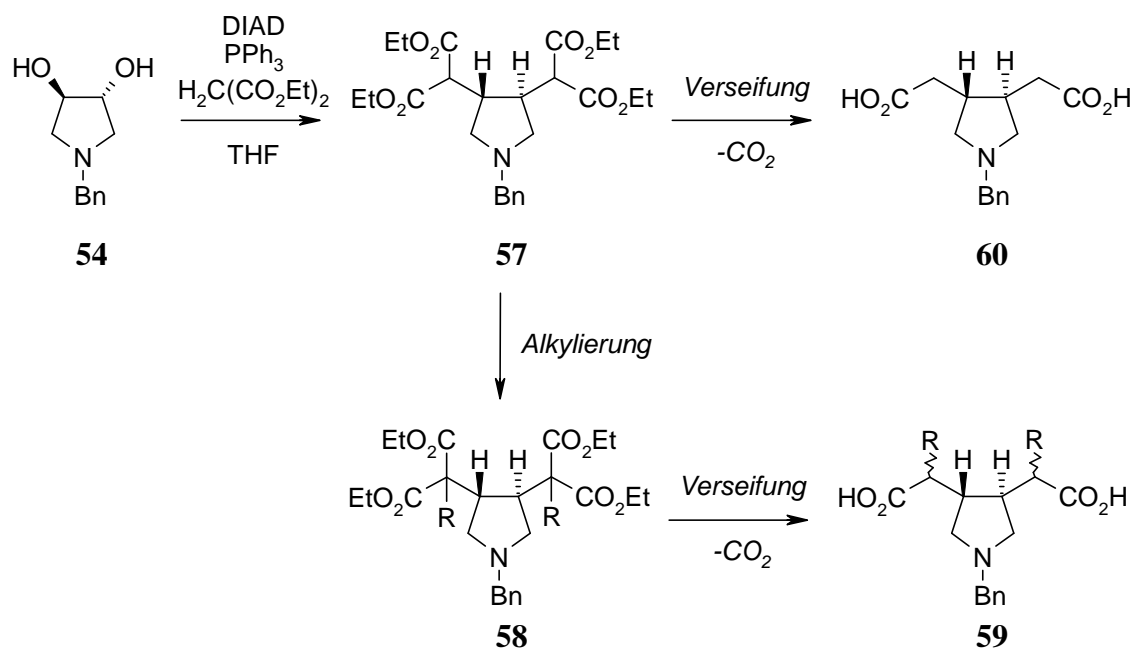
Schema 30: Synthese des Diamins 32 durch Mitsunobu-Reaktion^[60]

Da die *Mitsunobu*-Reaktion unter Inversion erfolgt, musste, um zum gewünschten Enantiomer des Diamins **32** zu gelangen, der aus D-(-)-Weinsäure zugängliche Alkohol **54** verwendet werden. Die *Mitsunobu*-Reaktion^[65] zum Diazid verlief unter den publizierten Bedingungen mit guter Ausbeute (69%). Für die Darstellung der in größeren Mengen benötigten Synthesestufe **32** sollte jedoch die wasserfreie Darstellung^[66] und Verwendung der explosiven, flüchtigen und giftigen Stickstoffwasserstoffsäure umgangen werden. Als alternative Azid-Quelle wurde das stabile und in THF-lösliche Zn(N₃)₂·2 Py verwendet^[67]. Das Azid konnte jedoch nur in geringer Ausbeute (12%) isoliert werden. Auch die Variation anderer Reaktionsparameter wie z.B. die Substitution des DEAD durch DIAD und von THF durch Benzol als Lösungsmittel führte zu keiner besseren Ausbeute.

Das Diazid **55** musste durch Säulenchromatographie aufgereinigt werden, um das bei der Reaktion entstehende Triphenylphosphinoxid und das Hydrazinderivat abzutrennen; es fiel hierbei als farbloses Öl an. Obwohl keine entsprechenden Beobachtungen gemacht wurden, war zu erwarten, dass das Diazid explosiv ist, da man allgemein davon ausgehen kann, dass eine Verbindung dann zur Explosion neigt, wenn der Quotient aus der Summe der Kohlenstoff- und Sauerstoffatome geteilt durch die Zahl der Stickstoffatome kleiner als drei ist.^[68] Für das Azid **55** ist dieser Quotient 11/7 ~ 1.6, für die analoge *N*-BOC-geschützte Verbindung **72** ebenfalls 11/7 ~ 1.6. Da sich bei der Darstellung der Esterderivate **46** bereits gezeigt hatte, dass sich die Benzylgruppe in der letzten Synthesestufe zum Teil nur sehr schwer oder gar nicht hydrogenolytisch abspalten lässt, wurde die analoge BOC-geschützte Verbindung dargestellt. Die Umsetzung des *N*-BOC-geschützten Diols **70** in der *Mitsunobu*-Reaktion unter analogen Bedingungen führte jedoch abermals zu schlechten und vor allem nicht reproduzierbaren Ausbeuten.

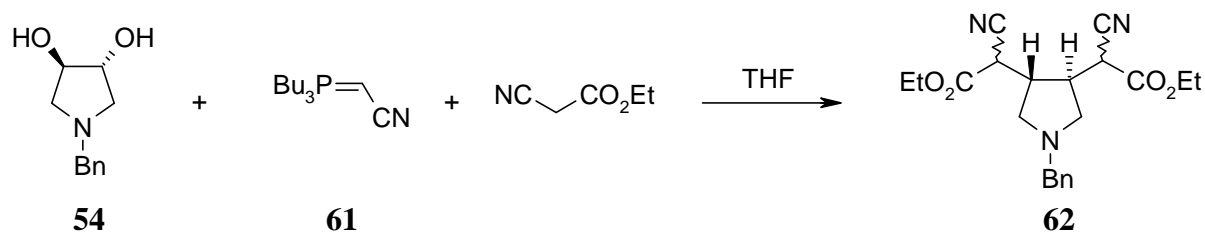
Um die Stufe des Diazids **55** zu umgehen, wurden andere Stickstoffnukleophile wie Phthalimid^[69] oder Sulfonamide^[70] in der *Mitsunobu*-Reaktion eingesetzt. Es konnten jedoch auch hier keine entsprechenden Produkte isoliert werden. Als Alternative lassen sich auch Kohlenstoffnukleophile in der *Mitsunobu*-Reaktion verwenden, wobei jedoch nur stark CH-acide Verbindungen eingesetzt werden können, da der pK_a-Wert des Betain-Intermediats bei

etwa 13 liegt und sonst das Betain bevorzugt die nukleophile Substitution eingehen würde. Als mögliche CH-acide Verbindungen kommen in *Mitsunobu*-Reaktionen^[71] Malonsäure-derivate wie Malonsäurediethylester ($pK_a = 16.4$)^[72] oder Ethylmalonatmononitril ($pK_a = 13.1$) in Betracht.^[73] Da das Produkt der Substitution **57** jedoch auch eine CH-azide Verbindung ist, ist eine Alkylierung zu **58** denkbar (Schema 31). Über Verseifung und Decarboxylierung gelangt man schließlich zu den entsprechenden Säuren **59** bzw. **60**, die sich durch Veresterung derivatisieren lassen und über Enolat-Chemie die Möglichkeit der Substitution in α -Position zum Ring böten. Dabei ist durch die Abschirmung des Rings eine hohe Diastereoselektivität zu erwarten. Bei geringer Selektivität bietet das α -chirale Carbonyl-System die Möglichkeit der Epimerisierung oder Inversion durch stereoselektive Protonierung des Enolats bei tiefen Temperaturen.



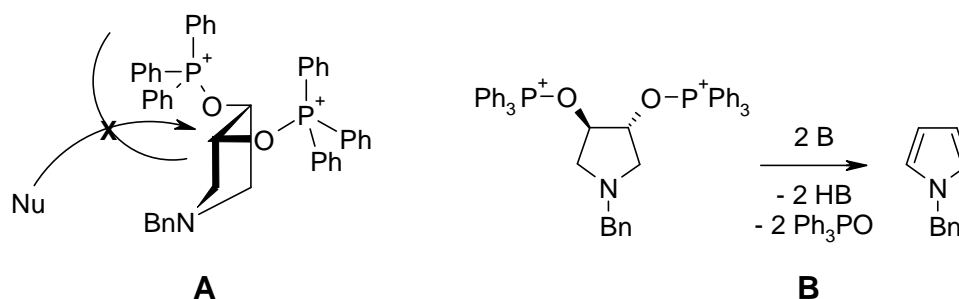
Schema 31: Syntheschema bei der Verwendung von Diethylmalonat als Nukleophil

Die *Mitsunobu*-Reaktion mit Diethylmalonat und dem Diol **54** führte jedoch nicht zum gewünschten Produkt **57**. Ein Grund hierfür könnte die zu geringe Basizität des Betain-Intermediats sein. Das Phosphor-Ylid **61** ist eine stärkere Base und wurde bereits erfolgreich in *Mitsunobu*-Reaktionen von CH-aziden Verbindungen eingesetzt. Das Phosphor-Ylid wurde daher *in situ* generiert und in einer Reaktion mit Ethylmalonatmononitril und dem Diol **54** eingesetzt (Schema 32).^[74] Das Produkt **62** konnte jedoch auch hier nicht isoliert werden.



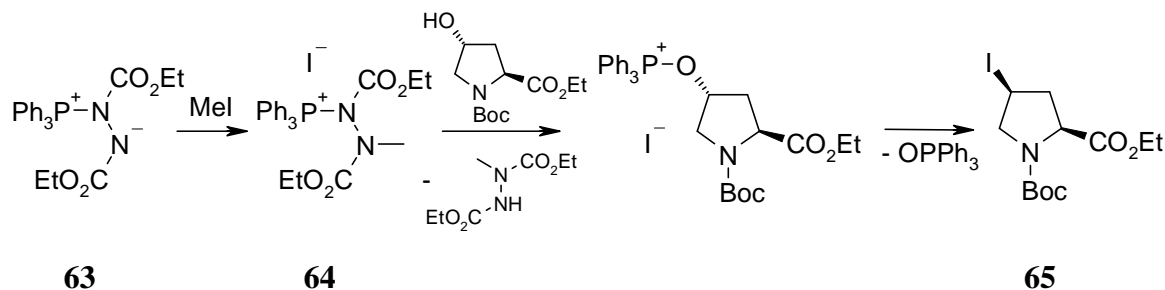
Schema 32: Syntheschema bei der Verwendung des Phosphor-Ylids 61

Eine mögliche Erklärung für die schlechte Reaktivität des Diols **54** in den verschiedenen Varianten der *Mitsunobu*-Reaktion ist die starke Abschirmung des Moleküls durch die Triphenylphosphoniumgruppen, die den Angriff von größeren Nucleophilen erschwert. Die Verwendung von stärker basischen Nucleophilen kann zudem zur Eliminierung von Triphenylphosphinoxid unter der Bildung von Benzylpyrrol führen (Schema 33).



Schema 33: Mögliche Gründe für die mangelnde Reaktivität gegenüber sterisch anspruchsvollen (A) und basischen Nucleophilen (B)

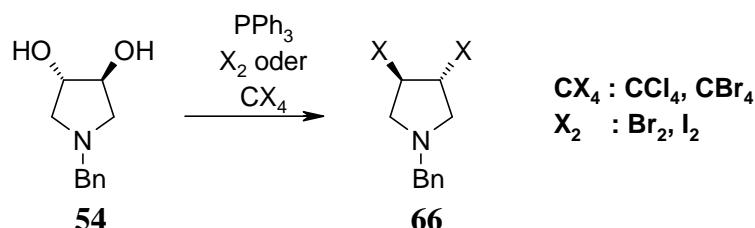
Eine Methode zur Verwendung des nucleophilen aber nicht basischen Iodid-Ions besteht in der Verwendung von Methyljodid in der *Mitsunobu*-Reaktion. Durch das starke Methylierungsreagenz wird das Betain-Derivat **63** zu **64** alkyliert statt als Base zu dienen. Dieses Verfahren wurde verwendet um aus einem 4-Hydroxypyrrolinderivat das 4-Iodo-Derivat **65** herzustellen (Schema 34).^[75] Die Übertragung dieser Reaktion auf das 3,4-Dihydroxypyrrolidin **70** blieb jedoch erfolglos.



Schema 34: Synthese eines 4-Iodopyrrolin Derivates durch *Mitsunobu* Reaktion^[75]

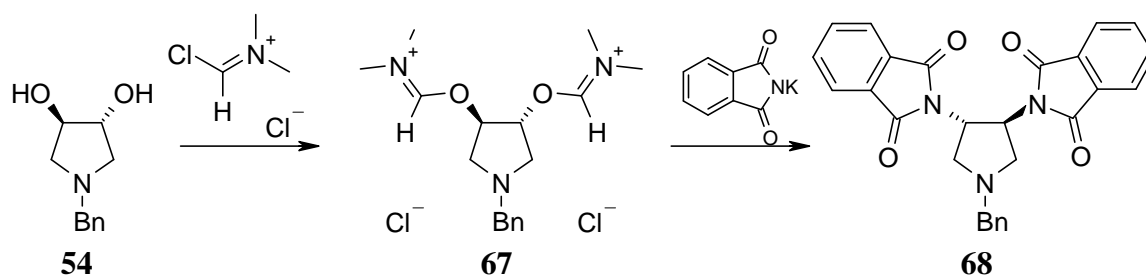
Die Verwendung von Triphenylphosphoniumhalogeniden in der *Appel*-Reaktion bzw. *Mukaiyama*-Redoxkondensation (Schema 35) ist eine weitere Möglichkeit, über die gleichen reaktiven Oxo-Phosphonium-Intermediate wie bei der *Mitsunobu*-Reaktion die Alkyl-

halogenide zu gewinnen. Das entsprechende Triphenylphosphoniumhalogenid wird durch Reaktion von Triphenylphosphin mit verschiedenen Halogenen bzw. Tetrahalogenmethanen erhalten. Die Verwendung von Triphenylphosphin mit CCl_4 , CBr_4 , Br_2 oder I_2 zur Reaktion mit dem Pyrrolidin-Diol **54** führte in keinem Fall zu den gewünschten Pyrrolidin-3,4-dihalogeniden **66**.



Schema 35: Versuch der Herstellung der 3,4-Dihalo-Pyrrolidine **66** über eine *Appel*-Reaktion

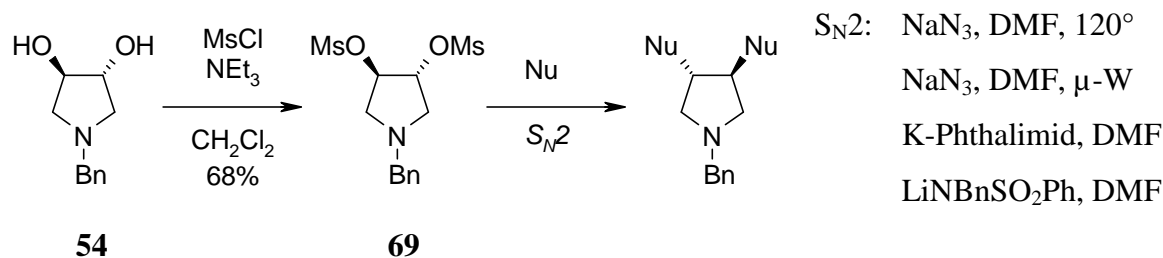
Auch alternative Aktivierungsmethoden zur *Mitsunobu*-Reaktion wurden untersucht. Die Verwendung des *Vielsmeyer*-Reagenz, dargestellt aus DMF und Oxalylchlorid, zur Aktivierung des Alkohols (**67**) und eine anschließende $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion mit Phthalimid-Kalium zu **68** führte zu keinem isolierbaren Produkt.^[76]



Schema 36: Alternative Aktivierung des Diols mit dem *Vielsmeyer*-Reagenz^[76]

3.7 Aktivierung des 3,4-Dihydroxy-pyrrolidin-Systems als Sulfonsäureester

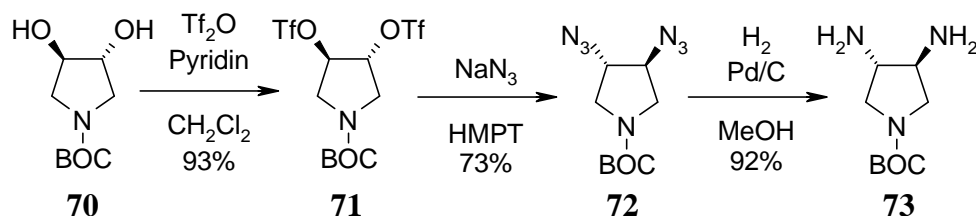
Die Verwendung von Sulfonsäureestern zur Aktivierung von Alkoholen zur nukleophilen Substitution oder Eliminierung ist eine Standardmethode in der organischen Synthese. Für die Reaktion von Sulfonaten des Pyrrolidin-Diols mit verschiedenen Nucleophilen (z.B. Mesylat mit NaPPh_2 ^[58, 59], NaN_3 ^[77], Triflat mit TBAF^[78]) waren in der Literatur bereits mehrere Beispiele beschrieben. Die Umsetzung des Pyrrolidin-Diols **54** zum Dimesylat **69** verlief problemlos, die Substitution mit Natriumazid in DMF^[77, 79] über 20 Stunden bei 120°C gelang jedoch nicht. Sowohl der Ersatz des schlecht löslichen Natriumazids durch $\text{Zn}(\text{N}_3)_2 \cdot 2 \text{Py}$ als auch die Verwendung von Mikrowellenstrahlung führte zu keiner Reaktion des Mesylats **69**, ebenso wenig wie die Verwendung von Phthalimid-Kalium oder lithiierten Sulfonamiden als Nucleophile (Schema 37).



Schema 37: Versuche zur Nukleophilen Substitution des Dimesylats 69

Aufgrund des hohen Risikos beim Erhitzen von Alkylaziden bzw. Natriumazid über längere Zeit wurden keine weiteren Versuche unternommen, das Diazid auf diesem Weg zu gewinnen. Das Dimesylat erwies sich als verhältnismäßig reaktionsträge, da auch unter drastischen Bedingungen keine Eliminierung zum Pyrrol zu beobachten war.

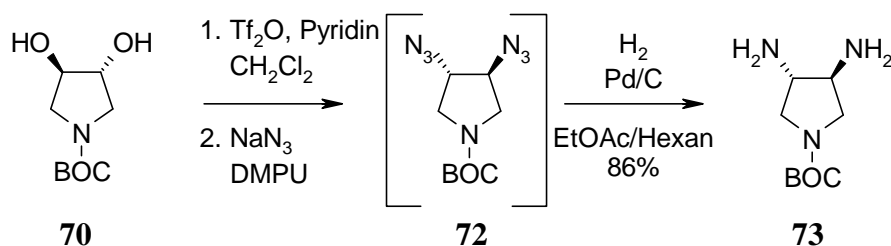
Um die Reaktivität der Abgangsgruppe zu erhöhen, ohne eine stärkere sterische Abschirmung in Kauf nehmen zu müssen, wurde das Mesylat durch Triflat ersetzt. Die Reaktion des BOC-geschützten Diols **70** mit Trifluormethansulfonsäureanhydrid in Dichlormethan mit Pyridin als Base wurde analog zu einer Literaturvorschrift ausgeführt.^[80] Popsavin *et al.* führten eine wässrige Aufarbeitung durch und konnten das Triflat nur in geringer Ausbeute isolieren.^[81] Durch die modifizierte Aufarbeitung analog zu Diéguez^[80], bei der das Reaktionsgemisch direkt auf Kieselgel einrotiert und säulenchromatografisch aufgereinigt wurde, konnte das Triflat in guter Ausbeute (93%) erhalten werden. Es erwies sich als stabiler kristalliner Feststoff, der jedoch thermolabil ist. Die Anwesenheit von tertiären Aminen wie bei Substitution des Pyridins durch Triethylamin oder die Verwendung des Benzyl-geschützten Diols (**54**) als Reaktand führte ebenfalls zur Zersetzung des Triflats. Die $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion des Triflats **71** mit Natriumazid in HMPT^[81] verlief bei Raumtemperatur glatt zum Diazid **72** (Schema 38), die sich anschließende Reduktion durch katalytische Hydrierung in Methanol führte in einer dreistufigen Synthesesequenz zum Diamin **73**.



Schema 38: Dreistufige Synthese des Diamins 73

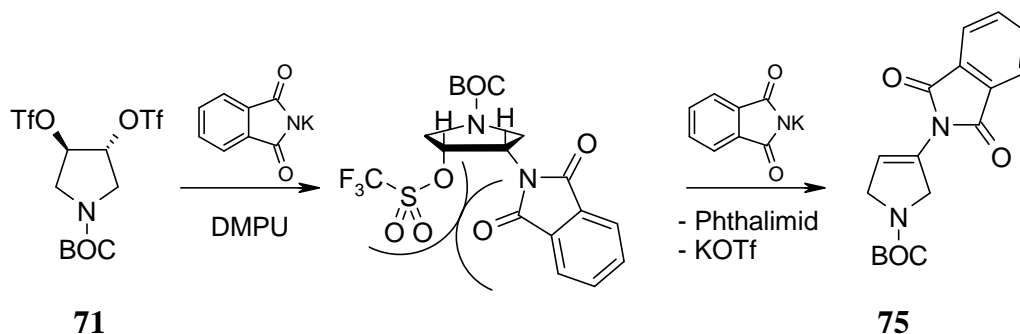
Um die Isolierung des empfindlichen Triflats **71** zu vermeiden, wurde das Reaktionsgemisch der Triflierungsreaktion einrotiert und anschließend Natriumazid und HMPT zugegeben. Die Aufreinigung erfolgte mittels Flash-Chromatographie. Auch die Isolierung des potentiell explosiven Azids **72** als Reinsubstanz konnte vermieden werden, in dem nach der chromato-

graphischen Aufreinigung das Lösungsmittel nicht entfernt, sondern zur Lösung des Azids im Eluenten Palladium auf Aktivkohle gegeben und über Nacht hydriert wurde. Die Substitution des cancerogenen HMPT gegen Dichlormethan oder DMF als Lösungsmittel resultierte in keiner Reaktion, wohingegen die Verwendung von DMPU sogar zu einer besseren Ausbeute im Vergleich zum HMPT führte. Dieses Verfahren ermöglichte schließlich die Synthese des Diamins **73** im mittleren Maßstab bei gleichzeitiger Minimierung des Risikos.



Schema 39: Optimierte Bedingungen zur Synthese des Diamins **73 ohne Isolierung des Azids **72****

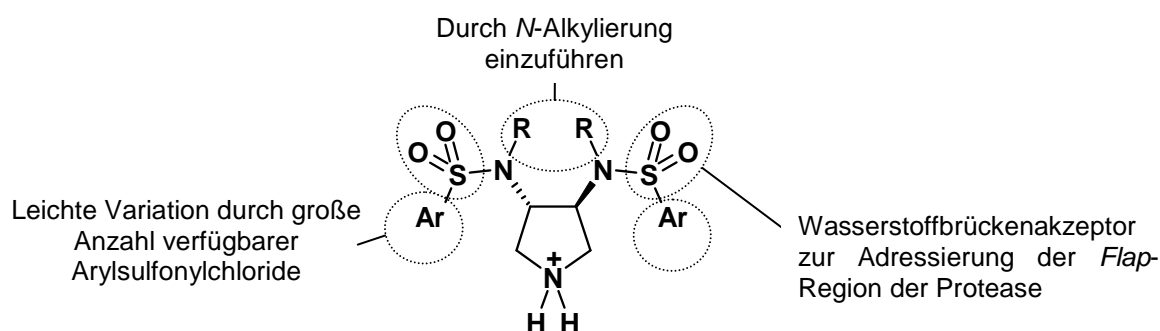
Um auch noch die Stufe des Diazids zu umgehen wurde versucht, die nukleophile Substitution des Triflats mit anderen Stickstoff-Nukleophilen durchzuführen. Hierzu wurde *N*-Benzyl-benzolsulfonamid aus Benzylamin und Benzolsulfonylchlorid hergestellt und mit verschiedenen Basen wie Natriumhydrid oder *n*-Butyllithium in THF, Kalium-*tert*-butylat oder Kaliumcarbonat unter Ultraschallbedingungen in Acetonitril deprotoniert. Um die Aktivität zu steigern und die Löslichkeit zu erhöhen, wurde bei den Kaliumsalzen 18-Krone-6 zugegeben. Das zugegebene Triflat zersetzte sich jedoch unter den basischen Bedingungen (pK_a von $\text{BnNHSO}_2\text{Ph} = 15.7$).^[82] Als weniger basisches Nukleophil wurde Phthalimid-Kalium ($\text{pK}_a = 13.4$)^[83] in DMPU eingesetzt. Es konnte jedoch nur das Pyrrolinderivat **75** isoliert werden. Gründe dafür könnten die sterische Wechselwirkung zwischen den *syn*-stehenden Substituenten, die zu einer zusätzlichen Aktivierung des Triflats führen, sowie die höhere Basizität des Phthalimids sein, die eine Eliminierung aus dem Monosubstitutionsprodukt **74** begünstigt.



Schema 40: Mögliche Ursache für die Eliminierung zu **75**

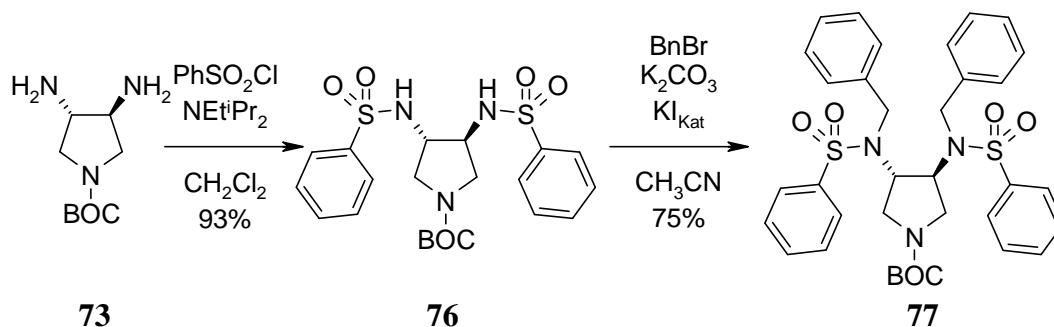
3.8 Synthese *N*-alkylierter Sulfonamide

Das *N*-BOC-geschützte (3*S*,4*S*)-3,4-Diamino-pyrrolidin **73** diente als Grundbaustein für eine Reihe von Inhibitoren. Aufgrund der einfach durchzuführenden Alkylierung am Stickstoffatom und der großen Zahl an kommerziell verfügbaren Arylsulfonsäurechloriden wurden damit die zugänglichen Arylsulfonamide als Akzeptorsubstituenten zur Adressierung der *Flap*-Region der HIV-Protease ausgewählt. Die entsprechenden Carbonsäureamide wurden nicht verwendet, da zum einen deren Alkylierung deutlich schwieriger durchzuführen ist und sie zum anderen im Bezug auf die Carbonylgruppe eine ungünstige Ausrichtung des *N*-Alkylrestes besitzen.



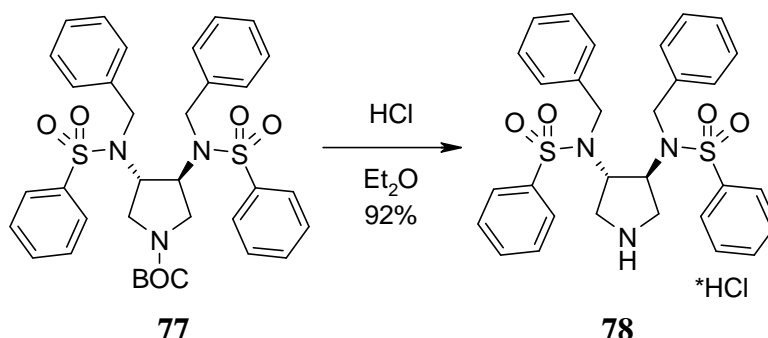
Schema 41: Vorteile bei der Verwendung von Arylsulfonamiden als Bausteine

Zunächst wurde das von der Phenylsulfonsäure abgeleitete Sulfonamid **76** synthetisiert. Die Reaktion des Diamins **73** mit Phenylsulfonylchlorid in Gegenwart von *Hünig*-Base in Dichlormethan verlief glatt^[84] und das Produkt **76** konnte in guter Ausbeute (86%) kristallin durch Ausfällen aus Hexan erhalten werden. Als Elektrophil für die sich anschließende *N*-Alkylierung wurde Benzylbromid gewählt, da es sowohl eine hohe Reaktivität als auch gleichzeitig eine gute Stabilität besitzt. Die Reaktion mit Kalium-*tert*-butylat als Base in DMF^[84] ergab jedoch wider Erwarten kein Alkylierungsprodukt. Als Alternative wurde Kaliumcarbonat als Base in siedendem Acetonitril^[84] verwendet. Zur Steigerung der Reaktivität wurde eine katalytische Menge Kaliumiodid zugegeben, was zum Alkylierungsprodukt **77** in guter Ausbeute (75%) führte.



Schema 42: Synthese der geschützten Inhibitorvorstufe **77**

Die Entschützung des *N*-benzylierten Sulfonamids **77** unter wasserfreien Bedingungen mit 2M HCl in Diethylether zum Hydrochlorid **78** verlief mit guter Ausbeute. Der Inhibitor **78** zeigte im Assay^[32] eine Affinität von 2 μM gegenüber der HIV-Protease.



Schema 43: Synthese des Inhibitors **78**

Unter Annahme der Bindung der protonierten endozyklischen Aminogruppe an die katalytische Dyade und einer Wechselwirkung der Sulfonyl-Sauerstoffatome mit den Hauptketten-Stickstoffatomen der Isoleucine 50/50' legten computergestützte Modelling Studien mit dem Programm *Moloc*^[85] einen symmetrischen Bindungsmodus nahe, wobei die modellierte Position des Pyrrolidin-Rings sehr gut mit der Kristallstruktur des Inhibitors **22** übereinstimmte.

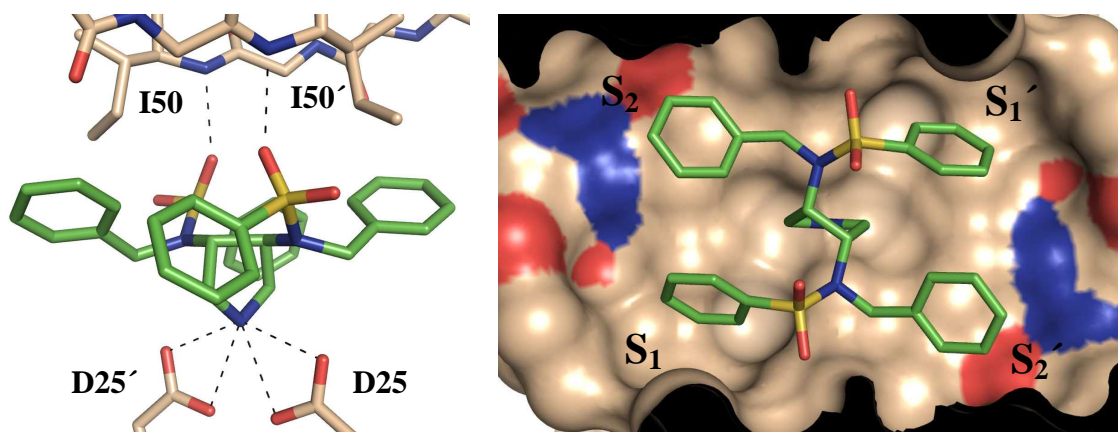
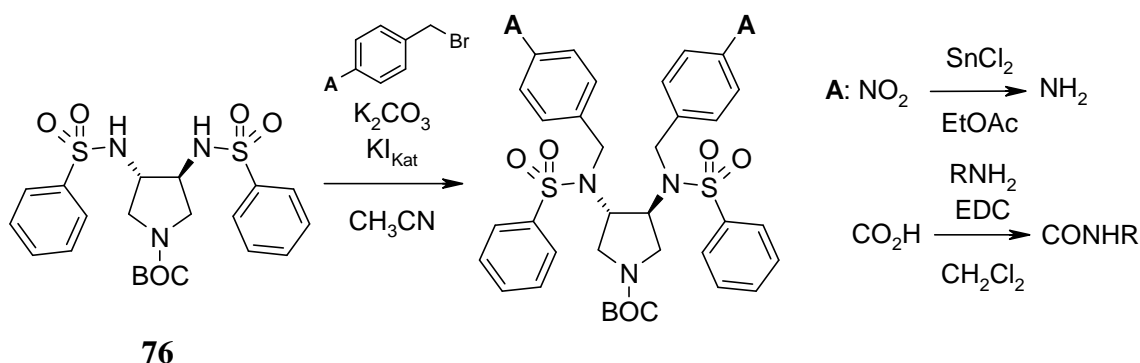


Abbildung 13: Modellierter Bindungsmodus des Inhibitors **78**

In diesem Modell bildet jeweils ein Sauerstoffatom der Sulfongruppen eine Wasserstoffbrücke mit dem entsprechenden Hauptketten-Stickstoffatom der Isoleucine 50/50' aus. Die Phenylreste am Schwefel besetzen die S_1/S_1' -Taschen des Enzyms, die *N*-Benzylreste adressieren die S_2/S_2' -Taschen (Abbildung 13).

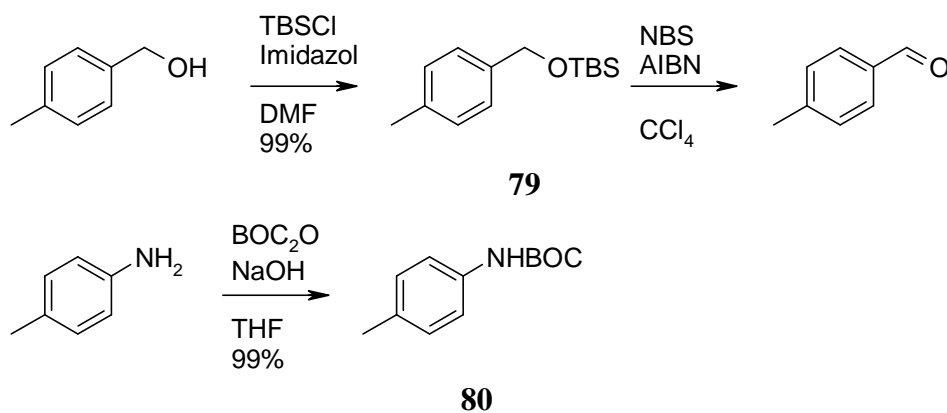
Um diese Bindungshypothese mittels einer Struktur-Aktivitäts-Beziehung zu bestätigen, sollten Substituenten in *para*-Position am *N*-Benzylrest eingeführt werden, die polare Wechselwirkungen mit den Aspartaten 30 und 30' eingehen können. Als *para*-Substituent wurde eine Aminogruppe ausgewählt. Als Synthon für die Aminogruppe sollte die analoge

Nitroverbindung dienen, die über das entsprechende Nitrobenzylbromid zugänglich sein sollte. Als zweiter möglicher Substituent wurde eine Carbonsäure ausgewählt, die sich leicht in die entsprechenden Amide überführen lassen sollte. Die Verwendung von 4-Brommethylbenzoesäure und 4-Brommethylnitrobenzol als Alkylierungsmittel von **76** führte aber überraschenderweise zur Zersetzung der Benzylbromide unter den gewählten Reaktionsbedingungen.



Schema 44: Versuch der Einführung polarer Substituenten am *N*-Benzylrest

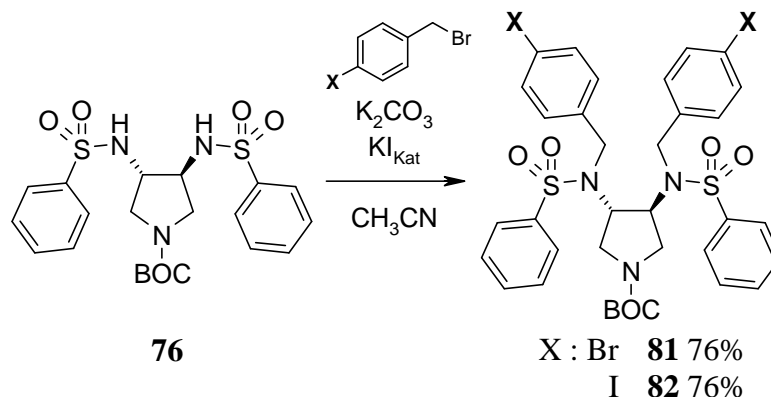
Der Grund für die leichte Zersetzung der Benzylbromide liegt wahrscheinlich in der zusätzlichen Aktivierung durch die elektronenziehenden Substituenten in *para*-Position. Um dieses Problem zu umgehen, sollten die Substituenten durch einen TBS-geschützten Benzylalkohol und ein BOC-geschütztes Anilinderivat eingeführt werden. Die entsprechenden Benzylbromide sollten durch eine *Wohl-Ziegler*-Bromierung aus den Toluolderivaten dargestellt werden.^[43] Die Synthese der geschützten Toluolderivate **79** und **80** verlief in sehr guter Ausbeute (99%), die TBS-Schutzgruppe erwies sich jedoch unter den Bedingungen der Bromierung als nicht stabil genug, und es konnte nur der entsprechende Aldehyd isoliert werden.



Schema 45: Einführung polarer Substituenten am *N*-Benzylrest; TBS: ^tBuMe₂Si

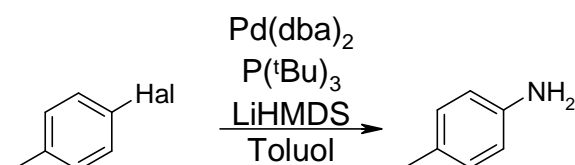
Eine weitere Alternative zur Einführung von verschiedenen Substituenten in dieser Position ist der Einsatz von Übergangsmetall-katalysierten Kupplungen.^[86, 87] Da durch Palladium-

katalysierte Reaktionen sowohl aromatische Amine als auch Carbonylderivate wie Ester und Amide aus den Arylhalogeniden zugänglich sind, wurden die entsprechenden Vorläufermoleküle aus dem Sulfonamid **76** durch Alkylierung mit den entsprechenden Benzylbromiden in guter Ausbeute (76%) dargestellt.



Schema 46: Synthese von Arylhalogeniden als Vorläufer von Pd-katalysierten Reaktionen

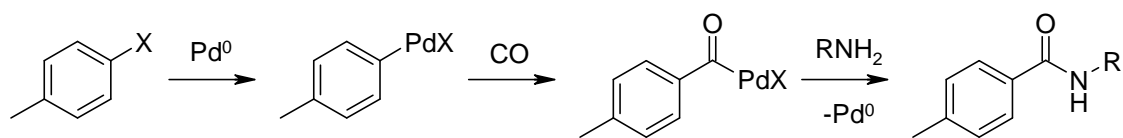
Aus dem reaktiveren Aryliodid **82** sollte mittels einer *Buchwald-Hartwig*-Aminierung das entsprechende Anilinderivat synthetisiert werden. Zumeist werden in dieser Reaktion primäre oder sekundäre Amine als Nucleophile eingesetzt. Da sich Ammoniak in dieser Reaktion als ungeeignet erwiesen hat, sind mehrere Verfahren entwickelt worden, um primäre aromatische Amine herzustellen. In diesem Fall verwendet man Ammoniak-Äquivalente, die bei der Aufarbeitung zu den primären Aminen reagieren, wie z.B. Bis-trimethylsilylaminderivate^[88] oder sich leicht entschützen lassen, wie Diallylamin^[89] oder BOC-Amid.^[90]



Schema 47: Synthese primärer Anilinderivate mittels einer Buchwald-Hartwig-Aminierung

Es wurde versucht, ein primäres Anilinderivat aus dem Aryliodid **82** herzustellen, eine Kupplung mit Lithiumhexamethyldisilazan als Nucleophil, Pd(dba)₂ als Katalysator und Tri-*tert*-butylphosphin als Ligand in Toluol^[88] führte jedoch zu keiner Umsetzung des Aryliodids.

Eine weitere Möglichkeit zur Derivatisierung der Arylhalogenide **81** und **82** bestand in der Palladium-katalysierten Carbonylierung durch Insertion von Kohlenmonoxid in die Kohlenstoff-Palladium Bindung und nachfolgendem Abfangen des Acylpalladium-Intermediats mit primären Aminen führen zu den entsprechenden Amiden (Schema 48).



Schema 48: Synthese von Amiden mittels Palladium-katalysierter Carbonylierung.

In dieser Reaktion können auch andere Nukleophile wie Wasser und Alkohole eingesetzt werden, um die entsprechenden Carbonsäuren oder Ester zu erhalten. Ein Nachteil dieser Reaktion liegt in der Verwendung des giftigen Kohlenmonoxids, das zumeist erst unter hohem Druck in einem Autoklaven zur Reaktion gebracht werden kann. Eine Alternative liegt in der Verwendung von Übergangsmetallcarbonylen, die unter Erwärmen Kohlenmonoxid freisetzen. Hierbei hat sich Molybdänhexacarbonyl als vorteilhafte CO-Quelle erwiesen.^[91, 92] Das Arylhalogenid wird üblicherweise mit Molybdänhexacarbonyl, Palladium-Katalysator und Amin mittels Mikrowellenstrahlung erwärmt. Da kein Labormikrowellengerät zur Verfügung stand, wurde ein alternatives Protokoll von *Yamazaki* verwendet,^[93] wobei das Kohlenmonoxid aus Molybdänhexacarbonyl und DBU durch Erwärmen in einem Druckgefäß freigesetzt wird. Bei der Auswahl des Amids wurde sich am zyklischen Harnstoff VX-638 orientiert.

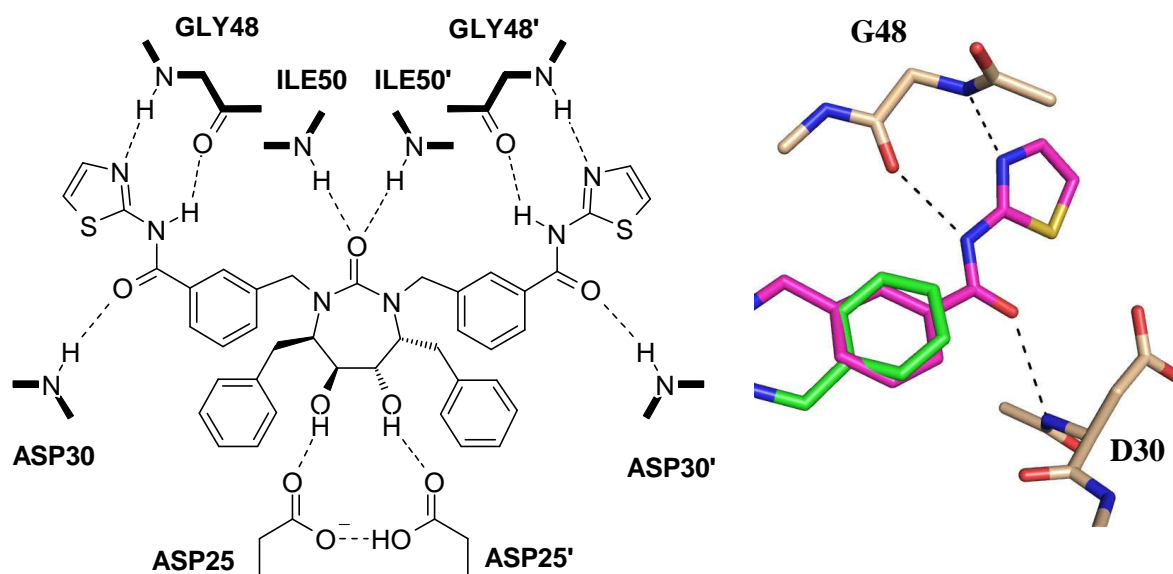


Abbildung 14: Polare Wechselwirkungen des Inhibitors VX-638 im Komplex mit der HIV-Protease (PDB-Code 1QBR)^[29]. Überlagerung der P₂-Reste von VX-638 (violett) mit dem angenommenen Bindungsmodus von 78 (grün)

Der HIV-Protease-Inhibitor VX-638 besitzt zur Adressierung der Reste Aspartat 30 und Glycin 48 einen 2-Aminothiazolamid Substituenten (Abbildung 14).^[29] Aufgrund der ähnlichen Ausrichtung im erwarteten Bindungsmodus von **78** wurde als primäres Amin 2-Aminopyridin verwendet, um ein analoges Wasserstoffbrückennetzwerk aufzubauen. Nach

der Reaktion des Arylhalogenids **82** mit dem von *Herrmann* entwickelten Palladazyklus^[87] als Katalysator, 2-Aminopyridin als Nukleophil und Kaliumcarbonat als Base konnte jedoch kein Carbonylierungsprodukt isoliert werden.

3.9 Kristallstruktur des Inhibitors **78** und strukturbasiertes Design

Jark Böttcher gelang es, den Inhibitor **78** im Komplex mit der HIV-Protease zu kristallisieren und den Bindungsmodus mittels Röntgenstrukturanalyse mit einer Auflösung von 1.50 Å aufzuklären (PDB-Code: 2PQZ). Es stellte sich heraus, dass die Besetzung der Subtaschen des Enzyms vom Modell abwich. Der zentrale Pyrrolidin-Ring bindet zwar wie erwartet an die beiden katalytischen Aspartate 25 und 25', ein *Flap*-Wasser-Molekül wie im Fall von peptidischen Inhibitoren wird jedoch nicht beobachtet. Stattdessen interagiert eine der Sulfonylgruppen direkt mit der *Flap*-Region der Protease und bildet Wasserstoffbrücken mit den Hauptketten-NH-Funktionen der Isoleucine 50 und 50' aus. Der Phenyl-Substituent am Schwefel besetzt die S₂-Tasche, der *N*-Benzylrest die S₁'-Tasche. Der zweite Arm des Inhibitors zeigt eine analoge Taschenbesetzung. Die zweite Sulfonylgruppe besitzt jedoch keine Partner, mit denen sie polare Wechselwirkungen eingehen kann, stattdessen besetzt sie einen Teil der S₂'-Tasche, und der Phenyl-Substituent liegt tiefer in der Tasche als bei dem symmetrieäquivalenten Teil.

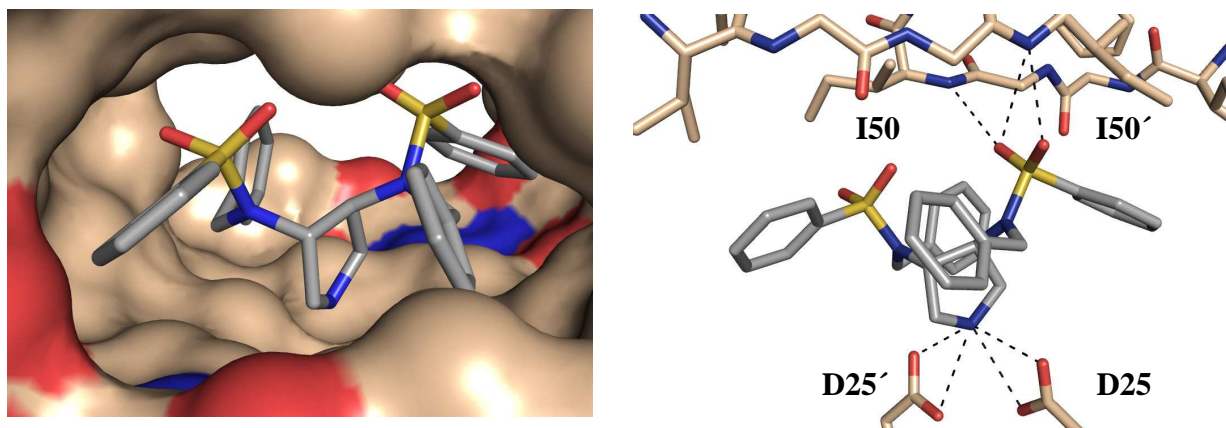


Abbildung 15: In der Röntgenstruktur beobachteter Bindungsmodus von **78**

Betrachtet man die C₂-Achse der Aminosäuren der Bindetasche und die C₂-Achse der Atome des Pyrrolidin-Rings genauer, so fällt auf, dass sich die beiden Achsen im Pyrrolidin-Stickstoff-Atom schneiden und einen Winkel von etwa 20° bilden (Abbildung 16). Das zentrale Sauerstoffatom eines Sulfonyl-Substituenten liegt in der Nähe der Protein-Symmetrieachse, auf der häufig das *Flap*-Wassermolekül beobachtet wird. Dreht man die Proteinstruktur um ihre C₂-Achse und überlagert sie dann mit der Ausgangsstruktur, erkennt man die starke Abweichung vom symmetrischen Bindungsmodus. Der Phenylrest am nicht

wechselwirkenden Sulfon liegt etwa 2.1 Å tiefer in der S₂'-Tasche als der entsprechende Phenylrest in der S₂-Tasche. Für die Substituenten in der S₁-Tasche beträgt die Distanz 1.7 Å, wobei nun der *N*-Benzylrest des wechselwirkenden Sulfonamids tiefer in die Tasche reicht. Auf der Ebene des Proteins zeigt sich, dass die Protease hauptsächlich im *Flap*-Bereich von der Symmetrie abweicht und sich in Richtung des wechselwirkenden Sulfons verschiebt.

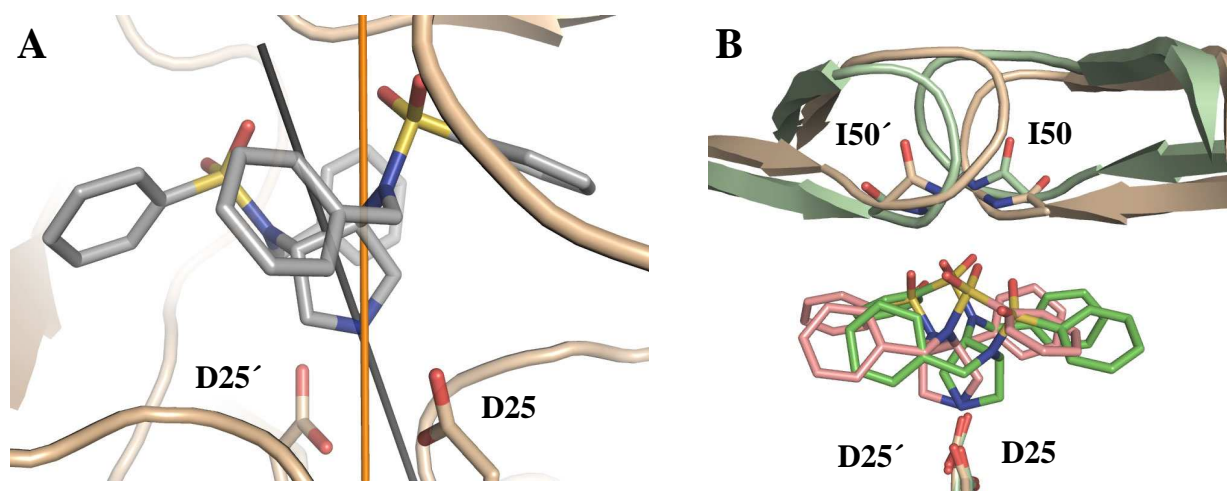


Abbildung 16: (A) Vergleich der C₂-Achsen des Inhibitors **78** (grau) und des Enzyms (orange); (B) Überlagerung der um die C₂-Achse gedrehten Röntgenstruktur mit der Ausgangsstruktur.

Die beobachtete Konformation des Pyrrolidins entspricht sehr genau einer Röntgenstruktur des 3,4-*trans*-Diaminopyrrolidin-Trihydrochlorides **83** (Abbildung 17).^[77] Auch dort nimmt der Ring nicht die C₂-symmetrische *Twist*-Konformation ein, sondern befindet sich in einer *Envelope*-Konformation, wobei das C3 aus der Ebene heraussteht.

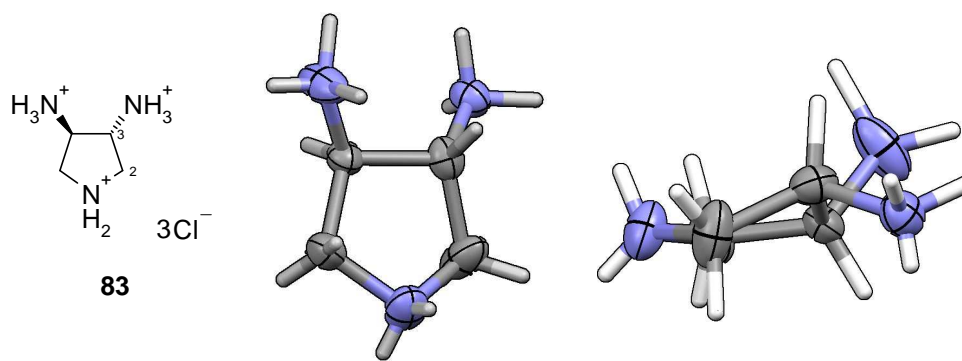


Abbildung 17: Kristallstruktur des 3,4-*trans*-Diaminopyrrolidin-Trihydrochlorides **83**; Kohlenstoff grau, Stickstoff blau, Ellipsoide mit 50% Aufenthaltswahrscheinlichkeit, Wasserstoffatome als Stäbe gezeigt^[77]

In der Struktur des Protein-Ligand-Komplexes befinden sich die Amino-Substituenten am Ring in diaxialer Position, während in der Struktur des unsubstituierten Amins **83** eine diäquatoriale Konformation eingenommen wird. Es ist anzunehmen, dass sich bei **78** die sterisch anspruchsvollen Sulfonylgruppen in der diäquatorialen Konformation zu nahe

kommen würden und deshalb die diaxiale Konformation eingenommen wird, denn die *Envelope*-Konformation ermöglicht einen größeren Abstand der Sulfone.

Die Betrachtung des Bindungsmodus legt die Vermutung nahe, dass durch die Wasserstoffbrückenbindungen des Pyrrolidin-Rings und des Sulfons die Ausrichtung eines der beiden Arme bereits festgelegt ist und der Phenyl- und Benzylrest die S_2 und $S_{1'}$ -Tasche gut besetzen können. Durch die starre Ausrichtung am zentralen Ring kann das Sulfon nur die S_2' -Tasche besetzen, da sich sonst die beiden Sulfone wahrscheinlich zu sehr nähern. In der Röntgenstruktur beträgt der Abstand der beiden sich am nächsten kommenden Sulfonyl-Sauerstoffatome nur 3.3 Å. Somit verbleibt für den *N*-Benzylrest nur noch die Besetzung der S_1 -Tasche, wobei die benzyliche Methylengruppe der terminalen Ethylgruppe der Seitenkette des Isoleucins 84 mit einem Abstand von 3.8 Å sehr nahe kommt. Diese Seitenkette zeigt eine abweichende Konformation im Vergleich zu anderen Röntgenstrukturen des Proteins. Dort steht die terminale Methylgruppe meistens in Richtung der Bindetasche und trennt die S_1' - und S_2 -Tasche, bei der Struktur von **78** zeigt sie dagegen aus der Bindetasche heraus.

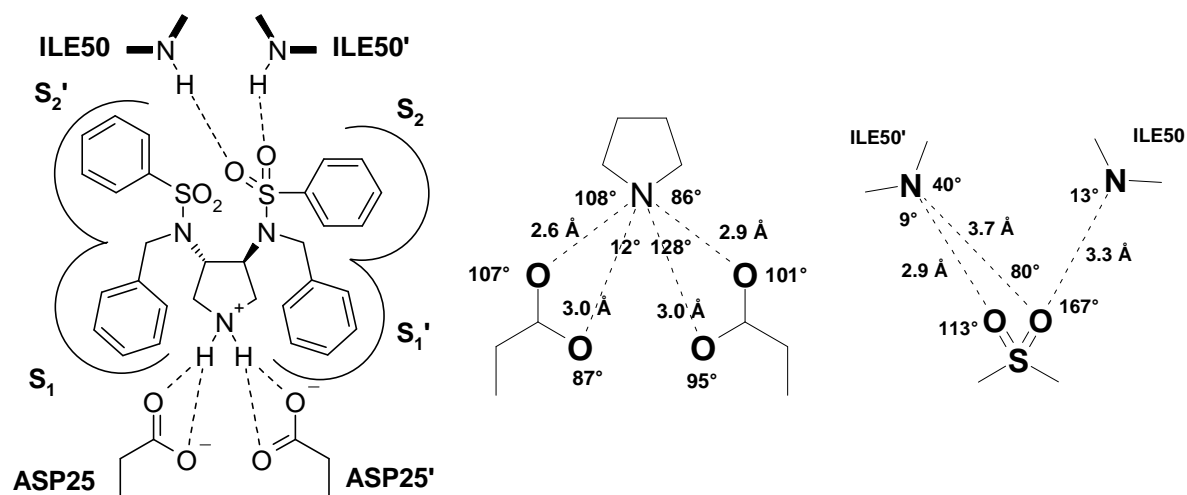


Abbildung 18: Schematische Darstellung des beobachteten Bindungsmodus von **78** (links); in der Röntgenstruktur beobachtete polare Wechselwirkungen: mit der katalytischen Dyade (Mitte) und der Flap-Region (rechts); Winkel am Pyrrolidin-Stickstoffatom: Diederwinkel zwischen C5-N1-C2 und entsprechenden Sauerstoffatom; Winkel an den Aspartat-Sauerstoffatomen: Winkel zwischen der O-C Bindung des Aspartats und dem Pyrrolidin-Stickstoffatom; Winkel an den Amid-Stickstoffatomen: Winkel zwischen der C-N-C Ebene der Amidbindung und dem entsprechenden Sauerstoffatom; Winkel an den Sulfonyl-Sauerstoffatomen: Winkel zwischen der S=O Bindung und dem entsprechenden Amid-Stickstoffatom.

Es ist anzunehmen, dass der Ligand seine Affinität hauptsächlich durch hydrophobe Kontakte mit den Subtaschen des Enzyms gewinnt, da nur vier Wasserstoffbrücken ausgebildet werden, wobei die Salzbrücke zwischen der wahrscheinlich zweifach deprotonierten katalytischen Dyade und dem vermutlich protonierten endozyklischen Amin sicher die stärkste

Wechselwirkung ist, die zugleich den Liganden in der Bindetasche fixiert. Die Wasserstoffbrückenbindungen zu den Aspartatresten erfolgen nicht symmetrisch. Eine geometrische Betrachtung deutet darauf hin, dass die Wasserstoffbrücke einmal zum oberen, im anderen Fall zum unteren Sauerstoffatom der Carboxylatgruppen ausgebildet wird (Abbildung 18, Mitte). Da in Kristallstrukturen die Wasserstoffatome aufgrund ihrer geringen Streumasse nur bei sehr hohen Auflösungen observabel sind, kann in diesem Fall über den Protonierungszustand nur spekuliert werden. Die pK_a -Werte der Seitenketten der proteinogenen Aminosäuren sind zwar bekannt, in Proteinen kann es jedoch aufgrund der lokalen Umgebung eines Restes zu einer dramatischen Verschiebung dieses erwarteten pK_a -Wertes kommen. Im Fall der HIV-Protease beeinflussen sich die beiden Aspartate durch ihren geringen Abstand stark. In verschiedenen Untersuchungen wurde gezeigt, dass in der *apo*-HIV-Protease wie auch in Protein-Inhibitor Komplexen die katalytische Dyade in mono-protoniertem, in manchen Fällen auch in zweifach protoniertem Zustand vorliegt.^[94, 95] Die pK_a -Werte der beiden Aspartate wurden mit 3.4-3.7 und 5.5-6.5, 3.1-3.3 und 4.9-5.3^[94] bzw. 3.3 und 6.8^[95] experimentell bestimmt. Paul Czodrowski entwickelte in der Arbeitsgruppe *Klebe* ein Ladungsmodell, mit dem sich die pK_a -Werte der Seitenketten von Aminosäuren berechnen lassen.^[96] Die durchgeführte Berechnung der pK_a -Werte für die Kristallstruktur des Liganden **22** (PDB-Code 1XL2) kommt zu dem Ergebnis, dass die katalytische Dyade vollständig deprotoniert und der Ligand protoniert vorliegt.^[35] In der Struktur dieses Komplexes befindet sich ein Wassermolekül in der Nähe der katalytischen Dyade, welches jedoch nur einen geringen Einfluss auf die Berechnung des pK_a -Wertes hat. Dieses Wassermolekül wird bei der Struktur von **78** nicht beobachtet. Die Position des Pyrrolidin-Rings in beiden Strukturen ist sehr ähnlich, die Position des Stickstoffatoms unterscheidet sich aber um 0.5 Å. Eine *Poisson-Boltzmann* Rechnung zur Bestimmung des pK_a -Wertes des Liganden und der katalytischen Dyade wurde analog zu der Berechnung von **22** durchgeführt. Als Modell- pK_a für das Pyrrolidin wurde 11.0 und als Dielektrizitätskonstante ϵ für das Innere des Proteins 20 angenommen. Die pK_a -Werte des C- und N-Terminus der beiden Proteinketten sowie der Histidine 69 und 69' wurden als konstant angenommen, da der Abstand zur katalytischen Dyade ausreichend groß ist, um eine signifikante Beeinflussung ausschließen zu können. Das Ergebnis der Berechnung ist qualitativ vergleichbar mit der Berechnung des Komplexes von **22** (Tabelle 4). Die pK_a -Werte der katalytischen Dyade erfahren eine starke Verschiebung in den negativen Bereich, der berechnete pK_a -Wert des Pyrrolidins steigt deutlich an. Ausgehend von diesen pK_a -Werten ergibt eine Berechnung des Protonierungsgrades bei pH 5, dass die katalytische Dyade vollständig deprotoniert und der

Ligand protoniert vorliegt. Andere titrierbare Gruppen weisen keine außergewöhnlich verschobenen pK_a -Werte auf. Von Interesse ist außerdem der Protonierungszustand der Aspartate 29/29' und 30/30', die einen Teil der S_2/S_2' -Tasche bilden. Die pK_a -Werte werden für Aspartat 29 mit 1.89 und für Aspartat 29' mit 1.62, für Aspartat 30 mit 2.71 und für Aspartat 30' mit 2.58 berechnet. Diese Aspartate sind somit ebenfalls als deprotoniert anzusehen.

	<i>apo</i> ^[94]	<i>apo</i> ^[94]	<i>apo</i> ^[95]	22 ^[35]	78
pK_a ASP25	3.4-3.7	3.1-3.3	3.3	-4.18	-0.22
pK_a ASP25'	5.5-6.5	4.9-5.3	6.8	0.42	3.29
pK_a Ligand	apo	apo	apo	16.66	18.10

Tabelle 4: Experimentell bestimmte pK_a -Werte der katalytischen Dyade im apo-Zustand und durch *Poisson-Boltzmann* Berechnungen erhaltene pK_a -Werte der Strukturen der HIV-Protease im Komplex mit **22** und **78** (Modell- pK_a des Pyrrolidins: **11**; $\epsilon = 20$)

Durch das starre Pyrrolidin-Gerüst ist die Ausrichtung der „Arme“ des Inhibitors bereits festgelegt. Die Wechselwirkung der beiden Sulfonylgruppen über ein *Flap*-Wasser-Molekül wird bei **78** wahrscheinlich deshalb nicht beobachtet, da für eine gute tetraedrische Koordination des Wassers ein Abstand von ca. 5 Å ideal wäre, durch die 3,4-Substitution am Pyrrolidin-Ring ist der Abstand aber vorgegeben. Um ein Wasser bei diesem kurzen Akzeptor-Abstand komplexieren zu können, müsste sich das Wasser näher an der *Flap*-Region der Protease aufhalten, wozu sich jedoch dieser Bereich reorganisieren und sich vor allem die Isoleucine 50 und 50' vom Inhibitor weg bewegen müssten. Auf diese Weise würden die hydrophoben Kontakte mit den Seitenketten der Isoleucine verringert.

Den Sulfonyl-Sauerstoffatomen bleibt somit nur die direkte Wechselwirkung mit der *Flap*-Region. Da die Ausrichtung und der Abstand der Gruppen durch das Substitutionsmuster am Ring vorgegeben ist, kann nur eines der Sulfonyle Wechselwirkungen eingehen. Dabei nimmt ein Sauerstoffatom etwa die Position des *Flap*-Wassermoleküls ein, bildet jedoch nur eine Wasserstoffbrücke mit dem Hauptketten-NH des Isoleucins 50 aus. Das Isoleucin 50' dreht sich, um eine Wasserstoffbrücke zum zweiten Sulfonyl-Sauerstoffatom auszubilden. Durch diese Ausrichtung der Amidbindung ist keine Wasserstoffbrücke mit dem zentralen Sulfonyl-Sauerstoffatom zu erwarten (Abbildung 18, rechts).

Zusammenfassend gibt es wahrscheinlich zwei Gründe für den beobachteten unsymmetrischen Bindungsmodus: Der Ligand besitzt wahrscheinlich eine Vorzugs-Konformation, die von der C_2 -Symmetrie abweicht und die Wechselwirkungen mit dem Protein,

insbesondere des *Flap*-Bereichs der Protease, werden nicht symmetrisch ausgebildet, da sich die beiden Sulfonylgruppen sonst wahrscheinlich zu nahe kommen müssten.

Basierend auf dieser Struktur eröffnen sich mehrere Möglichkeiten, die Affinität des Liganden **78** durch Modifikationen zu erhöhen. Trotz des beobachteten unsymmetrischen Bindungsmodus von **78** wurden weiter symmetrische Inhibitoren synthetisiert, um auf die ausgearbeitete Syntheseroute zurückgreifen zu können. Um die Löslichkeit des Liganden zu erhöhen und gerichtete Wechselwirkungen zu erhalten, bietet sich die Einführung von Donor- oder Akzeptorgruppen an. Als mögliche Partner für Wasserstoffbrücken kommen vor allem diejenigen Aminosäuren des Proteins in Frage, die Teil des Peptiderkennungsmotivs der HIV-Protease sind. Darunter fallen Glycin 27 zur Erkennung der zur Schnittstelle benachbarten Amidbindung sowie Aspartat 29 und Glycin 48 zur Erkennung der jeweils nächsten Amidbindung. Ein weiterer möglicher Partner ist das Aspartat 30, das zur Wechselwirkung mit polaren Substrat-Seitenketten in der S_2 -Tasche dient. Im natürlichen Substrat finden sich neben den hydrophoben Aminosäuren wie Valin, Leucin und Isoleucin auch polare Aminosäuren wie Asparagin, Glutamin, Threonin, Glutamat oder Histidin an dieser Stelle.

Ausgehend von der Struktur des Liganden und der Synthese bietet sich bevorzugt eine Substitution an den aromatischen Ringen an, da eine Veränderung des Substitutionsmusters der zentralen Pyrrolidin-Einheit eine komplette Umstellung der Synthese erforderlich machen würde. Der unsymmetrische Bindungsmodus erschwert jedoch die passende Dekoration, da sich die Ringe unterschiedlich tief in der jeweiligen Tasche befinden. Diese mittlere Distanz der entsprechenden symmetrieäquivalenten Ringatome beträgt zwischen der S_1 - und S_1' -Tasche 1.7 Å und zwischen der S_2 - und S_2' -Tasche 2.1 Å. Eine analoge Substitution dürfte sich daher in den Taschen im Vergleich mit ihrer symmetrieäquivalenten Subtasche sehr wahrscheinlich stark unterschiedlich auswirken.

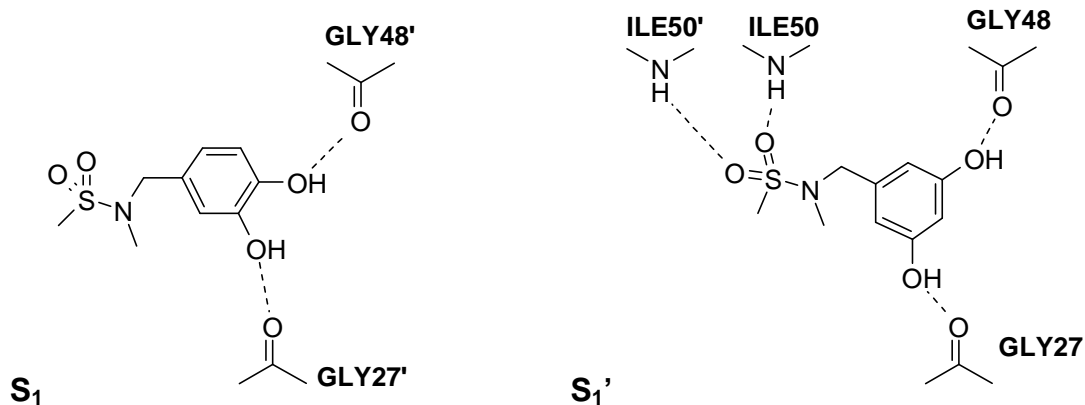


Abbildung 19: Mögliche Adressierung des Peptiderkennungsmotivs ausgehend von der Struktur von **78** durch Substitution am *N*-Benzylrest in der S_1 -Tasche (links) und der S_1' -Tasche (rechts)

In der S_1/S_1' -Tasche böte sich die Möglichkeit, die Carbonylgruppe des Glycin 27 über einen Wasserstoffbrücken-Donor in *meta*-Position zu adressieren. Der Abstand zwischen dem C3 des aromatischen Rings und der Carbonylgruppe beträgt 3.4 Å bzw. 3.6 Å, die Ausrichtung der Phenyl-Ringe in der Tasche ist jedoch nicht ideal, um eine Wechselwirkung zu erreichen. Die Substitution in 5-Position mit einem Donor-Substituenten kann in der S_1' -Tasche zur Wechselwirkung mit der Carbonylgruppe des Glycins 48 führen. In der S_1 -Tasche ist der Winkel jedoch ungünstig, und die Substitution sollte besser in *para*-Position erfolgen (Abbildung 19). Bei der Entwicklung von Inhibitoren der HIV-Protease werden meistens Benzyl- oder Isobutylreste verwendet, um die S_1/S_1' -Taschen zu adressieren. Der Ansatz, durch polare Gruppen das Peptid-Erkennungsmotiv aus der Tasche heraus zu adressieren, wurde selten verfolgt. Aufgrund des geringen Erfolges bei der *N*-Alkylierung mit substituierten Benzylbromiden (siehe Schema 44) wurde diese Strategie zu Gunsten anderer Ansätze daher nicht weiter verfolgt.

In der S_2/S_2' -Tasche bieten sich vor allem die Aspartate 30/30' als Partner für polare Wechselwirkungen an. Bei der Bindung der Substrate dienen sie zur Wechselwirkung mit polaren Seitenketten. Die jeweilige Position der Phenylsulfonylreste des Inhibitors **78** zeigt, dass sowohl in der S_2 als auch in der S_2' -Tasche durch Einführung eines Substituenten in *para*-Position Wechselwirkungen mit dem Protein angenommen werden können und damit einhergehend eine Affinitätssteigerung möglich sein sollte (Abbildung 20, A und B). Der Inhibitor Amprenavir bildet mit einem aromatischen Amin ebenfalls Wasserstoffbrücken mit dem Aspartat 30 aus, wobei sowohl das Hauptketten-NH als auch die Seitenkette des Aspartats 30 adressiert wird. Eine Überlagerung der Kristallstruktur von Amprenavir^[37] mit der Struktur des Inhibitors **78** zeigt eine gute Übereinstimmung in der Position der jeweiligen Phenyl-Ringe in der S_2 -Tasche (Abbildung 20, C). In der ursprünglichen Position der aromatischen Aminogruppe des Amprenavirs befindet sich in der Struktur von **78** ein Wassermolekül. Somit erschien es vielversprechend, diesen Ring in *para*-Position mit einer Aminogruppe oder einem Carboxamid auszustatten.

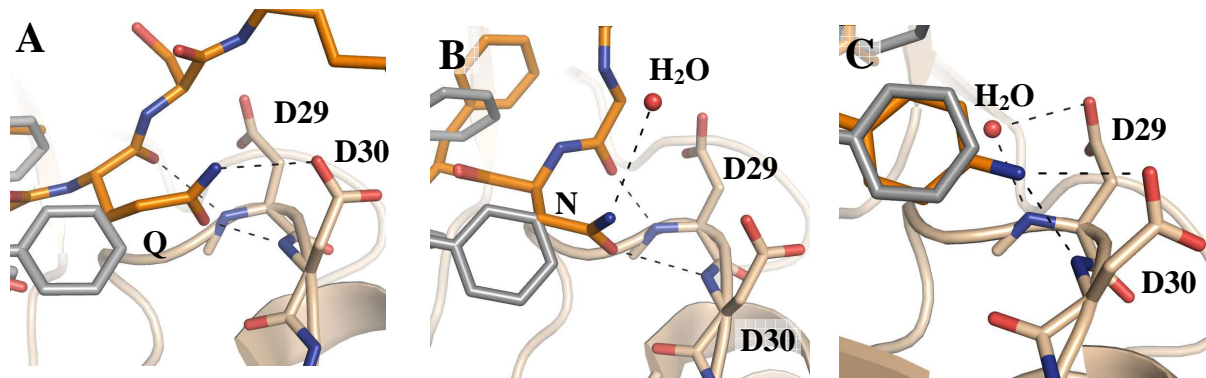


Abbildung 20: Überlagerung von Kristallstrukturen der inaktiven HIV-Protease Mutante D25N mit Substrat Decapeptiden (orange) (A, B), der Struktur des Inhibitors Amprenavir (orange) (C) und der Kristallstruktur von **78** (grau); bei den Substratkomplexen wird das Carbonyl der Peptidbindung durch das NH von Aspartat 29, das Carbonyl der Seitenkette durch das NH von Aspartat 30 adressiert, die Seitenketten der Substrate bei Glutamin (A, Struktur 1KJF)^[97] durch eine Wasserstoffbrücke mit der Seitenkette von Aspartat 30, bei Asparagin (B, Struktur 1MT9)^[13] erfolgt die Wechselwirkung über ein Wasser. Bei der Struktur von Amprenavir (C, Struktur 1HPV)^[37] werden Wasserstoffbrücken vom aromatischen Amin mit dem Hauptketten-NH und der Seitenkette von Aspartat 30 ausgebildet. An der Position der Substrat-Peptidbindung befindet sich ein Wasser.

In der HIV-Protease ist die S_1 -Tasche nicht deutlich von der S_3 -Tasche abgetrennt. Betrachtet man den Enzym-Inhibitor-Komplex von **78** genauer, so erkennt man, dass der *N*-Benzylrest hauptsächlich die S_1 -Tasche besetzt und nur geringfügig in die S_3 -Tasche hineinreicht, die somit größtenteils unbesetzt bleibt. Der Abstand des Liganden zum Arginin 8, welches das Ende der S_3 -Tasche bestimmt, beträgt mehr als 5 Å. In der S_1' -Tasche ist die Situation vergleichbar. Hier wird die Tasche durch den Benzylrest deutlich besser ausgefüllt, da der Rest tiefer bis in die S_3' -Tasche reicht und der Abstand zum Arginin 8' so nur noch etwa 4.5 Å beträgt. Da der Phenyl-Ring in beiden Taschen senkrecht zum Arginin steht, ist keine polare Wechselwirkung möglich (Abbildung 21). Außer Arginin 8/8' bieten sich in der S_3/S_3' -Tasche keine weiteren Partner für polare Wechselwirkungen an, da dieser Teil der Tasche sonst nur aus den Seitenketten der Aminosäuren Prolin 81/81' und Valin 82/82' gebildet wird. Durch das Einführen eines hydrophoben Substituenten am Ring könnte diese Tasche deutlich besser ausgefüllt werden (siehe Abbildung 15). Aufgrund der Zunahme der hydrophoben Kontakte sollte sich die Affinität eines Inhibitors ebenfalls steigern lassen. Als Punkt für die Substitution böten sich vor allem die *para*-Positionen der Phenyl-Ringe an, da ein dortiger Substituent in der S_1 und in der S_1' -Tasche in Richtung der S_3 bzw. S_3' -Tasche deuten sollte. Als Substituenten sind besonders kleine hydrophobe Substituenten wie Halogene geeignet, die zusätzlich noch eine gute Polarisierbarkeit aufweisen und sich in der Synthese einfach einführen lassen (siehe Schema 46).

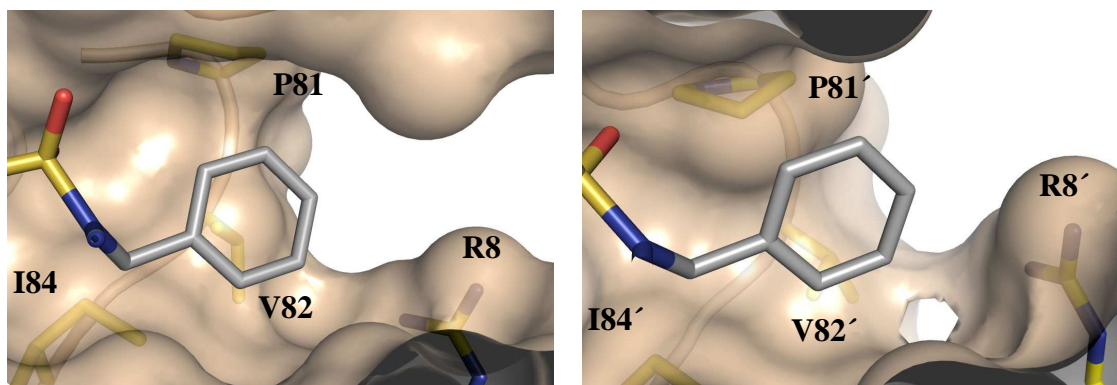


Abbildung 21: Darstellung der S_1 -Tasche (links) und der S_1' -Tasche (rechts) in der Struktur des Inhibitors **78** im Komplex mit der HIV-1-Protease

In der S_2/S_2' -Tasche ist die Oberfläche des Liganden **78** noch nicht optimal auf die Form der Bindetasche abgestimmt. Oberhalb des Isoleucins 84 in Richtung der *Flap*-Region befindet sich noch ein kleiner Hohlraum, der in einigen Strukturen mit Substratpeptiden von einer Seitenkette besetzt wird. In manchen Fällen liegt das Substrat in zwei Konformationen vor, wobei eine in Richtung des Isoleucins zeigt. In der S_2' -Tasche liegt der Phenyl-Ring tiefer in der Tasche und dieser Hohlraum ließe sich durch einen Substituenten in *ortho*-Position am Ring ausfüllen. In der S_2 -Tasche füllt der Phenyl-Ring dagegen bereits einen Teil dieses Hohlraums aus.

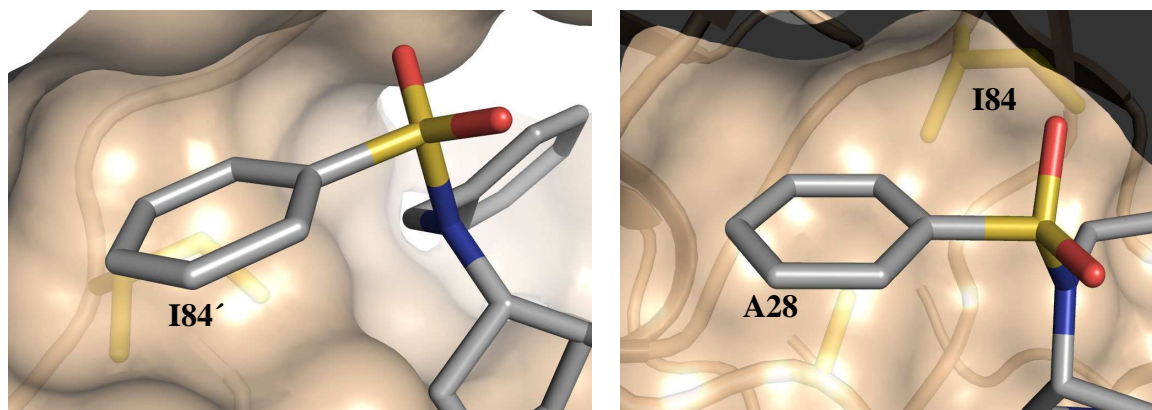


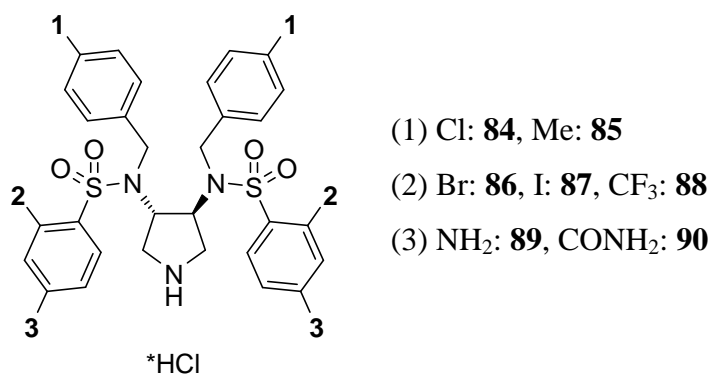
Abbildung 22: Darstellung der S_2 -Tasche (links, N-S-Ar-Diederwinkel: 82°) und der S_2' -Tasche (rechts, N-S-Ar-Diederwinkel: 62°) in der Struktur des Inhibitors **78** im Komplex mit der HIV-1-Protease

In den beiden Taschen zeigt der Phenylsulfonylrest darüber hinaus eine unterschiedliche Konformation. In der normalerweise zu beobachtenden Vorzugskonformation eines Aryl-substituierten Sulfonamids liegt die Ebene des Rings senkrecht zur Bindung des Schwefels zum Stickstoffatom. In der S_2 -Tasche wird diese Konformation eingenommen und der Diederwinkel zwischen N-S-Phenylebene beträgt 82° . In dieser Ausrichtung würde ein *ortho*-Substituent am Phenyl-Ring genau in Richtung des Hohlraums zeigen. In der S_2' -Tasche liegt der Aromat jedoch gekippt in der Tasche, der Diederwinkel beträgt nur noch 62° und die

Ringebene ist parallel zu einer der Schwefel-Sauerstoff-Doppelbindungen angeordnet. In dieser Konformation würde ein *ortho*-Substituent in Richtung des Isoleucins 84' und nicht in den Hohlraum darüber zeigen. Eine leichte Drehung des Rings in seine Vorzugskonformation würde einen etwaigen Substituenten ebenfalls in dem Hohlraum platzieren. Es ist nicht zu erwarten, dass der Energieunterschied zwischen den beiden Konformeren sehr groß sein sollte, da in Kristallstrukturen von Arylsulfonamiden beide zu beobachten sind. Somit scheint eine Drehung um 20° möglich, wenn dadurch eine bessere Oberflächenübereinstimmung erreicht werden kann. Ein Grund für die unterschiedliche Ausrichtung der Phenyl-Ringe könnte die unterschiedlich tiefe Besetzung der Tasche sein. In der S₂-Tasche bietet die Vorzugskonformation gute Möglichkeiten, *Van der Waals*-Wechselwirkungen einzugehen. In der S₂'-Tasche liegt der Ring dagegen tiefer in der Tasche, und durch eine Drehung des Aromaten kann sich der Ligand besser der Seitenkette von Isoleucin 47 anpassen. Der Energieaufwand für diese Drehung aus der Vorzugskonformation wird wahrscheinlich durch die zusätzlichen *Van der Waals*-Kontakte kompensiert. Als Substituenten in *ortho*-Position zur Adressierung des Hohlraums oberhalb von Isoleucin 84 sind kleine hydrophobe Substituenten wie ein Chloratom oder eine Methylgruppe geeignet, da sie sich synthetisch ebenfalls einfach einführen lassen.

Ausgehend von der Kristallstruktur von **78** erschienen vor allem Substitutionen an den nachfolgenden Positionen an den Aromaten sehr viel versprechend:

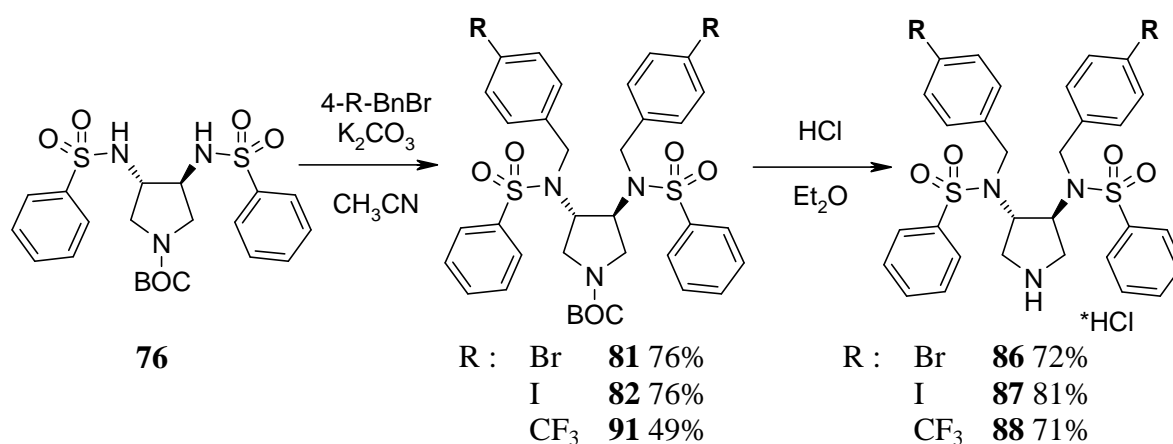
- (1) Halogene in *para*-Position am *N*-Benzylrest, um die S₁/S₃-Tasche besser auszufüllen.
- (2) Methyl bzw. Chlor in *ortho*-Position am Sulfonyl-Arylrest, um die Oberflächenübereinstimmung in der S₂-Tasche zu erhöhen.
- (3) Amin bzw. Carboxamid in *para*-Position am Sulfonyl-Arylrest, um eine Adressierung von Aspartat 30 analog zu Amprenavir und den Substraten zu erreichen.



Schema 49: An Hand der Analyse der Kristallstruktur von 78 ausgewählte Struktur-Modifikationen

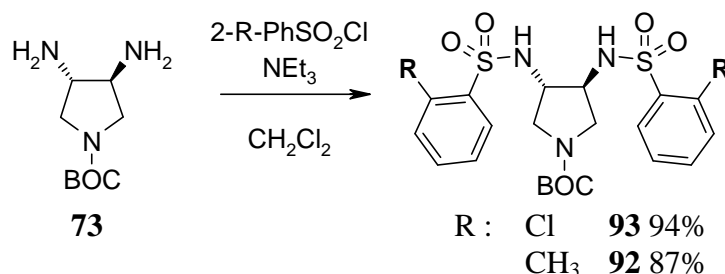
3.10 Synthese von aus der Struktur des Inhibitors 78 abgeleiteter Inhibitoren

Die Einführung der zusätzlichen Substituenten in *para*-Position am *N*-Benzylrest ließ sich problemlos erreichen, da der *N*-Benzylrest erst im letztem Schritt eingeführt wird. Die Darstellung der Vorstufen **81** und **82** für die Halogen-substituierten Inhibitoren **86** (Brom-substituiert) und **87** (Iod-substituiert) wurde bereits in Kapitel 3.8 (siehe S.49) beschrieben. Die Einführung des 4-Trifluormethylbenzylrestes erfolgte analog zur geschützten Vorstufe **91**. Die Entschützung der Vorstufen erfolgte wiederum durch saure Abspaltung der BOC-Gruppe zu den Hydrochloriden.

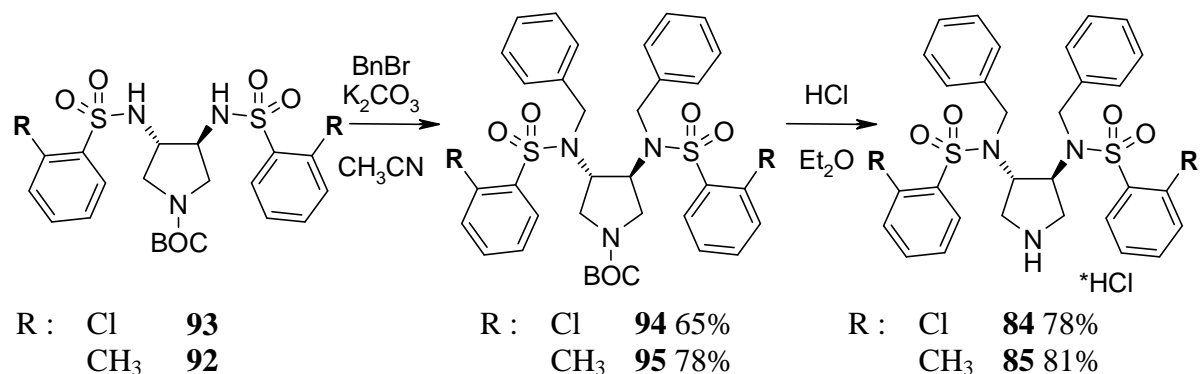


Schema 50: Synthese der am *N*-Benzylrest in *para*-Position substituierten Inhibitoren

Für die am Aryl-Sulfon modifizierten Inhibitoren mussten erst die zu **76** analogen Sulfonamide dargestellt werden. Dazu wurde das Diamin **73** mit 2-Methyl-sulfonylchlorid zu **92** und mit 2-Chlor-sulfonylchlorid zu **93** umgesetzt. Die beiden Sulfonamide wurden anschließend mit Benzylbromid zu den BOC-geschützten Inhibitorvorstufen **94** und **95** alkyliert und im letzten Syntheseschritt die BOC-Schutzgruppe unter sauren Bedingungen abgespalten, wodurch die Inhibitoren **84** und **85** in Form ihrer Hydrochloride erhalten wurden.



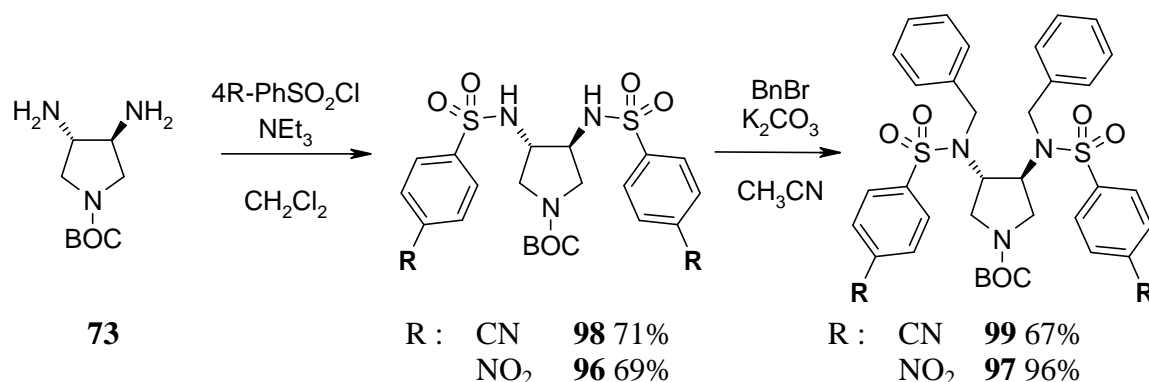
Schema 51: Synthese der am Sulfonyl-Arylrest in *ortho*-Position substituierten Sulfonamide



Schema 52: Synthese der am Sulfonyl-Arylrest in *ortho*-Position substituierten Inhibitoren

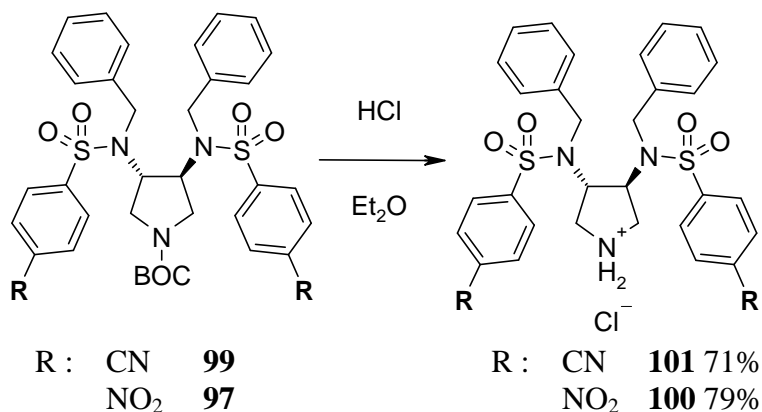
Für die Synthese der am Sulfonyl-Arylrest in *para*-Position mit einer Aminogruppe bzw. einem Carboxamid substituierten Inhibitoren mussten entsprechend geschützte Vorläufer verwendet werden, da bei der Alkylierung das aromatische Amin selbst als Nukleophil reagieren kann. Die Verwendung des BOC-geschützten aromatischen Amins wurde ebenfalls nicht verfolgt, da auch das Carbamat unter drastischen Bedingungen alkyliert werden kann. Andere Schutzgruppen, die in Carboxamiden oder Carbamaten resultieren, haben die gleichen Nachteile oder hätten die Synthesesequenz deutlich verlängert. Zur Herstellung des Amins wurde daher als Vorläufer die entsprechende Nitroverbindung ausgewählt, da sich aromatische Nitroverbindungen leicht mit verschiedenen Reduktionsmitteln wie z.B. H₂/Pd oder Raney-Nickel, SnCl₂ oder Al/Hg und Ultraschall unter milden Bedingungen reduzieren lassen. Die Kondensation des Amins **73** mit 4-Nitrobenzolsulfonylchlorid (Nosylchlorid) zum sehr gut kristallisierenden Sulfonamid **96** verlief in guter Ausbeute. Dieses durch die beiden elektronenziehenden Substituenten zusätzlich aktivierte Sulfonamid **96** ließ sich in sehr guter Ausbeute zur Verbindung **97** alkylieren.

Bei der Synthese des Carboxamids wurde ein analoger Ansatz verfolgt. Dieses ist zwar ein schlechteres Nukleophil als das Amin, hätte jedoch unter den drastischen Alkylierungsbedingungen auch benzyliert werden können. Als Vorläufer bot sich hier das entsprechende Nitril an, das leicht in das Amid überführt werden kann. Die Verseifung von Nitrilen im Sauren führt in der Regel direkt zur entsprechenden Carbonsäure. Im Basischen erfolgt die Reaktion über das Carboxamid, welches jedoch leichter als das entsprechende Nitril hydrolysiert wird, jedoch unter milden basischen Bedingungen selektiv zum Amid verseift werden kann. Die Kondensation des Amins **73** mit 4-Cyanosulfonylchlorid ergab das Sulfonamid **98**, welches sich problemlos zur Verbindung **99** alkylieren ließ.



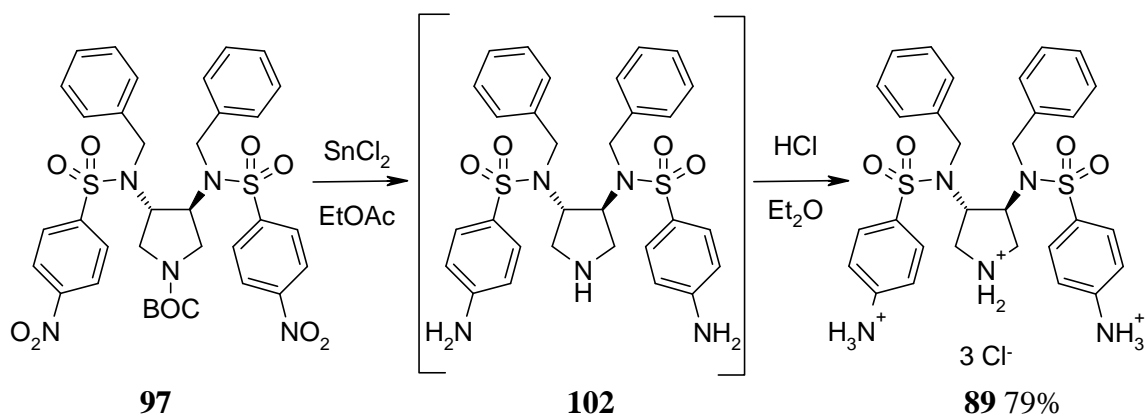
Schema 53: Synthese der am Sulfonyl-Arylrest in *para*-Position substituierten Sulfonamide

Die BOC-geschützten Pyrrolidin-Derivate **97** und **99** wurden mit HCl in Diethylether ebenfalls zu den Inhibitoren **100** und **101** entschützt. Diese waren nach dem ursprünglichen Design zwar nicht vorgesehen (siehe Schema 49), da sie jedoch als Synthese Zwischenprodukte dargestellt wurden, sollten mit ihnen zusätzliche Informationen über die Struktur-Aktivitäts-Beziehung dieser Klasse von Liganden gewonnen werden.



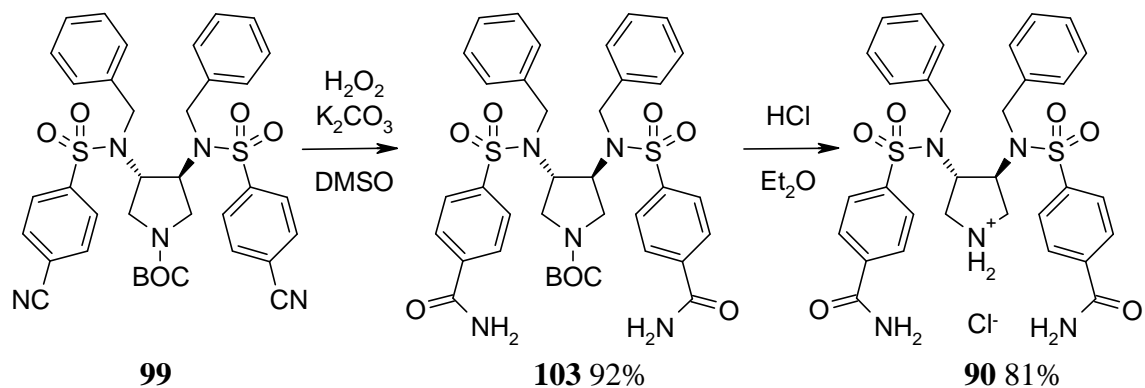
Schema 54: Entschützung zu den Inhibitoren **101** und **100**

Die Nitroverbindung **97** wurde durch Reduktion mit Zinn(II)chlorid in Ethylacetat in das entsprechende Amin überführt.^[98, 99] Unter den Reaktionsbedingungen wurde gleichzeitig die BOC-Schutzgruppe abgespalten und die Verbindung **102** erhalten, welche durch Ausfällen des Trihydrochlorids **89** aus etherischer Lösung aufgereinigt wurde (Schema 56).



Schema 55: Reduktion der Nitroverbindung 97 zum Inhibitor 89

Zur Hydrolyse des Nitrils wurde zunächst der Harnstoff-Komplex von Wasserstoffperoxid verwendet^[100], jedoch konnte das daraus resultierende Carboxamid **103** nicht isoliert werden. Mittels der milden Hydrolysemethode mit einer Mischung aus DMSO und H₂O₂ mit Kaliumcarbonat als Base bei 0°C^[101] konnte schließlich **103** in exzellenter Ausbeute erhalten werden. Der Inhibitor **90** wurde aus der Verbindung **103** wiederum durch Entschützung im Sauren freigesetzt.

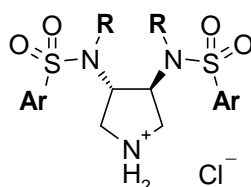


Schema 56: Selektive Hydrolyse des Nitrils 99 zur Synthese des Inhibitors 90

Bei dem Versuch, aus Nitril **99** das entsprechende Aminomethylderivat durch Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid zu erhalten, konnte kein Produkt isoliert werden. Weitere denkbare Derivatisierungen des Nitrils wie Verseifung zur Carbonsäure oder Zykladdition zum Tetrazol wurden nicht durchgeführt.

3.11 Struktur-Aktivitäts-Beziehung der Inhibitoren der 2. Generation

Die synthetisierten Inhibitoren wurden von Jark Böttcher auf ihre Affinität gegenüber der HIV-Protease in einem fluoreszenzbasierten kompetitiven Bindungs-Assay gemessen. Alle aus der Analyse der Kristallstruktur von **78** vorgeschlagenen Modifikationen zeigten eine deutliche Verbesserung der Affinität (Tabelle 5) gegenüber dem Wildtyp der HIV-Protease.



	<u>Ar</u> -SO ₂	<u>R</u> -N	K _i	R	ΔG	ΔG/n _i	VdW
78			2.15	1.0	-34.2	0.88	457
86			0.46	4.7	-38.2	0.93	515
87			0.39	5.5	-38.7	0.94	524
88			0.80	2.7	-36.8	0.78	500
84			0.77	2.8	-36.9	0.90	492
85			0.67	3.2	-37.3	0.91	491
100			1.72	1.3	-34.8	0.77	432
101			3.30	0.7	-33.1	0.77	504
89			0.27	8.0	-39.6	0.97	472
90			0.26	8.3	-39.7	0.88	463

Tabelle 5: Affinitäten in μM der modifizierten Inhibitoren gegenüber der HIV-Protease; R: Verbesserung der Affinität gegenüber **78**; $\Delta\text{G} = RT \ln K_i$ für $T=315\text{K}$ in kJ; n_i: Zahl der Schweratome; $|\Delta\text{G}/n_i|$: Ligand Efficacy; VdW: Mit dem Programm MOE berechnete hydrophobe Van der Waals-Oberfläche in \AA^2

Die Einführung von hydrophoben Substituenten in *para*-Position am *N*-Benzylrest führte zu einer Verbesserung um den Faktor drei bei der Trifluormethyl-substituierten Verbindung (**88**), um den Faktor fünf bei der Brom-substituierten (**86**) und um den Faktor sechs bei der Iod-substituierten Verbindung (**87**). Die Steigerung der Affinität korreliert mit der Größe der Substituenten und damit mit der im Protein vergrabenen hydrophoben Oberfläche. Die Einführung von hydrophoben Substituenten in *ortho*-Position am *S*-Arylrest führte zu einer Verbesserung etwa um den Faktor drei für das Chlor- (**84**) bzw. das Methyl-Derivat (**85**), wobei die Methyl-substituierte Verbindung eine geringfügig bessere Affinität zeigt. Trägt man die Werte der freien Bindungsenthalpie ΔG gegen die hydrophobe Oberfläche auf (Diagramm 3), so erkennt man einen linearen Zusammenhang. Aufgrund der geschlossenen Bindetasche, in welcher der gebundene Ligand keine Kontakte mehr zu Solvenzmolekülen ausbilden kann, ist die Approximation, dass die hydrophobe Oberfläche des Liganden der vergrabenen Oberfläche entspricht, zulässig. Die Beobachtung, dass ein Hinzufügen ähnlich großer Substituenten (CF_3 , CH_3 und Cl) unabhängig vom Ort der Substitution eine sehr ähnliche Veränderung der Affinität bewirkt, legt die Vermutung nahe, dass die größere vergrabene hydrophobe Oberfläche für die veränderte Affinität verantwortlich ist. Wie ausgehend von **78** erwartet, ist sowohl in der S_1 - wie auch in der S_2 -Tasche genug Platz für die substituierten aromatischen Reste.

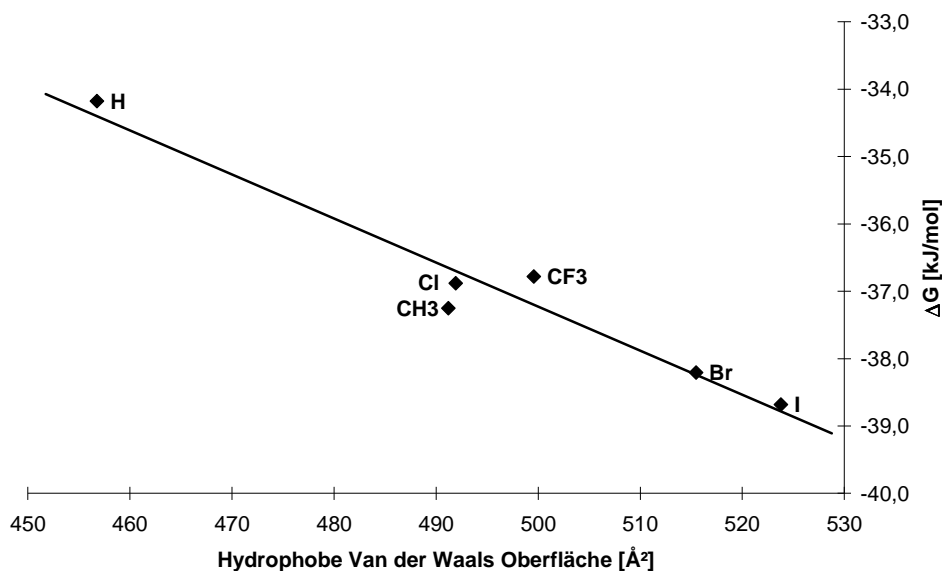


Diagramm 3: Zusammenhang zwischen freier Bindungsenthalpie ΔG und der mit dem Programm MOE berechneten hydrophoben *Van der Waals*-Oberflächen der Liganden bei Substitution mit hydrophoben Resten; Gleichung der Regressionsgeraden: $y = -0.0654x - 4.5099$ kJ; $R^2 = 0.9493$

Die lineare Regression ergibt eine Änderung der Bindungsaffinität von 65 J pro Å^2 vergrabener hydrophober Oberfläche. Eine Extrapolation auf eine hydrophobe Oberfläche von

0 \AA^2 würde demnach den Anteil an polaren Wechselwirkungen zur freien Bindungsenthalpie ergeben. Basierend auf diesem Modell würde dieser Anteil nur etwa 4.51 kJ/mol betragen, eine Energie, die aufgrund der Salzbrücke zwischen der katalytischen Dyade und dem protonierten sekundären Amin des Pyrrolidins sowie der beiden durch das Sulfon ausgebildeten Wasserstoffbrücken jedoch sehr klein erscheint. Es ist anzunehmen, dass die lineare Regression in dem doch sehr kleinen Bereich zwischen 460 und 520 \AA^2 keine genauen Aussagen über die Situation bei einer kleinen hydrophoben Oberfläche erlaubt.

Die Einführung von Wasserstoffbrückenakzeptoren wie dem Nitril **101** oder der Nitroverbindung **100** führt dagegen zu keinem einheitlichen Trend. Die Nitroverbindung **100** zeigt eine ähnliche Affinität wie die Ausgangsverbindung. Die Nitrogruppe kann zwar wahrscheinlich als Akzeptor dienen, der benötigte Energieaufwand für die Desolvatation der Nitrogruppe wird jedoch bei der Bindung des Inhibitors kompensiert, womit die Affinität somit nahezu unverändert bleibt. Für das Nitril **101** ergibt sich als einzige Verbindung in der Serie eine schlechtere Affinität als für die Ausgangsverbindung **78**. Die Ausrichtung des Nitrils ist wahrscheinlich nicht ideal, um eine Wasserstoffbrücke auszubilden. Berücksichtigt man den Aufwand für die größere Desolvatationsenergie des Nitrils, nimmt so die Gesamtenergie bei Bindung an das Protein ab.

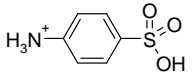
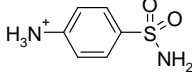
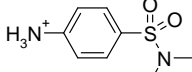
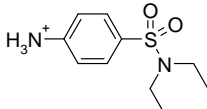
Struktur	pK _a	Referenz
	0.64	[102]
	2.06	[103]
	1.54	[103]
	1.75	[103]

Tabelle 6: pK_a-Werte von analog zu **89 substituierten Anilin-Derivaten**

Die Einführung von Wasserstoffbrückendonoren wie dem Amin (**89**) oder dem Carboxamid (**90**) führt zu einer deutlichen Verbesserung der Affinität der Inhibitoren. Sie nimmt im Falle des Amino-substituierten Inhibitors **89** um den Faktor 8, bei dem Carboxamid-substituierten Inhibitor **90** sogar um den Faktor 9 zu. Es ist anzunehmen, dass das aromatische Amin in **89** nicht basisch genug ist, um in wässriger Lösung und in der Bindetasche in der protonierten Form vorzuliegen. Die experimentell bestimmten pK_a-Werte für die Aminogruppen analog

substituierter aromatischer Amine liegen bei zwei oder sind sogar noch kleiner (Tabelle 6). Der geringe pK_a -Wert der Verbindungen lässt sich durch ihr Vorliegen als phenyloge Sulfonsäurederivate erklären.

Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Aminogruppe nur die Funktion eines Wasserstoffbrückendonors übernimmt und keine zusätzliche Salzbrücke ausgebildet werden kann. Im Fall des Carboxamids **90** ist nicht erkennbar, ob die im Vergleich zum Amin **89** ähnliche Steigerung der Affinität nur durch die Donor-Eigenschaften oder auch durch Akzeptor-Eigenschaften der Carbonylgruppe hervorgerufen wird. Die Nitro-Verbindung **100** kann ähnlich wie das Carboxamid als Wasserstoffbrückenakzeptor dienen und hat eine bessere Affinität als die unsubstituierte Verbindung, so dass davon auszugehen ist, dass auch die Carbonylgruppe des Amids als Akzeptor dient. Der unsymmetrische Bindungsmodus von **78** lässt außerdem die Annahme zu, dass sowohl das Amin als auch das Carboxamid verschiedene Wechselwirkungsmuster in der S_2 - und S_2' -Tasche zeigen und eine Beurteilung der einzelnen polaren Beiträge deshalb unmöglich ist. Da die Affinität der beiden Inhibitoren deutlich zunimmt, ist es wahrscheinlich, dass alle zusätzlich eingeführten polaren Gruppen Wechselwirkungs-Partner in der Bindetasche finden.

Zusammenfassend ergibt sich für alle aus der Röntgenstruktur von **78** abgeleiteten Modifikationen eine deutliche Verbesserung der Affinität. Die Vergrößerung der hydrophoben Oberfläche führt zu einer linearen Steigerung der Bindungsenergie der Liganden, wobei die Löslichkeit jedoch deutlich abnimmt. Die polaren Substituenten zeigen die größte Steigerung der Affinität und erhöhen zudem noch zusätzlich die Löslichkeit der Inhibitoren.

3.12 Bindungsmodi der verbesserten Inhibitoren

Um zu überprüfen, ob der Bindungsmodus sich durch die zusätzlichen Substituenten und die dadurch hervorgerufenen Wechselwirkungen verändert hat und ob die Steigerung der Affinität durch die vorhergesagten Wechselwirkungen hervorgerufen wird, sollte der Bindungsmodus erneut bestimmt werden. Für repräsentative Vertreter dieser Serie von Inhibitoren wurden von Jark Böttcher durch Kokristallisation mit der HIV-Protease und Bestimmung der Kristallstrukturen die Bindungsmodi bestimmt. Für die am *N*-Benzylrest *para*-substituierten Derivate wurde die Iod-substituierte Verbindung **87** untersucht und für die am *S*-Arylrest *ortho*-substituierten, aufgrund der größeren Streumasse des Chlors, die Chlor-substituierte Verbindung **84**. Für die am *S*-Arylrest *para*-substituierten Verbindungen wurden beide polaren Vertreter untersucht, das Amin **89** sowie das Amid **90**, um die gerichteten

Wechselwirkungen im Detail zu analysieren. Durch die zusätzlichen Kristallstrukturen sollte auch die bestmögliche Kombination der die S_1 - bzw. S_2 -Tasche adressierenden Substituenten gefunden werden, um auf diesem Weg eine weitere Steigerung der Affinität der Inhibitoren zu erreichen.

3.12.1 Bindungsmodus des Iod-substituierten Inhibitors **87**

Aus der Reihe der am *N*-Benzylrest substituierten Verbindungen wurden mit der Iod-Verbindung **87** die zur Strukturbestimmung am besten geeigneten Kristalle erhalten. Die Struktur des Protein-Inhibitor-Komplexes wurde von Jark Böttcher am Synchrotron BESSY mit einer Auflösung von 1.41 Å bestimmt (PDB-Code: 2QNP).

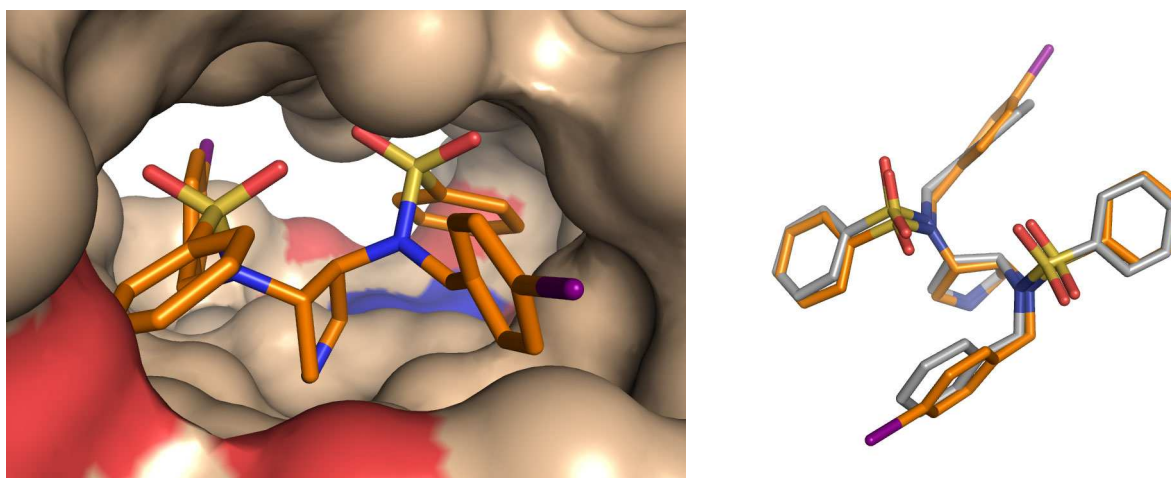


Abbildung 23: Links: In der Röntgenstruktur beobachteter Bindungsmodus von **87**; rechts: Überlagerung der Strukturen von **78** (grau) und **87** (orange), rmsd=0.45 Å

Der Inhibitor **87** zeigt einen Bindungsmodus, der in den polaren Wechselwirkungen und der Taschenbesetzung dem von **78** gleicht. Die Aminogruppe des Pyrrolidins adressiert die katalytische Dyade und eines der Sulfone bildet zwei direkte Wasserstoffbrücken zu den Isoleucinen 50 und 50' aus. Die *N*-Benzylreste besetzen die S_1/S_1' -Taschen und die *S*-Phenylreste die S_2/S_2' -Taschen der Protease.

Die Überlagerung der Strukturen von **87** und **78** zeigt in der Positionierung der Phenylreste in der S_2 - und der S_2' -Tasche keinen Unterschied. In der S_1 - und S_1' -Tasche liegt der Aromat hingegen in einer leicht veränderten Position vor. Der Rest ragt etwas tiefer in die Tasche, durch den voluminösen Iod-Substituenten in *para*-Position ist der Benzylrest gezwungen etwas nach oben auszuweichen, da sonst der Substituent wahrscheinlich Arginin 8 zu nahe kommen würde.

Da der Bindungsmodus praktisch identisch zu **78** ist, lässt sich die bessere Affinität wahrscheinlich auf die größere vergrabene hydrophobe Oberfläche zurückführen (Diagramm 3, Seite 66).

3.12.2 Bindungsmodus des Chlor-substituierten Inhibitors 84

Die Kristallstruktur des Inhibitors **84** im Komplex mit der HIV-Protease wurde von Jark Böttcher in Marburg mit einer Auflösung von 2.30 Å bestimmt (PDB-Code 2QNQ). Der Bindungsmodus gleicht dem der Ausgangsstruktur: Die *N*-Benzylreste besetzen die S_1/S_1' -Taschen und die *ortho*-Chlor-phenylreste die S_2/S_2' -Taschen des Enzyms. Die polaren Wechselwirkungen sind ebenfalls sehr ähnlich: Das endozyklische Amin bindet an die katalytische Dyade und eines der Sulfone bildet direkte Wechselwirkungen mit den Isoleucinen 50 und 50' der *Flap*-Region aus (Abbildung 24).

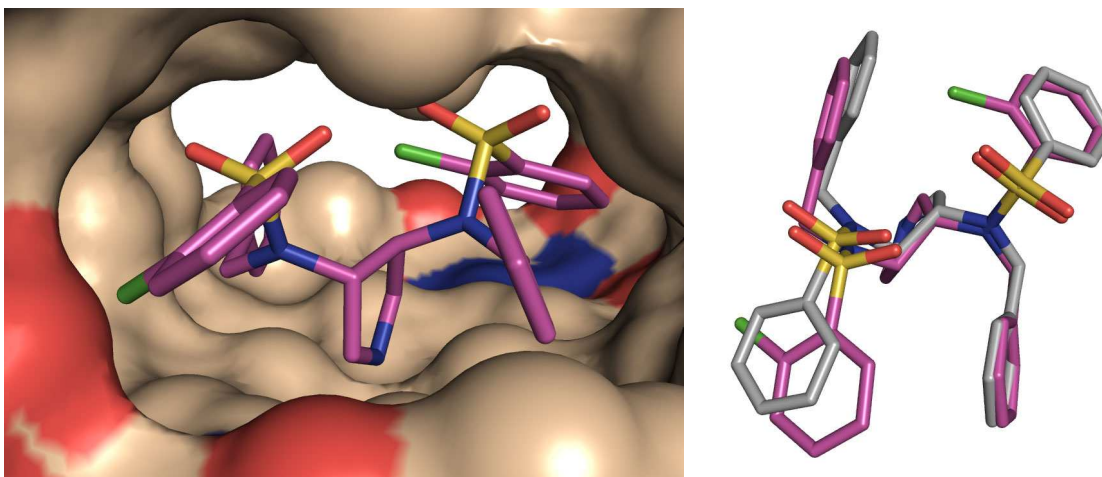


Abbildung 24: Links: In der Röntgenstruktur beobachteter Bindungsmodus von **84**; rechts: Überlagerung der Strukturen von **78** (grau) und **84** (violett), rmsd=0.67 Å

Die Längen der beiden Wasserstoffbrücken, die das Sulfon zu den Isoleucinen ausbildet, sind mit 3.4 Å und 3.0 Å vergleichbar mit denen in der Struktur des Inhibitors **78** beobachteten Abständen. Die Lage des Pyrrolidin-Rings ist praktisch identisch, nur die Konformation des Rings ist etwas abweichend. Nicht das C4, welches das nicht wechselwirkende Sulfon trägt steht in der *Envelope*-Konformation aus der Ebene heraus, sondern das C2 ist um etwa 0.5 Å verschoben und somit die Ausrichtung der Substituenten am C4 abweichend. Es ist jedoch fraglich, ob dieser Unterschied signifikant oder nur auf die geringere Auflösung der Röntgenstruktur zurückzuführen ist. Der Teil des Inhibitors mit dem Sulfon, welches die Wasserstoffbrücken ausbildet, besetzt die S_1' - und S_2 -Tasche. Es nimmt die gleiche Konformation ein und liegt praktisch an der gleichen Position wie bei **78** (siehe Abbildung 24 rechts). Entgegen der geplanten Ausrichtung steht der *ortho*-Chlor-Substituent jedoch nicht in Richtung des Hohlraumes oberhalb des Isoleucins **84** sondern in Richtung der S_1 -Tasche und der Hohlraum bleibt unbesetzt. Wie schon bei der Struktur von **78** beobachtet, reicht der Aromat bereits in diesen Teil der Tasche und der Hohlraum könnte zu klein für den Chlor-Substituenten sein. Die Lage dieses aromatischen Rings scheint durch die Wasserstoffbrücken des Sulfons

bestimmt zu werden. Eine starke Abweichung lässt sich jedoch in der Ausrichtung der Reste in der S_1 - und S_2' -Tasche beobachten. Auch in der S_2' -Tasche scheint der Chlor-Substituent zu groß für den adressierten Hohlraum zu sein. Der aromatische Ring wird um etwa 1 Å verschoben und der Chlor-Substituent nimmt ungefähr die Position des *ortho*-Kohlenstoffatoms des Inhibitor **78** ein. Die Position der Schwefelatome unterscheidet sich nur um 0.6 Å. Aufgrund der starren Struktur des Sulfonamids wird dadurch die Lage des Benzylrestes in der S_1 -Tasche verändert, wobei die Methylengruppe des Benzylrestes um 1 Å in Richtung der S_2' -Tasche verschoben wird, und der Phenylring etwa 1 Å kürzer in die S_1 -Tasche reicht als bei **78**. Es ist anzunehmen, dass die abweichende Ausrichtung des Restes in der S_2' -Tasche auch die veränderte Konformation des Pyrrolidin-Rings verursacht. Es bleibt unklar, warum diese Ausrichtung und nicht eine ähnliche Konformation wie in der S_2 -Tasche eingenommen wird, wo der zusätzliche Substituent praktisch keine Veränderungen hervorruft und in Richtung der S_1 -Tasche steht. Ursächlich könnte die unterschiedliche Ausrichtung der beiden Aromaten in der S_2 - und S_2' -Tasche sein. In der S_2' -Tasche liegt der Ring nicht in der Vorzugskonformation aromatischer Sulfonamide, sondern ist um etwa 20° gedreht. Der Abstand des entsprechenden *ortho*-Kohlenstoffatoms zum Carbonyl-Sauerstoffatom des Glycins **48** beträgt nur noch 3.8 Å. Ein Chlor-Substituent an dieser Stelle würde also bei der Länge der Chlor-Kohlenstoffbindung von 1.75 Å nur noch einen Abstand von etwa 2 Å haben. In der S_2 -Tasche beträgt dieser Abstand aufgrund der unterschiedlichen Lage und Ausrichtung der Ringe jedoch 3.3 Å. Da ein Chloratom und eine Methylgruppe sich in ihrer Größe und ihren Eigenschaften sehr ähnlich sind und darüber hinaus die Affinität praktisch gleich ist, ist zu erwarten, dass der Bindungsmodus der analogen Methylverbindung **85** dem Bindungsmodus der Chlorverbindung **84** gleicht.

Der Inhibitor **84** zeigt im Vergleich zu **78** eine um etwa 3 kJ/mol größere freie Bindungsenthalpie (Tabelle 5, Seite 65). Obwohl im Bindungsmodus die Abweichungen in der S_1 - und S_2' -Tasche relativ groß sind, korreliert die gesteigerte Affinität recht gut mit der größeren hydrophoben Oberfläche (Diagramm 3, Seite 66), somit scheinen die Verzerrungen keinen sehr großen Einfluss auf die Bindungsenergie zu haben. Jedoch zeigen sowohl die Chlorverbindung **84** wie auch die Methylverbindung **85** eine etwas größere Bindungsenergie als durch das Modell zu erwarten ist. Zudem sind die hydrophoben Wechselwirkungen nicht gerichtet und so von der Ausrichtung der Reste in den Taschen verhältnismäßig unabhängig.

3.12.3 Bindungsmodus des Amino-substituierten Inhibitors 89

Der Inhibitor **89** im Komplex mit der HIV-Protease wurde von Jark Böttcher kristallisiert und die Kristallstruktur mit einer Auflösung von 1.78 Å bestimmt (PDB-Code 2PWC). Der bestimmte Bindungsmodus gleicht dem in der Struktur von **78** beobachteten: Das Pyrrolidin-Stickstoffatom adressiert die katalytische Dyade, die *N*-Benzylreste besetzen die S_1/S_1' -Taschen und die *S*-Arylreste die S_2/S_2' -Taschen. Ein Sulfon bildet zwei Wasserstoffbrücken zu den Isoleucinen 50 und 50' in der *Flap*-Region der Protease aus, während das zweite Sulfon keine polaren Wechselwirkungs-Partner findet.

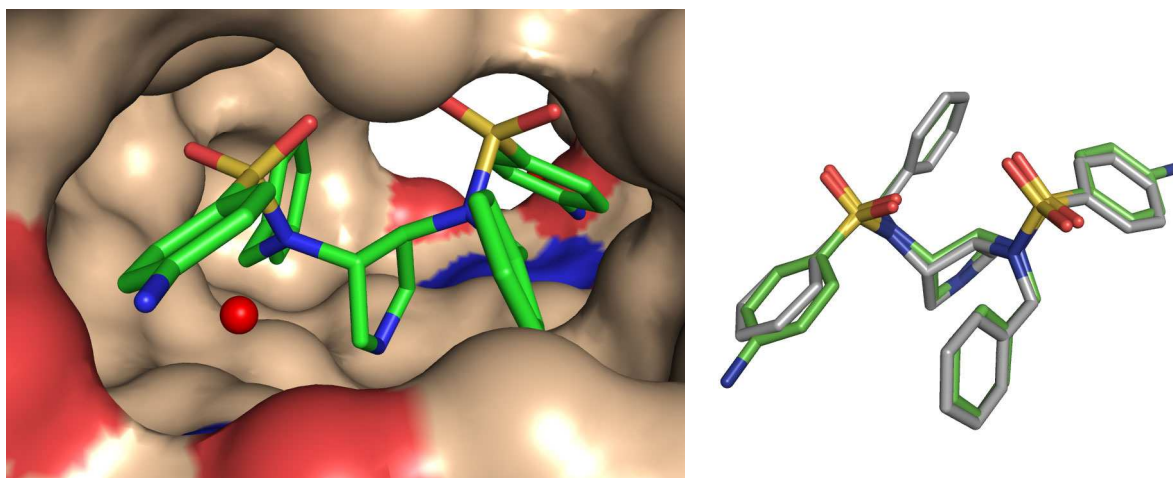


Abbildung 25: Links: In der Röntgenstruktur beobachteter Bindungsmodus von **89**; rechts: Überlagerung des Bindungsmodus von **78** (grau) und **89** (grün), rmsd=0.36 Å

Der Bindungsmodus der Aminoverbindung **89** ist der Ausgangsverbindung **78** deutlich ähnlicher als der Bindungsmodus der Chlorverbindung **84** (Siehe Tabelle 8, Seite 77). Die Abweichungen in den Atompositionen liegen im Bereich der Auflösung der Röntgenstrukturen.

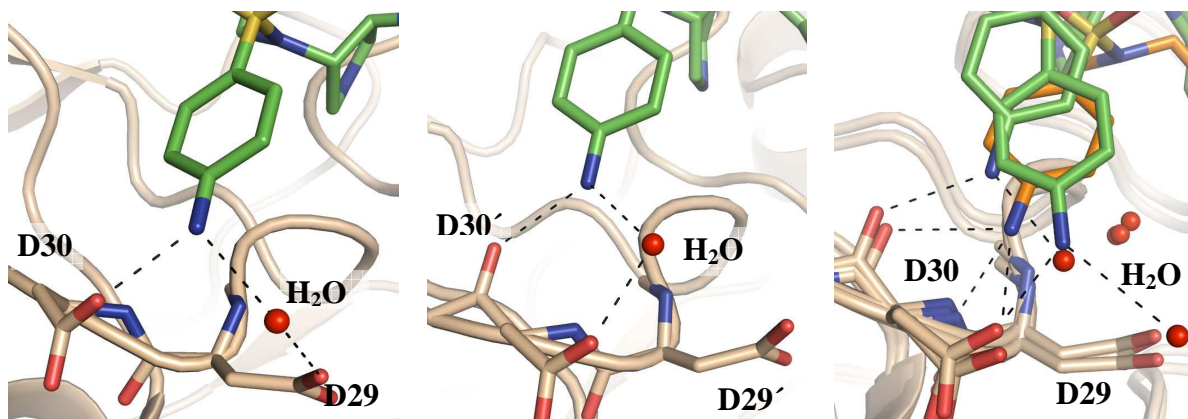


Abbildung 26: Wasserstoffbrückennetzwerk in der Struktur des Inhibitors **89** S_2 -Tasche (links) und S_2' -Tasche (mitte); Überlagerung der S_2 - und S_2' -Tasche der Struktur von **89** (grün) mit der Struktur von Amprenavir (orange)

Wie aufgrund des unsymmetrischen Bindungsmodus zu erwarten war, sind die Wechselwirkungen der beiden aromatischen Aminogruppen in der S_2 - und S_2' -Tasche unterschiedlich, da in der S_2 -Tasche der Aromat etwa 1.6 Å tiefer in der Tasche zum Liegen kommt. Beide aromatischen Aminogruppen bilden jeweils zwei Wasserstoffbrücken aus, wobei eine direkt mit dem Protein und die zweite vermittelt über ein Wassermolekül ausgebildet wird. In der S_2 -Tasche (Abbildung 26, links) wird die Wechselwirkung mit der Seitenkette des Aspartats 30 ausgebildet, das Wassermolekül verbrückt den Liganden mit der Seitenkette des Aspartats 29. In der S_2' -Tasche (Abbildung 26, Mitte) ist die Situation ähnlich, dort wird die direkte Wechselwirkung mit der Hauptkettencarbonylgruppe des Aspartats 30 ausgebildet. Über ein verbrückendes Wassermolekül wechselwirkt der Ligand nun mit der Seitenkette des Aspartats 30. Das Wassermolekül befindet sich hier in der Position an der sich die Aminogruppe des Liganden in der S_2 -Tasche befindet (Abbildung 26, rechts). In der Struktur des Inhibitors **78** befindet sich in der S_2' -Tasche ein Wassermolekül an vergleichbarer, um 1.5 Å in Richtung des Inhibitors verschobener, Position. In der S_2 -Tasche fehlt ein entsprechendes Solvenzmolekül. Die Konformation der Seitenketten der Aspartate ist in beiden Strukturen trotz der unterschiedlichen Wasserstoffbrückennetzwerke praktisch identisch. Vergleicht man den Bindungsmodus von **89** mit dem des Amprenavirs (**3**)^[37] (Abbildung 26, rechts), so zeigt sich, dass sich die Situation in der S_2 -Tasche für beide Beispiele gleicht. Durch die leicht unterschiedliche Ausrichtung der Aminogruppe ist das Wechselwirkungsmuster verschieden und Amprenavir kann sowohl die Hauptkettencarbonylgruppe als auch die Seitenkette des Aspartats 30 direkt adressieren.

Da der pK_a -Wert eines aromatischenamins, welches in *para*-Position mit einem Sulfon substituiert ist, als phenyloges Sulfonsäurederivat einen Wert kleiner als zwei annimmt (Tabelle 6, Seite 67), ist anzunehmen, dass die beiden aromatischen Aminogruppen des Inhibitors **89** nicht protoniert vorliegen. Um jedoch eine besondere Veränderung des pK_a -Wertes durch die beiden Aspartat-Seitenketten in unmittelbarer Nähe auszuschließen wurden *Poisson-Boltzmann* Rechnungen mit dem von Paul Czodrowski in der Arbeitsgruppe *Klebe* entwickelten Ladungsmodell durchgeführt (Tabelle 7), der Beitrag der Wassermoleküle wurde hierbei vernachlässigt. Es wurden vergleichbare Parameter wie schon bei der Berechnung mit dem Inhibitor **78** verwendet.

	ASP29	ASP30	Ar-NH ₃ ⁺	ASP29'	ASP30'	Ar'-NH ₃ ⁺
78	1.89	2.71	-	1.62	2.58	-
89	2.00	2.12	-3.07	1.62	2.41	-3.83

Tabelle 7: Durch *Poisson-Boltzmann* Berechnungen erhaltene pK_a-Werte der HIV-Protease im Komplex mit **89** und **78** und der aromatischen Aminogruppen von **89** (Modell-pK_a des Pyrrolidins: 11, der aromatischen Amine: 1.75; ε = 20)

Die Berechnung der pK_a-Werte zeigen für das Protein qualitativ den gleichen Trend wie bei **78**, die pK_a-Werte der beiden Aspartate 29 und 30 sind leicht verringert und somit als deprotoniert anzunehmen. Der pK_a-Wert des Anilin-Stickstoffs wird weit, bis in den negativen Bereich, verschoben und somit ist auszuschließen, dass es sich um die protonierte Form handelt. Zusammenfassend zeigt sich nur ein geringer Einfluss des Liganden auf den pK_a-Wert der Aspartate und der Ligand ist daher als freies Amin anzusehen, ein zusätzlicher Gewinn an Bindungsenergie durch eine Salzbrücke lässt sich somit ausschließen.

Der Inhibitor **89** zeigt im Vergleich zu **78** eine um etwa 5 kJ/mol stärker negative freie Bindungsenthalpie (Tabelle 5, Seite 65). Der Bindungsmodus ist vergleichbar und die Verbesserung der Affinität dürfte durch die zusätzlichen Wasserstoffbrücken zustande kommen. Das Amin besitzt eine bessere Löslichkeit und somit auch eine höhere Desolvatationsenergie. Das zusätzlich beobachtete verbrückende Wassermolekül in der S₂-Tasche senkt ebenfalls die Bindungsenergie. Es bleibt jedoch fraglich, ob im Komplex von **78** sich nicht auch Wasser an einer ähnlichen Position befindet, sich jedoch aufgrund mangelnder Fixierung durch Wasserstoffbrücken mit dem Liganden und damit höherer Mobilität in der Struktur nicht beobachten lässt.

3.12.4 Bindungsmodus des Carboxamid-substituierten Inhibitors **90**

Der in *para*-Position mit einem Carboxamid substituierte Inhibitor **90** wurde von Jark Böttcher im Komplex mit der HIV-Protease kristallisiert und die Kristallstruktur am DESY in Hamburg mit einer Auflösung von 1.50 Å bestimmt (PDB-Code 2PWR). Der Bindungsmodus gleicht dem der Ausgangsverbindung **78**. Der Pyrrolidin-Stickstoff adressiert die katalytischen Aspartate, eines der Sulfone bildet zwei Wasserstoffbrücken zu den Isoleucinen 50 und 50' der Protease aus, während die zweite Sulfonylgruppe keine polaren Wechselwirkungen zeigt. Wie in der Struktur von **78** besetzen die *N*-Benzyl-Substituenten die S₁- und S₁'-Taschen, während die *S*-Aryl-Substituenten die S₂- und S₂'-Taschen besetzen (Abbildung 27).

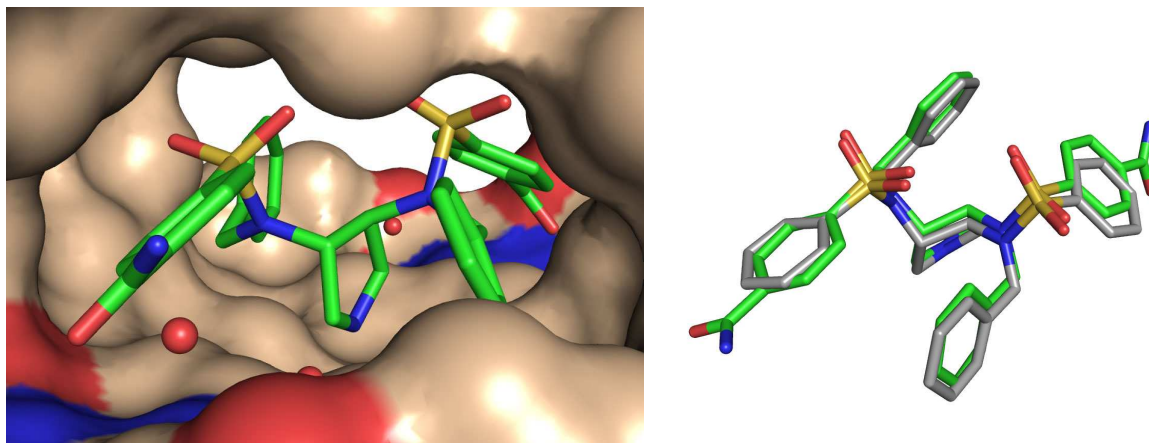


Abbildung 27: Links: In der Röntgenstruktur beobachteter Bindungsmodus von **90**; rechts: Überlagerung des Bindungsmodus von **78** (grau) und **90** (grün), rmsd=0.99

Der Bindungsmodus des Amid-substituierten Inhibitors **90** ist der Ausgangsverbindung nicht ganz so ähnlich wie der Bindungsmodus der Aminoverbindung **89**, aber deutlich ähnlicher als der der Chlorverbindung **84** (Siehe Tabelle 8, Seite 77). In der S_1 -, S_1' - und S_2' -Tasche liegen die Abweichungen in den Atompositionen von **78** und **90** im Bereich der Auflösung der Röntgenstrukturen. In der S_2 -Tasche ist dagegen eine leichte Drehung des Aromaten zu erkennen, die wahrscheinlich auf die durch das Amid ausgebildeten Wasserstoffbrücken zurückzuführen ist.

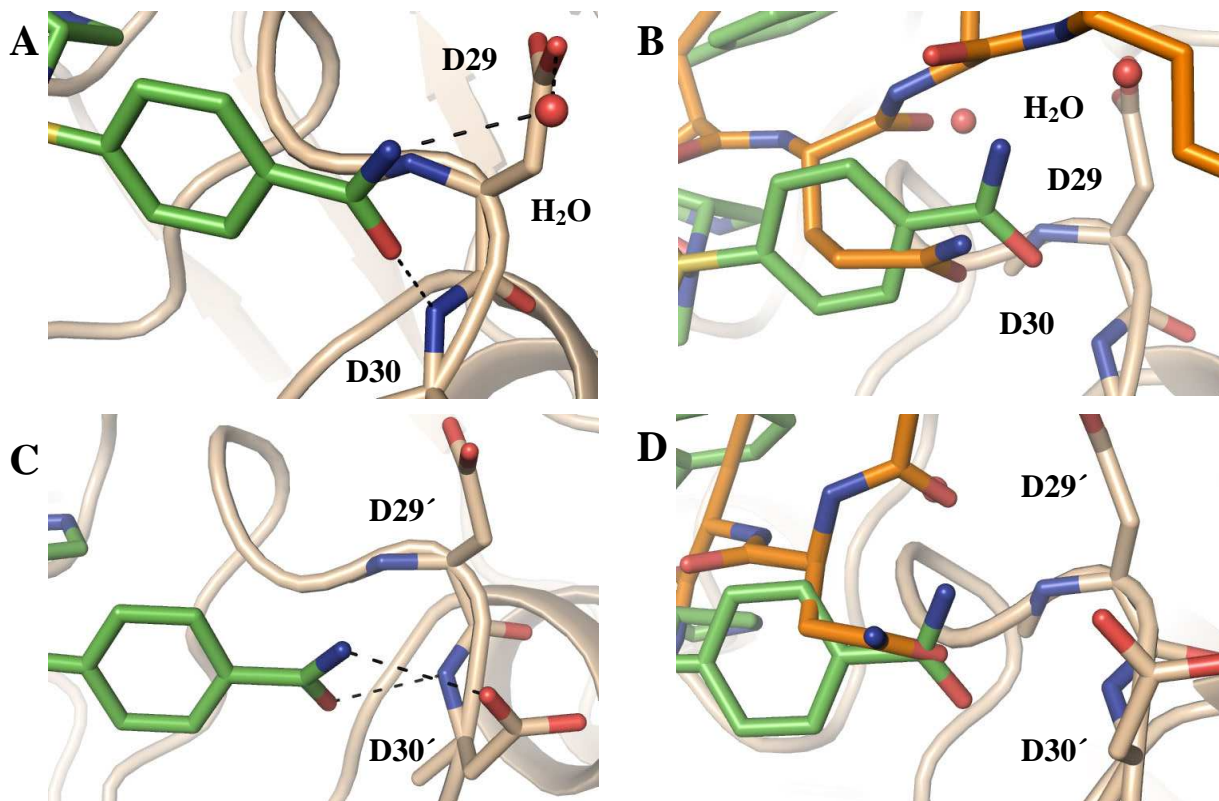


Abbildung 28: Wasserstoffbrückennetzwerk in der Struktur des Inhibitors **90** S_2 -Tasche(A, B) und S_2' -Tasche (C, D); Überlagerung der Struktur des Inhibitors mit den Substratkomplexen **1KJF** (B) und **1MT9** (D)

Aufgrund des unsymmetrischen Bindungsmodus ist das beobachtete Wasserstoffbrückennetzwerk in der S_2 - und S_2' -Tasche unterschiedlich. In der S_2 -Tasche bildet das Amid mit dem Carbonyl-Sauerstoffatom eine Wasserstoffbrücke zu dem Hauptketten-NH des Aspartats 30 aus, während die Aminogruppe des Amids über ein Wasser verbrückt eine Wechselwirkung mit der Seitenkette des Aspartats 29 eingeht (Abbildung 28 A). Die Carbonylgruppe dreht sich dazu um etwa 8° aus der Ebene des Aromaten heraus. In der S_2' -Tasche wird ebenfalls eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Carbonyl-Sauerstoffatom und dem Hauptketten-NH von Aspartat 30' ausgebildet, die Aminogruppe geht jedoch diesmal eine direkte Wechselwirkung mit der Seitenkette des Aspartats 30' ein (Abbildung 28 C). In diesem Fall dreht sich die Carbonylgruppe um 46° aus der Ebene des Aromaten heraus. Die beobachteten Wasserstoffbrückennetzwerke entsprechen sehr gut denen des Substrates, wobei in der S_2 -Tasche die Wechselwirkungen des Glutamins (Abbildung 28 B) und in der S_2' -Tasche die Wechselwirkungen des Asparagins (Abbildung 28 D) imitiert werden.

Aufgrund der Konjugation mit dem aromatischen Ring liegt die Vorzugskonformation der Carbonylgruppe in der Ringebene. Die Ausrichtung unterscheidet sich damit stark von den in den Substratstrukturen beobachteten Orientierungen der Amidgruppe, wobei in der S_2' -Tasche die Gruppen beinahe senkrecht zueinander stehen. Dabei sind auch die bereits bei der Struktur von **78** beobachteten unterschiedlichen Ausrichtungen der aromatischen Ringe in den beiden Subtaschen zu beachten. Während in der S_2 -Tasche der Aromat bereits geneigt vorliegt, kann der Substituent in der begünstigten Lage in der Ringebene verbleiben. In der S_2' -Tasche zeigt der Ring jedoch keine so günstige Orientierung und die Carbonylgruppe muss sich daher stärker aus der Ebene herausdrehen.

Der Amid-dekorierte Inhibitor **90** zeigt eine deutlich bessere Affinität als die Ausgangsverbindung, was sicher auf die ausgebildeten zusätzlichen Wasserstoffbrücken zurückzuführen ist. Der Unterschied zum Amino-substituierten Inhibitor ist jedoch nicht besonders groß. Ein Grund dafür könnte in der unpassenden Ausrichtung der Amidgruppen liegen. Für die Drehung der Carbonylgruppen aus der Ringebene heraus muss zusätzlich Energie aufgewendet werden. Eine deutliche Verbesserung ließe sich sicher erzielen, wenn die Konjugation der Carbonylgruppe zum Aromaten durch eine Substitution an den beiden angrenzenden Positionen gebrochen würde und die Amidgruppe sich somit senkrecht zum Ring ausrichten könnte.

3.12.5 Zusammenfassung der beobachteten Bindungsmodi der substituierten Inhibitoren

Inhibitoren	78	87	84	89	90
78	-	0.45	0.67	0.36	0.99
87	0.45	-	0.56	0.57	0.54
84	0.67	0.56	-	0.72	0.85
89	0.36	0.57	0.72	-	0.28
90	0.54	0.66	0.85	0.28	-

Tabelle 8: Vergleich der in den Kristallstrukturen beobachteten Bindungsmodi der Inhibitoren durch rmsd-Werte der Substruktur von 78 in Å

Vergleicht man die beobachteten Bindungsmodi der substituierten Inhibitoren mit der Kristallstruktur der Ausgangsverbindung **78** (Abbildung 29, Tabelle 8), so fällt auf, dass sich die Position der Gruppen, die polare Wechselwirkungen eingehen, wie der Pyrrolidin-Ring und eines der Sulfone, nur geringfügig verändern. Auch die Konformation der Inhibitoren ist sehr ähnlich, die einzigen größeren Abweichungen sind in der Struktur der *ortho*-Chlor substituierten Verbindung **84** zu erkennen.

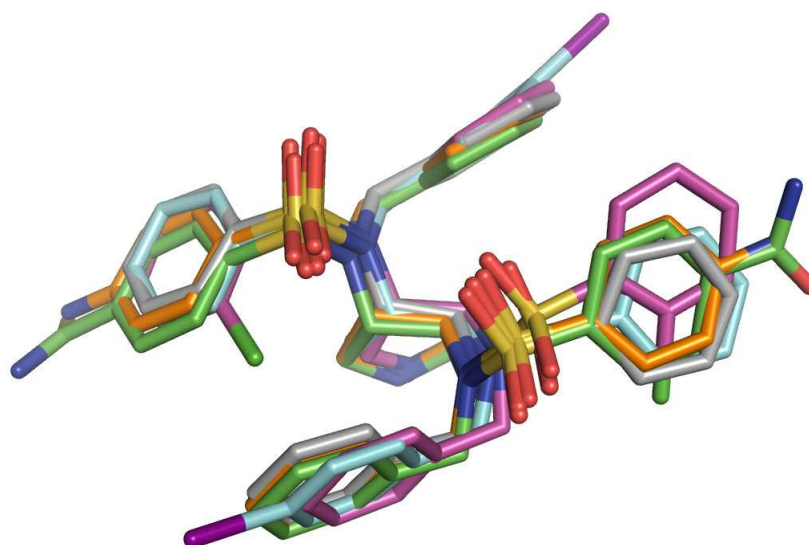


Abbildung 29: Überlagerung der beobachteten Bindungsmodi der Ausgangsverbindung **78** (grau), der Iod-substituierten Verbindung **87** (hellblau), der Chlor-substituierten Verbindung **84** (violett), der Amino-substituierten Verbindung **89** (orange) und der Amid-substituierten Verbindung **90** (grün)

Die Reste, die die S_2' - und die S_1 -Tasche adressieren liegen in allen Strukturen praktisch in der gleichen Konformation und Position vor. Im Fall des Amins ist eine kleine Verschiebung, im Fall des Amids eine etwas stärkere Verschiebung zu beobachten, die wahrscheinlich durch die zusätzlichen Wasserstoffbrücken hervorgerufen wird. Die starre Struktur des aromatischen

Rings und des Sulfonamids bewirken bei einer solchen Verschiebung eine andere Positionierung in der S_1 -Tasche. Auch in den beiden anderen Taschen lässt sich ein solcher Effekt beobachten. Durch den stärker abweichenden Bindungsmodus der Chlorverbindung ist hier der beobachtete Effekt besonders ausgeprägt. Trotz der guten Steigerung der Affinität durch die Einführung der zusätzlichen Substituenten in *ortho*-Position wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt, da der Bindungsmodus vor allem in der S_2' -Tasche stark von dem der anderen Inhibitoren abweicht und fraglich war, ob eine Kombination polarer Reste in *para*-Position einen entsprechend positiven Effekt haben würde, da der Ring durch einen zusätzlichen Substituenten in *ortho*-Position wahrscheinlich in eine andere Ausrichtung gebracht würde.

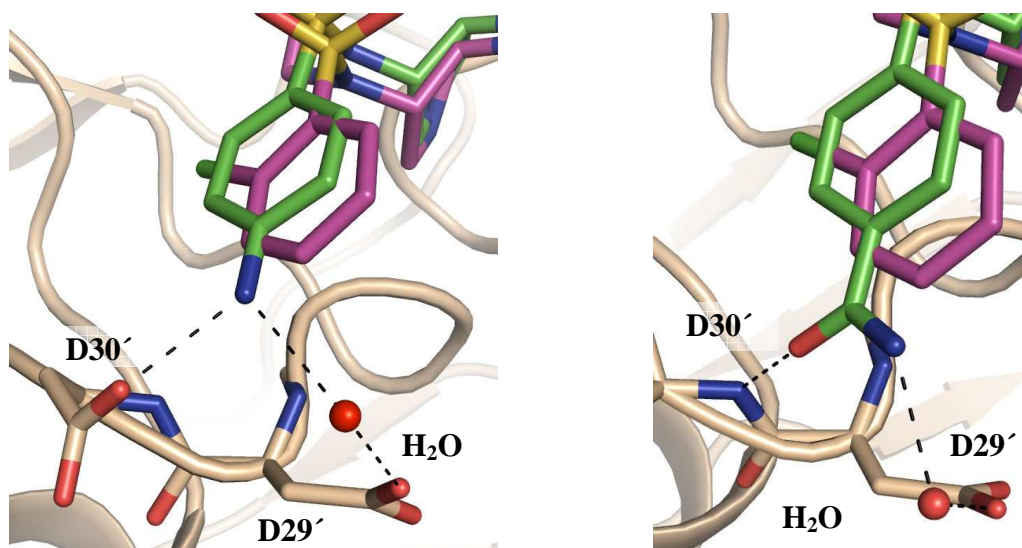
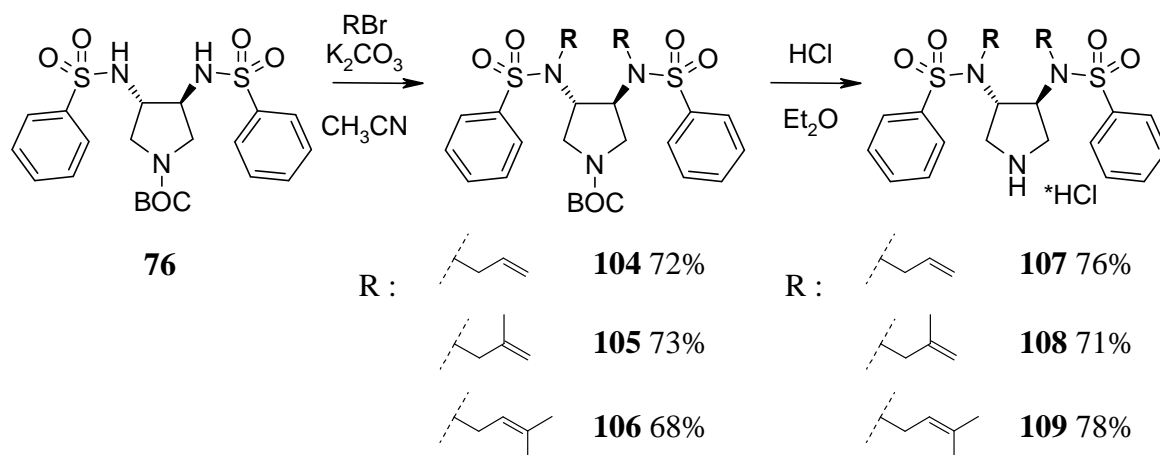


Abbildung 30: Überlagerung der beobachteten Bindungsmodi in der S_2' -Tasche der Chlor-substituierten Verbindung 84 (violett); links mit der Amino-substituierten Verbindung 89 (grün); rechts mit der Amid-substituierten Verbindung 90 (grün)

3.13 Variation der *N*-Benzylgruppe von 78

Da die synthetisierten Inhibitoren als Substituent für die S_1/S_1' -Tasche alle eine Benzylgruppe besitzen, wurde durch eine Variation an dieser Position versucht auch kleinere Substituenten einzuführen. Da für die Alkylierung nur reaktive Alkylhalogenide verwendet werden konnten, die nicht zum entsprechenden Olefin eliminieren können, wurden Allylbromid sowie zwei weitere an der Doppelbindung Methyl-substituierte Derivate verwendet. Als Ausgangsverbindung wurde das Sulfonamid **76**, das unter analogen Bedingungen alkyliert wurde, verwendet. Die Ausbeuten dieser Alkylierungen waren jedoch deutlich schlechter als bei den Benzylverbindungen. Später konnten durch optimierte Reaktionsbedingungen auch für diese Allylbromide bessere Ausbeuten erzielt werden.



Schema 57: Synthese der am Stickstoff mit Allylresten substituierten Inhibitoren

Die Allyl-substituierten Verbindungen wurden von Jark Böttcher auf ihre Affinität gegenüber der HIV-Protease in einem fluoreszenzbasierten kompetitiven Bindungs-Assay gemessen, sie zeigten leider nur vergleichbare oder sogar deutlich schlechtere Aktivität im Vergleich zu **78**. Trägt man für diese Liganden die Größe der hydrophoben *Van der Waals*-Oberfläche und Bindungsenergie gegeneinander auf, so zeigt sich auch hier ein linearer Zusammenhang. Nimmt man den aus der ersten Serie von Liganden abgeleiteten Zusammenhang als Modell, so lässt sich die Affinität der Liganden **107** und **109** mit nur einer geringen Abweichung vorhersagen (Diagramm 4).

		K_i	R	ΔG	$ \Delta G/n_i $	VdW
78		2.15	1.0	-34.4	0.88	457
107		12.3	0.17	-29.6	0.95	382
108		74.7	0.03	-24.9	0.75	416
109		1.57	1.33	-35.0	1.00	451

Tabelle 9: Übersicht über die Affinitäten in μM der Allyl-substituierten Inhibitoren und **78** gegenüber der HIV-Protease; R : Verbesserung der Affinität gegenüber **78**; $\Delta G = RT \ln K_i$ für $T=315\text{K}$ in kJ ; n_i : Zahl der Schweratome; $|\Delta G/n_i|$: *Ligand Efficacy*; VdW: Mit dem Programm MOE berechnete hydrophobe *Van der Waals*-Oberfläche in \AA^2 .

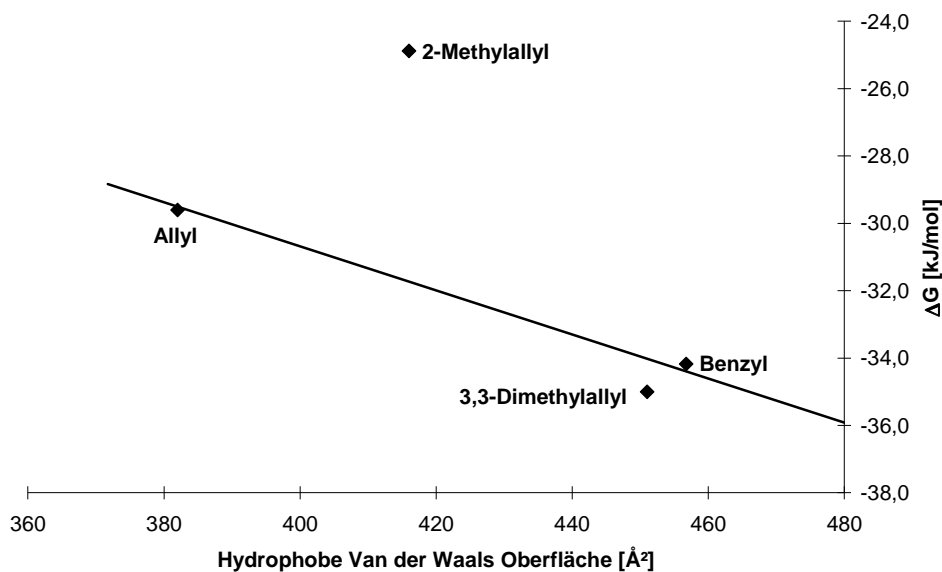


Diagramm 4: Zusammenhang zwischen freier Bindungsenthalpie ΔG und der mit dem Programm MOE berechneten hydrophoben *Van der Waals*-Oberfläche der Allyl-substituierten Liganden; die Gerade entspricht der Regressionsgeraden aus Diagramm 3.

Eine Ausnahme bildet hier jedoch die Verbindung **108**, die eine deutlich geringere Affinität zeigt, als durch das Modell vorhergesagt wird. Diese Verbindung zeigt zudem die schwächste Bindung an das Protein aller Inhibitoren dieser Serie. Da das Modell für alle anderen Inhibitoren die Bindungsenergie mit einer Abweichung von weniger als 3% vorhersagen kann, ist anzunehmen, dass dieser Inhibitor einen Teil der Bindungsaffinität verliert, die er durch die zusätzliche hydrophobe Oberfläche gewinnen sollte. Die wahrscheinlichste Erklärung für die verhältnismäßig geringe Affinität von **108** liegt in der Form des Inhibitors, die nicht ausreichend auf die Bindetasche abgestimmt ist, und so ein erzwungenes Ausweichen des Proteins durch den Liganden erforderlich macht. Darüber hinaus wird durch den 2-Methylallylrest kein zusätzlicher Bereich der Bindetasche adressiert, wie es bei einem Benzyl-Substituenten der Fall ist. Es ist also anzunehmen, dass auch bei den Benzyl-Substituenten eine entsprechende Anpassung der Bindetasche notwendig ist. Im direkten Vergleich zwischen Benzyl- und 2-Methylallyl-Derivat wird die Affinität der Benzyl-Verbindung durch die zusätzlichen Kohlenstoffatome des Rings bewirkt. Eine genaue Betrachtung der in der Kristallstruktur von **78** beobachteten direkten Nachbarn der aromatischen Ringe in der S_1 - und S_1' -Tasche zeigt Abbildung 31. In beiden Fällen sind die Abstände zu den angrenzenden Aminosäuren im Bereich des *Van der Waals*-Abstandes, einige Abstände sind jedoch noch kleiner. In der S_1' -Tasche ergeben sich für die beiden oberen Atome des aromatischen Rings sehr kurze Abstände zum Prolin 81 und dem Carbonyl-Sauerstoffatom des Glycins 48. In der S_1 -Tasche liegt der Ring nicht so tief in der Tasche und

es ergeben sich viele Kontakte mit Abständen die vier Å unterschreiten, wobei der Abstand zum Carbonyl-Sauerstoffatom des Glycins 27' besonders kurz ist. In beiden Taschen ist die Seitenkette des Isoleucins 84 mit seiner terminalen Methylgruppe an diesen Kontakten beteiligt. In anderen Kristallstrukturen des Proteins steht diese Gruppe in Richtung der *Flap*-Region der Protease, in der Struktur von **78** scheint sie jedoch durch den Liganden nach unten in Richtung des Leucins 23 gedrückt zu werden.

Interessant ist in diesem Fall der Vergleich mit der Struktur von **84**, da dort durch den *ortho*-Chlor-Substituent am Phenyl-Ring in der S_2' -Tasche der Benzylrest in der S_1 -Tasche noch weiter in die Richtung des katalytischen Zentrums gezogen wird. Durch diese Bewegung kommen die beiden Kohlenstoffatome der terminalen Ethylgruppe von ILE84 in einen sehr kurzen Abstand zum *ipso* und *ortho*-Kohlenstoffatom des Benzylrestes. Hier hat die Seitenkette des Isoleucin 84 jedoch die aus anderen Kristallstrukturen bekannte Konformation, in der die terminale Ethylgruppe in Richtung der Seitenkette des Threonins 80 zeigt.

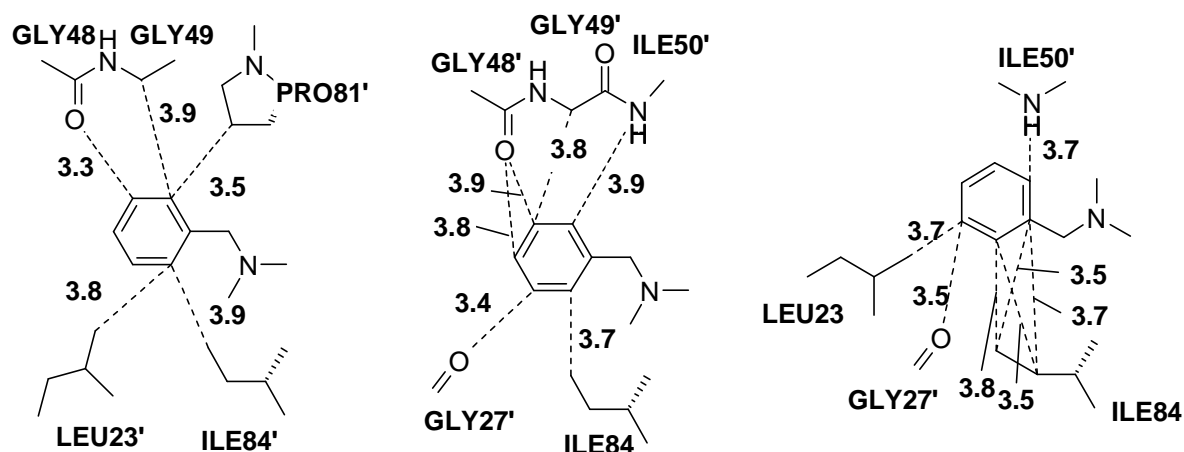


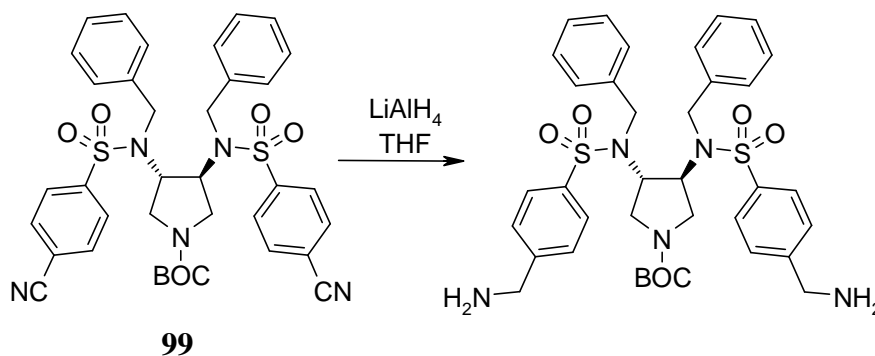
Abbildung 31: Schematische Darstellung der Abstände < 4 Å in der Kristallstruktur von **78** in der S_1' -Tasche (links) und der S_1 -Tasche (Mitte); S_1 -Tasche in der Kristallstruktur von **84** (rechts)

Eine Verzweigung an der *ipso*-Position verschlechtert die Bindungsaffinität für den Inhibitor mit dem 2-Methyl-substituierten Allylrest **108**. Die Bindungsenergie ist etwa 5 kJ/mol kleiner als erwartet. Der Inhibitor mit dem 3,3-Dimethyl-Allylrest (**109**) zeigt eine etwas bessere Affinität als durch das Modell vorhergesagt, was ebenfalls daraufhin deutet, dass sich ein Substituent in 2-Position abträglich auf die Affinität auswirkt.

3.14 Weitere Variation der Inhibitoren

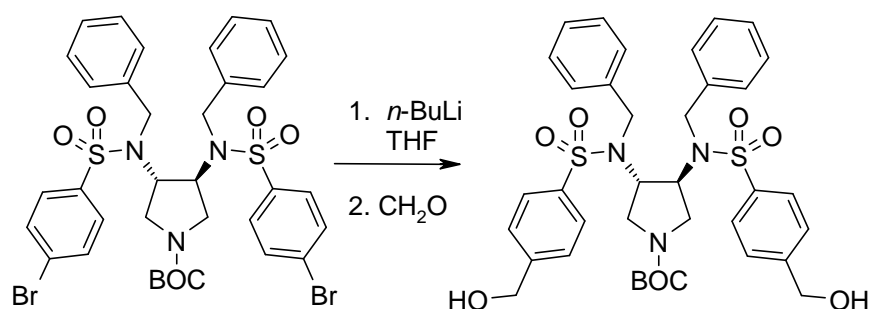
Obwohl der Carboxamid-substituierte Inhibitor **90** der höchstafine innerhalb der Serie ist, zeigt sich bei der Auswertung der Röntgenstruktur, dass die starre Struktur des aromatischen Carboxamids keine ideale Ausrichtung für polare Wechselwirkungen bietet. Aus diesem

Grund sollte ein Inhibitor mit einer frei drehbaren Hydroxymethylgruppe oder einer Aminomethylgruppe dargestellt werden. Die Aminomethyl-substituierte Verbindung sollte aus dem Nitril **99** durch Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid synthetisiert werden (Schema 58). Auf diesem Weg konnte jedoch kein entsprechendes Benzylamin erhalten werden.



Schema 58: Versuchte Synthese eines Aminomethyl-substituierten Inhibitors

Für die Synthese der Hydroxymethyl-Verbindung wurde zunächst die entsprechend substituierte Brom-Verbindung dargestellt, aus der durch Halogen-Metall-Austausch und Addition an Formaldehyd der entsprechende Benzylalkohol synthetisiert zugänglich sein sollte (Schema 59).



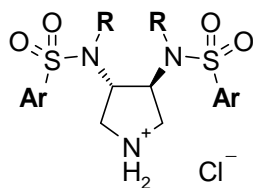
Schema 59: Versuchte Synthese eines Hydroxymethyl-substituierten Inhibitors

Jedoch zersetzte sich die Verbindung nach der Metallierung. Auch eine Transmetallierung auf Zink und die Verwendung von *Knochel*-Cupraten^[104] führte nicht zur gewünschten Reaktion. Eine entsprechende *Negishi*-Kupplung zur Einführung einer Hydroxymethylgruppe ist in der Literatur beschrieben.^[105] Da das benötigte Stannan $\text{Bu}_3\text{SnCH}_2\text{OH}$ jedoch nicht kommerziell erhältlich ist, wurde dieser Weg nicht weiter verfolgt.

3.15 Aktivität der Inhibitoren gegenüber Mutanten der HIV-Protease

Da die Punktmutationen von Isoleucin 84 zu Valin und von Isoleucin 50 zu Valin bei der Entwicklung von Resistenzen gegenüber klinisch angewendeten HIV-Protease-Inhibitoren häufig auftreten^[30], wurden im Rahmen eines studentischen Vertiefungsprojektes von Martin

Münzel unter Anleitung von Jark Böttcher diese Mutanten, sowie die Doppelmutante der HIV-Protease generiert und exprimiert. Die synthetisierten Inhibitoren wurden ebenfalls auf ihre Aktivität gegenüber diesen Mutanten getestet.



	<u>Ar-SO₂</u>	<u>R-N</u>	WT	I50V	I84V	I50V/WT	I84V/WT
78			2.15	10.9	1.07	5.1	0.50
107			12.3	k.I	84.0	-	6.8
108			74.7	346	53.1	4.6	0.71
109			1.57	10.6	5.82	6.8	3.7
86			0.46	2.61	0.55	5.7	1.2
87			0.39	1.43	0.33	3.7	0.86
88			0.80	2.97	0.50	3.7	0.62
84			0.77	2.59	0.47	3.4	0.62
85			0.67	2.05	0.46	3.1	0.69
100			1.72	8.00	0.92	4.7	0.53
101			3.30	7.91	0.49	3.8	0.15
89			0.27	1.03	0.13	3.8	0.47
90			0.26	1.42	0.04	5.5	0.14

Tabelle 10: Übersicht über die Affinitäten (K_i in μM) der Inhibitoren gegenüber Varianten der HIV-Protease; k.I. keine Inhibition; I50V/WT: K_i (I50V)/ K_i (WT); I84V/WT: K_i (I84V)/ K_i (WT)

Gegenüber der I50V Mutante zeigen die Inhibitoren insgesamt zwar eine deutlich geringere Affinität, die Struktur-Wirkungs-Beziehung ist jedoch vergleichbar mit der des Wildtyps. Im Durchschnitt ist die beobachtete Affinität etwa um den Faktor vier geringer. Die geringere Affinität aller Inhibitoren ist wahrscheinlich auf den geringeren Oberflächenkontakt mit dem Protein zurückzuführen, da sich die Bindetasche durch die Mutation deutlich vergrößert. Auch die Affinität der Mutante gegenüber den natürlichen Substraten und dem Assay-Substrat ist deutlich herabgesetzt.

Obwohl bei der Mutation von Isoleucin 84 zu Valin eine vergleichbare Vergrößerung der Bindetasche erfolgt, nimmt die Effizienz der Protease kaum ab. Für die I84V Mutante ergibt sich gegenüber den Inhibitoren eine zum Wildtyp vergleichbare Affinität, in zwei Fällen ist sie sogar deutlich höher als gegenüber dem Wildtyp. Die Affinität der Ausgangsverbindung **78** nimmt um den Faktor zwei, die des Amid-Substituierten Inhibitors **90** sogar fast um den Faktor acht zu.

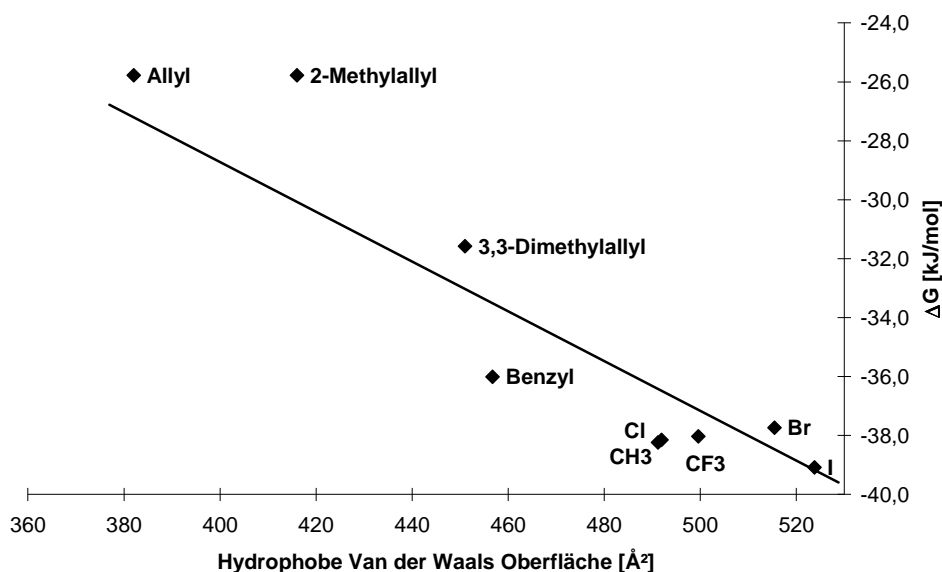


Diagramm 5: Zusammenhang zwischen freier Bindungsenthalpie ΔG gegenüber der I84V-Mutante und der mit dem Programm MOE berechneten hydrophoben Van der Waals Oberfläche (T=315 K); Gleichung der Regressionsgeraden: $y = -0.0844x + 5.0492$ kJ; $R^2 = 0.7696$

Die Struktur-Wirkungs-Beziehung ist der des Wildtyps qualitativ ähnlich. Es ergibt sich jedoch keine gute Korrelation zwischen hydrophober Oberfläche und Bindungsenergie, da die Chlor- (**84**), die Methyl- (**85**), die Trifluormethyl- (**88**) und die Bromverbindung (**86**) trotz unterschiedlicher hydrophober Oberfläche eine vergleichbare Affinität zeigen. Für die Serie der Allyl-substituierten Verbindungen ergibt sich nun zwar mit der hydrophoben Oberfläche ein Anstieg der Bindungsenergie, dieser erfolgt jedoch nicht linear (Diagramm 5). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die für den Wildtyp gefundene einfache Korrelation

zwischen der hydrophoben Oberfläche und der Affinität eventuell nur auf eine Kompensation verschiedener Effekte zurückzuführen ist, oder bei der Mutante andere Effekte eine Rolle spielen, die verschiedene Bindungssituationen bei den Inhibitoren verursachen.

Um diese Effekte genauer zu untersuchen und auszuschließen, dass der Bindungsmodus durch die Mutation stark beeinflusst wird, wurde der Inhibitor **90** von Jark Böttcher jeweils in Komplex mit der I84V- und der I50V-Mutante der HIV-Protease kristallisiert. Die Kristallstrukturanalyse zeigte praktisch einen identischen Bindungsmodus (Abbildung 32). Die polaren Wechselwirkungen sind identisch und die Abweichungen der beobachteten Atompositionen sind im Fehlerbereich der Röntgenstrukturanalyse.

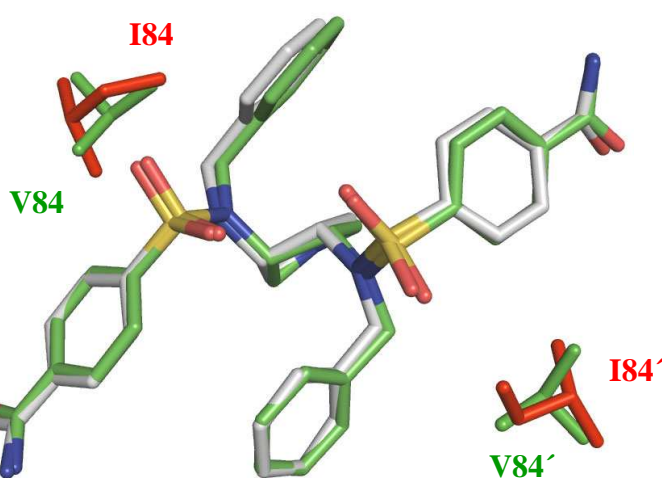


Abbildung 32: Überlagerung der Röntgenstrukturen des Inhibitors **90** in Komplex mit dem Wildtyp (**90** grau, I84 rot) und der I84V-Mutante (**90** grün, V84 grün) der HIV-Protease

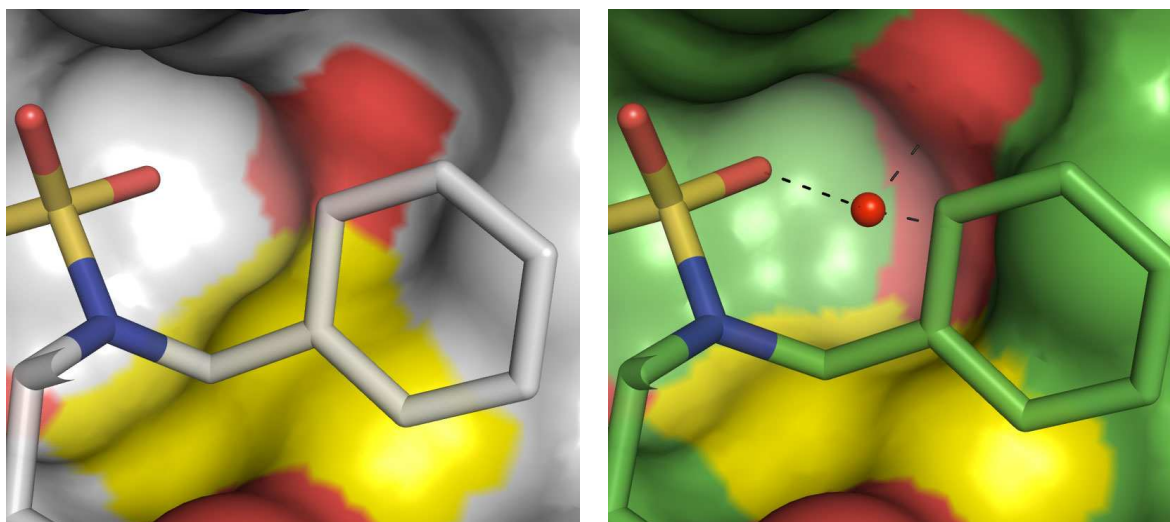


Abbildung 33: Links: Bereich der Mutation in der S_1' -Tasche in der Wildtyp Struktur, Oberfläche des I84 in gelb; rechts: Bereich der Mutation mit eingelagertem Wassermolekül in der I84V-Mutantenstruktur, Oberfläche V84 in gelb

Die Substitution des Isoleucins 84 durch das kleinere Valin bewirkt eine Vergrößerung der Bindetasche. Durch die fehlende Methylgruppe in der Seitenkette bildet sich ein zusätzlicher Hohlraum, der von Valin 84, der Seitenkette des Threonins 80 und dem Hauptketten-Carbonylsauerstoffatom von Valin 82 begrenzt wird. In dieser polaren Umgebung befindet sich ein Wassermolekül, welches mit einem der in der Wildtyp Struktur keine Wechselwirkung eingehenden Sulfonyl-Sauerstoffatome eine Wasserstoffbrücke ausbildet. Die begrenzenden polaren Reste bilden ebenfalls Wechselwirkungen aus. In der I84V-Mutante kann der Inhibitor weitere durch ein Wassermolekül verbrückte Wechselwirkungen eingehen. Die Akzeptorfunktionen des polaren Sulfons werden somit zumindest teilweise abgesättigt.

Dieses zusätzliche Wassermolekül kann jedoch nicht alleine für die bessere Affinität gegenüber der I84V-Mutante verantwortlich gemacht werden. Auch in der Struktur des Inhibitors **89** mit der I84V-Mutante findet sich an dieser Stelle ein verbrückendes Wasser, wobei dieser Inhibitor eine ähnliche Affinität gegenüber dem Wildtyp und der Mutante aufweist. Letztendlich ist die deutliche Verbesserung der Affinität der Amid-substituierten Verbindung **90** gegenüber der I84V-Mutante nur dadurch zu erklären, dass der sehr starre Inhibitor die polaren Wechselwirkungen in der S_2/S_2' -Tasche besser ausbilden kann, ohne eine entsprechende Anpassung des Proteins zu erfordern. In der S_2 -Tasche zeigt der Inhibitor **90** im Vergleich zum Amin **89** eine leichte Drehung (Abbildung 29), ob dieser kleine Unterschied für die unterschiedlichen Affinitäten verantwortlich gemacht werden kann, bleibt jedoch fraglich.

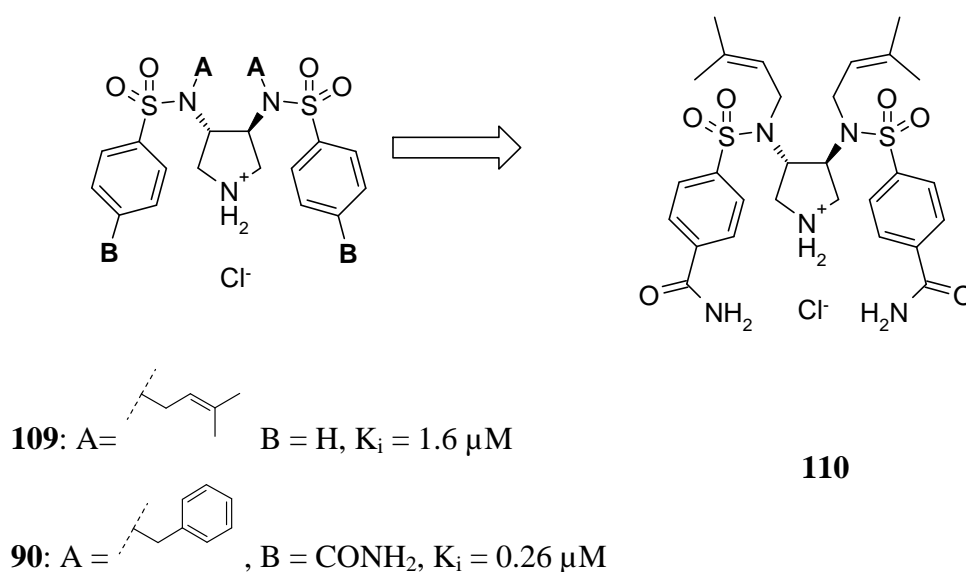
Eine Erklärung für die mit Ausnahme der beiden Allylverbindungen **107** und **109** und der Bromverbindung **86** bessere Affinität gegenüber der I84V-Mutante liegt in einem erzwungenen Ausweichen des Proteins. In allen Strukturen befinden sich die Benzylreste in der S_1/S_1' -Tasche in sehr kurzem Abstand zur Seitenkette des Isoleucins 84 (Abbildung 31). Die Seitenkette wird durch den Liganden nach unten in Richtung des Leucins 23 gedrückt. Dieses Verhalten ist für alle Benzyl-substituierten Verbindungen zu erwarten. Bei den in der S_1/S_1' -Tasche *para*-substituierten Verbindungen ist die Affinität gegenüber der I84V-Mutante vergleichbar oder sogar schlechter als gegenüber dem Wildtyp. Durch den zusätzlichen Substituenten wird der Benzylrest wahrscheinlich nun auch in Richtung der Seitenkette des Valins 84 gedrückt. Auffällig ist die deutlich geringere Affinität der beiden in 2-Position unsubstituierten Allylverbindungen **107** und **109**. Wahrscheinlich kann der kleine Substituent den durch die Mutation entstehenden Hohlraum nicht ausreichend ausfüllen und verliert so deutlich an Oberflächenkontakt. Im Fall des 2-Methylallyl-substituierten Inhibitors **108** ist

dieser Effekt jedoch nicht zu beobachten. Dieser Inhibitor zeigt eine um 0.9 kJ/mol bessere Bindungsenergie, vergleichbar mit 1.2 kJ/mol bei der Trifluormethylverbindung (**88**), 1.3 kJ/mol bei der Chlorverbindung (**84**) und 1.0 kJ/mol bei der Methylverbindung (**85**). Somit lässt sich für die Mutante eine ähnliche Schlussfolgerung ziehen wie für den Wildtyp (siehe 3.13): Eine Verzweigung in 2-Position senkt die Affinität des Inhibitors, der Effekt ist jedoch durch die vergrößerte Bindetasche nicht so stark ausgeprägt. Eine weitere Vergrößerung des Substituenten führt zu einer Verbesserung der Affinität. Für den Wildtyp scheint der optimale Kompromiss im Dimethylallyl-Substituenten zu liegen, während für die I84V-Mutante der Benzyl-Substituent der beste Kompromiss zu sein scheint.

3.16 Kombination von Substituenten

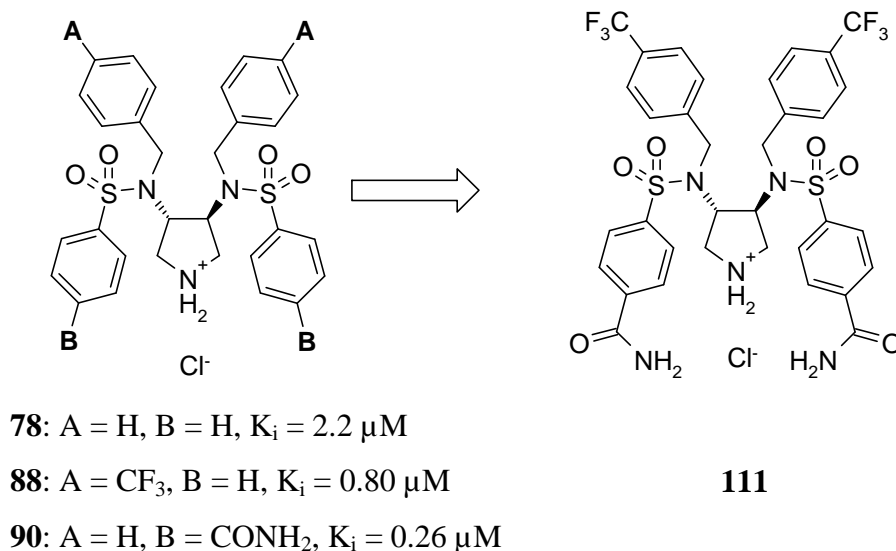
Um die Affinität der Inhibitoren weiter zu verbessern, wurden die Ergebnisse zweier Optimierungsstrategien kombiniert: Einführung besserer Reste für die S_1/S_1' -Tasche in Kombination mit einem polaren Substituenten am Ring zur effektiven Adressierung der S_2/S_2' -Tasche.

Da unter den unsubstituierten Phenylsulfonylderivaten der *N*-Dimethylallyl-substituierte Inhibitor **109** eine geringfügig bessere Affinität gegenüber dem Wildtyp zeigte als die Benzyl-substituierte Verbindung **78**, wurde dieser Rest für die S_1/S_1' -Tasche mit dem Amid-Substituenten kombiniert. Das Amid wurde ausgewählt, da es im Vergleich zum entsprechenden Amin synthetisch einfacher zugänglich war, und da das Amid **90** außerdem die beste Affinität in der Verbindungsreihe aufgewiesen hatte. Ziel war es, mit dieser Kombination einen Inhibitor mit vergleichsweise geringer molarer Masse mit verbesserter Affinität gegenüber dem Wildtyp der Protease zu erhalten (Schema 60).



Schema 60: Entwicklung des Kombinationsinhibitors **110** für den Wildtyp der HIV-Protease

Die Einführung von Substituenten in den *para*-Positionen an den aromatischen Ringen führte zu einer deutlichen Verbesserung der Affinität im Vergleich zur Ausgangsverbindung **78** mit vier unsubstituierten Phenyl-Ringen. Zur Adressierung der S_1/S_1' -Tasche wurde das Trifluormethyl-substituierte Benzylderivat ausgewählt. Die entsprechende Verbindung **88** zeigte zwar geringere Affinität als die entsprechenden Brom- und Iod-substituierten Verbindungen, es handelt sich jedoch um den leichtesten Substituenten, der am ehesten so genannte *drug-like* Eigenschaften besitzt.



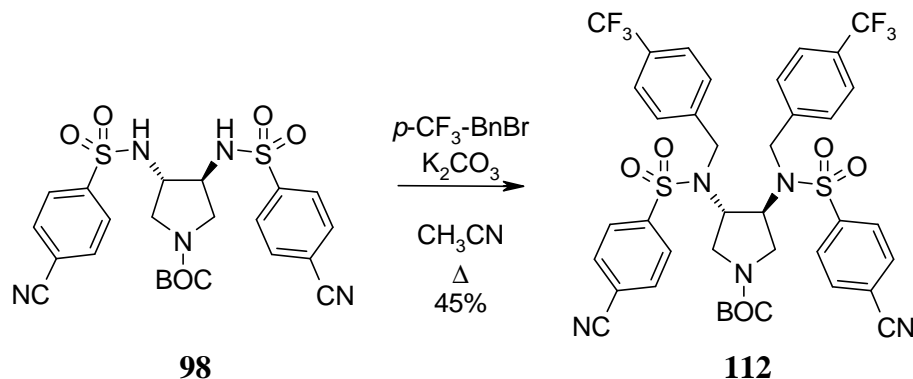
Schema 61: Entwicklung des Kombinationsinhibitors **111**

Als polarer Substituent wurde ebenfalls das Amid ausgewählt. Die Affinität der Verbindung **90** ist geringfügig besser als die der Amino-substituierten Verbindung, ausschlaggebend war jedoch die sehr gute Affinität der Verbindung gegenüber der I84V-Mutante der HIV-Protease (siehe 3.15).

Eine Kombination der beiden Substituenten in *para*- und *ortho*-Position am Phenyl-Sulfonylrest wurde nicht durchgeführt, da die Kristallstruktur des Chlor-Derivats **84** eine deutliche Abweichung der Konformation und Platzierung in der S_2' -Tasche gezeigt hatte (Abbildung 30). Da in der S_2' -Tasche auch andere Partner zur Wechselwirkung denkbar sind und eine Flexibilität der Seitenketten vorauszusetzen ist, könnten eventuell auch bei einer mit dem Chlor-Derivat **84** analogen Konformation günstige Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet werden. Da diese Annahme im Vergleich zu den anderen Kombinationen jedoch spekulativer war und die entsprechenden zweifach substituierten Sulfonylchloride nicht kommerziell erhältlich sind, wurde dieser Ansatz zugunsten der anderen beiden Kombinationen **110** und **111** nicht weiter verfolgt.

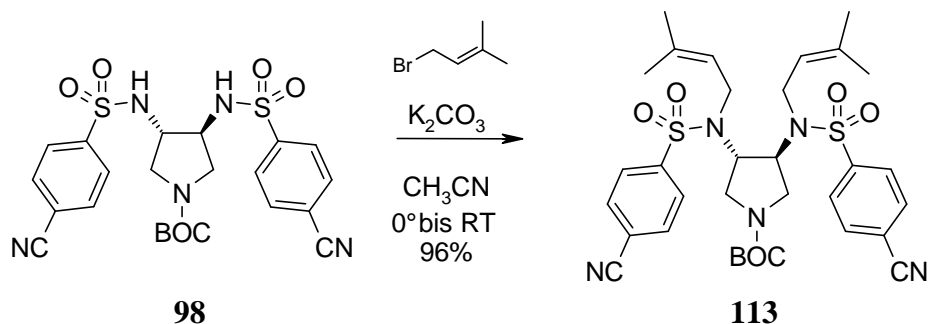
Die beiden Verbindungen wurden analog zu den anderen Inhibitoren synthetisiert, dabei wurde das *para*-Cyano-substituierte Sulfonamid **98** als gemeinsame Vorstufe verwendet und

mit 4-Trifluormethylbenzylbromid bzw. 3,3-Dimethylallylbromid alkyliert. Das Benzylbromid zeigte sich wie bei der Synthese der Verbindung **91** als verhältnismäßig reaktionsträge und das Alkylierungsprodukt **112** konnte nur in mäßiger Ausbeute erhalten werden (Schema 60).



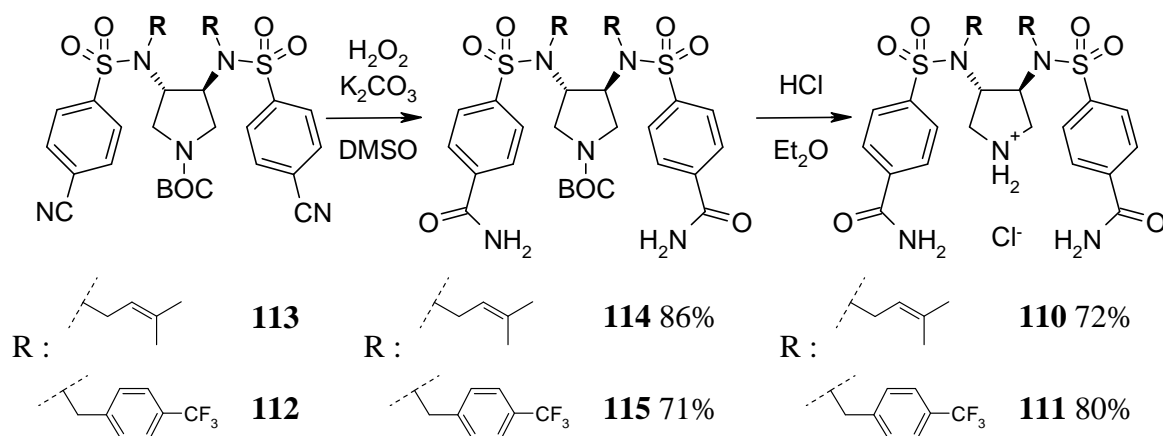
Schema 62: Alkylierung von **98** zur Synthese des Kombinationsinhibitors **111**

Nach den Erfahrungen bei der Synthese der Allyl-substituierten Verbindungen (siehe 3.13) wurde die Alkylierung unter milden Bedingungen bei 0°C ohne Zugabe des Kaliumiodids als Katalysator durchgeführt und das entsprechende Produkt **113** konnte in sehr guter Ausbeute isoliert werden (Schema 63).



Schema 63: Alkylierung von **98** zur Synthese des Kombinationsinhibitors **110**

Die beiden auf diesem Weg erhaltenen Nitrile **112** und **113** wurden analog der Synthese von **103** unter milden Bedingungen und in sehr guter Ausbeute mit 30%-igem H₂O₂, Kaliumcarbonat als Base und DMSO als Katalysator zu den entsprechenden Amiden **115** und **114** hydrolysiert. Die BOC-Gruppe wurde durch Reaktion mit HCl in Diethylether abgespalten und so die Hydrochloride der Inhibitoren **111** und **110** erhalten (Schema 64).



Schema 64: Selektive Hydrolyse der Nitrile zu den Amiden und anschließende Entschützung zu den Inhibitoren **110** und **111**.

Die erhaltenen Kombinationsinhibitoren wurden im Assay auf ihre Aktivität gegenüber den verschiedenen Varianten der HIV-Protease getestet (Tabelle 11). Für beide Verbindungen ergibt sich im Vergleich zu den Ausgangsverbindungen **109** und **88** durch die zusätzliche Amidfunktion eine deutliche Verbesserung der Affinität. Jedoch sind die synergistischen Effekte unterschiedlich stark ausgeprägt: Während die Allylverbindung nur eine um den Faktor vier bessere Affinität zeigt, beläuft sich dieser Faktor bei der Benzylverbindung auf 11.

Struktur	K_i WT	K_i I50V	K_i I84V
 110	0.48	13.7	1.87
 111	0.07 ^[a]	0.26	0.01 ^[b]

Tabelle 11: Affinitäten der beiden Kombinationsinhibitoren gegenüber Varianten der HIV-Protease in μM ; ^[a] $K_i = 74 \text{ nM}$; ^[b] $K_i = 12 \text{ nM}$

3.16.1 Bindungsmodus des Allyl-Amid-Kombinationsinhibitors 110

Der Allyl-Amid-Kombinationsinhibitor **110** wurde von Jark Böttcher im Komplex mit der HIV-Protease kristallisiert und die Struktur mit einer Auflösung von 1.65 Å bestimmt. Der Bindungsmodus des Inhibitors zeigt nur geringe Abweichungen von dem der Ausgangsverbindung **90**. Der Pyrrolidin-Stickstoff adressiert die katalytische Dyade des Enzyms und eine der Sulfongruppen bildet Wasserstoffbrücken zu den Isoleucinen 50 und 50' der *Flap*-Region aus. Die Allylreste besetzen die S_1/S_1' -Taschen und die *para*-Amid-substituierten Aryl-Sulfonylreste die S_2/S_2' -Taschen der Protease.

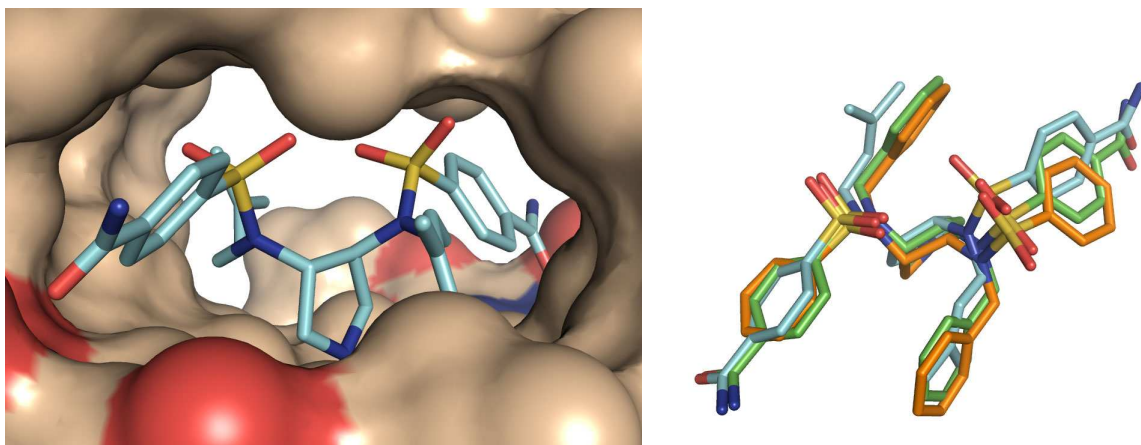


Abbildung 34: Links: In der Röntgenstruktur beobachteter Bindungsmodus von **110**; rechts: Überlagerung des Bindungsmodus von **110** (hellblau), **90** (grün) und **78** (orange)

Im Vergleich mit der Struktur von **90** ergeben sich die stärksten Abweichungen in der S_1 -Tasche, die das unterschiedliche Verhalten gegenüber der I84V-Mutante erklären und wahrscheinlich durch die Substitution des Benzylrestes gegen den Dimethylallylrest hervorgerufen werden.

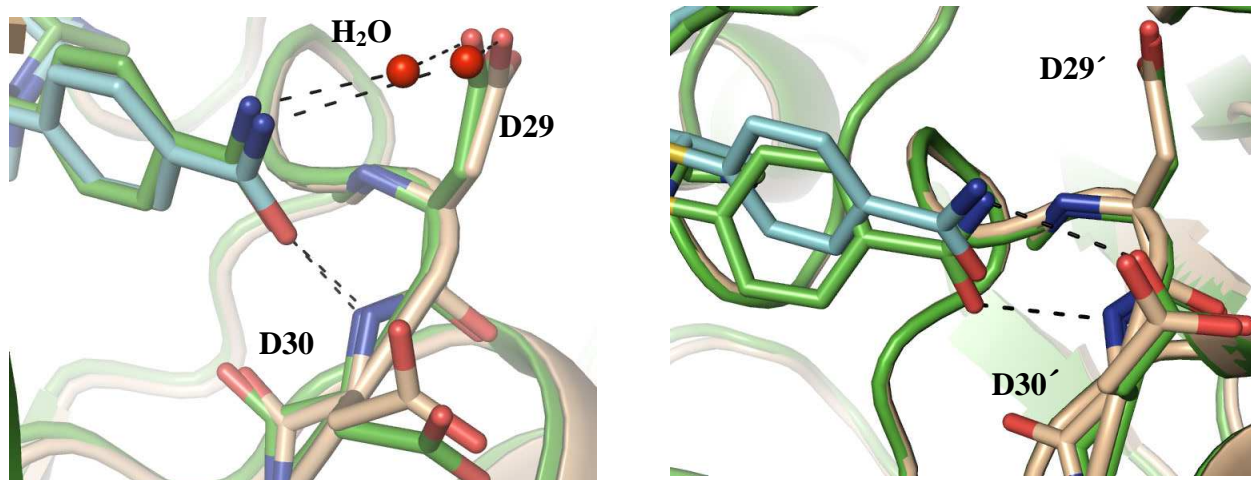


Abbildung 35: Überlagerung der Bindungsmodi von **110** (hellblau) und **90** (grün). S_2 -Tasche links, S_2' -Tasche rechts

Der Vergleich der polaren Wechselwirkungen der Amidgruppe in der S_2 - und S_2' -Tasche ergibt ein analoges Wechselwirkungsmuster wie schon beim Inhibitor **90** beobachtet. In der S_2 -Tasche bildet der Carbonyl-Sauerstoff des Amids eine Wasserstoffbrücke mit dem Hauptketten NH des Aspartats 30 aus und das Amid-NH des Inhibitors bildet über ein Wasser verbrückt eine Wechselwirkung mit der Seitenkette des Aspartats 29. In der S_2' -Tasche werden direkte Wasserstoffbrücken mit dem Hauptketten-Stickstoffatom des Aspartats 30' und der Seitenkette des Aspartats 30' ausgebildet. Die polaren Wechselwirkungen in der S_2' -Tasche sind ebenfalls vergleichbar: Der aromatische Ring des Inhibitors **110** befindet sich in einer stärker gekippten Konformation. Diese Abweichung wird wahrscheinlich durch das starre Sulfonamid vermittelt und durch die veränderte Konformation des Dimethylallylrestes in der S_1 -Tasche hervorgerufen (Abbildung 35).

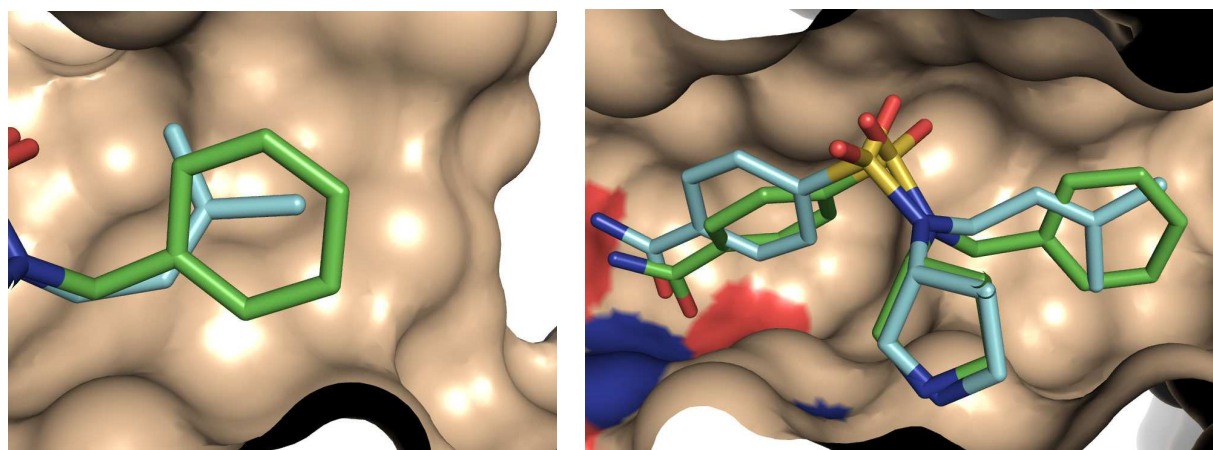


Abbildung 36: Überlagerung der Bindungsmodi von **110** (hellblau) und **90** (grün); S_1' -Tasche links, S_1 und S_2' -Tasche rechts

In der S_1' -Tasche kommen der Dimethylallylrest und der Benzylrest auf vergleichbaren Positionen zu liegen, und die Benzyl- bzw. Allylmethylengruppen befinden sich an gleicher Stelle, wobei der kleinere Allyl-Substituent nicht so tief in die Tasche hinein reicht (Abbildung 36, links). Der Rest steht nach oben und weicht so der Seitenkette des Leucin 23 aus, die sich in den Strukturen der Benzyl-substituierten Inhibitoren nur in einem sehr kurzen Abstand zu den *ortho*- und *meta*-Kohlenstoffatomen des Aromaten befindet (Abbildung 31).

In der S_1 -Tasche weicht die Ausrichtung des Allyl-Substituenten des Inhibitors **110** dagegen stärker von der Ausrichtung des Aromaten ab. Der Allylrest weicht nach oben der Seitenkette des Isoleucins 84' aus, die bei Benzyl-substituierten Inhibitoren in der Nähe des *ortho*-Kohlenstoffatoms des Aromaten kommt (Abbildung 31). Dieses Ausweichen bewirkt durch die starre Struktur des Sulfonamids die abweichende Position der Sulfongruppe, die sich so dem Isoleucin 50 annähert und die Wasserstoffbrücke verkürzt, während der Abstand zum Isoleucin 50' zunimmt und die Wasserstoffbrücke somit deutlich verlängert ist. Um mit dem

Carboxamid die Wasserstoffbrücken zum Aspartat 30' auszubilden, muss sich der Aromat senkrecht zu seiner Vorzugskonformation ausrichten.

Durch diesen abweichenden Bindungsmodus lässt sich erklären, warum dieser Inhibitor keine höhere Affinität gegenüber der I84V-Mutante der HIV-Protease zeigt. Der Dimethylallylrest ist zwar besser geeignet die S₁-Tasche zu adressieren, da er flexibler ist und so dem Isoleucin 84' ausweichen kann. Ein Teil dieses Vorteils wird jedoch durch die erzwungene Rotation des Aromaten in der S₂'-Tasche aus der Vorzugskonformation wieder zunichte gemacht. Im Falle des Austauschs des Isoleucins 84 gegen ein Valin entsteht eine vergrößerte Bindetasche. In der S₁-Tasche ist der Inhibitor nun nicht mehr darauf angewiesen der Seitenkette auszuweichen und das Sulfonamid, der Aromat und das Amid können die in den anderen Strukturen beobachtete Konformation einnehmen. In der S₁'-Tasche besitzt der Inhibitor aufgrund des verhältnismäßig kleinen Allyl-Substituenten keine Möglichkeit mehr den durch die Mutation auftretenden Hohlraum vollständig auszufüllen und verliert somit an Oberflächenkontakt und damit einhergehend an Affinität.

3.16.2 Bindungsmodus des *p*-CF₃-Benzyl-Amid-Kombinationsinhibitors **111**

Der *p*-CF₃-Amid-Kombinationsinhibitor **111** wurde von Jark Böttcher im Komplex mit der HIV-Protease kristallisiert und die Kristallstruktur mit einer Auflösung von 1.48 Å bestimmt (PDB-Code: 2QNN). Der Bindungsmodus entspricht einer Kombination aus den Bindungsmodi der beiden Ausgangsverbindungen, der Iod-Verbindung **87** und des Amids **90** (Abbildung 37 rechts). Die beiden Trifluormethylgruppen zeigen eine Fehlordnung, die häufig in Kristallstrukturen beobachtet wird, wobei sich die in diesem Fall beobachteten zwei Rotationsisomere in ihren Wechselwirkungen nicht wesentlich unterscheiden. Aus diesem Grund wird hier nur auf eine der Konformationen eingegangen. Wie in den anderen Komplex-Strukturen auch, bindet auch hier die endozyklische Aminogruppe des Pyrrolidins an die katalytische Dyade, ein Sulfon bildet Wasserstoffbrücken zu den Isoleucinen 50 und 50' der *Flap*-Region aus. Die *N*-Benzylgruppen adressieren die S₁- und S₁'-Tasche und die Aryl-Sulfonylreste die S₂- und S₂'-Taschen.

Die Überlagerung der Bindungsmodi der beiden Ausgangsverbindungen mit dem Bindungsmodus von **111** zeigt, dass die jeweils entsprechenden Seitenketten eine identische Ausrichtung besitzen und dass die beobachteten polaren Wechselwirkungen vergleichbar sind.

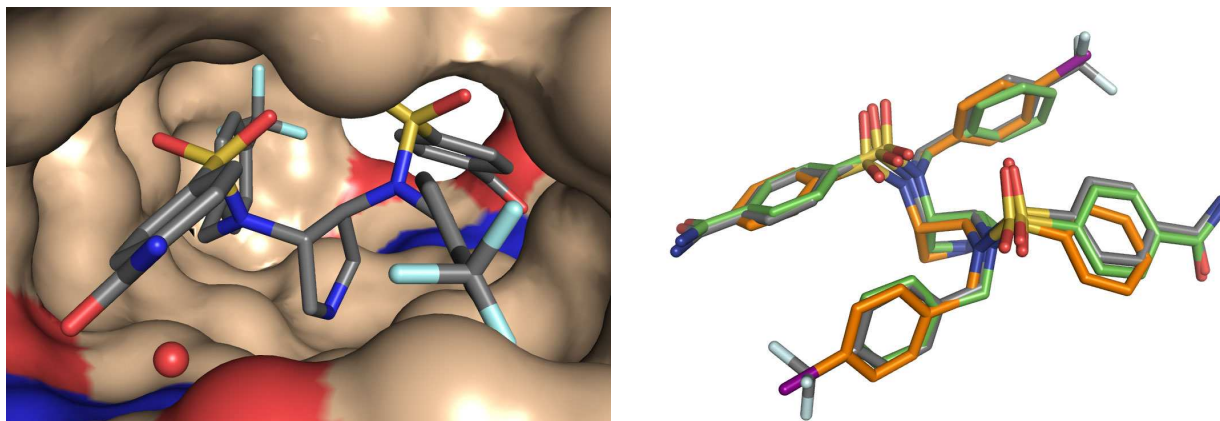


Abbildung 37: Links: In der Röntgenstruktur beobachteter Bindungsmodus von **111**; rechts: Überlagerung des Bindungsmodus von **111** (grau), **90** (grün, rmsd = 0.32) und **87** (orange, rmsd = 0.61)

Der Trifluormethyl-benzylrest von **111** und der Iodbenzylrest von **87** besitzen in der S_1 -Tasche eine praktisch identische Ausrichtung. In der S_1' -Tasche ist die Übereinstimmung etwas geringer (Abbildung 38). Dies wird wahrscheinlich durch die Wasserstoffbrücken der Amidgruppe verursacht, die eine Verschiebung des Restes in der S_2 -Tasche bewirkt. Durch die starre Sulfonamidgruppe wirkt sich diese Verschiebung wie bei **90** auch analog in der S_1' -Tasche aus.

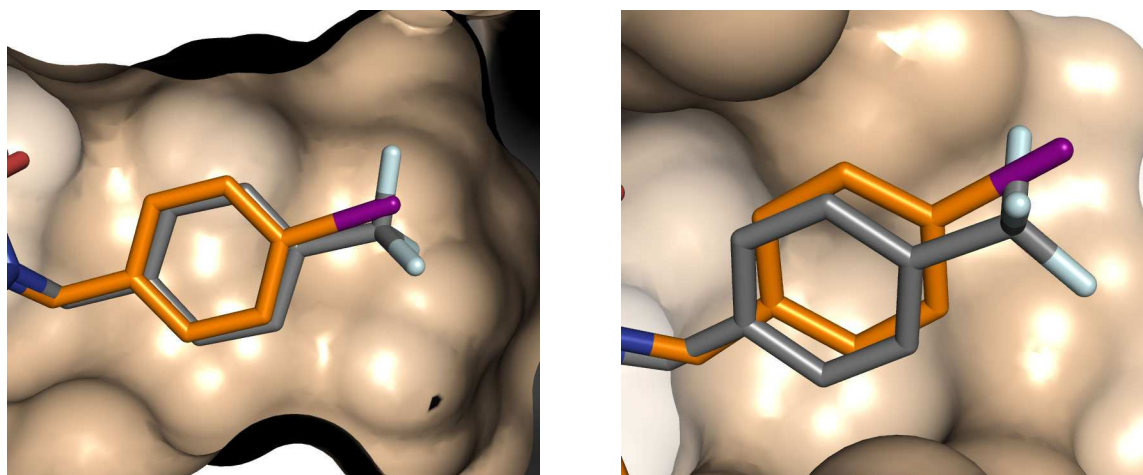


Abbildung 38: Überlagerung der Bindungsmodi von **111** (grau) und **87** (orange); S_1 -Tasche links; S_1' -Tasche rechts

Ein Vergleich der polaren Wechselwirkungen des Amids in der S_2 -Tasche ergibt ein ähnliches Wechselwirkungsmuster wie bei Verbindung **90**, wobei der Carbonyl-Sauerstoff eine Wasserstoffbrücke mit dem Hauptketten-NH des Aspartats 30 ausbildet und das Amid-NH des Liganden eine über ein Wasser verbrückte Wechselwirkung mit der Seitenkette des Aspartats 29 eingeht. In der S_2' -Tasche werden direkte Wasserstoffbrücken sowohl zum Hauptketten-NH von Aspartat 30' als auch zu der Seitenkette von Aspartat 30' ausgebildet (Abbildung 39).

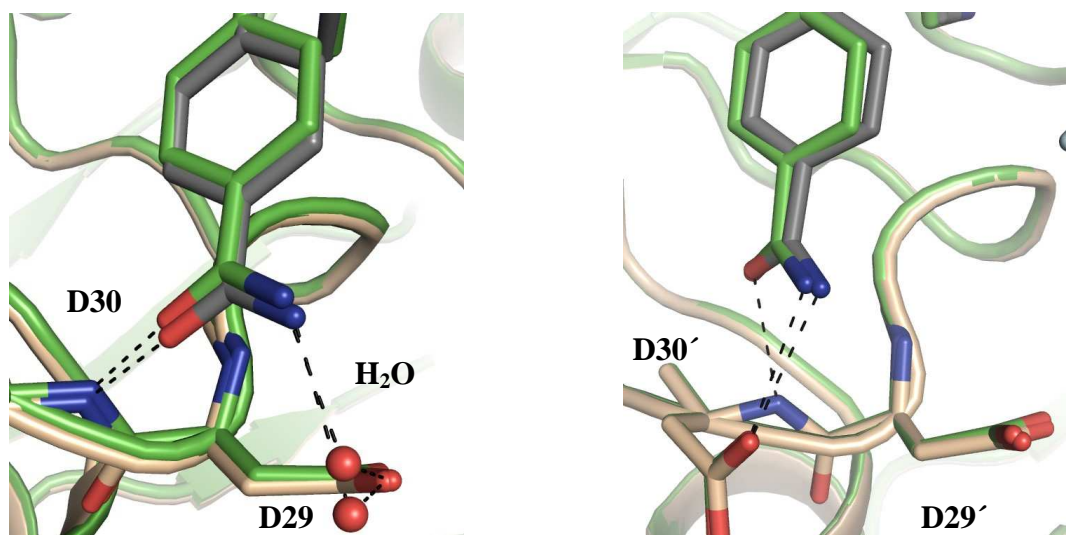
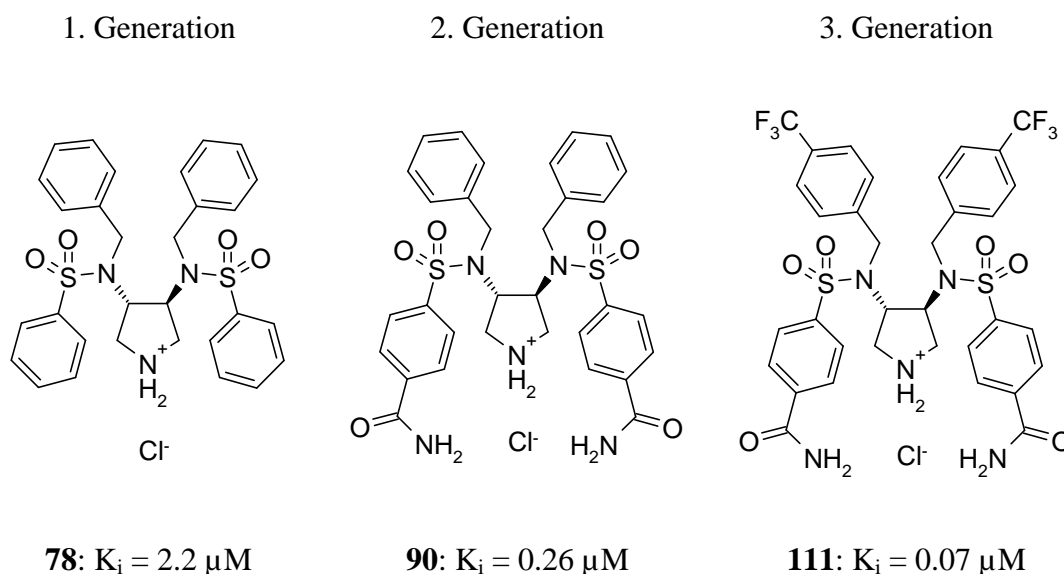


Abbildung 39: Überlagerung der Bindungsmodi von 111 (grau) und 90 (grün); S₂-Tasche links; S₂'-Tasche rechts

3.17 Interpretation und Bewertung der beobachteten Bindungsmodi

Ausgehend von der Kristallstruktur des Inhibitors **78** konnte die Affinität der Inhibitoren in einem strukturbasierten Designprozess schrittweise bis in den zweistellig nanomolaren Bereich optimiert werden (Schema 65). Die in den intermediären Stufen aufgenommenen Kristallstrukturen ermöglichten die gezielte Auswahl weiterer Modifikationen.



Schema 65: Schrittweise Verbesserung der Inhibitoren

Die Auswertung der Strukturen deutet darauf hin, dass es sich bei dem beobachteten Bindungsmodus um einen Kompromiss zwischen verschiedenen Faktoren handelt, die sich unterschiedlich auf die Affinität auswirken: Es handelt sich um sehr starre Verbindungen, der affinste Inhibitor besitzt nur vier frei drehbare Bindungen und die relative Ausrichtung der

Seitenketten des Inhibitors ist dadurch schon vorgegeben. Durch Wechselwirkung der endozyklischen Aminogruppe mit der katalytischen Dyade wird der Ring in der Bindetasche fixiert und aufgrund der Stereochemie und des starren Pyrrolidin-Rings sind die Seitenketten des Inhibitors bereits ausgerichtet. Ausgehend von dieser Ausrichtung versucht der Inhibitor möglichst viele polare Wechselwirkungen einzugehen und seine Seitenketten so auszurichten, dass möglichst wenig Reorganisation des Proteins erforderlich ist. Durch die Wechselwirkung eines Sulfons ist ein Sulfonyl-Arylrest in der S_2 -Tasche bereits fixiert und kann eventuell noch polare Wechselwirkungen durch einen Substituenten eingehen. Durch die gerichteten Wechselwirkungen ist die Ausrichtung des Alkylrestes am Stickstoff bereits vorgegeben und der Substituent muss die S_1' -Tasche besetzen. Die Benzyl-Substituenten sind zu groß für diese Tasche und erfordern ein Ausweichen des Isoleucins 84'. Die anderen beiden Substituenten können die S_1 - und S_2 -Tasche in einer entspannten Konformation besetzen, da die Konformation des zentralen Sulfons nicht durch gerichtete Wechselwirkungen fixiert wird. Dies zeigt sich beim Vergleich der Struktur des Allyl-substituierten Inhibitors **110**, da dort dieser Bereich des Moleküls sehr gut mit den anderen Strukturen überlagert. Auch in der S_1 -Tasche ist der Benzylrest zu groß und erfordert ebenfalls ein Ausweichen des Isoleucins 84. Diese erzwungene Reorganisation des Proteins an Isoleucin 84 und 84' im Wildtyp erklärt die bessere Affinität gegenüber der I84V-Mutante, bei der ein solches Ausweichen der Seitenkette nicht mehr erforderlich ist.

Der von **78** eingenommene Bindungsmodus kann als Kompromiss der verschiedenen Wechselwirkungen und Vorzugskonformationen angesehen werden. Darin liegt wahrscheinlich auch die Erklärung für den inkorrekten Vorschlag eines Bindungsmodus durch die Docking Programme für dieses Problem, da die verwendeten Programme noch nicht in der Lage sind, die einzelnen Beiträge gegeneinander abzuwägen und so die richtige Lösung zu finden.

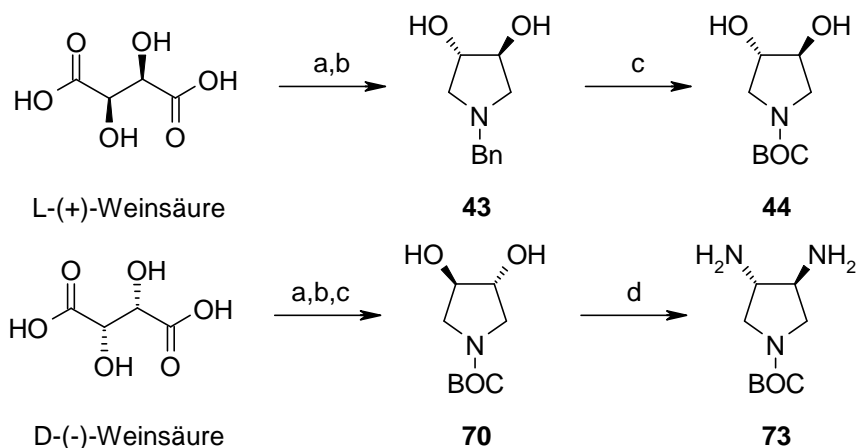
Eine offene Frage liegt auch in der Dynamik des Systems. Da der symmetrische Inhibitor unsymmetrisch an das symmetrische Enzym bindet, stellt sich die Frage, wie und ob sich der Bindungsmodus in den entsprechenden symmetrieäquivalenten Bindungsmodus umwandeln könnte und welchen Einfluss dies auf die Bindungssituation hätte. Eine Untersuchung einer möglichen Umwandlung gestaltet sich schwierig, da Moleküldynamik-Simulationen wahrscheinlich nicht die ausreichende Genauigkeit besitzen um diesen Prozess zu simulieren. Als Alternative bleibt die NMR-Spektroskopie als experimentelle Möglichkeit. Da jedoch beide Bindungsmodi symmetrieäquivalent sind, lassen sie sich im NMR-Experiment nicht voneinander unterscheiden. Ist die Umwandlung der beiden Zustände schneller als die NMR-Zeit-

skala, so zeigt sich nur die gemittelte Struktur, die nicht mit der Kristallstruktur in Einklang zu bringen ist, was zumindest als Beweis der schnellen Umwandlung interpretiert werden könnte. Ist die Umwandlung langsamer als die NMR-Zeitskala, so lassen sich zwar die beiden Teile des Inhibitors unterscheiden, es lässt sich aber nicht beweisen, ob sich die beiden Zustände ineinander umwandeln. Dies wäre nur der Fall, wenn eine langlebige stabile Zwischenstufe zu beobachten wäre. Die zweite Möglichkeit wäre die gezielte Synthese eines unsymmetrischen Inhibitors, der beispielsweise an einem der vier aromatischen Ringe deuteriert ist, um die Zustände unterscheiden zu können.

Die Inhibitoren wurden ausgehend von dem starren Gerüst von **78** erfolgreich optimiert und aufgrund der durch das Gerüst vorgegebenen Orientierung wurde immer ein analoger Bindungsmodus beobachtet. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass ein analoger Inhibitor mit mehr konformativen Freiheiten sich noch besser an die Form der Bindetasche anpassen könnte. Ähnliches gilt für die Adressierung anderer Aspartat-Proteasen als Targets, wobei einige Verbindungen Affinität gegenüber Renin, Plasmeypsin II und IV und Cathepsin D zeigten, eine gezielte Ausstattung und Optimierung lässt sicher auch eine Entwicklung potenter Inhibitoren dieser Enzyme zu.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Im Verlauf dieser Arbeit konnte ausgehend von der Röntgenstruktur von **22** ein neues Grundgerüst für HIV-Protease-Inhibitoren, basierend auf einem Pyrrolidin-System entwickelt werden. Mit Hilfe eines *Chiral-Pool* Ansatzes und aufbauend auf Arbeiten von Nagel^[59] konnte die enantioselektive Synthese des funktionalisierten 3,4-disubstituierten Pyrrolidin-Grundkörpers realisiert werden. Durch die Optimierung der Reduktionsbedingungen unter Verwendung von Lithiumaluminiumhydrid gelang der Zugang zu **43** (3*S*, 4*S*) und **54** (3*R*, 4*R*) im größeren Maßstab ohne den Einsatz des toxischen Borans. Ausgehend von den zentralen Diol-Bausteinen (**43** *N*-Bn 3*S*, 4*S*; **54** *N*-Bn 3*R*, 4*R*, **44** *N*-BOC 3*S*, 4*S* und **70** *N*-BOC 3*R*, 4*R*) konnten erste Inhibitoren synthetisiert und die Synthese der analogen Amino-Verbindung (**73**) mittels einer BOC-Schutzgruppenstrategie optimiert werden. Nur mit einer Reaktionsführung über das entsprechende potentiell explosive Diazid (**72**) war es möglich, das für die weitere Synthesestrategie essentielle Amin darzustellen. Durch eine gezielte Optimierung und mittels direkter Reduktion statt Isolierung des Azids als Reinsubstanz, konnte das Risiko auf ein Mindestmaß reduziert werden. Auf diesem Weg konnte das Amin **73** in guten Ausbeuten und im Maßstab bis ~11 mmol (2.25 g) dargestellt werden, was erst eine weitere Dekoration des Grundgerüsts ermöglichte.



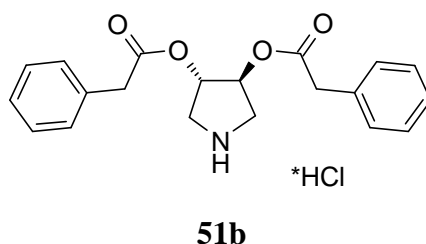
Schema 66: Ausgearbeitete Synthese der enantiomerenreinen 3,4-difunktionalisierten Pyrrolidine aus den entsprechenden Weinsäuren; (a) BnNH_2 , Xylol, Rückfluss (b) LiAlH_4 , THF, Rückfluss (c) BOC_2O , H_2 , Pd/C, MeOH (d) TiF_2O , Pyridin, CH_2Cl_2 $-78^\circ\text{C} \rightarrow -10^\circ\text{C}$, dann NaN_3 , DMPU und nach chromatographischer Aufreinigung H_2 , Pd/C, EtOAc/Hexan

Die Verwendung von Arylsulfonamiden als Akzeptorfunktionen ermöglichte die Einführung weiterer Substituenten am Stickstoff. Durch *N*-Alkylierung mit reaktiven Elektrophilen wie Benzyl- oder Allylbromiden und anschließender Entschützung konnten so Verbindungen erhalten werden, die vier Reste zur Adressierung der Subtaschen der Protease besitzen.

Die Möglichkeit diese Reste in den letzten Stufen der Synthese einzuführen und die große Zahl an kommerziell verfügbaren Allyl-, Benzylbromiden und Sulfonylchloriden sowie deren einfache synthetische Zugänglichkeit ermöglichen die gezielte Variation der Seitenketten. Durch die Darstellung der Zielstrukturen in enantiomerenreiner Form war eine eindeutige Interpretation der biologischen Messdaten möglich und eine Bindungshypothese konnte erarbeitet werden. Nur mittels der erarbeiteten Synthese war es möglich, ausgehend von Struktur-Wirkungs-Beziehungen und Röntgenstrukturen die Inhibitoren zu optimieren.

4.1 Pyrrolidin-diester

Eine Umsetzung des Diols **44** zu den entsprechenden Diestern führte zu Inhibitoren im mikromolaren Bereich und ermöglichte die Entwicklung einer ersten Struktur-Wirkungs-Beziehung und einer daraus abgeleiteten Bindungshypothese. Die Inhibitoren weisen zum größten Teil nur eine schwache Aktivität gegenüber der Protease auf. Die Verbindung **51b** zeigte jedoch mit 18 μM eine für ihre Größe sehr gute Affinität. Die Ausstattung mit den beiden Benzylresten als Substituenten zur Adressierung der Subtaschen des Enzyms wurde als Grundstruktur für die Entwicklung der späteren Inhibitoren übernommen.



Schema 67: Struktur des affinsten Inhibitors aus der Serie der Diester ($K_i = 18 \mu\text{M}$)

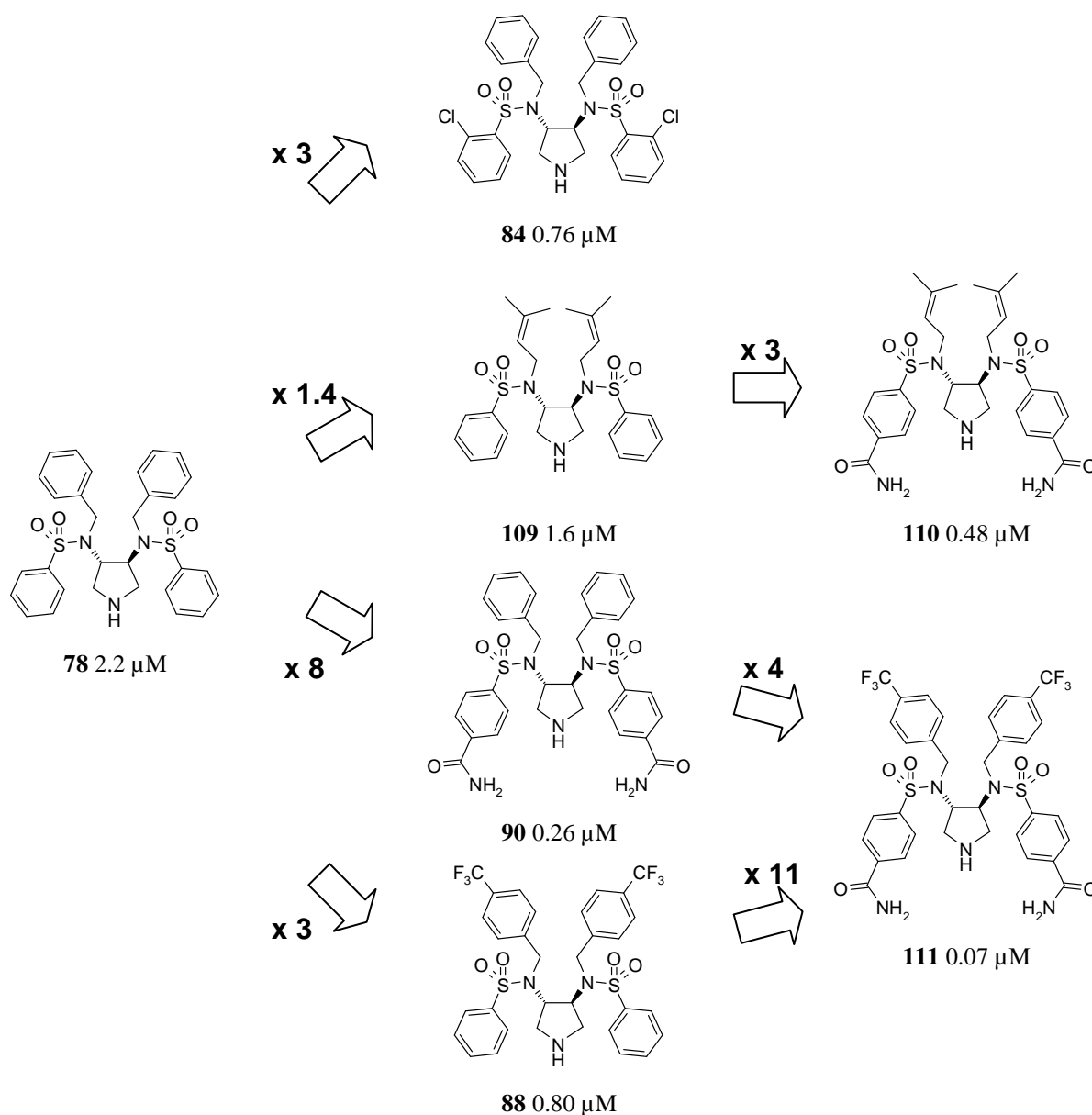
Die deutlich höhere Affinität aller Verbindungen der Diester-Serie gegenüber der HIV-Protease Mutante I84V birgt ein vielversprechendes Potential zur weiteren Optimierung dieser Klasse von Verbindungen gegenüber dieser Enzym-Variante. Die systematische Variation der Ester-Seitenketten in dieser Serie ermöglicht außerdem nach Aktivitätsbestimmung gegenüber anderen Aspartylproteasen eine weitere Optimierung des Pyrrolidinsystems in Bezug auf andere Targets.

4.2 Sulfonamide

Ausgehend vom Amin **73** konnte über Kondensation zum Benzolsulfonamid, *N*-Alkylierung mit Benzylbromid und Entschützung der Inhibitor **78** synthetisiert werden. Die Affinität gegenüber der HIV-Protease konnte, im Vergleich zum besten Inhibitor der Diester-Serie, deutlich gesteigert werden. Die Analyse der Kokristallstruktur dieser Verbindung im

Komplex mit der HIV-Protease ermöglichte nun die weitere gezielte Verbesserung der Inhibitoren.

Als Strategie zur Optimierung wurden Substitutionen an den aromatischen Ringen ausgewählt. Als vielversprechendster Ansatzpunkt wurden hydrophobe Substituenten in *para*-Position am *N*-Benzylrest und in *ortho*-Position am *S*-Arylrest sowie polare Gruppen in *para*-Position am *S*-Arylrest eingeführt. Die daraus hervorgegangenen Inhibitoren der zweiten Generation (**84**, **85**, **86**, **87**, **89** und **90**) zeigten alle eine deutlich bessere Affinität gegenüber der HIV-Protease.



Schema 68: Übersicht über die schrittweise Verbesserung der Inhibitoren

Durch Analyse der Kokristallstrukturen von ausgewählten Vertretern jeder Klasse und dem Vergleich mit der Ausgangsstruktur konnte gezeigt werden, dass der Bindungsmodus dieser

optimierten Inhibitoren analog dem von **78** ist und die Verbesserung der Affinität der zusätzlich substituierten Inhibitoren durch die vorhergesagten Wechselwirkungen verursacht wird. Die zusätzliche Variation der Substituenten in der S₁-Tasche durch die Synthese von weiteren Allyl-Derivaten zeigte die Überlegenheit des Benzylrestes, obwohl er etwas zu groß für diese Tasche zu sein scheint.

Ausgehend von den Strukturen der einfach substituierten Inhibitoren wurde die beste Kombination von Substituenten zur Darstellung von Inhibitoren der 3. Generation ausgewählt. Die Kombination der Trifluormethyl-Gruppe mit einem Amidsubstituenten zum Inhibitor **111** führte zur erwarteten Steigerung der Affinität bis in den zweistellig nanomolaren Bereich. Die Röntgenstruktur zeigt einen Bindungsmodus, der vergleichbar mit dem der beiden entsprechend substituierten Ausgangsverbindungen **87** und **90** ist. Die Synthese des Kombinationsinhibitors **110** und die Analyse der Röntgenstruktur ermöglichten das bessere Verständnis der Struktur-Affinitäts-Beziehung in der Reihe der Allyl-substituierten Inhibitoren.

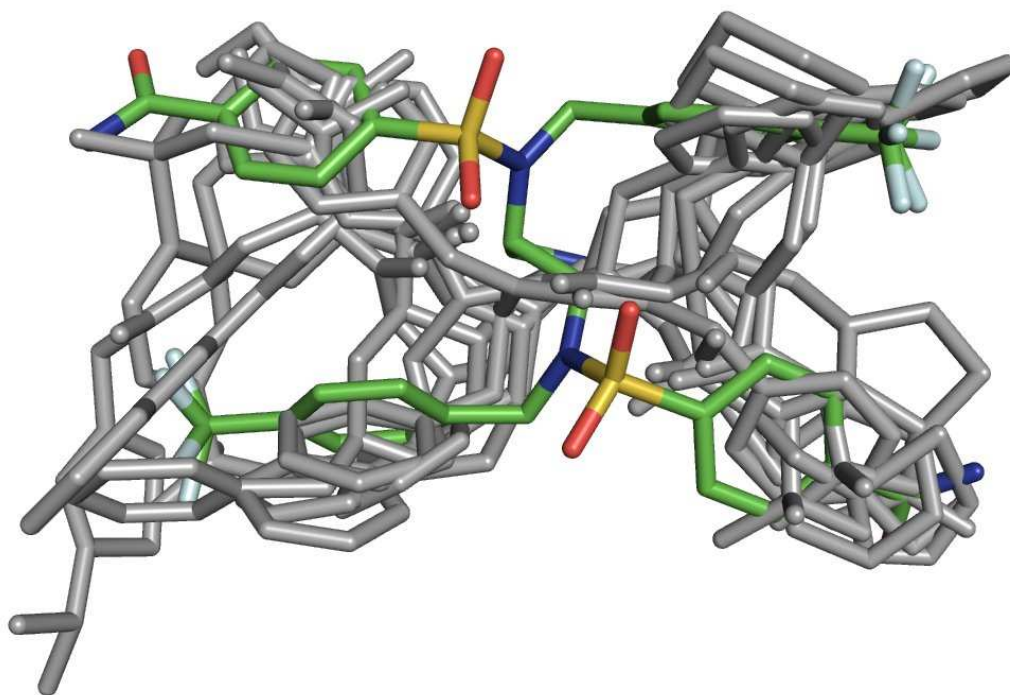


Abbildung 40: Überlagerung der Röntgenstrukturen der HIV-Protease-Inhibitoren Saquinavir (1, 1MTB), Ritonavir (2, 1HXW), Amprenavir (3, 1HPV), Nelfinavir (4, 1OHR), Indinavir (5, 2BPX), DMP-323 (6, 1QBS) und Tipranavir (7, 1D4Y) und des Inhibitors der 3. Generation (111, grün)

Die synthetisierten Inhibitoren wurden ebenfalls auf ihre Aktivität gegenüber Mutanten der HIV-Protease getestet und zeigten dort ein neuartiges Aktivitätsprofil. Die Mutation von Isoleucin 84 zu Valin wird unter der Therapie mit allen zugelassenen HIV-Proteasehemmern

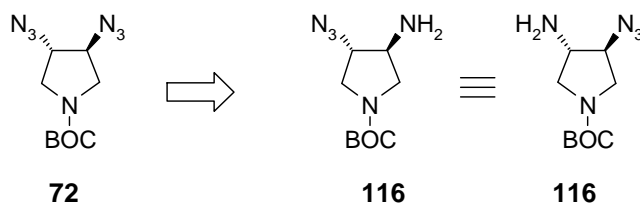
beobachtet und senkt die Affinität der Inhibitoren so drastisch, dass es in Kombination mit anderen Mutationen zur Entwicklung von Resistenzen und durch die starke Ähnlichkeit der Verbindungen zu Kreuzresistenzen kommen kann. Die im Zuge dieser Arbeit entwickelten Inhibitoren zeigen eine deutlich höhere Aktivität gegenüber dieser Punktmutante der Protease. Auf struktureller Basis ist diese Beobachtung durch die Besetzung der S_1 und S_1' -Taschen des Enzyms aus einer anderen Richtung im Vergleich zu peptidomimetischen Inhibitoren erklärbar (Abbildung 40).

In dieser Arbeit konnte die enantioselektive Synthese von 3,4-disubstituierten Pyrrolidinen ausgearbeitet werden. Ausgehend von D-(-)-Weinsäure konnten die Inhibitoren in 7-8 Stufen mit einer Gesamtausbeute über alle Stufen von 7-20% dargestellt werden. Dies entspricht einer durchschnittlichen Ausbeute von über 70% pro Stufe. Durch strukturbasiertes Design und röntgenkristallographischer Analyse der strukturellen Veränderung durch die eingeführten Substitutionen konnte die Affinität der Verbindungen gegenüber der HIV-Protease in einem iterativen Prozess bis in den zweistellig nanomolaren Bereich gesteigert werden. Die Verbindungen zeigen einen neuartigen Bindungsmodus und ein von peptidomimetischen Hemmstoffen abweichendes Aktivitätsprofil, insbesondere die Affinität der Verbindungen bis in den niedrig nanomolaren Bereich gegenüber der I84V-Mutante der Protease ist hier hervorzuheben.

4.3 Ausblick Desymmetrisierung

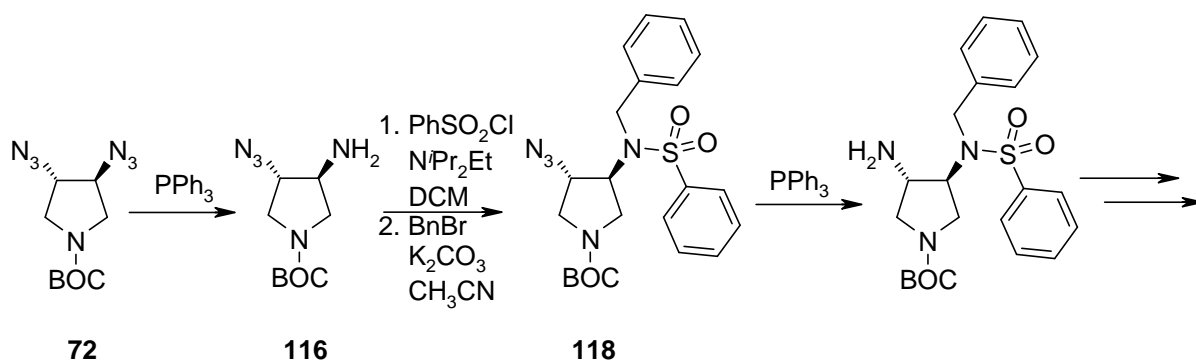
Ausgehend vom unsymmetrischen Bindungsmodus der Inhibitoren lassen sich auch entsprechende unsymmetrische Inhibitoren ableiten, wobei ein „Arm“ des Inhibitors konstant gehalten werden sollte, um mit dem Sulfon ein analoges Wechselwirkungsmuster mit den Isoleucinen 50 und 50' aufzubauen und mit dem *N*-Benzylrest die S_1 -Tasche und mit dem *S*-Arylrest die S_2' -Tasche zu besetzen. Für den anderen „Arm“ des Inhibitors sind verschiedene Vorgehensweisen denkbar, wobei die einfachste Desymmetrisierung in der Substitution eines der Sulfone von **78** durch eine Methylengruppe zu **117** (Siehe Schema 73, S. 105) besteht.

Durch die Symmetrie der Vorläufermoleküle sind die beiden Substituenten in 3- und 4-Position am Pyrrolidin-Ring äquivalent. Zur Desymmetrisierung ist so nur die selektive Reaktion einer der Gruppen notwendig, es ist jedoch keine Stereoselektivität erforderlich (Schema 69).



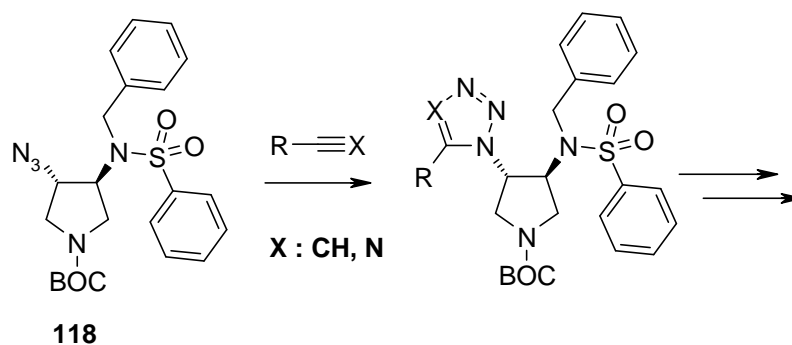
Schema 69: Stereoselektivität der Desymmetrisierung aufgrund der C_2 -Symmetrie am Beispiel der Reduktion des Diazids **72**

Als Ausgangspunkt für die Desymmetrisierung bietet sich hier vor allem das Diazid **72** an. Da das Azid als maskierte Aminfunktion angesehen werden kann, lässt sich durch selektive Reduktion nur einer der beiden Azidgruppen ein unsymmetrischer Inhibitor synthetisieren. Zur Reduktion bietet sich die *Staudinger*-Reaktion an, da sie chemoselektiv und unter milden Bedingungen abläuft. Die selektive Reduktion von Diaziden in Lösung ist in der Literatur bereits beschrieben.^[106, 107] Nach Reduktion, Sulfonylierung und *N*-Alkylierung wird das Mono-Azid **118** reduziert und kann nun ebenfalls entsprechend dekoriert werden (Schema 70).



Schema 70: Synthese unsymmetrischer Inhibitoren ausgehend von Diazid **72**

Alternativ kann die Azidgruppe von **118** auch in einer *Huisgen* [3+2]-Zykloadditionen mit Nitrilen zu Tetrazolen umgesetzt werden. Weitere Möglichkeiten bieten die stereoselektiven kupferkatalysierten bzw. rutheniumkatalysierten Varianten der Reaktion mit Alkinen zu Tetrazolen. In diesem Fall wird ein Rest eingeführt, der die S_2 -Tasche bereits teilweise ausfüllt. Die milden und selektiven Reaktionen erlauben so die Einführung einer großen Zahl an möglichen Substituenten für die S_2 -Tasche.



Schema 71:[3+2]-Zykloaddition zur Einführung von Triazolen (X=C) und Tetrazolen (X=N) als Reste für die S_2 -Tasche

Da sich auf diesem Weg nur dreiarmlige Inhibitoren gewinnen lassen, muss ein neuartiger Ansatz verwendet werden, um die S_1 -Tasche zu adressieren. Die Kristallstruktur des *ortho*-Chlor-substituierten Inhibitors **84** offenbarte, dass der *ortho*-Chlor-Substituent am Rest in der S_2 -Tasche in Richtung der S_1 -Tasche deutet. Durch Verwendung eines entsprechend langen und starren Substituenten, beispielsweise eines Phenylringes sollte die S_1 -Tasche von dieser Position aus zu besetzen sein.

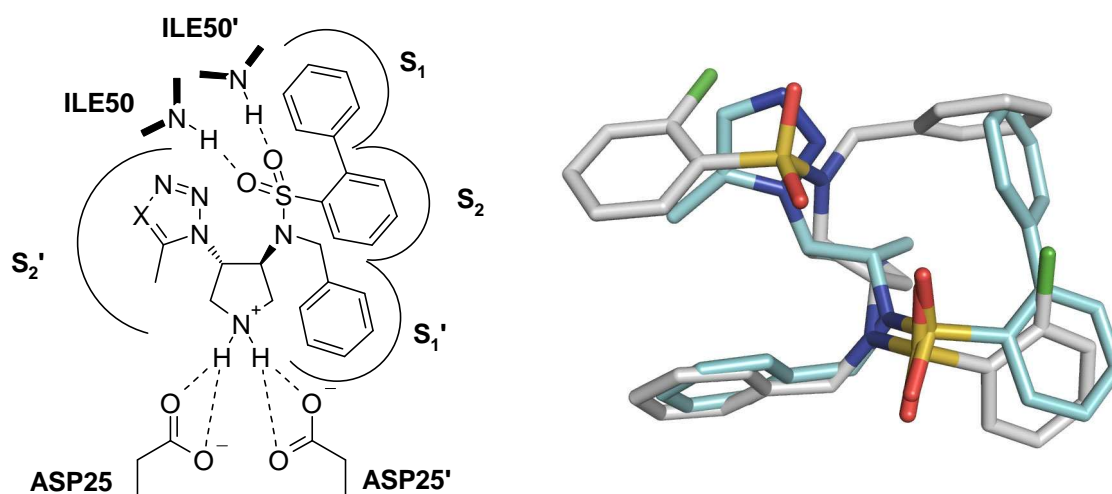
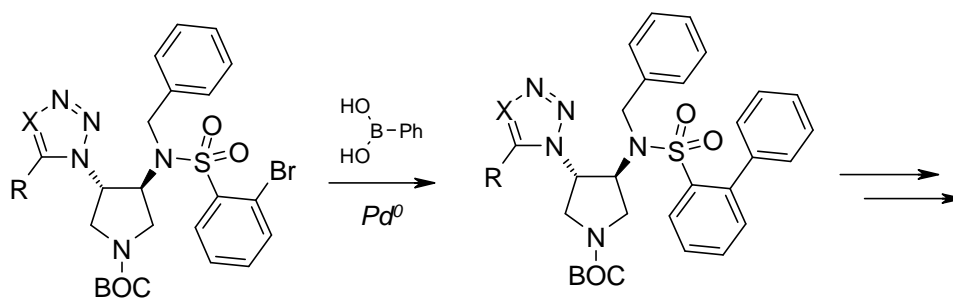


Abbildung 41: Schematische Darstellung der alternativen Möglichkeit die S_1 -Tasche durch *ortho*-Substitution aus der S_2 -Tasche heraus zu adressieren (links); Überlagerung des Bindungsmodus des *ortho*-Chlor-substituierten Inhibitors **84** (grau) mit dem in der Kristallstruktur **84** mit dem Programm Moloc minimierten Triazolderivat (hellblau)

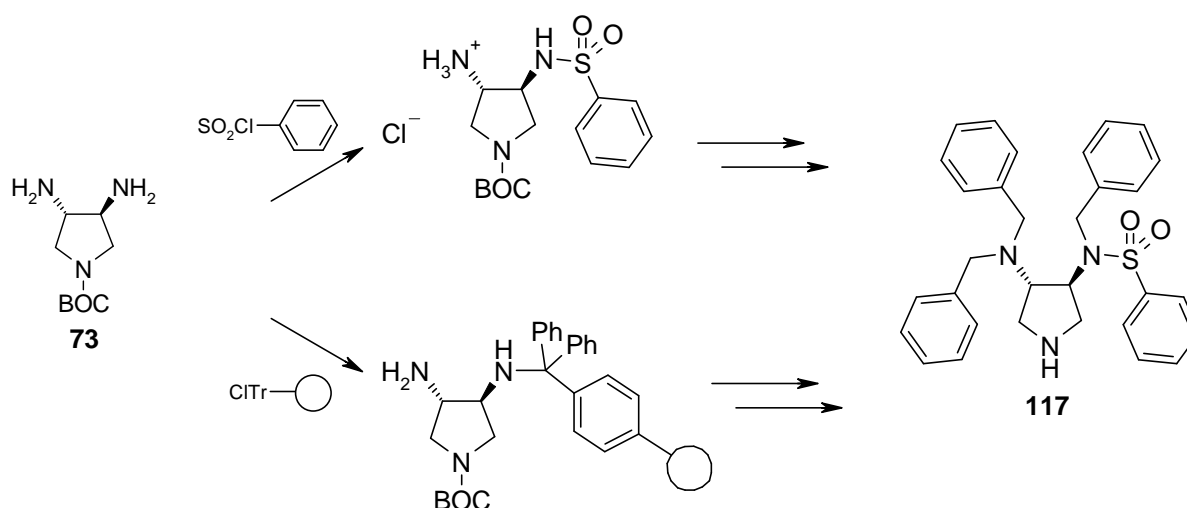
Da sich entsprechende Biphenylsysteme durch Palladium-katalysierte Kupplungsreaktionen aufbauen lassen, bietet sich ein solches Vorgehen in diesem Fall an. Durch Verwendung des entsprechenden *ortho*-Brom-Derivates kann der entsprechende Substituent erst spät in der Synthese eingeführt werden. Auf diesem Syntheseweg sind die Substituenten für die Substaschen einzeln in der Reihenfolge S_2 , S_1' , S_2' und S_1 einführbar.



Schema 72: Synthese von Biphenylderivaten zur alternativen Adressierung der S₁-Tasche mittels Suzuki-Kupplung

Die Stufe des Diamins **73** bietet ebenfalls die Möglichkeit zur Desymmetrisierung, wobei zwei mögliche Strategien denkbar sind (Schema 73). Die einfachste Möglichkeit besteht in der stöchiometrischen Reaktion mit einem Äquivalent Sulfonylchlorid ohne zusätzliche Base. In diesem Fall sollte die zweite Aminogruppe protoniert werden und so nicht mehr für die Kondensationsreaktion zur Verfügung stehen. Jedoch konkurriert in diesem Fall das Monosubstitutionsprodukt mit dem Diamin um das Proton.

Eine Möglichkeit das Hydrochlorid des Monosubstitutionsproduktes aus dem Gleichgewicht zu entfernen liegt in der Wahl eines geeigneten Lösungsmittels. Die Sulfonamide zeigen eine starke Neigung zur Kristallisation und so sollte das Hydrochlorid des Monosubstitutionsproduktes als erstes aus einer Lösung in Tetrahydrofuran oder Diethylether ausfallen. Im Falle von gleichen *N*-Alkylresten kann dreifach alkyliert werden. Um selektiv verschiedene Reste einzuführen ist wahrscheinlich die Anwendung von Schutzgruppen erforderlich.



Schema 73: Mögliche Synthese unsymmetrischer Inhibitoren ausgehend von 73

Eine weitere Möglichkeit ist die Anbindung des Diamins **73** an eine Festphase, beispielsweise ein Trityl-Harz. Durch die geringe lokale Konzentration des Elektrophils kann nur eine der Aminogruppen reagieren. Die weitere Ausstattung und Variation der Seitenketten könnte

dann über Festphasensynthese erfolgen. Nach Reaktion der freien Aminogruppe mit einem Sulfonylchlorid könnte das Produkt wieder von der Festphase abgespalten werden. Ein solches Vorgehen zur Desymmetrierung ist auch für die *Staudinger*-Reaktion des Diazids unter Einsatz von polymergebundenem Triphenylphosphin denkbar.

4.4 Abgeleitete Ringsysteme als alternative Grundgerüste

Vom beobachteten Bindungsmodus des Inhibitors **78** und der analogen Verbindungen lassen sich auch alternative Grundgerüste ableiten. Die Überlagerung des Inhibitors in der Struktur mit seinem Symmetrieäquivalenten (siehe S.52) legt die Erweiterung des Pyrrolidins ($pK_a=11.27$) zum Piperidin ($pK_a=11.22$) oder eine Verengung zum Azetidin ($pK_a=11.29$) nahe.^[108] Die wichtigsten Wechselwirkungen durch die endozyklische Aminofunktion und den Sulfonylrest lassen sich durch ein 4-Amino-substituiertes Piperidin-System oder ein 3-Amino-substituiertes Azetidin realisieren, welche beide aufgrund der C_s -Symmetrie nicht chiral sind. Durch Docking-Studien mit dem Programm GOLD und der Kristallstruktur des Inhibitors **78** konnten entsprechende Docking-Posen für entsprechende Piperidin bzw. Azetidin-Systeme gefunden werden (Abbildung 42).

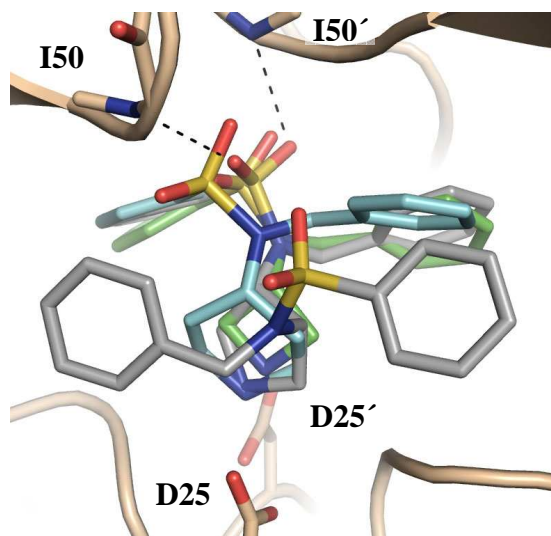
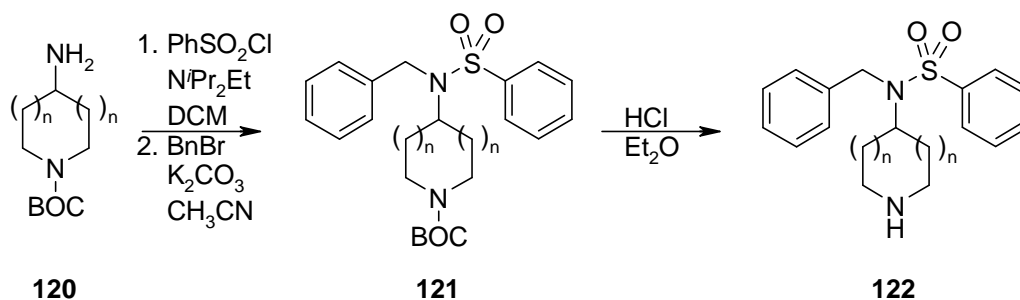


Abbildung 42: Durch das Program GOLD vorhergesagter Bindungsmodus des Piperidins (hellblau) und Azetidins (grün) in der Struktur des Inhibitors **78** (grau)

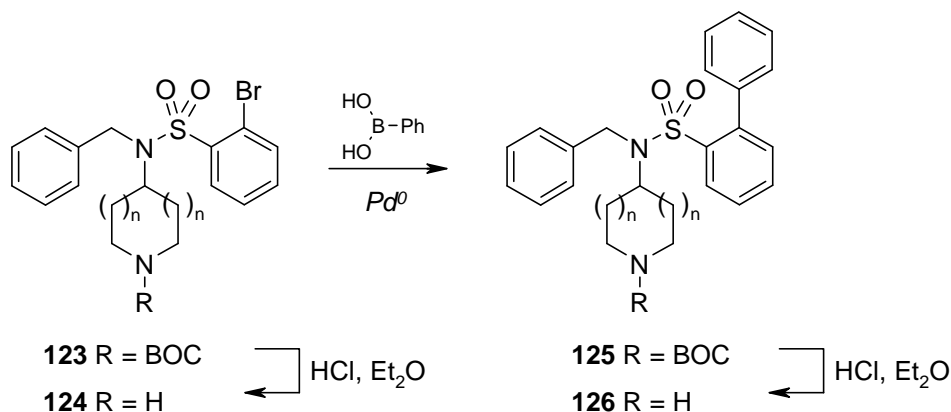
Die Verwendung von sechsgliedrigen Azacyklen wurde bereits mehrfach erfolgreich angewendet: Für die Aspartat-Proteasen Renin und Plasmepsin II wurden bereits potente Inhibitoren entwickelt, die auf einem Piperidin- bzw. Piperazin-System beruhen. Die *Roche* AG hat eine Serie von 3,4-substituierten Piperidinen als Renin-Inhibitoren entwickelt.^[109, 110] Von *Actelion Pharmaceuticals* wurden 4-substituierte Piperidine als Plasmepsin II Inhibitoren publiziert, wobei in diesem Fall die Wechselwirkung des endozyklischen Amins jedoch nicht

direkt mit der katalytischen Dyade erfolgt, sondern über ein Wasser vermittelt wird.^[111] Die Firma *Vertex* hat eine Serie von Piperazin-Derivaten als β -Sekretase Inhibitoren patentiert.^[112] Die Darstellung der Piperidine bzw. Azetidine könnte analog der Darstellung der Inhibitoren des Typs **78** erfolgen (Schema 74). Als Ausgangsverbindungen können das kommerziell erhältliche *N*-BOC-geschützte 4-Amino-Piperidin (**120**, $n=1$) oder das 3-Amino-Azetidin (**120**, $n=0$) verwendet werden. Durch Kondensation mit Benzolsulfonylchlorid und Alkylierung mit Benzylbromid gelangt man zu **121**. Nach Abspalten der BOC-Schutzgruppe mit HCl in Diethylether gelangt man zum potentiellen Inhibitor **122**.



Schema 74: Synthese von Azetidin- ($n=0$) und Piperidin-Derivaten ($n=1$)

Da mit zweiarmigen Inhibitoren auf Basis des Pyrrolidin-Systems nur mittlere Affinitäten erreicht werden konnten, ist es für hohe Affinitäten wahrscheinlich notwendig, weitere Subtaschen des Enzyms zu adressieren. Eine Möglichkeit die S_1 -Tasche zu adressieren, ist die *ortho*-Substitution am Sulfonyl-Phenyl-Ring (siehe Abschnitt 4.3), die analog über Palladium-katalysierte Kupplungsreaktionen eingeführt werden könnte.

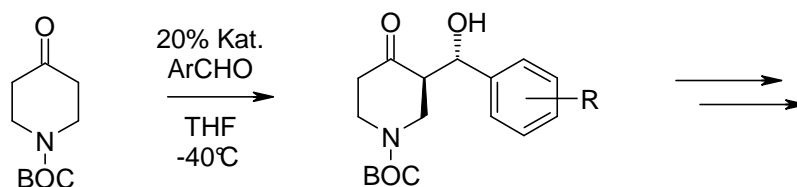


Schema 75: Einführung eines Substituenten für die S_1 -Tasche mittels Suzuki-Kupplung

Aufgrund der milden und chemoselektiven übergangsmetallkatalysierten Reaktion könnte es möglich sein, sogar das bereits entschützte Derivat **124** in der Kupplung zu verwenden (Schema 75). Das Arylbromid **124** sollte analog zu **122** mit kommerziell verfügbarem 2-Brombenzolsulfonylchlorid darstellbar sein. Die Kupplung beispielsweise mit Boronsäuren führt zu dreiarmigen Inhibitoren des Typs **126**. Für den Fall, dass sich die Kupplung mit dem

freien nukleophilen endozyklischen Amin als problematisch erweisen sollte, lässt sich die Reaktion auch analog mit dem BOC-geschützten Derivat **123** zu **125** durchführen, welches anschließend zu **126** entschützt wird.

Die Einführung eines weiteren Substituenten um Inhibitoren zu erhalten, die alle vier Subtaschen des Enzyms adressieren, stellt ein größeres Problem dar. Für Azetidine ist eine entsprechende Ausstattung schwierig, im Piperidinsystem ist das C3 am besten zur Verzweigung geeignet. Die Darstellung ist jedoch deutlich aufwendiger, da die C_s -Symmetrie der Moleküle verloren geht und es erforderlich wird, die Synthese stereoselektiv zu führen. Eine Möglichkeit zur Synthese solcher Verbindungen liegt in einer organokatalytischen Aldol-Reaktion, bei der das BOC-geschützte Piperidinon stereoselektiv mit Benzaldehyd-Derivaten reagiert.^[113]



Schema 76: Organokatalytische Methode zur Synthese von chiralen Piperidinen^[113]

5 Experimenteller Teil

5.1 Abkürzungsverzeichnis

aq.	wässrig
Ar	aromatisch
Bn	benzyl
BOC	<i>tert</i> -Butyl-oxycarbonyl
BOC ₂ O	Pyrokohlensäure-di- <i>tert</i> -butylester
ges.	wässrig gesättigt
DIAD	Diisopropylazadicarboxylat
DEAD	Diethylazadicarboxylat
DMAP	(4- <i>N,N'</i> -Dimethylamino)-pyridin
DMPU	<i>N,N'</i> -Dimethylpyrrolidon
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimid
EtOAc	Essigsäureethylester
HMPT	Hexamethylphosphorsäuretriamid
HV	Hochvakuum ($p < 10^{-1}$ mbar)
min.	Minuten
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -Butylether
org.	organisch
RT	Raumtemperatur
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TFA	Trifluoressigsäure
TMS	Tetramethylsilan

5.2 Allgemeine Anmerkungen

NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektren wurden von der NMR-Abteilung des Fachbereichs Pharmazie der Philipps-Universität Marburg mit supraleitenden Mutliresonanzspektrometern der Firma Jeol vom Typ Eclipse + (^1H : 500 MHz, ^{13}C : 125 MHz, ^{19}F : 471 MHz) und ECX (^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz) in handelsüblichen deuterierten Lösungsmitteln vermessen. Die chemischen Verschiebungen δ sind als ppm angegeben. Bei ^1H -Spektren wurde das Signal von Tetramethylsilan als interner Standard zugesetzt ($\delta_{\text{TMS}} = 0.00$ ppm), bei ^{13}C -Spektren wurde das jeweils zentrale Signal des Lösungsmittels als Referenz verwendet (CDCl_3 : $\delta = 77.16$ ppm, $\text{MeOH-}d_4$: $\delta = 49.00$ ppm, $\text{DMSO-}d_6$: $\delta = 39.52$ ppm), bei ^{19}F -Spektren wurde Trifluortoluol ($\delta = -63.90$ ppm) als externer Standard verwendet.

Für die Signalmultiplizitäten werden folgende Abkürzungen verwendet:

<i>s</i>	Singulett
<i>d</i>	Dublett
<i>t</i>	Triplett
<i>q</i>	Quartett
<i>smul</i>	Symmetrisches Multipllett
<i>m</i>	Multipllett
<i>br</i>	Breites Singnal

Für die ^{13}C -Spektren wurden die chemischen Verschiebungen der Signale durch Protonenbreitbandentkoppelte Spektren (*Single Pulse Complete Decoupling* Experiment: COM) bestimmt, die Signal-Zuordnung erfolgte zusätzlich durch APT-Spektren (*Attached Proton Test*) und wenn angegeben über zweidimensionale C,H-Korrelationsspektren (*Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*: HMQC). Signale deren zweifelsfreie Zuordnung mit den verwendeten Methoden nicht möglich war, sind durch einen Stern (*) gekennzeichnet. Die Bearbeitung der Spektren erfolgte mit der Software Delta 4.3.5 der Firma Jeol Inc. USA.

Massenspektrometrie

Die massenspektrometrischen Messungen erfolgten in der Abteilung für Massenspektrometrie des Fachbereichs Pharmazie der Philipps-Universität Marburg mit einem doppel-fokussierenden Sektorfeld-Spektrometer vom Typ VG 7070 der Firma Vacuum Generators, wobei Elektronenstoß (EI) als Ionisierungsmethode verwendet wurde. Für ESI-Spektren (*Electron Spray Ionisation*: ES+) erfolgte die Messung mit einem doppelfokussierenden

Sektorfeld-Spektrometer mit EBE-Geometrie vom Typ VG-Autospec der Firma Micromass. Die Ionenmassen sind als m/z in u angegeben.

Elementaranalysen

Die Elementaranalysen wurden von der Abteilung des Fachbereichs Pharmazie der Philipps-Universität Marburg mit einem CH-Analyser der Firma Labomatic/Woesthoff, einem CHN-Autoanalyser der Firma Hewlett Packard und einem Vario Micro Cube der Firma Elementar Analysen GmbH bestimmt.

Schmelzpunkte

Die Schmelzpunkte wurden mit einem Heiztischmikroskop HM-Lux der Firma Leitz (Wetzlar) bestimmt und sind unkorrigiert.

Chromatographie

Zur säulenchromatographischen Aufreinigung (*Flash-Chromatographie*: FC) wurde Kieselgel 60 (Korngröße 0.04-0.063 mm) der Firma Macherey und Nagel verwendet. In einigen Fällen kam eine Sepacore-MPLC der Firma Büchi inklusive Fraktionensammler C-660 und Detektionseinheit (bei 220 nm bzw. 254 nm) zum Einsatz. Zur präparativen *reversed phase*-HPLC wurde eine Anlage der Firma Varian, bestehend aus 2 präparativen Pumpen Model 218, UV-Vis Detektor Model 320, Fraktionssammler Model 701, und einer Säule Nucleodur 5 μm C8 ec. 100 Å, 250 x 32.0 mm der Firma Macherey-Nagel, unter Benutzung der zugehörigen Star-LC-Software Version 6.0, verwendet. Die Detektion erfolgte bei 220 nm. Als Elutionsmittel dienten Wasser und Acetonitril jeweils mit 0.1 % TFA. Zur Dünnschichtchromatographie wurden Aluminiumplatten mit Kieselgel 60 F₂₅₄ der Firma Merck verwendet. Die Detektion erfolgte durch UV-Absorption oder durch Anfärbung mit jeweils geeigneten Färbereagenzien.

Chemikalien und Reaktionen

Lösungsmittel in p.a.-Qualität oder wasserfrei wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet. THF wurde über LiAlH₄ getrocknet und vor der Verwendung frisch destilliert. Hexan, EtOAc und MTBE wurden vor der Verwendung destilliert. Feuchtigkeitsempfindliche Reaktionen wurden in ausgeheizten Glasgeräten unter einer Atmosphäre handelsüblichen Argons durchgeführt. Der Transfer von Lösungsmitteln und Reagenzien erfolgte durch Septen mittels Spritzen und Kanülen.

5.3 Allgemeine Arbeitsvorschriften

AAV1: Acylierung des Pyrrolidin-Diols 44 mit einem Säurechlorid

Zu einer Lösung von 305 mg des Pyrrolidin-Diols (1.5 mmol) in 5 ml CH_2Cl_2 wurden 4.5 mmol des Säurechlorides und anschließend 627 μl Triethylamin (4.5 mmol) tropfenweise zugegeben, gefolgt von der Zugabe einer katalytischen Menge DMAP. Nach 13 h Rühren wurden 5 ml ges. NaHCO_3 -Lösung zugegeben und 15 min gerührt. Die aq. Phase wurde abgetrennt und mit Dichlormethan (5×5 ml) extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden mit ges. NaCl -Lösung gewaschen (3×10 ml), über MgSO_4 getrocknet, filtriert und das Filtrat am Rotavapor eingengt. Das Rohprodukt wurde mittels FC an der MPLC aufgereinigt.

AAV2: Acylierung des Pyrrolidin-Diols 44 mit einer Säure unter Aktivierung mit EDC

305 mg des Pyrrolidin-Diols (1.5 mmol), 3.15 mmol der Säure und 12 mg DMAP (0.15 mmol) wurden in 10 ml CH_2Cl_2 gelöst und auf 0°C gekühlt. Nach Zugabe von 604 mg EDC (3.15 mmol) wurde die Reaktionsmischung 1 h bei 0°C auf RT aufwärmen gelassen und über Nacht gerührt. Abschließend wurde das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt und der Rückstand mit 10 ml H_2O und 20 ml EtOAc aufgenommen. Die aq. Phase wurde mit EtOAc extrahiert (3×15 ml). Die vereinigten org. Phasen wurden mit ges. NaHCO_3 -Lösung (3×10 ml) und mit ges. NaCl -Lösung gewaschen (3×10 ml), über MgSO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt. Die Aufreinigung erfolgte über MPLC.

AAV3: Entschützen der Pyrrolidin-Diester 45

0.75 mmol des Pyrrolidin-Diesters wurden in 5 ml 2 M HCl in Et_2O gelöst und so lange bei Raumtemperatur gerührt, bis mittels DC kein Edukt mehr festzustellen war. Das ausgefallene Hydrochlorid wurde abgetrennt, indem die überstehende Lösung abpipetiert wurde, anschließend dreifach mit trockenem Ether gewaschen und im HV getrocknet. Wenn das auf diesem Weg erhaltene Produkt noch nicht die ausreichende Reinheit besaß wurde es noch über MPLC aufgereinigt.

AAV4 : Kondensation zu Sulfonamiden

1.0 mmol des Diamins **73** wurden in 6 ml CH_2Cl_2 gelöst, 2.4 mmol Triethylamin oder Diisopropylethylamin sowie 2.2 mmol Arylsulfonylchlorid wurden tropfenweise zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 14-20 h bei RT gerührt und anschließend in 10 ml ges. NH_4Cl -Lsg. gegeben. Die aq. Phase wurde abgetrennt und mit MTBE (3×10 ml) extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden mit ges. NaCl -Lsg. (3×10 ml) gewaschen, über Na_2SO_4

getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt. Das verbleibende Öl wurde in 5 ml CH_2Cl_2 gelöst und tropfenweise zu 50 ml schnell gerührtem kaltem Hexan gegeben. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert, mit Hexan gewaschen und getrocknet. Das auf diesem Weg erhaltene Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung weiter verwendet.

AAV5: N-Alkylierung von Sulfonamiden

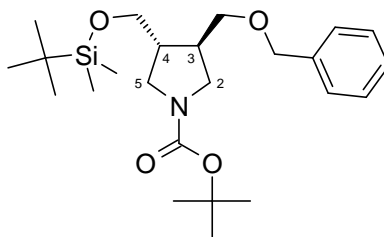
1.00 mmol des Sulfonamids und 3.00 mmol wasserfreies K_2CO_3 wurden in 7.5 ml trockenem CH_3CN suspendiert, bei reaktionsträgen Benzylbromiden wurde zusätzlich eine katalytische Menge KI hinzugefügt. 2.40 mmol des Benzyl- oder Allylbromids wurden zugegeben und die Mischung die angegebene Zeit bei der angegebenen Temperatur gerührt. Nachdem die Reaktionsmischung wieder RT erreicht hatte, wurden die unlöslichen Anteile abfiltriert und mit etwas MTBE gewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden am Rotavapor eingeeengt und das verbliebene Öl mittels FC aufgereinigt.

AAV6: Hydrolyse von Nitrilen zu Amiden

0.30 mmol des Nitrils wurden in 3 ml DMSO gelöst und auf 0°C gekühlt. 1.5 ml 30% aq. H_2O_2 und 200 mg (0.15 mmol) K_2CO_3 wurden zu dem gefrorenem Gemisch gegeben, welches nach langsamen Aufwärmen auf RT und noch weitere 30 min. bei RT gerührt wurde. Anschließend wurde erneut auf 0°C gekühlt und 50 ml H_2O zugegeben. Das ausgefallene Produkt wurde abfiltriert und mit H_2O gewaschen. Um Reste von DMSO zu entfernen wurde der so erhaltene Niederschlag in 5 ml CHCl_3 gelöst und diese Lösung mit H_2O (3×10 ml) und ges. NaCl-Lsg. (10 ml) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt.

AAV7: BOC-Entschützung

0.20 mmol des BOC-geschützten Pyrrolidins wurden in 5 ml 2 M HCl in Et_2O gelöst. Nach 14 h wurde die überstehende Lösung abpipettiert. Das Hydrochlorid wurde mehrfach mit trockenem Ether gewaschen und im HV getrocknet.

***rac*-(3,4-*trans*)-1-BOC-3-Benzylloxymethyl-4-(*tert*-butyl-dimethyl-silanyloxymethyl)-pyrrolidin (26)**

260 mg (6.48 mmol) einer 60% Suspension von NaH in Mineralöl wurden in 5 ml THF suspendiert auf 0°C gekühlt und anschließend 1.6 g (4.32 mmol) des Silylethers **19** in 9 ml THF gelöst tropfenweise zugegeben. Es wurde auf RT erwärmt, 30 min. bei RT gerührt, erneut auf 0°C gekühlt und 0.75 ml (6.48 mmol) Benzylchlorid tropfenweise zugegeben. Als Katalysator wurden anschließend 130 mg (0.86 mmol) NaI zugegeben und auf RT aufwärmen gelassen. Nach 16 h wurden 5 ml ges. NH₄Cl-Lsg. zur Reaktionsmischung gegeben, die aq. Phase abgetrennt und mit MTBE (3×5 ml) extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden mit ges NaHCO₃-Lsg. (3×5 ml), anschließend mit ges NaCl-Lsg. (3×5 ml) gewaschen über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt. Die Aufreinigung erfolgte mittels FC (Hexan: EtOAc 2:1). Es konnten 963 mg (51%) des Benzylethers **26** als farbloses Öl erhalten werden.

¹H-NMR (CDCl₃, 22.1 °C, 500.16 MHz):

δ _H (ppm) = 7.42-7.26	<i>m</i> , 5H, CH ₂ CCH, CH ₂ CCHCH, CH ₂ CCHCHCH
4.49	<i>s</i> , 2H, OCH ₂ Ph
3.59-3.22	<i>mbr</i> , 6H, C(2)H ₂ *, C(5)H ₂ *, CH ₂ OTBS*
3.14-3.01	<i>mbr</i> , 2H, CH ₂ OBn*
2.29-2.16	<i>mbr</i> , 1H, C(3)H
2.15-2.02	<i>mbr</i> , 1H, C(4)H
1.36	<i>sbr</i> , 9H, OC(CH ₃) ₃
0.77	<i>sbr</i> , 4.5H, SiC(CH ₃) ₃
0.76	<i>sbr</i> , 4.5H, SiC(CH ₃) ₃
-0.06	<i>sbr</i> , 3H, SiCH ₃
-0.07	<i>sbr</i> , 3H, SiCH ₃

¹³C-NMR (CDCl₃, 26.9 °C, 125.77 MHz): Zuordnung über HMQC

δ _C (ppm) = 154.7	CO ₂ C(CH ₃) ₃
138.4	CH ₂ C _{Ar}
128.5	CH ₂ CCHCH*
127.8	CH ₂ CCH*
127.7	CH ₂ CCHCHCH
79.2	CO ₂ C(CH ₃) ₃
73.3	OCH ₂ Ph
71.8	CH ₂ OBn
64.2	CH ₂ OSi

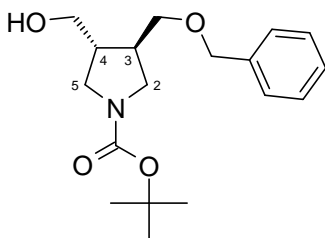
49.5, 48.4	C2* (Rotamere)
48.6, 48.4	C5* (Rotamere)
43.8, 42.9	C3* (Rotamere)
41.1, 40.1	C4* (Rotamere)
28.6	CO ₂ C(CH ₃) ₃
26.0	SiC(CH ₃) ₃
18.4	SiC(CH ₃) ₃
-5.3	SiCH ₃

MS (ES+, RT):

m/z (%) 436 (77, [M+H]⁺), 872 (100, [2M+H]⁺), 1330 (71, [3M+H]⁺)

EA	C ₂₄ H ₄₁ NO ₄ Si	435.68			
Ber.:		C: 66.16%	H: 9.49%	N: 3.21%	
Gef.:		C: 66.26%	H: 8.90%	N: 4.50%	

rac-(3,4-trans)-1-BOC-3-Benzyloxymethyl-4-hydroxymethyl-pyrrolidin (27)



1.90 g (4.37 mmol) des Silylethers **26** wurden in 50 ml THF gelöst, auf 0°C gekühlt und 9.7 ml TBAF 1 M in THF (9.7 mmol) tropfenweise zugegeben. Nach 30 min bei 0°C war das Edukt vollständig umgesetzt. Die Reaktionsmischung wurde bei 0° mit 25 ml H₂O und 25 ml EtOAc versetzt. Die org. Phase wurde mit ges NaCl-Lsg. (1×25 ml) gewaschen über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt. Nach Aufreinigung mittels FC (Hexan:EtOAc 1:1) wurden 1.31 g (93%) des Alkohols **27** als farbloses Öl erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 22.8 °C, 500.16 MHz):

δ _H (ppm) = 7.40-7.25	<i>m</i> , 5H, CH ₂ CCH, CH ₂ CCHCH, CH ₂ CCHCHCH
4.63-4.51	<i>m</i> , 2H, CH ₂ Ph
3.72-3.37	<i>mbr</i> , 6H, C(2)H ₂ *, C(5)H ₂ *, CH ₂ OH*
3.11-2.98	<i>mbr</i> , 2H, CH ₂ OBn*
2.38-2.11	<i>mbr</i> , 2H, C(4)H, C(3)H
1.97-2.89	<i>mbr</i> , 1H, OH*
1.44	<i>sbr</i> , 9H, OC(CH ₃) ₃

¹³C-NMR (CDCl₃, 26.9 °C, 125.77 MHz): Zuordnung über HMQC

δ _C (ppm) = 154.2	CO ₂ C(CH ₃) ₃
137.4	CH ₂ C _{Ar}
128.7	CH ₂ CCHCH
128.1	CH ₂ CCHCHCH
128.0	CH ₂ CCH
79.5	CO ₂ C(CH ₃) ₃
73.7	OCH ₂ Ph

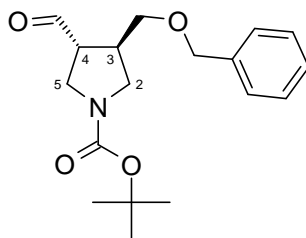
71.8	$\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{OBn}$
64.2	$\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{OH}$
49.0, 48.9	$\text{C}2^*$ (Rotamere)
48.6, 48.4	$\text{C}5^*$ (Rotamere)
46.5, 45.3	$\text{C}3^*$ (Rotamere)
43.3, 42.7	$\text{C}4^*$ (Rotamere)
28.6	$\text{CO}_2\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$

MS (ES+, RT):

m/z (%) 322 (100, $[M+H]^+$), 665 (82, $[2M+Na]^+$), 987 (92, $[3M+Na]^+$)

EA	$\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{NO}_4$	321.42		
	Ber.:	C: 67.26%	H: 8.47%	N: 4.36%
	Gef.:	C: 58.91%	H: 7.35%	N: 4.88%

***rac*-(3,4-*trans*)-1-BOC-3-Benzoyloxymethyl-4-formyl-pyrrolidin (**28**)**



0.54 ml (6.30 mmol) Oxalylchlorid wurden in 20 ml CH_2Cl_2 vorgelegt, auf -78°C gekühlt und tropfenweise mit 0.9 ml (12.6 mmol) DMSO in 10 ml CH_2Cl_2 versetzt. Nach 30 min bei -78°C wurden 1.31 g (4.20 mmol) des Alkohols **27** in 10 ml CH_2Cl_2 gelöst zugegeben und 1 h bei -78°C gerührt. Anschließend wurden 4.40 ml (25.2 mmol) Diisopropylethylamin zugegeben und die Reaktionsmischung innerhalb von 40 min auf -10°C aufwärmen gelassen. Die Reaktionsmischung wurde in 25 ml H_2O gegeben und die aq. Phase abgetrennt und mit CH_2Cl_2 extrahiert (5×10 ml). Die vereinigten org. Phasen wurden mit ges. NH_4Cl -Lsg. (3×10 ml), ges. NaHCO_3 -Lsg. (3×10 ml) und mit ges. NaCl -Lsg. (3×10 ml) gewaschen. Anschließend wurde über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt. Nach Aufreinigung mittels FC (Hexan: EtOAc 1:1) wurden 1.35 g (85%) des Aldehyds **28** als farbloses Öl erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 23.4°C , 500.16 MHz):

$\delta_{\text{H}}(\text{ppm}) = 9.68$	<i>s</i> , 1H, $\text{C}(4)\text{HCHO}$
7.39-7.26	<i>m</i> , 5H, CH_2CCH , CH_2CCHCH , $\text{CH}_2\text{CCHCHCH}$
4.52	<i>sbr</i> , 2H, CH_2Ph
3.72-3.47	<i>mbr</i> , 4H, $\text{C}(2)\text{H}_2^*$, $\text{C}(5)\text{H}_2^*$
3.44	<i>dd</i> , 1H, $^2J = 9.3$ Hz, $^3J = 7.4$ Hz, CH_2OBn^*
3.23-3.11	<i>mbr</i> , 1H, CH_2OBn^*
3.02-2.89	<i>mbr</i> , 1H, $\text{C}(4)\text{H}^*$
2.85-2.74	<i>mbr</i> , 1H, $\text{C}(3)\text{H}^*$
1.45	<i>sbr</i> , 9H, $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$

¹³C-NMR (CDCl₃, 26.5 °C, 125.77 MHz): Zuordnung über HMQC

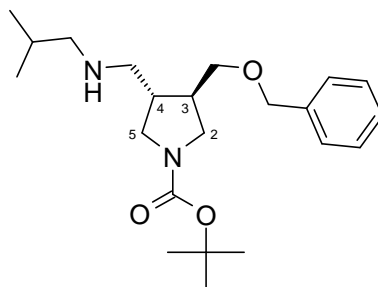
δ _C (ppm) = 200.5	C(4)CHO
154.4	CO ₂ C(CH ₃) ₃
137.9	CH ₂ C _{Ar}
128.6	CH ₂ CCHCH
128.0	CH ₂ CCHCHCH
127.7	CH ₂ CCH
79.9	CO ₂ C(CH ₃) ₃
73.4	OCH ₂ Ph
70.6	CH ₂ OBn
53.8, 52.7	C2* (Rotamere)
48.2, 47.8	C5* (Rotamere)
45.0	C4*
40.1, 39.6	C3* (Rotamere)
28.6	CO ₂ C(CH ₃) ₃

MS (ES⁺, RT):

m/z (%)	320 (13, [M+H] ⁺), 352 (100, [M+MeOH+H] ⁺), 374 (64, [M+MeOH+Na] ⁺), 390 (64, [M+MeOH+K] ⁺)
---------	---

EA	C ₁₈ H ₂₅ NO ₄	319.40			
Ber.:		C: 67.69%	H: 7.89%	N: 4.39%	
Gef.:		C: 67.50%	H: 7.74%	N: 4.99%	

***rac*-(3,4-*trans*)-1-BOC-3-Benzyloxymethyl-4-(*isobutylamino*)-methyl-pyrrolidin (29)**



933 mg (2.9 mmol) des Aldehyds **28** wurden in 20 ml MeOH vorgelegt, mit 0.35 ml (3.5 mmol) Isobutylamin und 0.58 ml (3.5 mmol) Triethylorthoformiat versetzt und 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurde auf 0°C gekühlt und 221 mg (5.8 mmol) Natriumborhydrid in kleinen Portionen zugegeben. Nach 30 min bei 0°C wurde die Reaktionsmischung mit 20 ml EtOAc und 20 ml ges. NaHCO₃-Lsg. versetzt und der entstandene Niederschlag abfiltriert. Die aq. Phase wurde abgetrennt und mit EtOAc extrahiert (5×10 ml). Die vereinigten org. Phasen wurden mit ges. NaCl-Lsg. (3×25 ml) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt. Nach Aufreinigung mittels FC (Hexan:EtOAc 2:1, Dann EtOAc:MeOH 95:5) wurden 1.00 g (92%) des Amins **29** in Form eines braunen Harzes erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 30°C, 500.16 MHz):

$\delta_{\text{H}}(\text{ppm}) = 7.40-7.27$	<i>m</i> , 5H, CH_2CCH , CH_2CCHCH , $\text{CH}_2\text{CCHCHCH}$
4.53	<i>d</i> , 1H, $^2J = 11.9$ Hz, CH_2Ph
4.50	<i>d</i> , 1H, $^2J = 11.9$ Hz, CH_2Ph
3.67-3.38	<i>mbr</i> , 5H, C(2) H_2^* , C(5) H_2^* , CH_2OBn^*
3.20-3.01	<i>mbr</i> , 3H, C(4) CH_2N , CH_2OBn^*
2.72-2.65	<i>mbr</i> , 1H, C(3)*
2.60-2.64	<i>mbr</i> , 1H, C(4)*
2.38	<i>d</i> , 2H, $^3J = 6.6$ Hz, C(4) CH_2NHCH_2
2.28-2.12	<i>m</i> , 1H, $\text{NCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$
1.45	<i>sbr</i> , 9H, $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$
0.86	<i>d</i> , 6H, $^3J = 6.6$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$

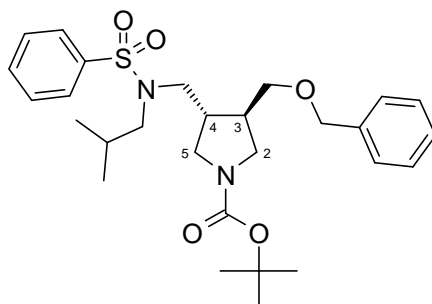
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 27.2 °C, 125.77 MHz):

$\delta_{\text{C}}(\text{ppm}) = 154.6$	$\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$
138.0	$\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}}$
128.6	$\text{CH}_2\text{CCHCH}^*$
127.9	$\text{CH}_2\text{CCHCHCH}^*$
127.6	CH_2CCH^*
79.4	$\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$
73.5	OCH_2Ph
71.7	CH_2OBn
57.9	$\text{NCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2^*$
52.4	$\text{C5CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2^*$
50.5, 50.1	C2* (Rotamere)
49.2, 48.7	C5* (Rotamere)
43.2, 42.5	C4* (Rotamere)
42.0, 41.0	C3* (Rotamere)
28.6	$\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$
28.0, 27.8	$\text{NCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ (Rotamere)
20.7, 20.6	$\text{NCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ (Rotamere)

MS (ES+, RT):

m/z (%) 377 (100, $[M+H]^+$), 753 (98, $[2M+H]^+$)

EA	$\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_4$	376.54		
Ber.:		C: 70.18%	H: 9.64%	N: 7.44%
Gef.:		C: 69.95%	H: 9.15%	N: 7.99%

***rac*-(3,4-*trans*)-1-BOC-3-[(Benzolsulfonyl-*isobutyl*-amino)-methyl]-4-benzyloxymethyl-pyrrolidin (30)**

804 mg (2.14 mmol) des Amins **29** wurden in 20 ml THF gelöst, auf 0°C gekühlt und mit 0.60 ml (4.27 mmol) Triethylamin und 0.55 ml (4.27 mmol) Benzolsulfonylchlorid versetzt und eine katalytische Menge DMAP zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde auf RT aufwärmen gelassen und 20 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit 20 ml EtOAc verdünnt und in 30 ml ges. NaHCO₃-Lsg gegeben. Die aq. Phase wurde abgetrennt und mit EtOAc (5×10 ml) extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden mit ges. NaCl-Lsg. (3×20 ml) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt. Nach Aufreinigung mittels FC (Hexan:EtOAc 2:1) wurden 985 mg (89%) des Sulfonamids **30** in Form eines farblosen Feststoffes erhalten. Schmelzpunkt: 86°C

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 30°C, 500.16 MHz):

δ _H (ppm) = 7.78	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> = 7.3 Hz, SO ₂ CCH
7.67	<i>t</i> , 1H, ³ <i>J</i> = 7.4 Hz, SO ₂ CCHCHCH
7.59	<i>t</i> , 2H, ³ <i>J</i> = 7.7 Hz, SO ₂ CCHCH
7.40-7.27	<i>m</i> , 5H, CH ₂ CCH, CH ₂ CCHCH, CH ₂ CCHCHCH
4.45	<i>s</i> , 2H, OCH ₂ Ph
3.51-3.34	<i>mbr</i> , 4H, C(2)H ₂ *, C(5)H ₂ *
3.11-3.01	<i>mbr</i> , 4H, C(4)CH ₂ N, CH ₂ OBn*
2.86-2.76	<i>mbr</i> , 2H, C(3)H*, C(4)H*
2.38-2.13	<i>m</i> , 2H, C(4)CH ₂ NCH ₂
1.83	<i>smul</i> , 1H, ³ <i>J</i> = 7.0 Hz, NCH ₂ CH(CH ₃) ₂
1.39	<i>sbr</i> , 9H, OC(CH ₃) ₃
0.79	<i>d</i> , 6H, ³ <i>J</i> = 6.6 Hz, NCH ₂ CH(CH ₃) ₂

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 125.77 MHz):

δ _C (ppm) = 153.6	CO ₂ C(CH ₃) ₃
138.7	SO ₂ C _{Ar} *
138.4	CH ₂ C _{Ar} *
132.9	SO ₂ CCHCHCH*
129.4	SO ₂ CCHCH*
128.3	CH ₂ CCHCH*
127.49	CH ₂ CCHCHCH*
127.44	CH ₂ CCH*
127.1	SO ₂ CCH*
78.3	CO ₂ C(CH ₃) ₃

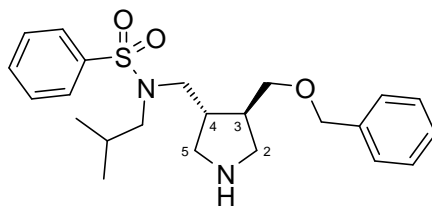
72.3	OCH ₂ Ph
70.7	CH ₂ OBn (Rotamere)
57.9	NCH ₂ CH(CH ₃) ₂ * (Rotamere)
51.6, 51.4	C2* (Rotamere)
49.4	C4CH ₂ NHCH ₂ CH(CH ₃) ₂ *
48.1, 47.8	C5* (Rotamere)
41.2, 40.6	C3* (Rotamere)
	C4 vom DMSO-Signal überdeckt
28.3	CO ₂ C(CH ₃) ₃
26.7	NCH ₂ CH(CH ₃) ₂ (Rotamere)
19.7	NCH ₂ CH(CH ₃) ₂

MS (ES+, RT):

m/z (%) 539 (70, [M+Na]⁺), 1056 (100, [2M+Na]⁺), 1572 (8, [3M+Na]⁺)

EA	C ₂₈ H ₄₀ N ₂ O ₅ S	516.71				
	Ber.:	C: 65.09%	H: 7.80%	N: 5.42%	S: 6.21%	
	Gef.:	C: 65.25%	H: 7.49%	N: 8.22%	S: 6.34%	

rac-(3,4-trans)-[(Benzolsulfonyl-isobutyl-amino)-methyl]-4-benzyloxymethyl-pyrrolidin (25)



252 mg (0.48 mmol) des Sulfonamids **30** wurden in 2 ml CH₂Cl₂ gelöst, auf 0°C gekühlt und tropfenweise mit 1 ml Trifluoressigsäure versetzt und 30 min bei 0°C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt. Zum öligen Rückstand wurden 10 ml MTBE und 10 ml ges. NaHCO₃-Lsg. gegeben. Die aq. Phase wurde abgetrennt und mit MTBE (5×5 ml) extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden mit ges. NaCl-Lsg. (3×10 ml) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt. Das resultierende freie Amin **25** wurde im HV getrocknet und 202 mg (99%) in Form eines blassgelben Öls erhalten.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 30°C, 500.16 MHz):

δ _H (ppm) = 7.67	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> = 7.3 Hz, SO ₂ CCH
7.66	<i>t</i> , 1H, ³ <i>J</i> = 7.3 Hz, SO ₂ CCHCHCH
7.59	<i>t</i> , 2H, ³ <i>J</i> = 7.5 Hz, SO ₂ CCHCH
7.40-7.23	<i>m</i> , 5H, CH ₂ CCH, CH ₂ CCHCH, CH ₂ CCHCHCH
4.43	<i>s</i> , 2H, OCH ₂ Ph
3.33	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> = 7.3 Hz, CH ₂ OBn
3.07	<i>dd</i> , 1H, ² <i>J</i> = 14.2 Hz, ³ <i>J</i> = 9.6 Hz, C(4)CH ₂ N
2.96	<i>dd</i> , 1H, ² <i>J</i> = 14.0 Hz, ³ <i>J</i> = 5.7 Hz, C(4)CH ₂ N
2.88	<i>dd</i> , 2H, ² <i>J</i> = 11.0 Hz, ³ <i>J</i> = 7.8 Hz, NCH ₂ CH(CH ₃) ₂
2.86	<i>dd</i> , 1H, ² <i>J</i> = 14.0 Hz, ³ <i>J</i> = 7.3 Hz, C(5)H ₂ *
2.78	<i>dd</i> , 1H, ² <i>J</i> = 10.3 Hz, ³ <i>J</i> = 7.1 Hz, C(2)H ₂ *

2.76	<i>dd</i> , 1H, $^2J = 13.4$ Hz, $^3J = 7.8$ Hz, C(5)H ₂ *
2.46	<i>dd</i> , 1H, $^2J = 10.5$ Hz, $^3J = 5.8$ Hz, C(2)H ₂ *
2.05-1.97	<i>m</i> , 1H, NCH ₂ CH(CH ₃) ₂
1.92-1.80	<i>m</i> , 2H, C(4)H, C(3)H
0.79	<i>d</i> , 3H, $^3J = 6.6$ Hz, NCH ₂ CH(CH ₃) ₂
0.75	<i>d</i> , 3H, $^3J = 6.6$ Hz, NCH ₂ CH(CH ₃) ₂

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 125.77 MHz):

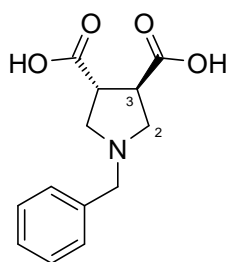
δ _C (ppm) = 138.8	SO ₂ C _{Ar} *
138.5	CH ₂ C _{Ar} *
132.6	SO ₂ CCHCHCH*
129.2	SO ₂ CCHCH*
128.1	CH ₂ CCHCH*
127.3	CH ₂ CCHCHCH*, CH ₂ CCH*
126.9	SO ₂ CCH*
72.3	CH ₂ OBn*
72.0	OCH ₂ Ph*
56.3	NCH ₂ CH(CH ₃) ₂ *
52.3	C4CH ₂ N*
50.8	C5*
49.7	C2*
43.0	C4*
42.0	C3*
26.8, 26.5	NCH ₂ CH(CH ₃) ₂ (Rotamere)
19.8	NCH ₂ CH(CH ₃) ₂

MS (ES+, RT):

m/z (%) 417 (44, [M+H]⁺), 833 (100, [2M+H]⁺), 1249 (12, [3M+H]⁺)

EA	C ₂₃ H ₃₂ N ₂ O ₃ S * 0.5 H ₂ O	425.59		
Ber.:	C: 64.91%	H: 7.82%	N: 6.58%	
Gef.:	C: 64.82%	H: 7.70%	N: 6.41%	

***rac*-(3,4-*trans*)-1-Benzyl-pyrrolidin-3,4-dicarbonsäure (31)**



12.21 g (40 mmol) des Diesters **16** wurden in 50 ml Ethanol gelöst, mit 10.88 g (272 mmol) NaOH und 50 ml H₂O versetzt und unter Rückfluss 3 h gekocht. Nach Abkühlen auf RT wurde am Rotavapor eingedunstet und vorsichtig 31 ml (272 mmol) 32% HCl zugegeben. Der ausgefallene organische Feststoff wurde abfiltriert und verworfen. Das Filtrat wurde mit NaHCO₃ neutralisiert, wobei das Produkt ausfiel. Nach Aufreinigung durch Umkristallisieren

aus 50 ml Ethanol wurden 6.8 g (68%) der Dicarbonsäure **31** in Form farbloser Kristalle erhalten. Schmelzpunkt 127°C

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0°C, 500.16 MHz):

$\delta_{\text{H}}(\text{ppm}) = 7.48-7.32$	<i>m</i> , 5H, CH_2CCH , CH_2CCH , CH_2CCHCH
4.03	<i>d</i> , 1H, $^2J = 12.8$ Hz, NCH_2Ph
3.99	<i>d</i> , 1H, $^2J = 12.8$ Hz, NCH_2Ph
3.29-3.20	<i>m</i> , 2H, C(3)H
3.20-3.07	<i>m</i> , 4H, C(2)H ₂

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 30.1°C, 125.77 MHz):

$\delta_{\text{C}}(\text{ppm}) = 173.5$	CO_2H
134.5	$\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}}$
129.6	CH_2CCH
128.5	CH_2CCH
128.2	CH_2CCHCH
57.9	CH_2Ph
55.1	C2
44.6	C3

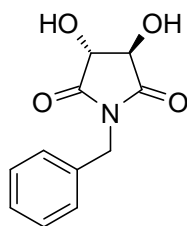
MS (EI):

m/z (%)	249 (100, $[\text{M}]^+$), 172 (48, $[\text{M-Ph}]^+$), 158 (35, $[\text{M-Bn}]^+$), 140 (37, $[\text{M-Bn-H}_2\text{O}]^+$), 91 (64, $[\text{Bn}]^+$)
---------	---

EA

$\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{NO}_4 \cdot 1.5 \text{H}_2\text{O}$	249.27			
Ber.:	C: 56.51%	H: 6.57%	N: 5.07%	
Gef.:	C: 56.57%	H: 6.25%	N: 4.82%	

(3R,4R)-1-Benzyl-3,4-dihydroxy-pyrrolidin-2,5-dion (42)



75 g (0.5 mol) L-(+)-Weinsäure wurden in 400 ml Xylol suspendiert und mit 55 ml Benzylamin versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 3 h unter Rückfluss am Wasserabscheider gekocht. Gegen Ende der Reaktion kristallisierte das Produkt schlagartig unter starkem Siedeverzug aus. Nach Abkühlen auf RT wurde das Produkt abfiltriert und mit wenig Aceton gewaschen. Es wurden 89.6 g (81%) des Imids **42** in Form beiger Nadeln erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmen mit Literaturwerten überein.^[61]

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 30 °C, 500.16 MHz):

δ _H (ppm) = 7.36-7.20	<i>m</i> , 5H, CH ₂ CCH ₂ , CH ₂ CCHCH ₂ , CH ₂ CCHCHCH ₂
6.28	<i>sbr</i> , 2H, OH
4.59	<i>d</i> , 1H, ² <i>J</i> = 15.1 Hz, CH ₂ Ph
4.53	<i>d</i> , 1H, ² <i>J</i> = 14.9 Hz, CH ₂ Ph
4.39	<i>sbr</i> , 2H, CHOH

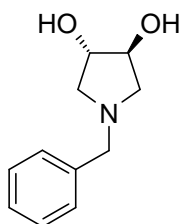
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 30 °C, 125.77 MHz):

δ _C (ppm) = 174.5	C=O
135.9	CH ₂ C _{Ar}
128.5	CH ₂ CCHCH ₂
127.5	CH ₂ CCH
127.4	CH ₂ CCHCHCH ₂
74.5	CHOH
41.1	CH ₂ Ph

MS (ES⁺, RT):

m/z (%) 244 (13, [M+Na]⁺), 465 (100, [2M+Na]⁺), 686 (51, [3M+Na]⁺)

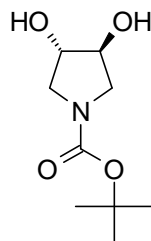
(3*S*,4*S*)-1-Benzyl-3,4-Dihydroxy-pyrrolidin (43)



In einem 500 ml Dreihalskolben wurden 100 ml LiAlH₄ Lösung (1M in THF, 100 mmol) mit 250 ml THF verdünnt und auf 0°C gekühlt. Unter Rühren wurden 8.19 g (37 mmol) des Imids **42** portionsweise zugegeben, wobei sich Wasserstoff entwickelte. Anschließend wurde die Suspension zum Rückfluss erhitzt, wobei sich der Feststoff vollständig löste und sich eine gelbe Lösung bildete. Nach 19 Stunden unter Rückfluss wurde die Reaktionsmischung auf -10°C gekühlt und tropfenweise mit 4 ml Wasser, 4 ml 20%iger NaOH-Lösung und 12 ml Wasser versetzt. Nach 1 h bei -10°C wurde der ausgefallene Niederschlag abfiltriert und mit heißem THF gewaschen, anschließend noch zweimal in 100 ml THF suspendiert, zum Rückfluss erhitzt und abfiltriert. Die Filtrate wurden vereinigt und das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt, wobei 5.64 g (80%) eines gelben Feststoffes als Rohprodukt erhalten wurden. Dieses wurde aus 40 ml Ethylacetat umkristallisiert und 4.37 g des Produktes **43** in Form beiger Nadeln gewonnen. Aus der Mutterlauge ließen sich weitere 0.26 g Produkt gewinnen. Gesamtausbeute 4.63 g (65%). Die spektroskopischen Daten stimmen mit Literaturwerten überein.^[61]

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0°C, 500.16 MHz):

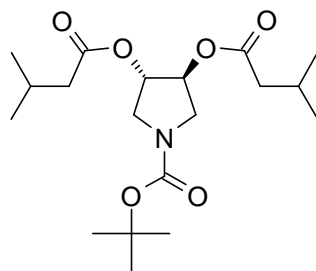
$\delta_{\text{H}}(\text{ppm}) = 7.28-7.24$	<i>m</i> , 4H, CH_2CCH , CH_2CCHCH
7.21	<i>m</i> , 1H, $\text{CH}_2\text{CCHCHCH}$
3.86	<i>smul</i> , 2H, C(3)H
3.57	<i>d</i> , 1H, $^2J = 13.1$ Hz, CH_2Ph
3.47	<i>d</i> , 1H, $^2J = 13.1$ Hz, CH_2Ph
2.76	<i>dd</i> , 2H, $^2J = 9.5$ Hz, $^3J = 5.8$ Hz, C(2)H ₂
2.32	<i>dd</i> , 2H, $^3J = 9.6$ Hz, $^3J = 4.4$ Hz, C(2)H ₂

(3S,4S)-1-BOC-3,4-Dihydroxy-pyrrolidin (44)

2.0 g (10.5 mmol) *N*-Benzyl-pyrrolidin **43** wurden in 70 ml Ethanol gelöst und 2.51 g (11.5 mmol) BOC₂O und 334 mg Pd/C zugegeben. Die Suspension wurde unter Wasserstoffatmosphäre 16 h bei RT gerührt. Der Katalysator wurde durch Filtration über Celite abgetrennt und das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt. Das resultierende gelbe Öl wurde aus 21 ml EtOAc umkristallisiert. Ausbeute an **44**: 1.91 g (90%) in Form beiger Kristalle. Schmelzpunkt 161°C. Die spektroskopischen Daten stimmen mit Literaturwerten überein.^[114]

¹H-NMR (CDCl₃, 24.2°C, 500.16 MHz):

$\delta_{\text{H}}(\text{ppm}) = 4.71$	<i>sbr</i> , 2H, OH*
4.11-4.06	<i>m</i> , 2H, C(3)H
3.61	<i>dbr</i> , 2H, $^2J = 8.5$ Hz, C(2)H ₂
3.34	<i>dbr</i> , 1H, $^2J = 8.9$ Hz, C(2)H ₂
3.28	<i>dbr</i> , 1H, $^2J = 10.1$ Hz, C(2)H ₂
1.45	<i>s</i> , 9H, C(CH ₃) ₃

(3S,4S)-1-BOC-3,4-Bis-(3-methyl-butyryloxy)-pyrrolidin (47a)

Durch Anwendung der AAV2 mit 348 μL (3.15 mmol) 3-Methylbuttersäure konnten nach FC (Hexan:MTBE 3:1) 490 mg (88%) **47a** in Form farbloser Kristalle erhalten werden. Schmelzpunkt: 41°C

¹H-NMR (CDCl₃, 22.6°C, 500.16 MHz):

δ _H (ppm) = 5.15	<i>d</i> , 1H, ³ <i>J</i> = 3.2 Hz, C(3)H
5.11	<i>d</i> , 1H, ³ <i>J</i> = 3.0 Hz, C(3)H
3.69	<i>dd</i> , 1H, ² <i>J</i> = 12.6 Hz, ³ <i>J</i> = 4.4 Hz, C(2)H ₂
3.66	<i>dd</i> , 1H, ² <i>J</i> = 13.0 Hz, ³ <i>J</i> = 4.4 Hz, C(2)H ₂
3.52	<i>d</i> , 1H, ² <i>J</i> = 13.1 Hz, C(2)H ₂
3.43	<i>d</i> , 1H, ² <i>J</i> = 13.1 Hz, C(2)H ₂
2.20	<i>d</i> , 4H, ³ <i>J</i> = 7.3 Hz, CH ₂ CH(CH ₃) ₂
2.08	<i>smul</i> , 2H, CH ₂ CH(CH ₃) ₂
1.46	<i>s</i> , 9H, OC(CH ₃) ₃
0.95	<i>s</i> , 12H, CH ₂ CH(CH ₃) ₂

¹³C-NMR (CDCl₃, 27.1°C, 125.77 MHz):

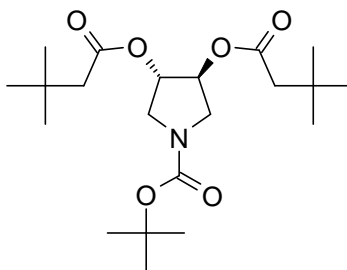
δ _C (ppm) = 170.5, 170.3	CH ₂ COOCH (Rotamere)
154.3	NCOOC(CH ₃) ₃
80.1	OC(CH ₃) ₃
75.1, 74.1	C3 (Rotamere)
50.4, 49.9	C2 (Rotamere)
43.3	CH ₂ COOCH
28.5	C(CH ₃) ₃
25.8	CH(CH ₃) ₂
22.4	CH(CH ₃) ₂

MS (ES⁺, RT):

m/z (%) 394 (22, [M+Na]⁺), 765 (100, [2M+Na]⁺), 1136 (11, [3M+Na]⁺),

EA	C ₁₉ H ₃₃ NO ₆	371.48			
	Ber.:	C: 61.43%	H: 8.95%	N: 3.77%	
	Gef.:	C: 61.22%	H: 9.05%	N: 3.84%	

(3S,4S)-1-BOC-3,4-Bis-(3,3-dimethyl-butyryloxy)-pyrrolidin (48a)



Die Verwendung der AAV1 mit 625 µL (4.5 mmol) 3,3-Dimethylbuttersäurechlorid führte nach FC (Hexan:MTBE 6:1) zu 545 mg (91%) **48a** in Form farbloser Kristalle.
Schmelzpunkt: 49°C

¹H-NMR (CDCl₃, 22.6°C, 500.16 MHz):

δ _H (ppm) = 5.15	<i>d</i> , 1H, ³ <i>J</i> = 3.7 Hz, C(3)H
5.10	<i>d</i> , 1H, ³ <i>J</i> = 3.7 Hz, C(3)H
3.69	<i>dd</i> , 1H, ² <i>J</i> = 13.1 Hz, ³ <i>J</i> = 4.6 Hz, C(2)H ₂
3.65	<i>dd</i> , 1H, ² <i>J</i> = 13.0 Hz, ³ <i>J</i> = 4.4 Hz, C(2)H ₂
3.53	<i>d</i> , 1H, ² <i>J</i> = 12.6 Hz, C(2)H ₂

3.45	<i>d</i> , 1H, $^2J = 12.6$ Hz, C(2)H ₂
2.21	<i>s</i> , 4H, COCH ₂ C(CH ₃) ₃
1.46	<i>s</i> , 9H, OC(CH ₃) ₃
1.02	<i>s</i> , 18H, CH ₂ C(CH ₃) ₃

¹³C-NMR (CDCl₃, 25.5°C, 125.77 MHz):

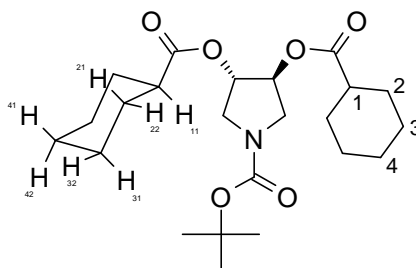
δ _C (ppm) = 171.2, 171.1	CH ₂ COOCH (Rotamere)
154.4	NCOOC(CH ₃) ₃
80.1	OC(CH ₃) ₃
75.0, 74.1	C3 (Rotamere)
50.5, 50.0	C2 (Rotamere)
47.9	CH ₂ COOCH
31.0	CH ₂ C(CH ₃) ₃
29.7	CH ₂ C(CH ₃) ₃ *
28.4	OC(CH ₃) ₃ *

MS (ES⁺, RT):

m/z (%) 422 (33, [M+Na]⁺), 821 (100, [2M+Na]⁺), 1220 (9, [3M+Na]⁺)

EA	C ₂₁ H ₃₇ NO ₆	399.53			
	Ber.:	C: 63.13%	H: 9.33%	N: 3.51%	
	Gef.:	C: 63.14%	H: 9.41%	N: 3.56%	

(3S,4S)-1-BOC-3,4-Bis-cyclohexanecarbonyloxy-pyrrolidin (49a)



Durch Anwendung der AAV1 mit 611 µL (4.5 mmol) Cyclohexylcarbonsäurechlorid konnten nach FC (Hexan:MTBE 5:1) 489 mg (77%) **49a** in Form farbloser Kristalle erhalten werden. Schmelzpunkt: 92°C

¹H-NMR (CDCl₃, 22.4°C, 500.16 MHz):

δ _H (ppm) = 5.13	<i>dbr</i> , 1H, $^3J = 3.2$ Hz, C(3) _{PyR} H
5.09	<i>dbr</i> , 1H, $^3J = 3.4$ Hz, C(3) _{PyR} H
3.66	<i>smul</i> , 2H, C(2)H ₂
3.49	<i>d</i> , 1H, $^2J = 12.8$ Hz, C(2) _{PyR} H ₂
3.40	<i>d</i> , 1H, $^2J = 12.6$ Hz, C(2) _{PyR} H ₂
2.30	<i>smul</i> , 2H, H ₁₁ *
1.92-1.83	<i>mul</i> , 4H, H ₂₂ *
1.78-1.70	<i>mul</i> , 4H, H ₃₂ *
1.67-1.61	<i>mul</i> , 2H, H ₄₂ *
1.47	<i>s</i> , 9H, OC(CH ₃) ₃
1.46-1.37	<i>mul</i> , 4H, H ₂₁ *
1.33-1.17	<i>mul</i> , 6H, H ₃₁ *, H ₄₁ *

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 24.9°C , 125.77 MHz):

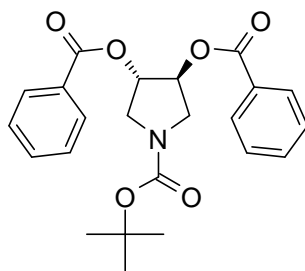
δ_{C} (ppm) = 175.0, 174.8	$\underline{\text{COOCyHex}}$ (Rotamere)
154.5	$\underline{\text{NCOOC}}(\text{CH}_3)_3$
80.1	$\underline{\text{OC}}(\text{CH}_3)_3$
74.9, 74.0	C3_{Pyr} (Rotamere)
50.4, 49.9	C2_{Pyr} (Rotamere)
43.0	C1_{CyHex} *
29.0, 28.9	C2_{CyHex} * (Rotamere)
28.6	$\text{C}(\underline{\text{CH}}_3)_3$
25.7, 25.4	C3_{CyHex} *, C4_{CyHex} *

MS (ES+, RT):

m/z (%) 446 (52, $[\text{M}+\text{Na}]^+$), 869 (100, $[\text{2M}+\text{Na}]^+$), 1292 (11, $[\text{2M}+\text{Na}]^+$)

EA	$\text{C}_{23}\text{H}_{37}\text{NO}_6$	423.55			
	Ber.:	C: 65.22%	H: 8.81%	N: 3.31%	
	Gef.:	C: 65.26%	H: 8.94%	N: 3.46%	

(3S,4S)-1-BOC-3,4-Bis-benzoyloxy-pyrrolidin (50a)



Die Anwendung der AAV1 mit 522 μL (4.5 mmol) Benzoylchlorid ergab nach FC (Hexan:MTBE 5:1) 518 mg (84%) **50a** in Form farbloser Kristalle. Schmelzpunkt: 158°C

^1H -NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 30°C , 500.16 MHz):

δ_{H} (ppm) = 8.01	d , 4H, $^3J = 7.3$ Hz, COOCCH
7.70	t , 2H, $^3J = 7.5$ Hz, COOCCHCHCH
7.56	t , 4H, $^3J = 7.8$ Hz, COOCCHCH
5.52	sbr , 2H, C(3)H
3.91-3.84	m , 2H, C(2)H ₂
3.59	d , 2H, $^2J = 12.6$ Hz, C(2)H ₂
1.41	s , 9H, $\text{OC}(\underline{\text{CH}}_3)_3$

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 24.3°C , 125.77 MHz):

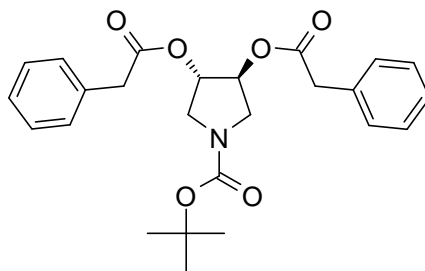
δ_{C} (ppm) = 165.5, 165.4	$\underline{\text{COOPh}}$ (Rotamere)
154.6	$\underline{\text{NCOOC}}(\text{CH}_3)_3$
133.7, 133.6	$\text{CH}_2\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}$
129.9	$\text{CH}_2\underline{\text{CCH}}$
129.4, 129.3	$\text{CH}_2\underline{\text{CCHCH}}$
128.6	$\text{CH}_2\underline{\text{CCHCHCH}}$
80.3	$\underline{\text{OC}}(\text{CH}_3)_3$
75.9, 75.0	C3 (Rotamere)
50.6, 50.0	C2 (Rotamere)
28.6	$\text{C}(\underline{\text{CH}}_3)_3$

MS (ES⁺, RT):

m/z (%) 434 (98, [M+Na]⁺), 845 (100, [2M+Na]⁺)

EA	C ₂₃ H ₂₅ NO ₆	411.46		
	Ber.:	C: 67.14%	H: 6.12%	N: 3.40%
	Gef.:	C: 67.10%	H: 6.27%	N: 3.44%

(3S,4S)-1-BOC-3,4-Bis-phenylacetoxy-pyrrolidin (51a)



Verwendung der AAV1 mit 569 μ L (4.5 mmol, 3 eq) Phenylacetylchlorid führte nach FC (Hexan:MTBE 4:1) zu 435 mg (66%) **51a** in Form eines gelben Öls.

¹H-NMR (CDCl₃, 23.5°C, 500.16 MHz):

δ_{H} (ppm) = 7.39-7.13	<i>m</i> , 10H, CH ₂ CCH, CH ₂ CCHCH, CH ₂ CCHCHCH
5.13	<i>d</i> , 1H, ³ <i>J</i> = 2.8 Hz, C(3)H
5.09	<i>d</i> , 1H, ³ <i>J</i> = 2.3 Hz, C(3)H
3.79-3.55	<i>m</i> , 6H, C(2)H ₂ , COCH ₂
3.50	<i>d</i> , 1H, ² <i>J</i> = 15.4 Hz, C(2)H ₂
3.37	<i>d</i> , 1H, ² <i>J</i> = 13.1 Hz, C(2)H ₂
1.46	<i>s</i> , 9H, OC(CH ₃) ₃

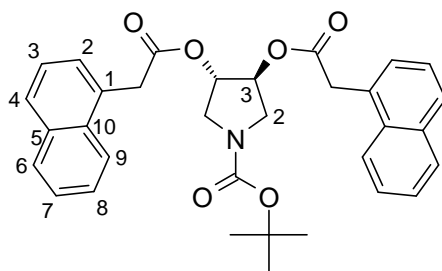
¹³C-NMR (CDCl₃, 26.8°C, 125.77 MHz):

δ_{C} (ppm) = 170.5, 170.3	CH ₂ COOCH (Rotamere)
154.3	NCOOC(CH ₃) ₃
133.3	CH ₂ C _{Ar}
129.2	CH ₂ CCH
128.8	CH ₂ CCHCH
127.5	CH ₂ CCHCHCH
80.1	OC(CH ₃) ₃
75.5, 74.6	C3 (Rotamere)
50.2, 49.7	C2 (Rotamere)
40.2	CH ₂ COOCH
28.5	C(CH ₃) ₃

MS (ES⁺, RT):

m/z (%) 462 (100, [M+Na]⁺), 901 (96, [2M+Na]⁺)

EA	C ₂₅ H ₂₉ NO ₆	439.51		
	Ber.:	C: 68.32%	H: 6.65%	N: 3.19%
	Gef.:	C: 69.21%	H: 6.62%	N: 2.87%

(3S,4S)-1-BOC-3,4-Bis-(1-naphthalen-1-yl-acetoxy)-pyrrolidin (52a)

Verwendung der AAV2 mit 587 mg (3.15 mmol) (1-Naphthyl)-essigsäure führte nach FC (Hexan:TBME 3:1) zu 631 mg (78%) **52a** in Form farbloser Kristalle. Schmelzpunkt: 86°C

¹H-NMR (CDCl₃, 22.4°C, 500.16 MHz):

δ _H (ppm) = 7.87	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> = 8.0 Hz, C(9) _{Ar} H
7.84	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> = 8.3 Hz, ⁴ <i>J</i> = 1.4 Hz, C(4) _{Ar} H
7.77	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> = 8.0 Hz, C(6) _{Ar} H
7.52-7.44	<i>m</i> , 4H, C(8) _{Ar} H, C(7) _{Ar}
7.39	<i>dd</i> , 2H, ³ <i>J</i> = 8.0 Hz, ³ <i>J</i> = 7.1 Hz, C(3) _{Ar} H
7.38	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> = 6.9 Hz, C(2) _{Ar} H
5.07	<i>d</i> , 1H, ³ <i>J</i> = 3.4 Hz, C(3) _{PyR} H
5.01	<i>d</i> , 1H, ³ <i>J</i> = 3.7 Hz, C(3) _{PyR} H
4.03	<i>sbr</i> , 4H, COCH ₂
3.49	<i>dd</i> , 1H, ² <i>J</i> = 12.7 Hz, ³ <i>J</i> = 4.2 Hz, C(2) _{PyR} H ₂
3.43	<i>d</i> , 1H, ² <i>J</i> = 13.0 Hz, C(2) _{PyR} H ₂
3.38	<i>dd</i> , 1H, ² <i>J</i> = 12.7 Hz, ³ <i>J</i> = 4.5 Hz, C(2) _{PyR} H ₂
3.25	<i>d</i> , 1H, ² <i>J</i> = 12.6 Hz, C(2) _{PyR} H ₂
1.41	<i>s</i> , 9H, C(CH ₃) ₃

¹³C-NMR (CDCl₃, 24.5°C, 125.77 MHz):

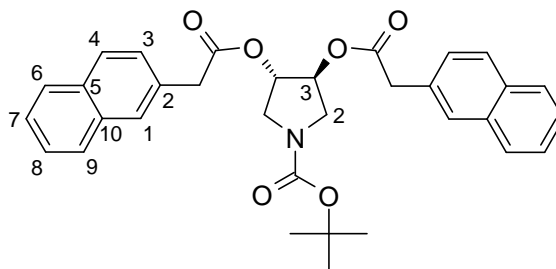
δ _C (ppm) = 170.4, 170.2	<u>C</u> O ₂ CH ₂ (Rotamere)
154.2	<u>C</u> O ₂ ^t Bu
133.9	C5 _{Ar}
132.0	C10 _{Ar}
129.8	C1 _{Ar}
128.9	C4 _{Ar}
128.4	C6 _{Ar}
128.1	C2 _{Ar}
126.6	C8 _{Ar}
126.0	C7 _{Ar}
125.5	C9 _{Ar}
123.6	C3 _{Ar}
80.0	<u>O</u> C(CH ₃) ₃
75.5, 74.6	C3 _{PyR} (Rotamere)
50.0, 49.6	C2 _{PyR} (Rotamere)
39.0	<u>C</u> OCH ₂ Ar
28.5	C(<u>C</u> H ₃) ₃

MS (ES⁺, RT):

m/z (%) 1101 (50, [2M+Na]⁺)

EA	C ₃₃ H ₃₃ NO ₆	539.63		
	Ber.:	C: 73.45%	H: 6.16%	N: 2.60%
	Gef.:	C: 68.05%	H: 6.56%	N: 2.32%

(3S,4S)-1-BOC-3,4-Bis-(2-naphthalen-2-yl-acetoxy)-pyrrolidin (53a)



Nach Anwendung der AAV2 mit 587 mg (3.15 mmol) (2-Naphthyl)-essigsäure wurden nach FC (Hexan:MTBE 3:1) 599 mg (74%) **53a** in Form farbloser Kristalle erhalten. Schmelzpunkt: 137°C

¹H-NMR (CDCl₃, 23.8°C, 500.16 MHz):

δ _H (ppm) = 7.84-7.77	<i>m</i> , 6H, C(9) _{Ar} H, C(4) _{Ar} H, C(6) _{Ar} H
7.70	<i>sbr</i> , 2H, C(1) _{Ar} H
7.50-7.43	<i>m</i> , 4H, C(7) _{Ar} H, C(8) _{Ar} H
7.36	<i>dbr</i> , 2H, ³ <i>J</i> = 8.3 Hz, C(3) _{Ar} H
5.18	<i>d</i> , 1H, ³ <i>J</i> = 3.2 Hz, C(3) _{PyR} H
5.14	<i>d</i> , 1H, ³ <i>J</i> = 2.8 Hz, C(3) _{PyR} H
3.78	<i>sbr</i> , 4H, COCH ₂
3.68	<i>dd</i> , 1H, ² <i>J</i> = 12.6 Hz, ³ <i>J</i> = 4.6 Hz, C(2) _{PyR} H ₂
3.66	<i>dd</i> , 1H, ² <i>J</i> = 12.7 Hz, ³ <i>J</i> = 4.7 Hz, C(2) _{PyR} H ₂
3.54	<i>d</i> , 1H, ² <i>J</i> = 12.8 Hz, C(2) _{PyR} H ₂
3.38	<i>d</i> , 1H, ² <i>J</i> = 12.6 Hz, C(2) _{PyR} H ₂
1.42	<i>s</i> , 9H, OC(CH ₃) ₃

¹³C-NMR (CDCl₃, 26.5°C, 125.77 MHz):

δ _C (ppm) = 170.5, 170.4	CO ₂ CH ₂ Ar
154.4	CO ₂ ^t Bu
133.5	C10 _{Ar}
132.7	C5 _{Ar}
130.8	C2 _{Ar}
128.5	C4 _{Ar} *
128.1	C1 _{Ar} *
127.8	C3 _{Ar} *
127.7	C6 _{Ar} *
127.2	C9 _{Ar} *
126.4	C8 _{Ar} *
126.1	C7 _{Ar} *
80.2	OC(CH ₃) ₃
75.6, 74.4	C3 _{PyR} (Rotamere)

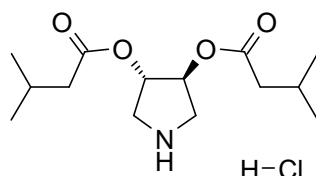
50.2, 49.7	C2 _{Pyr} (Rotamere)
41.4	COCH ₂ Ar
28.5	C(CH ₃) ₃

MS (ES⁺, RT):

m/z (%) 562 (100, [M+Na]⁺)

EA	C ₃₃ H ₃₃ NO ₆ * 0.5 H ₂ O	548.63		
Ber.:	C: 72.24%	H: 6.25%	N: 2.55%	
Gef.:	C: 72.29%	H: 6.38%	N: 2.52%	

(3S,4S)-3,4-Bis-(3-methyl-butiryloxy)-pyrrolidin Hydrochlorid (47b)



Der AAV3 folgend wurden mit 231 mg (0.62 mmol) des BOC-geschützten Pyrrolidins **47a** nach Aufreinigung über FC (CH₂Cl₂:MeOH 95:5) 196 mg (85%) des Hydrochlorids **47b** in Form sehr hygroskopischer farbloser Kristalle erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 23.6°C, 500.16 MHz):

δ _H (ppm) = 10.40	<i>sbr</i> , 2H, ⁺ NH ₂
5.25	<i>sbr</i> , 2H, C(3)H
3.81-3.32	<i>mbr</i> , 4H, C(2)H ₂
2.26	<i>sbr</i> , 4H, CH ₂ CH(CH ₃) ₂
2.09	<i>sbr</i> , 2H, CH ₂ CH(CH ₃) ₂
0.95	<i>sbr</i> , 12H, CH ₂ CH(CH ₃) ₂

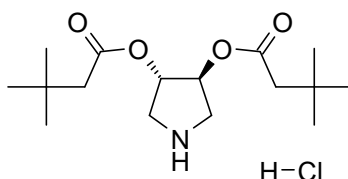
¹³C-NMR (CDCl₃, 27.1°C, 125.77 MHz):

δ _C (ppm) = 171.5	CH ₂ COOCH
74.1	C3
49.6	C2
42.9	CH ₂ COOCH
25.5	CH(CH ₃) ₂
22.4	CH(CH ₃) ₂

MS (ES⁺, RT):

m/z (%) 272 (100, [M+H]⁺), 543 (4, [2M+H]⁺)

EA	C ₁₄ H ₂₅ NO ₄ * HCl	307.82			
Ber.:	C: 54.63%	H: 8.51%	N: 4.55%	Cl: 11.52%	
Gef.:	C: 54.75%	H: 8.51%	N: 4.38%	Cl: 10.94%	

(3S,4S)-3,4-Bis-(3,3-dimethyl-butyryloxy)-pyrrolidin Hydrochlorid (48b)

Der AAV3 folgend ergaben 300 mg (0.75 mmol) des BOC-geschützten Pyrrolidins **48a** nach Aufreinigung über FC (CH₂Cl₂:MeOH 95:5) 219 mg (87%) des Hydrochlorids **48b** in Form farbloser Kristalle. Schmelzpunkt: 176°C

¹H-NMR (CDCl₃, 25.1°C, 500.16 MHz):

δ _H (ppm) = 5.22	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> = 3.9 Hz, C(3)H
3.59	<i>dd</i> , 2H, ² <i>J</i> = 13.2 Hz, ³ <i>J</i> = 4.0 Hz, C(2)H ₂
3.39	<i>d</i> , 2H, ² <i>J</i> = 13.1 Hz, C(2)H ₂
2.27	<i>s</i> , 4H, COCH ₂ C(CH ₃) ₃
1.03	<i>s</i> , 18H, CH ₂ C(CH ₃) ₃

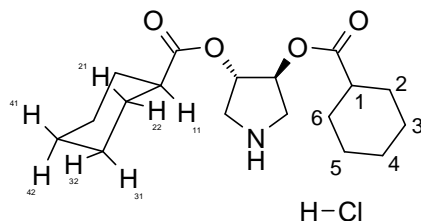
¹³C-NMR (CDCl₃, 27.0°C, 125.77 MHz):

δ _C (ppm) = 170.8	CH ₂ <u>C</u> OOCH
74.6	C3
49.5	C2
47.4	<u>CH</u> ₂ COOCH
30.9	CH ₂ <u>C</u> (CH ₃) ₃
29.6	CH ₂ C(<u>C</u> H ₃) ₃

MS (ES+, RT):

m/z (%) 300 (100, [M+H]⁺), 599 (27, [2M+H]⁺)

EA	C ₁₆ H ₂₉ NO ₄ * HCl	335.87			
Ber.:	C: 57.22%	H: 9.00%	N: 4.17%	Cl: 10.56%	
Gef.:	C: 58.50%	H: 8.97%	N: 4.46%	Cl: 8.67%	

(3S,4S)-3,4-Bis-cyclohexanocarbonyloxy-pyrrolidin Hydrochlorid (49b)

Der AAV3 folgend wurden mit 318 mg (0.75 mmol) des BOC-geschützten Pyrrolidins **49a** nach Aufreinigung über FC (CH₂Cl₂:MeOH 95:5) 204 mg (76%) des Hydrochlorids **49b** in Form farbloser Kristalle isoliert. Schmelzpunkt: 186°C

¹H-NMR (CDCl₃, 23.6°C, 500.16 MHz):

δ _H (ppm) = 10.54	<i>sbr</i> , 2H, ⁺ NH ₂
5.24	<i>d</i> , 2H, ³ J = 3.2 Hz, C(3)H
3.69-3.59	<i>smul</i> , 2H, C(2)H ₂
3.49	<i>dbr</i> , 2H, ² J = 11.9 Hz, C(2)H ₂
2.37	<i>tt</i> , 2H, ² J = 11.2 Hz, ³ J = 3.5 Hz, H ₁₁ *
1.92	<i>t</i> , 4H, ² J = 15.0 Hz, H ₂₂ *
1.79-1.71	<i>mul</i> , 4H, H ₃₂ *
1.64-1.60	<i>mul</i> , 2H, H ₄₂ *
1.49-1.38	<i>mul</i> , 4H, H ₂₁ *
1.33-1.17	<i>mul</i> , 6H, H ₃₁ *, H ₄₁ *

¹³C-NMR (CDCl₃, 24.8°C, 125.77 MHz):

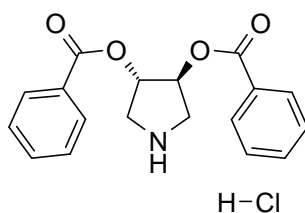
δ _C (ppm) = 174.5	<u>C</u> OOCy _{Hex}
74.0	C3 _{Pyr}
48.9	C2 _{Pyr}
42.7	C1 _{CyHex} *
28.9	C2 _{CyHex} *
28.7	C6 _{CyHex} *
25.6	C3 _{CyHex} *
25.3	C5 _{CyHex} *
25.2	C4 _{CyHex} *

MS (ES⁺, RT):

m/z (%)	324 (100, [M+H] ⁺)
---------	--------------------------------

EA	C ₁₈ H ₂₉ NO ₄ * HCl	359.90			
Ber.:	C: 60.07%	H: 8.40%	N: 3.89%	Cl: 9.85%	
Gef.:	C: 59.97%	H: 8.39%	N: 3.87%	Cl: 9.93%	

(3S,4S)-3,4-Bis-benzoyloxy-pyrrolidin Hydrochlorid (50b)



Der AAV3 folgend konnten mit 309 mg (0.75 mmol) des BOC-geschützten Pyrrolidins **50a** nach Aufreinigung über FC (CH₂Cl₂:MeOH 95:5) 206 mg (79%) des Hydrochlorids **50b** in Form farbloser Kristalle erhalten werden. Schmelzpunkt: 182°C

¹H-NMR (CDCl₃, 22.5°C, 500.16 MHz):

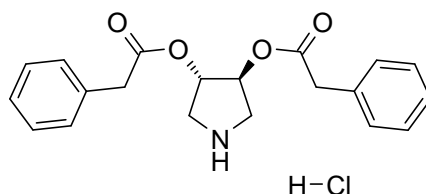
δ _H (ppm) = 10.82	<i>sbr</i> , 1H, ⁺ NH ₂
8.13	<i>sbr</i> , 4H, COOC <u>CH</u>
7.59	<i>sbr</i> , 2H, COOC <u>CHCHCH</u>
7.45	<i>sbr</i> , 4H, COOC <u>CHCH</u>
5.70	<i>sbr</i> , 2H, C(3)H
4.09-3.58	<i>mbr</i> , 4H, C(2)H ₂

¹³C-NMR (CDCl₃, 25.5°C, 125.77 MHz):

δ _C (ppm) = 164.9	<u>COOPh</u>
134.0	<u>CO₂CCHCH</u>
130.5	<u>CO₂CCHCHCH</u>
128.7	<u>CO₂CCH</u>
128.4	<u>CO₂C_{Ar}</u>
74.9	<u>C3</u>
50.0	<u>C2</u>

MS (ES⁺, RT):m/z (%) 312 (100, [M+H]⁺)

EA	C ₁₈ H ₁₇ NO ₄ * HCl	346.80			
Ber.:	C: 62.16%	H: 5.22%	N: 4.03%	Cl: 10.19%	
Gef.:	C: 61.96%	H: 5.44%	N: 3.89%	Cl: 10.06%	

(3S,4S)-3,4-Bis-phenylacetoxy-pyrrolidin Hydrochlorid (51b)

Der AAV3 folgend ergaben 330 mg (0.75 mmol) des BOC-geschützten Pyrrolidins **51a** nach Aufreinigung über FC (CH₂Cl₂:MeOH 95:5) 407 mg (91%) des Hydrochlorids **51b** in Form eines orangenen Öls.

¹H-NMR (CDCl₃, 23.5°C, 500.16 MHz):

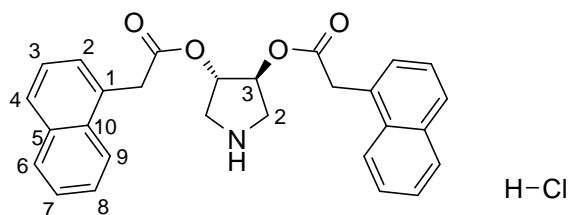
δ _H (ppm) = 10.46	<i>sbr</i> , 1H, ⁺ NH ₂
7.41-7.14	<i>m</i> , 10H, <u>CH₂CCH</u> , <u>CH₂CCHCH</u> , <u>CH₂CCHCHCH</u>
5.20	<i>s</i> , 2H, C(3)H
3.76-3.51	<i>m</i> , 8H, C(2)H ₂ , <u>COCH₂</u>

¹³C-NMR (CDCl₃, 24.8°C, 125.77 MHz):

δ _C (ppm) = 170.2	<u>CH₂COOCH</u>
132.8	<u>CH₂C_{Ar}</u>
129.4	<u>CH₂CCH</u>
128.7	<u>CH₂CCHCH</u>
127.5	<u>CH₂CCHCHCH</u>
74.6	<u>C3</u>
48.9	<u>C2</u>
40.8	<u>CH₂COOCH</u>

MS (ES⁺, RT):m/z (%) 340 (100, [M+H]⁺), 679 (14, [2M+H]⁺)

EA	C ₂₀ H ₂₁ NO ₄ * HCl * 0.5 H ₂ O	384.86			
Ber.:	C: 62.42%	H: 6.02%	N: 3.64%	Cl: 9.21%	
Gef.:	C: 62.80%	H: 6.11%	N: 3.56%	Cl: 8.66%	

(3S,4S)-3,4-Bis-(1-naphthalen-1-yl-acetoxy)-pyrrolidin Hydrochlorid (52b)

Der AAV3 folgend ergaben 378 mg (0.70 mmol) des BOC-geschützten Pyrrolidins **52a** nach Aufreinigung über FC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ 95:5) 303 mg (92%) des Hydrochlorids **52b** in Form oranger, sehr hygroskopischer Kristalle.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 21.5°C, 500.16 MHz):

$\delta_{\text{H}}(\text{ppm}) = 10.62$	<i>sbr</i> , 1H, $^+\text{NH}_2$
7.99	<i>d</i> , $^3J = 8.3$ Hz, 2H, C(9) _{Ar} H
7.87	<i>d</i> , $^3J = 8.0$ Hz, 2H, C(4) _{Ar} H
7.81	<i>d</i> , $^3J = 7.1$ Hz, 2H, C(6) _{Ar} H
7.59	<i>t</i> , $^3J = 7.3$ Hz, 2H, C(8) _{Ar} H
7.50	<i>t</i> , $^3J = 8.0$ Hz, 2H, C(7) _{Ar} H
7.48-7.41	<i>m</i> , 4H, C(2) _{Ar} H, C(3) _{Ar} H
5.17	<i>sbr</i> , 2H, C(3) _{Pyr} H
4.23-4.14	<i>smul</i> , 4H, COCH_2
3.59	<i>sbr</i> , 4H, C(2) _{Pyr} H ₂

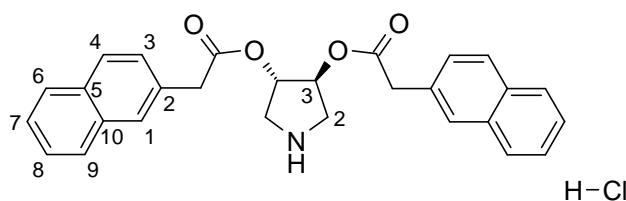
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 24.5°C, 125.77 MHz):

$\delta_{\text{C}}(\text{ppm}) = 170.1$	C=O
133.9	C5 _{Ar}
132.0	C10 _{Ar}
129.3	C1 _{Ar} *
128.9	C4 _{Ar} *
128.6	C6 _{Ar} *
128.4	C2 _{Ar} *
126.8	C8 _{Ar} *
126.0	C7 _{Ar} *
125.6	C9 _{Ar} *
123.8	C3 _{Ar} *
74.6	C3 _{Pyr}
49.1	C2 _{Pyr}
38.5	COCH_2Ar

MS (ES+, RT):

m/z (%) 440 (100, $[M+H]^+$), 879 (12, $[2M+H]^+$)

EA	$\text{C}_{28}\text{H}_{25}\text{NO}_4$ * HCl * 0.5 H ₂ O	475.98		
Ber.:	C: 69.34%	H: 5.61%	N: 2.89%	Cl: 7.31%
Gef.:	C: 68.74%	H: 5.65%	N: 2.89%	Cl: 7.45

(3S,4S)-3,4-Bis-(2-naphthalen-2-yl-acetoxy)-pyrrolidin Hydrochlorid (53b)

Der AAV3 folgend ergaben 404 mg (0.75 mmol) des BOC-geschützten Pyrrolidins **53a** nach Aufreinigung über FC (CH₂Cl₂:MeOH 95:5) 315 mg (89%) des Hydrochlorids **53b** in Form orangener Kristalle. Schmelzpunkt: 147°C

¹H-NMR (CDCl₃, 25.2°C, 500.16 MHz):

δ _H (ppm) = 7.82-7.77	<i>m</i> ; 6H, C(9) _{Ar} H, C(4) _{Ar} H, C(6) _{Ar} H
7.73	<i>sbr</i> ; 2H, C(1) _{Ar} H
7.47-7.43	<i>m</i> , 4H, C(7) _{Ar} H, C(8) _{Ar} H
7.41	<i>dd</i> , ³ <i>J</i> = 8.4 Hz, ⁴ <i>J</i> = 1.7 Hz, 2H, C(3) _{Ar} H
5.23	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> = 3.4 Hz, C(3) _{PyR} H
3.92-3.82	<i>smul</i> , 4H, COCH ₂
3.64	<i>d</i> , 1H, ³ <i>J</i> = 3.4 Hz, C(2) _{PyR} H ₂
3.62	<i>d</i> , 1H, ³ <i>J</i> = 3.7 Hz, C(2) _{PyR} H ₂
3.58	<i>s</i> , 1H, C(2) _{PyR} H ₂
3.56	<i>s</i> , 1H, C(2) _{PyR} H ₂

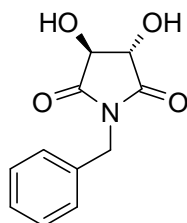
¹³C-NMR (CDCl₃, 24.5°C, 125.77 MHz):

δ _C (ppm) = 170.2	C=O
133.5	C10 _{Ar}
132.7	C5 _{Ar}
130.3	C2 _{Ar}
128.5	C4 _{Ar} *
128.4	C1 _{Ar} *
127.8	C3 _{Ar} *
127.7	C6 _{Ar} *
127.3	C9 _{Ar} *
126.3	C8 _{Ar} *
126.1	C7 _{Ar} *
74.7	C3 _{PyR}
49.0	C2 _{PyR}
41.0	COCH ₂ Ar

MS (ES+, RT):

m/z (%) 440 (100, [M+H]⁺), 879 (12, [2M+H]⁺)

EA	C ₂₈ H ₂₅ NO ₄ * HCl * 0.5 H ₂ O	475.98		
Ber.:	C: 69.34%	H: 5.61%	N: 2.89%	Cl: 7.31%
Gef.:	C: 69.41%	H: 5.60%	N: 2.91%	Cl: 7.07%

(3*S*,4*S*)-1-Benzyl-3,4-dihydroxy-pyrrolidin-2,5-dione (*ent*-42)

Die Darstellung von *ent*-42 erfolgte analog zu 42 aus D-(-)-Weinsäure. Gesamtausbeute 78.5 g (71%). Die spektroskopischen Daten stimmen mit Literaturwerten überein.^[60]

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 30 °C, 500.16 MHz):

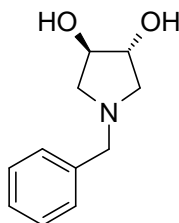
$\delta_{\text{H}}(\text{ppm}) = 7.37\text{-}7.21$	<i>m</i> , 5H, CH_2CCH , CH_2CCHCH , $\text{CH}_2\text{CCHCHCH}$
6.29	<i>d</i> , 2H, $^3J = 6.2$ Hz, OH
4.59	<i>d</i> , 1H, $^2J = 14.9$ Hz, CH_2Ph
4.54	<i>d</i> , 1H, $^2J = 15.1$ Hz, CH_2Ph
4.40	<i>d</i> , 2H, $^3J = 4.6$ Hz, CHOH

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 30 °C, 125.77 MHz):

$\delta_{\text{C}}(\text{ppm}) = 174.5$	CO
135.9	$\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}}$
128.5	CH_2CCHCH
127.51	CH_2CCH
127.46	$\text{CH}_2\text{CCHCHCH}$
74.5	CHOH
41.2	CH_2Ph

MS (ES+, RT):

m/z (%) 222 (10, $[M+H]^+$), 465 (100, $[2M+Na]^+$), 686 (36, $[3M+Na]^+$)

(3*R*,4*R*)-1-Benzyl-3,4-dihydroxy-pyrrolidin (54)

Die Darstellung von 54 erfolgte analog zu 43 aus dem Imid *ent*-42. Gesamtausbeute 5.05 g (71%). Die spektroskopischen Daten stimmen mit Literaturwerten überein.^[60]

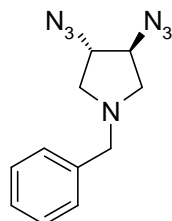
¹H-NMR (CDCl₃, 21.1 °C, 500.16 MHz):

$\delta_{\text{H}}(\text{ppm}) = 7.31\text{-}7.20$	<i>m</i> , 5H, CH_2CCH , CH_2CCHCH , $\text{CH}_2\text{CCHCHCH}$
4.38	<i>sbr</i> , 2H, OH
4.03	<i>t</i> , 2H, $^3J = 4.6$ Hz, C(3)H
3.60	<i>d</i> , 1H, $^2J = 12.6$ Hz, CH_2Ph
3.53	<i>d</i> , 1H, $^2J = 12.6$ Hz, CH_2Ph
2.88	<i>dd</i> , 2H, $^2J = 10.0$ Hz, $^3J = 6.0$ Hz, C(2)H ₂
2.41	<i>dd</i> , 2H, $^2J = 10.3$ Hz, $^3J = 4.1$ Hz, C(2)H ₂

¹³C-NMR (CDCl₃, 26.5 °C, 125.77 MHz):

δ _C (ppm) = 137.6	CH ₂ <u>C</u> _{Ar}
129.3	CH ₂ C <u>CH</u> CH
128.5	CH ₂ C <u>C</u> H
127.5	CH ₂ C <u>CH</u> CH <u>CH</u>
78.5	C3
60.33	<u>CH</u> ₂ Ph*
60.29	C2*

(3S,4S)-1-Benzyl-3,4-Diazido-pyrrolidin (55)



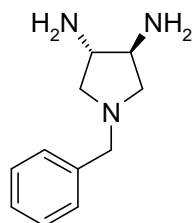
3.12 g (11.9 mmol) Triphenylphosphin wurden in 10 ml THF gelöst, auf 0°C gekühlt, gefolgt von der tropfenweisen Zugabe von 2.3 g (11.4 mmol) DIAD in 10 ml THF. Nach 5 min. Rühren bei 0°C wurden 2.27 ml 5 M HN₃ in Et₂O (11.4 mmol) zugegeben, nach 5 min bei 0°C wurde 1.0 g (5.2 mmol) des Diols **54** in einer Portion zugegeben und die Reaktionsmischung auf RT aufwärmen gelassen und 3 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotavapor vorsichtig entfernt und der Rückstand in CH₂Cl₂ gelöst und auf 10 g Kieselgel aufgezogen. Nach Reinigung über FC (Hexan: EtOAc 5:1) konnten 868 mg (69%) des Diazids **55** in Form eines farblosen Öls erhalten werden. Die spektroskopischen Daten stimmen mit Literaturwerten überein.^[60]

¹H-NMR (CDCl₃, 23 °C, 500.16 MHz):

δ _H (ppm) = 7.36-7.24	<i>m</i> , 5H, CH ₂ C <u>CH</u> , CH ₂ C <u>CH</u> CH <u>CH</u> , CH ₂ C <u>CH</u> CH <u>CH</u>
3.87	<i>smul</i> , 2H, C(3)H
3.67	<i>d</i> , 1H, ² <i>J</i> = 13.1 Hz, <u>CH</u> ₂ Ph
3.62	<i>d</i> , 1H, ² <i>J</i> = 13.1 Hz, <u>CH</u> ₂ Ph
2.98	<i>dd</i> , 2H, ² <i>J</i> = 10.1 Hz, ³ <i>J</i> = 6.4 Hz, C(2)H ₂
2.60	<i>dd</i> , 2H, ² <i>J</i> = 10.3 Hz, ³ <i>J</i> = 4.6 Hz, C(2)H ₂

¹³C-NMR (CDCl₃, 25.2 °C, 125.77 MHz):

δ _C (ppm) = 137.9	CH ₂ <u>C</u> _{Ar}
128.8	CH ₂ C <u>CH</u> CH
128.6	CH ₂ C <u>C</u> H
127.5	CH ₂ C <u>CH</u> CH <u>CH</u>
65.9	C3*
59.5	<u>CH</u> ₂ Ph*
57.8	C2*

(3S,4S)-1-Benzyl-3,4-Diamino-pyrrolidin (32)

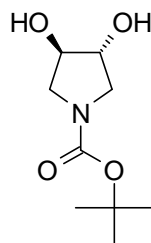
100 mg (0.4 mmol) des Diazids **55** wurden in 5 ml MeOH gelöst und mit 10 mg Pd/BaSO₄ versetzt und unter H₂-Atmosphäre 30 min bei RT gerührt. Anschließend wurde der Katalysator durch Filtration über Celite entfernt und das Filtrat am Rotavapor eingengt und im HV getrocknet, wobei 75 mg (95%) des Diamins **32** als farbloses Öl erhalten wurden. Die spektroskopischen Daten stimmen mit Literaturwerten überein.^[60]

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0°C, 500.16 MHz):

δ _H (ppm) = 7.34-7.18	<i>m</i> , 5H, CH ₂ CCH ₂ , CH ₂ CCHCH ₂ , CH ₂ CCHCHCH ₂
3.60	<i>d</i> , 1H, ² <i>J</i> = 13.1 Hz, CH ₂ Ph
3.53	<i>d</i> , 1H, ² <i>J</i> = 13.1 Hz, CH ₂ Ph
2.82	<i>smul</i> , 2H, C(3)H
2.74	<i>dd</i> , 2H, ² <i>J</i> = 9.1 Hz, ³ <i>J</i> = 6.5 Hz, C(2)H ₂
2.18	<i>dd</i> , 2H, ² <i>J</i> = 8.9 Hz, ³ <i>J</i> = 5.7 Hz, C(2)H ₂
1.60	<i>sbr</i> , 3H, NH ₂ *

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0°C, 125.77 MHz):

δ _C (ppm) = 139.3	CH ₂ C _{Ar}
128.3	CH ₂ CCHCH
128.0	CH ₂ CCH
126.5	CH ₂ CCHCHCH
61.6	C2*
60.7	C3
59.9	CH ₂ Ph*

(3R,4R)-1-BOC-3,4-Dihydroxy-pyrrolidin (70)

6.66 g (34.8 mmol) *N*-Benzyl-pyrrolidin (**54**) wurden in 100 ml Methanol gelöst und 8.36 g (38.3 mmol) BOC₂O und 666 mg Pd/C zugegeben. Die Suspension wurde unter Wasserstoffatmosphäre 16 h bei RT gerührt, anschließend der Katalysator durch Filtration über Celite abgetrennt und das Filtrat am Rotavapor eingedampft. Das resultierende gelbe Öl wurde in 25 ml heißem EtOAc gelöst und das Produkt kristallisierte beim Abkühlen der

Lösung. Die Kristalle wurden abfiltriert, mit kaltem EtOAc gewaschen, getrocknet und ergaben 4.50 g Produkt. Aus der Mutterlauge konnten durch Aufkonzentrieren weitere 0.84 g erhalten werden. Ausbeute an **70**: 5.34 g (74%) in Form beiger Kristalle. Schmelzpunkt 161°C. Die spektroskopischen Daten stimmen mit Literaturwerten überein.^[115]

¹H-NMR (CDCl₃, 22.2 °C, 500.16 MHz):

δ _H (ppm) = 3.94	<i>tbr</i> , 2H, ³ <i>J</i> = 3.3 Hz, C(3)H
3.67	<i>dd</i> , 1H, ² <i>J</i> = 12.0 Hz, ³ <i>J</i> = 4.9 Hz, C(2)H ₂
3.63	<i>dd</i> , 1H, ² <i>J</i> = 11.9 Hz, ³ <i>J</i> = 5.0 Hz, C(2)H ₂
3.42	<i>dd</i> , 2H, ² <i>J</i> = 12.1 Hz, ³ <i>J</i> = 2.3 Hz, C(2)H ₂
3.37	<i>dd</i> , 2H, ² <i>J</i> = 12.1 Hz, ³ <i>J</i> = 2.3 Hz, C(2)H ₂
1.44	<i>s</i> , 9H, C(CH ₃) ₃

¹³C-NMR (CDCl₃, 24.6 °C, 125.77 MHz):

δ _C (ppm) = 153.9	C=O
80.5	OC(CH ₃) ₃
64.2, 63.4	C3 (Rotamere)
48.8, 48.5	C2 (Rotamere)
28.4	OC(CH ₃) ₃

MS (ES⁺, RT):

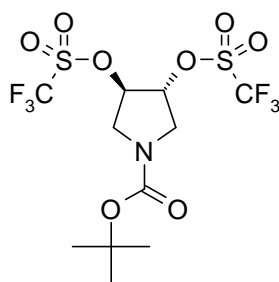
m/z (%) 204 (25, [M+H]⁺), 221 (5, [M+NH₄]⁺), 407 (78, [2M+H]⁺), 424 (100, [2M+NH₄]⁺)

HRMS (ES⁺):

m/z	berechnet für 2 C ₉ H ₁₇ NO ₄ * NH ₄	: 424.265891
	gefunden	: 424.264370

EA	C ₉ H ₁₇ NO ₄	203.24		
	Ber.:	C: 53.19%	H: 8.43%	N: 6.89%
	Gef.:	C: 52.90%	H: 8.50%	N: 6.90%

(3R,4R)-1-BOC-3,4-Bis-trifluoromethansulfonyloxy-pyrrolidin (71**)**



528 mg des Diols **70** (2.6 mmol) wurden in 18 ml trockenem CH₂Cl₂ suspendiert, mit 0.57 ml Pyridin (7.0 mmol) versetzt und auf -35°C gekühlt. 1 ml Tf₂O (6.0 mmol) wurde tropfenweise zugegeben, wobei sich die Lösung intensiv gelb färbte. Innerhalb 1 h wurde die Lösung unter Rühren auf -15°C aufwärmen gelassen. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt und der verbliebene Feststoff über FC (Hexan: EtOAc 5:1) gereinigt. Es wurden 869 mg (93%) des Produktes **71** in Form farbloser Kristalle erhalten. Schmelzpunkt 81°C

¹H-NMR (CDCl₃, 23.4°C, 500.16 MHz):

δ _H (ppm) = 5.38	<i>sbr</i> , 2H, C(3)H
3.97-3.72	<i>m</i> , 4H, C(2)H ₂
1.49	<i>s</i> , 9H, C(CH ₃) ₃

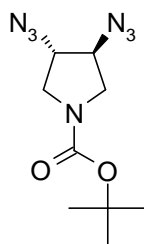
¹³C-NMR (CDCl₃, 26.7°C, 125.77 MHz):

δ _C (ppm) = 153.4	<u>C</u> OO ^t Bu
118.5	<i>q</i> , ¹ J _{C,F} = 319.6 Hz, CF ₃
85.4, 84.5	C3 (Rotamere)
81.7	OC(CH ₃) ₃
49.5, 49.1	C2 (Rotamere)
28.3	OC(CH ₃) ₃

MS (ESI, RT):

m/z (%)	485 (15, [M+NH ₄] ⁺), 490 (15, [M+Na] ⁺), 957 (100, [2M+Na] ⁺), 1424 (15, [3M+Na] ⁺)
---------	---

EA	C ₁₁ H ₁₅ F ₆ NO ₈ S ₂	467.36			
Ber.:		C: 28.27%	H: 3.24%	N: 3.00%	
Gef.:		C: 28.44%	H: 3.40%	N: 2.98%	

(3*S*,4*S*)-1-BOC-3,4-Diazido-pyrrolidin (72)Darstellung aus dem Diol **70**:

2.23 g (8.49 mmol) Triphenylphosphin wurden in 10 ml THF gelöst, auf 0°C gekühlt, gefolgt von der tropfenweisen Zugabe von 1.64 g (8.12 mmol) DIAD in 10 ml THF. Die resultierende Suspension wurde 5 min. bei 0°C gerührt und anschließend mit 1.62 ml 5 M HN₃ in Et₂O (8.12 mmol) versetzt. Nach 5 min. Rühren bei 0° wurden 750 mg (3.69 mmol) des Diols **70** in einer Portion zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde auf RT aufwärmen gelassen und 3 h bei RT gerührt. Anschließend wurden 7.5 g Kieselgel zugegeben und das Lsm. am Rotavapor entfernt. Aufreinigung über FC (Hexan:EtOAc 5:1) ergaben 456 mg (49%) des Diazids **72** in Form eines farblosen Öls.

Darstellung aus dem Bis-triflat **71**:

100 mg (0.28 mmol) des Bis-triflats **71** wurden in 1.4 ml HMPT gelöst und 506 mg (7.7 mmol) NaN₃ zugegeben. Die Suspension wurde 4 h bei RT gerührt und anschließend in 10 ml Wasser gegeben. Nach Extraktion mit MTBE (3×10 ml) wurden die vereinigten organischen Phasen mit H₂O (3×10 ml) und ges. NaCl Lsg. (3×10 ml) gewaschen über

MgSO₄ getrocknet, filtriert und einrotiert. Nach Aufreinigung über FC (Hexan:EtOAc 5:1) wurden 52 mg (73%) des Diazids **72** als farbloses Öl erhalten.

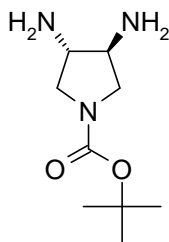
¹H-NMR (CDCl₃, 22.2 °C, 500.16 MHz):

δ _H (ppm) = 3.97	<i>smul</i> , 2H, C(3)H
3.69	<i>dd</i> , 1H, ² <i>J</i> = 12.1 Hz, ³ <i>J</i> = 5.0 Hz, C(2)H ₂
3.65	<i>dd</i> , 1H, ² <i>J</i> = 11.9 Hz, ³ <i>J</i> = 5.0 Hz, C(2)H ₂
3.45	<i>dd</i> , 1H, ² <i>J</i> = 11.8 Hz, ³ <i>J</i> = 2.3 Hz, C(2)H ₂
3.39	<i>dd</i> , 1H, ² <i>J</i> = 11.7 Hz, ³ <i>J</i> = 2.3 Hz, C(2)H ₂
1.47	<i>s</i> , 9H, C(CH ₃) ₃

¹³C-NMR (CDCl₃, 24.6 °C, 125.77 MHz):

δ _C (ppm) = 153.9	C=O
80.5	OC(CH ₃) ₃
64.2, 63.4	C3 (Rotamere)
48.8, 48.5	C2 (Rotamere)
28.4	OC(CH ₃) ₃

(3*S*,4*S*)-1-BOC-3,4-Diamino-pyrrolidin (**73**)



Darstellung aus dem Diazid **72**:

580 mg (2.3 mmol) des Diazids **72** wurden in 10 ml MeOH gelöst, mit 55 mg Pd/C versetzt und unter H₂-Atmosphäre 18 h bei RT gerührt. Der Katalysator wurde durch Filtration über Celite abgetrennt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der verbleibende Rückstand im HV getrocknet. Es wurden 480 mg (92%) des Diamins **73** in Form sehr hygroskopischer Kristalle erhalten.

Darstellung aus dem Diol **70**:

2.64 g (13.04 mmol) des Diols **70** wurden in 75 ml CH₂Cl₂ suspendiert und 2.85 ml (35.20 mmol) trockenes Pyridin wurde zugegeben und die Reaktionsmischung auf -80°C gekühlt. 5 ml Tf₂O wurden tropfenweise zugegeben und die Lösung innerhalb von 2 h auf -10°C aufwärmen gelassen. Das CH₂Cl₂ wurde bei RT am Rotavapor entfernt (Erwärmen kann zur Zersetzung des Bis-triflats führen). 23.65 g (264 mmol) im Vakuum getrocknetes NaN₃ und 50 ml DMPU wurden zugegeben und die Suspension bei RT 3.5 h gerührt. Anschließend wurden 100 ml H₂O zugegeben und mit MTBE extrahiert (5×50 ml) die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser (3×50 ml) und ges. NaCl-Lösung (3×50 ml) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und filtriert. 6 g Kieselgel wurden zu gegeben

und das Lösungsmittel vorsichtig bei RT am Rotavapor entfernt. Das Diazid wurde über FC aufgereinigt (Hexan:EtOAc 5:1) und die Produkt enthaltenden Fraktionen vereinigt. 250 mg Pd/C wurden zugegeben und unter H₂ Atmosphäre 14 h bei RT gerührt. Anschließend wurde der Katalysator durch Filtration über Celite abgetrennt, das Filtrat am Rotavapor eingedampft und das resultierende Öl im HV getrocknet. Es wurden 2.25 g (86%) an **73** in Form sehr hygroskopischer Kristalle erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 23.7 °C, 500.16 MHz):
 δ_{H} (ppm) = 3.77-3.46 *m*, 2H, C(3)H
 3.10-2.96 *m*, 4H, C(2)H₂
 1.57 *sbr*, 4H, NH₂
 1.46 *s*, 9H, C(CH₃)₃

¹³C-NMR (CDCl₃, 26.5 °C, 125.77 MHz):
 δ_{C} (ppm) = 154.4 C=O
 79.3 OC(CH₃)₃
 58.6, 58.1 C3 (Rotamere)
 52.5, 52.1 C2 (Rotamere)
 28.4 OC(CH₃)₃

MS (ES+, RT):

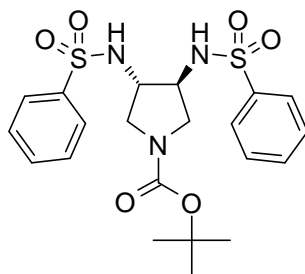
m/z (%) 202 (18, [M+H]⁺), 224 (68, [M+Na]⁺), 403 (84, [2M+H]⁺),
 425 (100, [2M+Na]⁺), 604 (37, [3M+H]⁺), 626 (89, [3M+Na]⁺)

HRMS (ES+):

m/z berechnet für C₉H₂₀N₃O₂ : 202.155552
 gefunden : 202.156485

EA C₉H₁₉N₃O₂ 201.27
 Ber.: C: 53.71% H: 9.52% N: 20.88%
 Gef.: C: 52.39% H: 9.54% N: 20.19%

(3*S*,4*S*)-1-BOC-3,4-Bis-(benzolsulfonylamino)-pyrrolidin (76**)**



Gemäß AAV4 wurden 183 mg (0.89 mmol) Diamin **73**, 256 μ L (2.0 mmol) Benzolsulfonylchlorid und 340 μ L Triethylamin in 5 ml CH₂Cl₂ innerhalb von 22 h umgesetzt. Ausbeute an **76**: 386 mg (86%) in Form farbloser Nadeln. Schmelzpunkt: 111 °C

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0°C, 500.16 MHz):

δ _H (ppm) = 8.07	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> = 6.9 Hz, NH
7.64	<i>t</i> , 4H, ³ <i>J</i> = 7.0 Hz, SO ₂ CCH
7.66	<i>tt</i> , 2H, ³ <i>J</i> = 7.5 Hz, ⁴ <i>J</i> = 1.5 Hz, SO ₂ CCHCHCH
7.59	<i>t</i> , 4H, ³ <i>J</i> = 7.7 Hz, SO ₂ CCHCH
3.52	<i>mbr</i> , 2H, C(3)H
3.18	<i>dd</i> , 2H, ² <i>J</i> = 11.5 Hz, ³ <i>J</i> = 5.6 Hz, C(2)H ₂
2.91	<i>dd</i> , 2H, ² <i>J</i> = 11.2 Hz, ³ <i>J</i> = 3.9 Hz, C(2)H ₂
1.32	<i>s</i> , 9H, C(CH ₃) ₃

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0°C, 125.77 MHz):

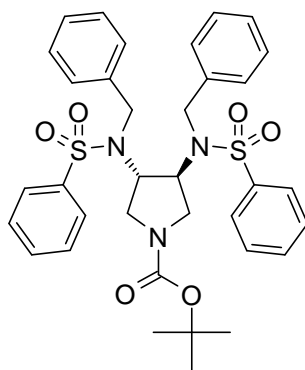
δ _C (ppm) = 153.0	C=O
140.7	SO ₂ C
132.5	SO ₂ CCHCHCH
129.2	SO ₂ CCHCH
126.4	SO ₂ CCH
78.6	OC(CH ₃) ₃
56.6, 55.8	C3 (Rotamere)
48.6, 48.2	C2 (Rotamere)
28.0	OC(CH ₃) ₃

MS (ES⁺, RT):

m/z (%) 504 (92, [M+Na]⁺), 985 (100, [2M+Na]⁺)

EA	C ₂₁ H ₂₇ N ₃ O ₆ S ₂	481.59		
Ber.:		C: 52.37%	H: 5.65%	N: 8.73%
Gef.:		C: 52.17%	H: 5.88%	N: 8.43%

(3*S*,4*S*)-1-BOC-3,4-Bis-[benzolsulfonyl-benzyl-amino]-pyrrolidin (77)



Die Anwendung der AAV5 mit 150 mg (0.31 mmol) Sulfonamid **76**, 89 µL (0.75 mmol) Benzylbromid und 129 mg (0.93 mmol) K₂CO₃ ergab nach FC (Hexan:MTBE 1:1:) 156 mg des alkylierten Sulfonamids **77** (75%) in Form farbloser Kristalle. Schmelzpunkt 76°C

¹H-NMR (CDCl₃, 24.1°C, 500.16 MHz):

δ _H (ppm) = 7.92	<i>sbr</i> , 2H, SO ₂ CCH
7.73	<i>sbr</i> , 2H, SO ₂ CCH
7.67-7.45	<i>mbr</i> , 6H, SO ₂ CCHCH, SO ₂ CCHCHCH
7.34-7.02	<i>mbr</i> , 10H, Bn

4.79	<i>sbr</i> , 1H, $\underline{\text{CH}_2\text{Ph}}$
4.45	<i>dbr</i> , 2H, $^2J = 15.4$ Hz, $\underline{\text{CH}_2\text{Ph}}$
4.30	<i>sbr</i> , 1H, $\underline{\text{CH}_2\text{Ph}}$
4.00-3.89	<i>m</i> , 1H, C(3)H
3.81-3.72	<i>m</i> , 1H, C(3)H
3.29-3.17	<i>mbr</i> , 1H, C(2)H
3.11-3.01	<i>mbr</i> , 3H, C(2)H
1.37	<i>s</i> , 9H, C($\underline{\text{CH}_3}$) ₃

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 27.0°C, 125.77 MHz):

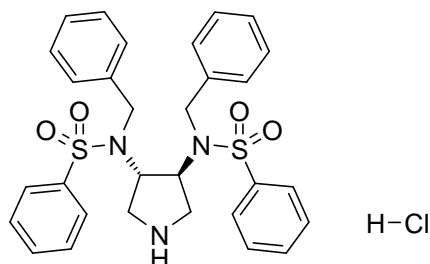
$\delta_{\text{C}}(\text{ppm}) = 153.6$	C=O
140.0	$\text{SO}_2\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}$
136.4	$\text{CH}_2\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}$
133.1	$\text{SO}_2\text{CCHCH}\underline{\text{C}}\text{H}$
129.4	$\text{CH}_2\text{CCH}\underline{\text{C}}\text{H}$
128.8	CH_2CCH
128.2	$\text{SO}_2\text{CCH}\underline{\text{C}}\text{H}$
128.1	$\text{CH}_2\text{CCHCH}\underline{\text{C}}\text{H}$
127.7, 127.3	$\text{SO}_2\text{C}\underline{\text{C}}\text{HCHCH}$ (Rotamere)
80.2	$\text{OC}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$
61.8, 60.2	C3 (Rotamere)
50.0, 48.9	C2 (Rotamere)
47.6, 46.1	$\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$ (Rotamere)
28.4	$\text{OC}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$

MS (ES+, RT):

m/z (%) 684 (100, $[M+\text{Na}]^+$), 1345 (86, $[2M+\text{Na}]^+$)

EA	$\text{C}_{35}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}_2$	661.85		
Ber.:		C: 63.52%	H: 5.94%	N: 6.35%
Gef.:		C: 63.57%	H: 6.10 %	N: 6.10%

(3S,4S)-3,4-Bis-[benzolsulfonyl-benzyl-amino]-pyrrolidin Hydrochlorid (78)



Die Verwendung der AAV7 mit 102 mg (0.15 mmol) des BOC-geschützten Pyrrolidins **77** in 3 ml 2M HCl in Et_2O ergab 87 mg **78** (92%) in Form farbloser Kristalle. Schmelzpunkt 221°C (Zersetzung)

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 30.0°C, 500.16 MHz):

$\delta_{\text{H}}(\text{ppm}) = 9.65$	<i>sbr</i> , 2H, $^+\text{NH}_2$
7.80	<i>dd</i> , 4H, $^3J = 8.4$ Hz, $^4J = 1.2$ Hz, SO_2CCH
7.72	<i>tt</i> , 2H, $^3J = 7.4$ Hz, $^4J = 1.2$ Hz, $\text{SO}_2\text{CCHCH}\underline{\text{C}}\text{H}$

7.60	<i>tt</i> , 4H, $^3J = 7.8$ Hz, $^4J = 1.6$ Hz, SO ₂ CCHCH
7.29-7.20	<i>mbr</i> , 10H, H _{Bn}
4.80	<i>smul</i> , 2H, C(3)H
4.39	<i>d</i> , 2H, $^2J = 16.5$ Hz, CH ₂ Ph
3.97	<i>d</i> , 2H, $^2J = 16.5$ Hz, CH ₂ Ph
3.01	<i>dd</i> , 2H, $^2J = 11.3$ Hz, $^3J = 7.9$ Hz, C(2)H ₂
2.78	<i>dd</i> , 2H, $^2J = 11.6$ Hz, $^3J = 8.1$ Hz, C(2)H ₂

¹³C-NMR (CDCl₃, 30.0°C, 125.77 MHz):

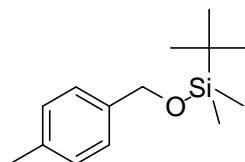
δ _C (ppm) = 139.1	SO ₂ C _{Ar}
136.6	CH ₂ C _{Ar}
133.3	SO ₂ CCHCHCH
129.4	CH ₂ CCHCH
128.2	CH ₂ CCH
128.0	SO ₂ CCHCH
127.4	CH ₂ CCHCHCH
127.2	SO ₂ CCHCHCH
57.7	C3
48.1	C2
43.2	CH ₂ Ph

MS (ES⁺, RT):

m/z (%) 562 (100, [M+H]⁺), 1123 (9, [2M+H]⁺)

EA	C ₃₀ H ₃₁ N ₃ O ₄ S ₂ * HCl * 0.5 H ₂ O	607.19		
Ber.:	C: 59.34%	H: 5.48%	N: 6.92%	
Gef.:	C: 59.75%	H: 5.45%	N: 6.93%	

***O*-tert-Butyl-dimethylsilyl-(4-Methylphenyl)-methanol (79)**



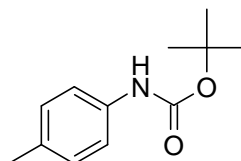
2.04 g (30 mmol) Imidazol und 3.61 g (24 mmol) TBS-Cl wurden in 20 ml DMF gelöst, auf 0°C gekühlt und portionsweise mit 2.44 g (20 mmol) 4-Methylphenyl-methanol versetzt. Die Reaktionsmischung wurde auf RT aufwärmen gelassen, 2 h bei RT gerührt und anschließend in 80 ml eines 1:1 Gemisches von H₂O und Hexan gegeben. Die aq. Phase wurde abgetrennt und mit Hexan (30 ml) extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt. Es wurden 4.72 g (99.8%) des Silylethers **79** in Form eines farblosen Öls erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 21°C, 500.16 MHz):

δ _H (ppm) = 7.15	<i>d</i> , 2H, $^3J = 8.0$ Hz, CH ₂ CCH*
7.07	<i>d</i> , 2H, $^3J = 7.8$ Hz, CH ₃ CCH*
4.64	<i>s</i> , 2H, ArCH ₂ OTBS
2.27	<i>s</i> , 3H, CH ₃ C _{Ar}

0.88	<i>s</i> , 9H, SiC(CH ₃) ₃
0.03	<i>s</i> , 6H, Si(CH ₃) ₂

***N*-BOC-*p*-Toluidin (80)**

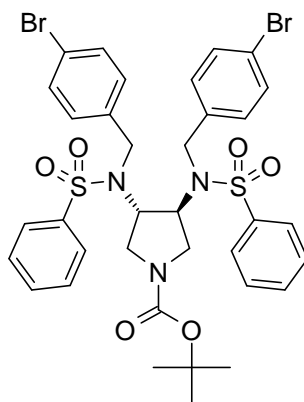


2.14 g (20 mmol) *p*-Toluidin wurden in 10 ml THF gelöst und 0.80 g (20 mmol) NaOH in 10 ml H₂O zugegeben. 4.80 g (22 mmol) BOC₂O in 20 ml THF wurden tropfenweise zugegeben und die Reaktionsmischung bei RT 18 h gerührt, anschließend am Rotavapor aufkonzentriert, mit 20 ml H₂O verdünnt und mit EtOAc (50 ml) extrahiert. Die org. Phase wurde abgetrennt und mit H₂O (20 ml) und ges. NaCl-Lsg. (2×20 ml) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und anschließend das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt. Der resultierende Feststoff wurde in 10 ml Hexan gelöst, das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt und der resultierende Feststoff im HV getrocknet. Es konnten 4.09 g (99%) des BOC-geschützten Amins **80** in Form farbloser Kristalle erhalten werden.

¹H-NMR (CDCl₃, 22.5°C, 500.16 MHz):

δ _H (ppm) = 7.23	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> = 7.8 Hz, NH <u>CCH</u>
7.07	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> = 8.3 Hz, CH ₃ C <u>CH</u>
6.51	<i>s</i> , 1H, NH
2.28	<i>s</i> , 3H, <u>CH</u> ₃ C _{Ar}
1.51	<i>s</i> , 9H, OC(<u>CH</u> ₃) ₃

(3*S*,4*S*)-1-BOC-3,4-Bis-[benzolsulfonyl-(4-bromo-benzyl)-amino]-pyrrolidin (81)



Unter Anwendung der AAV5 mit 482 mg (1.00 mmol) Sulfonamid **76**, 600 mg (2.40 mmol) 4-Brombenzylbromid und 415 mg (3.00 mmol) K₂CO₃ in 7.5 ml CH₃CN wurden nach FC (Hexan:TBME 2:1) 619 mg (76%) des Produktes **81** in Form farbloser Kristalle erhalten. Schmelzpunkt 87°C

¹H-NMR (CDCl₃, 19.4°C, 500.16 MHz):

δ _H (ppm) = 7.86	<i>sbr</i> , 2H, SO ₂ CCH
7.70	<i>sbr</i> , 2H, SO ₂ CCH
7.65-7.45	<i>mbr</i> , 6H, SO ₂ CCHCH, SO ₂ CCHCHCH
7.40	<i>sbr</i> , 2H, BrCCHCH
7.31	<i>sbr</i> , 2H, BrCCHCH
7.04	<i>sbr</i> , 2H, BrCCH
6.94	<i>sbr</i> , 2H, BrCCH
4.70	<i>sbr</i> , 1H, CH ₂ Ar
4.38	<i>d</i> , 2H, ² J = 16.0 Hz, CH ₂ Ar
4.19	<i>sbr</i> , 1H, CH ₂ Ar
4.05-3.91	<i>mbr</i> , 1H, C(3)H
3.78-3.67	<i>mbr</i> , 1H, C(3)H
3.28	<i>sbr</i> , 1H, C(2)H ₂
3.15	<i>sbr</i> , 1H, C(2)H ₂
3.04-2.95	<i>mbr</i> , 2H, C(2)H ₂
1.38	<i>s</i> , 9H, C(CH ₃) ₃

¹³C-NMR (CDCl₃, 23.9°C, 125.77 MHz):

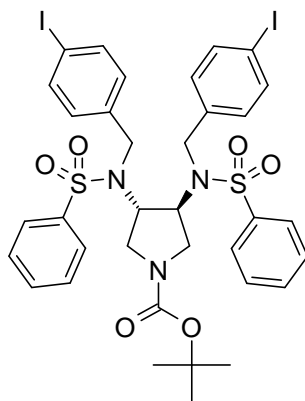
δ _C (ppm) = 153.5	C=O
139.6	SO ₂ C _{Ar}
135.4	CH ₂ C _{Ar}
133.3	SO ₂ CCHCHCH*
131.9	BrCCH*
129.8	BrCCHCH*
129.6	SO ₂ CCHCH*
127.6, 127.2	SO ₂ CCH (Rotamere)
122.2	BrC
80.5	OC(CH ₃) ₃
61.9, 60.4	C3 (Rotamere)
49.4, 48.4	C2 (Rotamere)
47.5, 46.3	CH ₂ Ar (Rotamere)
28.4	OC(CH ₃) ₃

MS (ES⁺, RT):

m/z (%)	840 (47, [⁷⁹ Br ⁷⁹ BrM+Na] ⁺), 842 (100, [⁷⁹ Br ⁸¹ BrM+Na] ⁺),
	844 (56, [⁸¹ Br ⁸¹ BrM+Na] ⁺), 1659 (65, [⁷⁹ Br ⁷⁹ Br ⁷⁹ Br ⁸¹ Br2M+Na] ⁺),
	1661 (89, [⁷⁹ Br ⁷⁹ Br ⁸¹ Br ⁸¹ Br2M+Na] ⁺), 1663 (58, [⁷⁹ Br ⁸¹ Br ⁸¹ Br ⁸¹ Br2M+Na] ⁺)

EA

C ₃₅ H ₃₇ Br ₂ N ₃ O ₆ S ₂	819.64		
Ber.:	C: 51.29%	H: 4.55%	N: 5.15%
Gef.:	C: 51.41%	H: 4.78%	N: 5.35%

(3S,4S)-1-BOC-3,4-Bis-[benzolsulfonyl-(4-iod-benzyl)-amino]-pyrrolidin (82)

Verwendung der AAV5 mit 482 mg (1.00 mmol) des Sulfonamids **76**, 713 mg (2.40 mmol) 4-Iodbenzylbromid und 415 mg (3.00 mmol) K_2CO_3 in 7.5 ml CH_3CN (7 h Rückfluss) ergab nach FC (Hexan:MTBE 2:1) 690 mg (76%) des *N*-alkylierten Sulfonamids **82** in Form farbloser Kristalle. Schmelzpunkt 98°C

1H -NMR ($CDCl_3$, 22.5°C, 500.16 MHz):

δ_H (ppm) = 7.92-7.43	<i>mbr</i> , 14H, SO_2CCHCH , SO_2CCH , $SO_2CCHCHCH$, $ICCHCH$
6.98-6.74	<i>mbr</i> , 4H, $ICCH$
4.69	<i>sbr</i> , 1H, CH_2Ar
4.38	<i>d</i> , 2H, $^2J = 16.0$ Hz, CH_2Ar
4.20	<i>sbr</i> , 1H, CH_2Ar
4.02-3.90	<i>mbr</i> , 1H, C(3)H
3.78-3.66	<i>mbr</i> , 1H, C(3)H
3.33-3.09	<i>mbr</i> , 2H, C(2)H ₂
3.05-2.95	<i>mbr</i> , 2H, C(2)H ₂
1.39	<i>s</i> , 9H, $C(CH_3)_3$

^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 26.1°C, 125.77 MHz):

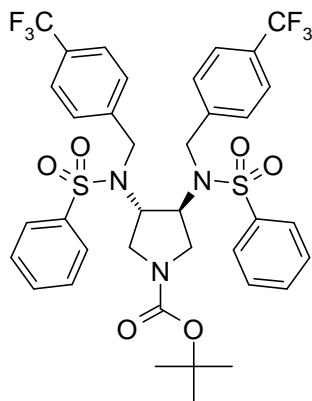
δ_C (ppm) = 153.5	C=O
139.6	SO_2C_{Ar}
137.9	$ICCH$, $ICCHCH$
136.0	CH_2C_{Ar}
133.3	$SO_2CCHCHCH$
130.0, 129.6	SO_2CCHCH (Rotamere)
127.6, 127.2	SO_2CCH (Rotamere)
93.8	IC
80.6	$OC(CH_3)_3$
61.9, 60.5	C3 (Rotamere)
49.4, 48.4	C2 (Rotamere)
47.5, 46.2	CH_2Ar (Rotamere)
28.5	$OC(CH_3)_3$

MS (ES+, RT):

m/z (%) 936 (100, $[M+Na]^+$), 1849 (70, $[2M+Na]^+$)

EA	$C_{35}H_{37}I_2N_3O_6S_2$	913.64		
	Ber.:	C: 46.01%	H: 4.08%	N: 4.60%
	Gef.:	C: 46.07%	H: 4.41%	N: 4.74%

(3S,4S)-1-BOC-3,4-Bis-[benzolsulfonyl-(4-trifluormethyl-benzyl)-amino]-pyrrolidin (91)



Durch Anwendung der AAV5 mit 421 mg (0.87 mmol) Sulfonamid **76**, 502 mg (2.10 mmol) 4-Trifluormethylbenzylbromid und 363 mg (2.52 mmol) K_2CO_3 in 10 ml CH_3CN (1h, $0^\circ C$, 14h RT dann 4h Reflux) konnten nach FC (Hexan:EtOAc 3:1) 390 mg (49%) des *N*-alkylierten Sulfonamids **91** in Form farbloser Kristalle erhalten werden. Schmelzpunkt $93^\circ C$

1H -NMR ($CDCl_3$, $24.5^\circ C$, 500.16 MHz):

$\delta_H(\text{ppm}) = 8.02-7.34$	<i>mbr</i> , 14H, $SO_2\text{Ph}$, $CF_3C\text{CH}^*$
7.29	<i>sbr</i> , 2H, $CH_2C\text{CH}^*$
7.17	<i>sbr</i> , 2H, $CH_2C\text{CH}^*$
4.72	<i>sbr</i> , 1H, $CH_2\text{Ar}$
4.46	<i>d</i> , 2H, $^2J = 16.2 \text{ Hz}$, $CH_2\text{Ar}$
4.29-4.07	<i>mbr</i> , 2H, $CH_2\text{Ar}$, C(3)H
3.98-3.81	<i>mbr</i> , 1H, C(3)H
3.33-3.29	<i>mbr</i> , 2H, C(2)H ₂
3.03	<i>sbr</i> , 2H, C(2)H ₂
1.37	<i>s</i> , 9H, C(CH ₃) ₃

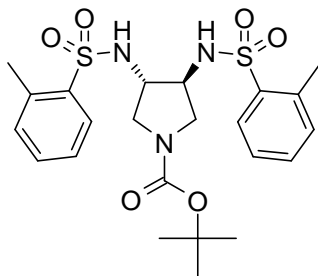
^{13}C -NMR ($CDCl_3$, $26.7^\circ C$, 125.77 MHz):

$\delta_C(\text{ppm}) = 153.6$	C=O
140.5	$SO_2\text{C}_{\text{Ar}}^*$
139.6	$CH_2\text{C}_{\text{Ar}}^*$
133.4	$SO_2C\text{CHCHCH}$
130.4	<i>q</i> , $^2J_{C,F} = 32.6 \text{ Hz}$, F_3CC_{Ar}
129.6	$SO_2C\text{CHCH}^*$
128.4	$CH_2C\text{CH}^*$
127.6, 127.3	$SO_2C\text{CH}^*$ (Rotamere)
125.8	$F_3CC\text{CH}^*$
124.0	<i>q</i> , $^1J_{C,F} = 272.6 \text{ Hz}$, F_3C
80.7	$OC(\text{CH}_3)_3$
62.0, 60.5	C3 (Rotamere)
49.4, 48.4	C2 (Rotamere)
47.3, 46.2	$CH_2\text{Ar}$ (Rotamere)
28.4	$OC(\text{CH}_3)_3$

MS (ES⁺, RT):m/z (%) 820 (95, [M+Na]⁺), 1616 (100, [2M+Na]⁺)**EA**C₃₇H₃₇F₆N₃O₆S₂ 797.84

Ber.: C: 55.70% H: 4.67% N: 5.27%

Gef.: C: 55.84% H: 4.82% N: 5.22%

(3S,4S)-1-BOC-3,4-Bis-(tolyl-2-sulfonylamino)-pyrrolidin (92)

Die AAV4 mit 402 mg (2.00 mmol) Diamin **73**, 635 μ L (4.40 mmol) 2-Methyl-benzol-sulfonylchlorid und 641 μ L in 10 ml CH₂Cl₂ (12 h) ergaben 888 mg **92** (87%) in Form farbloser Kristalle. Schmelzpunkt 106°C

¹H-NMR (CDCl₃, 25.0°C, 500.16 MHz):

$\delta_{\text{H}}(\text{ppm}) = 7.97$	<i>sbr</i> , 1H, SO ₂ CCH
7.91	<i>sbr</i> , 1H, SO ₂ CCH
7.50	<i>tbr</i> , 2H, ³ J = 7.0 Hz, CH ₃ CCHCH
7.39-7.28	<i>m</i> , 4H, CH ₃ CCH, SO ₂ CCHCH
5.80	<i>sbr</i> , 1H, NH
5.56	<i>sbr</i> , 1H, NH
3.60	<i>sbr</i> , 1H, C(2)H ₂
3.54-3.46	<i>smul</i> , 2H, C(3)H
3.43	<i>sbr</i> , 1H, C(2)H ₂
3.00	<i>sbr</i> , 2H, C(2)H ₂
2.64	<i>s</i> , 3H, C _{Ar} CH ₃
2.58	<i>s</i> , 3H, C _{Ar} CH ₃
1.35	<i>s</i> , 9H, C(CH ₃) ₃

¹³C-NMR (CDCl₃, 24.5°C, 125.77 MHz):

$\delta_{\text{C}}(\text{ppm}) = 154.0$	C=O
137.5	SO ₂ C _{Ar}
137.2	CH ₃ C _{Ar}
133.4	SO ₂ CCHCH
132.9	SO ₂ CCH
129.8, 129.6	CH ₃ CCHCH (Rotamere)
126.5, 126.4	CH ₃ CCH (Rotamere)
80.6	OC(CH ₃) ₃
56.9, 55.8	C3 (Rotamere)
49.8, 48.1	C2 (Rotamere)
28.4	OC(CH ₃) ₃
20.41	CH ₃ C _{Ar}
20.35	CH ₃ C _{Ar}

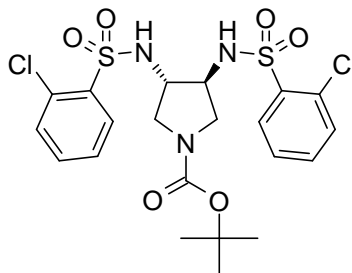
MS (ES+, RT):

m/z (%) 532 (30, [M+Na]⁺), 1041 (100, [2M+Na]⁺)

EA

C ₂₃ H ₃₁ N ₃ O ₆ S ₂	509.65		
Ber.:	C: 54.21%	H: 6.13%	N: 8.24%
Gef.:	C: 54.32%	H: 6.41%	N: 7.83%

(3S,4S)-1-BOC-3,4-Bis-(2-chlor-benzolsulfonylamino)-pyrrolidin (93)



Unter Anwendung der AAV4 mit 418 mg (2.08 mmol) Diamin **73**, 623 μ L (4.57 mmol) 2-Chlor-benzolsulfonylchlorid und 659 μ L (4.98 mmol) Triethylamin in 10 ml CH₂Cl₂ konnten 1075 mg (94%) des Sulfonamids **93** in Form farblose Kristalle erhalten werden. Schmelzpunkt 115°C

¹H-NMR (CDCl₃, 19.9°C, 500.16 MHz):

δ_{H} (ppm) = 8.10	<i>db</i> r, 1H, ³ J = 7.6 Hz, SO ₂ CCH
8.04	<i>db</i> r, 1H, ³ J = 7.6 Hz, SO ₂ CCH
7.59-7.49	<i>m</i> , 4H, ClCCH, ClCCHCH
7.48-7.41	<i>m</i> , 2H, SO ₂ CCHCH
5.92	<i>sbr</i> , 1H, NH
5.76	<i>sbr</i> , 1H, NH
3.65-3.52	<i>mul</i> , 3H, C(3)H, C(2)H ₂
3.50-3.41	<i>mul</i> , 1H, C(2)H ₂
3.14-3.06	<i>mul</i> , 2H, C(2)H ₂
1.36	<i>s</i> , 9H, C(CH ₃) ₃

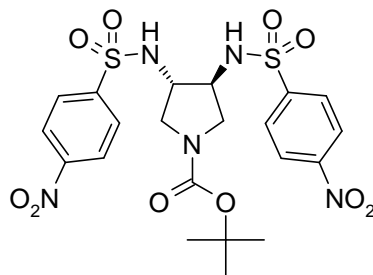
¹³C-NMR (CDCl₃, 23.0°C, 125.77 MHz):

δ_{C} (ppm) = 153.9	C=O
136.7	SO ₂ C _{Ar}
134.4, 134.3	ClCCHC
131.9	ClC*
131.7	ClCCH*
131.5	SO ₂ CCH*
127.5	SO ₂ CCHCH*
80.5	OC(CH ₃) ₃
57.3, 56.3	C3 (Rotamere)
49.4, 48.1	C2 (Rotamere)
28.4	OC(CH ₃) ₃

MS (ES+, RT):

m/z (%) 572 (56, [³⁵Cl₂M+Na]⁺), 574 (46, [³⁵Cl³⁷ClM+Na]⁺), 578 (11, [³⁷Cl₂M+Na]⁺), 1121(63, [4³⁵Cl 2M +Na]⁺), 1123(100, [2³⁵Cl ³⁷Cl 2M +Na]⁺), 1125(67, [2³⁵Cl 2³⁷Cl 2M +Na]⁺)

EA	$C_{21}H_{25}Cl_2N_3O_6S_2$	550.48		
Ber.:	C: 45.82%	H: 4.58%	N: 7.63%	
Gef.:	C: 45.72%	H: 4.76%	N: 7.41%	

(3S,4S)-1-BOC-3,4-Bis-(4-nitro-benzolsulfonylamino)-pyrrolidin (96)

Die Anwendung der AAV4 mit 425 mg (2.10 mmol) Diamin **73**, 1.024 g (4.62 mmol) Nosylchlorid und 879 μ L (6.30) Triethylamin in 20 ml CH_2Cl_2 ergaben 833 mg **96** (69%) in Form farbloser Nadeln. Schmelzpunkt 133°C

 1H -NMR (MeOH- d_4 , 24.6°C, 500.16 MHz):

δ_H (ppm) = 8.40	<i>d</i> , 2H, $^3J = 8.5$ Hz, $NO_2C\bar{C}H$
8.39	<i>d</i> , 2H, $^3J = 8.5$ Hz, $NO_2C\bar{C}H$
8.10	<i>d</i> , 2H, $^3J = 8.9$ Hz, $SO_2C\bar{C}H$
8.06	<i>d</i> , 2H, $^3J = 8.9$ Hz, $SO_2C\bar{C}H$
3.72	<i>smul</i> , 2H, $^3J = 6.9$ Hz, C(3)H
3.44	<i>dd</i> , 1H, $^2J = 11.5$ Hz, $^3J = 6.4$ Hz, C(2)H ₂
3.37	<i>dd</i> , 1H, $^2J = 11.5$ Hz, $^3J = 6.4$ Hz, C(2)H ₂
2.98	<i>dd</i> , 1H, $^2J = 11.5$ Hz, $^3J = 5.3$ Hz, C(2)H ₂
2.91	<i>dd</i> , 1H, $^2J = 11.3$ Hz, $^3J = 5.3$ Hz, C(2)H ₂
1.38	<i>s</i> , 9H, C(CH ₃) ₃

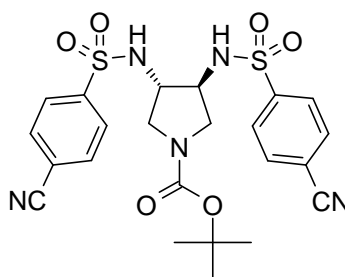
 ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 30.0°C, 125.77 MHz):

δ_C (ppm) = 152.9	C=O
149.6	$NO_2\bar{C}$
146.4	$SO_2\bar{C}$
128.1, 128.0	$SO_2C\bar{C}H$ (Rotamere)
124.5	$NO_2C\bar{C}H$
78.8	$OC(CH_3)_3$
56.7, 55.9	C3 (Rotamere)
48.4, 48.0	C2 (Rotamere)
27.9	$OC(CH_3)_3$

MS (ES⁺, RT):

m/z (%) 594 (97, $[M+Na]^+$), 1165 (100, $[2M+Na]^+$), 1736 (72 $[3M+Na]^+$)

EA	$C_{21}H_{25}N_5O_{10}S_2$	571.59		
Ber.:	C: 44.13%	H: 4.41%	N: 12.25%	
Gef.:	C: 43.72%	H: 4.54%	N: 12.19%	

(3S,4S)-1-BOC-3,4-Bis-(4-cyano-benzolsulfonylamino)-pyrrolidin (98)

Unter Verwendung der AAV4 mit 402 mg (2.00 mmol) Diamin **73**, 887 mg (4.40 mmol) 4-Cyanobenzolsulfonylchlorid und 641 μL Diisopropylethylamin in 12 ml CH_2Cl_2 konnten 759 mg (71%) des Sulfonamids **98** in Form farbloser Kristalle erhalten werden. Schmelzpunkt 139°C

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{MeOH-}d_4$, 21.7°C , 399.78 MHz):

$\delta_{\text{H}}(\text{ppm}) = 8.02$	$d, 2\text{H}, {}^3J = 8.5 \text{ Hz}, \text{SO}_2\text{CCH}$ *
7.99	$d, 2\text{H}, {}^3J = 8.7 \text{ Hz}, \text{SO}_2\text{CCH}$ *
7.95	$d, 2\text{H}, {}^3J = 8.2 \text{ Hz}, \text{NCCCH}$ *
7.94	$d, 2\text{H}, {}^3J = 8.5 \text{ Hz}, \text{NCCCH}$ *
3.67	<i>smul</i> , 2H, C(3)H
3.40	<i>dd</i> , 1H, ${}^2J = 11.5 \text{ Hz}, {}^3J = 6.2 \text{ Hz}, \text{C}(2)\text{H}_2$
3.36	<i>dd</i> , 1H, ${}^2J = 11.3 \text{ Hz}, {}^3J = 6.1 \text{ Hz}, \text{C}(2)\text{H}_2$
2.96	<i>dd</i> , 1H, ${}^2J = 11.8 \text{ Hz}, {}^3J = 5.2 \text{ Hz}, \text{C}(2)\text{H}_2$
2.92	<i>dd</i> , 1H, ${}^2J = 11.6 \text{ Hz}, {}^3J = 5.1 \text{ Hz}, \text{C}(2)\text{H}_2$
1.39	<i>s</i> , 9H, C(CH ₃) ₃

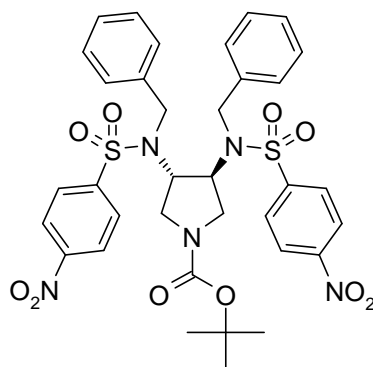
$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 35.0°C , 125.77 MHz):

$\delta_{\text{C}}(\text{ppm}) = 152.9$	C=O
144.8	$\text{SO}_2\text{C}_{\text{Ar}}$
133.3	SO_2CCHCH
127.2, 127.1	SO_2CCH (Rotamere)
117.6	$\text{C}_{\text{Ar}}\text{C}\equiv\text{N}^*$
115.1	$\text{C}_{\text{Ar}}\text{C}\equiv\text{N}^*$
78.8	$\text{OC}(\text{CH}_3)_3$
56.6, 55.8	C3 (Rotamere)
48.4, 47.9	C2 (Rotamere)
27.9	$\text{OC}(\text{CH}_3)_3$

MS (ES^+ , RT):

m/z (%) 554 (100, $[M+\text{Na}]^+$), 1085 (13, $[2M+\text{Na}]^+$)

EA	$\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_6\text{S}_2$	531.61		
Ber.:		C: 51.97%	H: 4.74%	N: 13.17%
Gef.:		C: 51.90%	H: 4.81%	N: 13.15%

(3S,4S)-1-BOC-3,4-Bis-[benzyl-(4-nitro-benzolsulfonyl)-amino]-pyrrolidin (97)

Die Durchführung der AAV5 mit 750 mg (1.31 mmol) Sulfonamid **96**, 343 μ l (2.89 mmol) Benzylbromid, 544 mg (3.94 mmol) K_2CO_3 und einer katalytischen Menge KI in 10 ml CH_3CN (4h Reflux) ergab nach FC (Hexan:EtOAc 2:1) 944 mg (96%) des *N*-alkylierten Sulfonamids **97** in Form farbloser Kristalle. Schmelzpunkt 158°C

1H -NMR ($CDCl_3$, 23.9°C, 500.16 MHz):

δ_H (ppm) = 8.31	<i>sbr</i> , 4H, $NO_2C\bar{C}H$
7.96	<i>sbr</i> , 2H, $SO_2C\bar{C}H$
7.83	<i>sbr</i> , 2H, $SO_2C\bar{C}H$
7.34-7.19	<i>mbr</i> , 6H $CH_2C\bar{C}H\bar{C}H$, $CH_2C\bar{C}H\bar{C}H$
7.12	<i>sbr</i> , 4H $CH_2C\bar{C}H^*$
4.85	<i>sbr</i> , 1H, CH_2Ph
4.45	<i>sbr</i> , 3H, CH_2Ph
4.08-3.84	<i>mbr</i> , 2H, C(3)H
3.45-3.29	<i>mbr</i> , 1H, C(2)H ₂
3.25-2.99	<i>mbr</i> , 3H, C(2)H ₂
1.38	<i>s</i> , 9H, $C(\bar{C}H_3)_3$

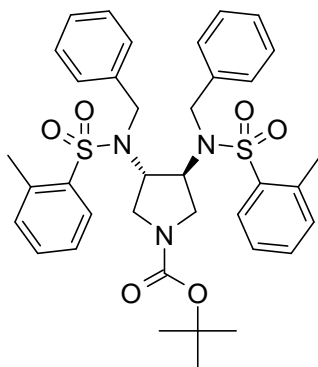
^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 27.3°C, 125.77 MHz):

δ_C (ppm) = 153.4	C=O
150.1	NO_2C_{Ar}
145.7	SO_2C_{Ar}
135.2	CH_2C_{Ar}
128.9	$CH_2C\bar{C}H\bar{C}H^*$
128.5	$SO_2C\bar{C}H^*$
128.6	$CH_2C\bar{C}H\bar{C}H^*$
128.4	$CH_2C\bar{C}H^*$
124.5	$NO_2C\bar{C}H$
80.7	$OC(\bar{C}H_3)_3$
61.5, 60.0	C3 (Rotamere)
49.9, 48.0	C2 (Rotamere)
47.2, 46.0	$\bar{C}H_2Ph$ (Rotamere)
28.3	$OC(\bar{C}H_3)_3$

MS (ES+, RT):

m/z (%) 774 (66, $[M+Na]^+$), 1525 (100, $[2M+Na]^+$)

EA	$C_{35}H_{37}N_5O_{10}S_2$	751.84		
	Ber.:	C: 55.91%	H: 4.96%	N: 9.31%
	Gef.:	C: 55.93%	H: 5.05%	N: 9.25%

(3S,4S)-1-BOC-3,4-Bis-[benzyl-(tolyl-2-sulfonyl)-amino]-pyrrolidin (95)


Der AAV5 mit 510 mg (1.00 mmol) Sulfonamid **92**, 285 μ l (2.40 mmol) Benzylbromid und 415 mg (3.00 mmol) K_2CO_3 in 7.5 ml CH_3CN (7 h, Reflux) folgend wurden nach FC (Hexan:EtOAc 2:1) 538 mg (78%) **95** in Form beiger Kristalle erhalten. Schmelzpunkt 82°C

1H -NMR ($CDCl_3$, 24.9°C, 500.16 MHz):

δ_H (ppm) = 7.97	<i>sbr</i> , 1H, $SO_2C\bar{C}H$
7.72	<i>sbr</i> , 1H, $SO_2C\bar{C}H$
7.53-7.03	<i>m</i> , 14H, $CH_3C\bar{C}H$, $SO_2C\bar{C}H\bar{C}H$, $CH_2C\bar{C}H$, $CH_2C\bar{C}H\bar{C}H$, $CH_3C\bar{C}H\bar{C}H^*$
6.91	<i>sbr</i> , 2H, $CH_2CHCH\bar{C}H^*$
4.79	<i>sbr</i> , 1H, CH_2Ph
4.61-4.35	<i>mbr</i> , 3H, CH_2Ph
4.14-4.05	<i>mbr</i> , 1H, C(3)H
4.01-3.93	<i>mbr</i> , 1H, C(3)H
3.50-3.38	<i>mbr</i> , 1H, C(2)H ₂
3.28-3.17	<i>mbr</i> , 1H, C(2)H ₂
2.99-2.81	<i>mbr</i> , 2H, C(2)H ₂
2.71	<i>sbr</i> , 3H, $C_{Ar}CH_3$
2.59	<i>sbr</i> , 3H, $C_{Ar}CH_3$
1.34	<i>s</i> , 9H, $C(CH_3)_3$

^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 25.1°C, 125.77 MHz):

δ_C (ppm) = 153.6	C=O
138.3	CH_2C_{Ar}
138.2, 138.0	$SO_2C_{Ar}^*$ (Rotamere)
137.4, 137.0	$CH_3C_{Ar}^*$ (Rotamere)
136.2	$SO_2C\bar{C}H\bar{C}H^*$
133.1	$SO_2C\bar{C}H^*$
130.2, 130.1	$CH_3C\bar{C}H\bar{C}H$ (Rotamere)*
128.8, 128.7	$CH_3C\bar{C}H$ (Rotamere)*
128.4	$CH_2C\bar{C}H\bar{C}H$
128.0	$CH_2C\bar{C}H\bar{C}H$
126.4	$CH_2C\bar{C}H$

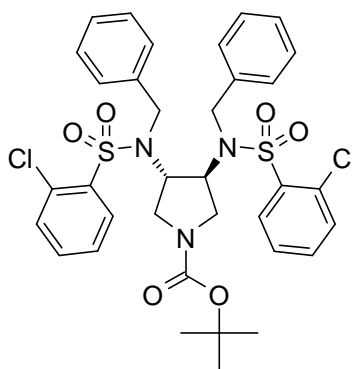
80.1	$\text{OC}(\underline{\text{CH}_3})_3$
59.3, 58.3	C3 (Rotamere)
49.0, 48.1	C2 (Rotamere)
47.8, 46.8	$\underline{\text{CH}_2}\text{Ph}$ (Rotamere)
28.4	$\text{OC}(\underline{\text{CH}_3})_3$
21.0	$\underline{\text{CH}_3}\text{C}_{\text{Ar}}$

MS (ES+, RT):

m/z (%) 712 (100, $[M+Na]^+$)

EA	$\text{C}_{37}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}_2$	689.90		
Ber.:	C: 64.42%	H: 6.28%	N: 6.09%	
Gef.:	C: 64.31%	H: 6.30%	N: 6.02%	

(3S,4S)-1-BOC-3,4-Bis-[benzyl-(2-chloro-benzolsulfonyl)-amino]-pyrrolidin (94)



Die Verwendung der AAV5 mit 550 mg (1.00 mmol) Sulfonamid **93**, 285 μl (2.40 mmol) Benzylbromid und 415 mg (3.00 mmol) K_2CO_3 in 7.5 ml CH_3CN (7 h, Reflux) ergab nach FC (Hexan:EtOAc 2:1) 477 mg (65%) **94** in Form beiger Kristalle. Schmelzpunkt 86°C

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 25.0°C , 500.16 MHz):

$\delta_{\text{H}}(\text{ppm}) = 7.81$	<i>sbr</i> , 1H, SO_2CCH
7.65	<i>sbr</i> , 1H, SO_2CCH
7.54-7.29	<i>m</i> , 4H, ClCCH , $\text{SO}_2\text{CCHCH}^*$
7.25-6.97	<i>m</i> , 12H, ClCCHCH , H_{Bn}
4.94	<i>sbr</i> , 1H, CH_2Ph
4.70-4.51	<i>mbr</i> , 3H, CH_2Ph
4.48-4.37	<i>mbr</i> , 1H, C(3)H
4.26-4.17	<i>mbr</i> , 1H, C(3)H
3.71-3.59	<i>mbr</i> , 1H, C(2)H ₂
3.46-3.35	<i>mbr</i> , 1H, C(2)H ₂
3.28-3.17	<i>mbr</i> , 1H, C(2)H ₂
3.13-3.03	<i>mbr</i> , 1H, C(2)H ₂
1.40	<i>s</i> , 9H, $\text{C}(\underline{\text{CH}_3})_3$

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 25.2°C , 125.77 MHz):

$\delta_{\text{C}}(\text{ppm}) = 153.7$	C=O
138.3	$\text{CH}_2\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}^*$
136.3, 135.6	$\text{SO}_2\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}^*$ (Rotamere)

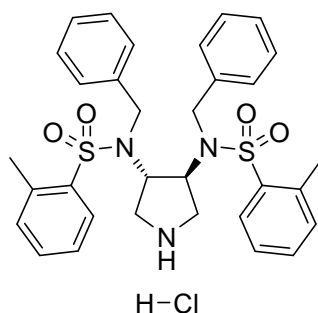
133.5	CICCH <u>C</u> H*
132.1	CH ₂ CCH <u>C</u> H*
131.9	CIC <u>C</u> H*
131.8, 131.3	ClC _{Ar} (Rotamere)
128.5	SO ₂ CCH <u>C</u> H*
128.2	SO ₂ C <u>C</u> H*
127.8	CH ₂ C <u>C</u> H*
127.0	CH ₂ CCH <u>C</u> H <u>C</u> H*
80.3	OC(CH ₃) ₃
60.0, 58.9	C3 (Rotamere)
49.2, 48.4	C2 (Rotamere)
47.7, 47.1	<u>C</u> H ₂ Ph (Rotamere)
28.5	OC(<u>C</u> H ₃) ₃

MS (ES+, RT):

m/z (%)	752 (100, [³⁵ Cl ³⁵ Cl M+Na] ⁺), 754 (87, [³⁵ Cl ³⁷ Cl M+Na] ⁺),
	756 (27, [³⁷ Cl ³⁷ Cl M+Na] ⁺), 1481 (24, [³⁵ Cl ³⁵ Cl ³⁵ Cl ³⁵ Cl 2M+Na] ⁺),
	1483 (41, [³⁵ Cl ³⁵ Cl ³⁵ Cl ³⁷ Cl 2M+Na] ⁺), 1485 (28, [³⁵ Cl ³⁵ Cl ³⁷ Cl ³⁷ Cl 2M+Na] ⁺)

EA	C ₃₅ H ₃₇ Cl ₂ N ₃ O ₆ S ₂	730.74		
Ber.:	C: 57.53%	H: 5.10%	N: 5.75%	
Gef.:	C: 57.44%	H: 5.12%	N: 5.86%	

(3S,4S)-3,4-Bis-[benzyl-(tolyl-2-sulfonyl)-amino]-pyrrolidin Hydrochlorid (85)



Die Anwendung der AAV7 mit 146 mg (0.20 mmol) des BOC-geschützten Pyrrolidins **95** in 5 ml 2M HCl in Et₂O ergab 101 mg (81%) des Hydrochlorids **85** in Form blaßgelber Kristalle. Schmelzpunkt 191°C

¹H-NMR (CDCl₃, 22.8°C, 500.16 MHz):

δ _H (ppm) = 9.66	<i>sbr</i> , 2H, ⁺ NH ₂
7.83	<i>sbr</i> , 2H, SO ₂ C <u>C</u> H
7.46	<i>sbr</i> , 2H, SO ₂ CCH <u>C</u> H*
7.38-6.91	<i>m</i> , 14H, C(CH ₃)CH, C(CH ₃)CH <u>C</u> H, HBn
4.69	<i>sbr</i> , 2H, C(3)H
4.42	<i>dbr</i> , 2H, ² J = 14.7 Hz, <u>C</u> H ₂ Ph
4.14	<i>dbr</i> , 2H, ² J = 14.4 Hz, <u>C</u> H ₂ Ph
3.22	<i>sbr</i> , 2H, C(2)H ₂
2.96	<i>sbr</i> , 2H, C(2)H ₂
2.63	<i>sbr</i> , 6H, C _{Ar} <u>C</u> H ₃

¹³C-NMR (CDCl₃, 25.6°C, 125.77 MHz):

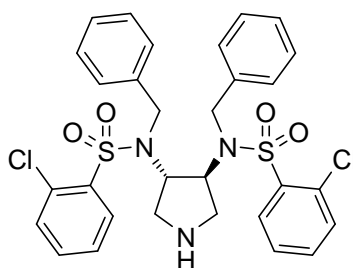
δ _C (ppm) = 137.8	SO ₂ C _{Ar} *
137.5	CH ₃ C _{Ar} *
136.0	CH ₃ C _{Ar}
133.5	SO ₂ CCHCH *
133.2	SO ₂ CCH *
130.2	CH ₃ CCHCH
129.2	CH ₂ CCHCH
128.5	CH ₂ CCH
128.4	CH ₂ CCHCHCH
126.8	CH ₃ CCH
58.8	C3
49.6	C2
46.2	CH ₂ Ph
21.1	CH ₃ C _{Ar}

MS (ES⁺, RT):

m/z (%) 590 (100, [M+H]⁺)

EA	C ₃₂ H ₃₅ N ₃ O ₄ S ₂ * HCl * 0.5 H ₂ O	635.24		
	Ber.:	C: 60.50%	H: 5.87%	N: 6.61%
	Gef.:	C: 60.44%	H: 5.85%	N: 6.61%

(3S,4S)-3,4-Bis-[benzyl-(2-chloro-benzolsulfonyl)-amino]-pyrrolidin Hydrochlorid (84)



H-Cl

Unter Anwendung der AAV7 mit 138 mg (0.20 mmol) des BOC-geschützten Pyrrolidins **94** in 5 ml 2M HCl in Et₂O konnten 104 mg (78%) des Hydrochlorids **84** in Form blaßgelber Kristalle erhalten werden. Schmelzpunkt 172°C (Zersetzung)

¹H-NMR (CDCl₃, 22.7°C, 500.16 MHz):

δ _H (ppm) = 9.87	<i>sbr</i> , 2H, ⁺ NH ₂
7.73	<i>d</i> , 2H, ³ J = 7.8 Hz, SO ₂ CCH
7.43	<i>dd</i> , 2H, ³ J = 7.3 Hz, ⁴ J = 0.9 Hz, ClCCH
7.38	<i>td</i> , 2H, ³ J = 7.6 Hz, ⁴ J = 1.1 Hz, SO ₂ CCHCH*
7.13	<i>t</i> , 2H, ³ J = 7.3 Hz, ClCCHCH*
7.10-7.04	<i>mbr</i> , 10H, CH ₂ CCH, CH ₂ CCHCH, CH ₂ CCHCHCH
4.97	<i>smul</i> , 2H, C(3)H
4.59	<i>d</i> , 2H, ² J = 15.8 Hz, CH ₂ Ph
4.37	<i>d</i> , 2H, ² J = 15.8 Hz, CH ₂ Ph
3.49	<i>sbr</i> , 2H, C(2)H ₂
3.12	<i>sbr</i> , 2H, C(2)H ₂

¹³C-NMR (CDCl₃, 24.7°C, 125.77 MHz):

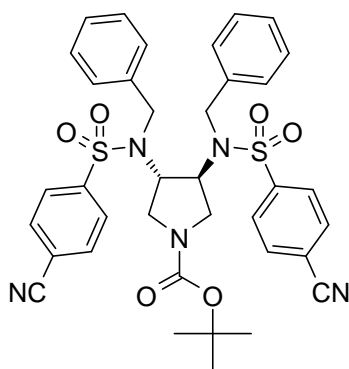
δ _C (ppm) = 137.9	SO ₂ <u>C</u> _{Ar}
135.3	CH ₂ <u>C</u> _{Ar}
133.8	SO ₂ CCH <u>CH</u> *
132.2	C <u>ICCH</u> *
131.9	C <u>ICCHCH</u> *
131.6	C <u>IC</u> _{Ar}
128.8	CH ₂ CCH <u>CH</u>
128.5	CH ₂ C <u>CH</u>
128.1	CH ₂ CCHCH <u>CH</u>
127.2	SO ₂ C <u>CH</u> *
58.4	C3
49.1	C2
45.6	<u>CH</u> ₂ Ph

MS (ES⁺, RT):

m/z (%)	630 (100, [³⁵ Cl ³⁵ Cl M+H] ⁺), 632 (90, [³⁵ Cl ³⁷ Cl M+H] ⁺), 634 (25, [³⁷ Cl ³⁷ Cl M+H] ⁺)
---------	--

EA	C ₃₀ H ₂₉ Cl ₂ N ₃ O ₅ S ₂ * HCl * H ₂ O	685.08		
Ber.:	C: 52.60%	H: 4.71%	N: 6.13%	
Gef.:	C: 52.45%	H: 4.73%	N: 6.16%	

(3S,4S)-1-BOC-3,4-Bis-[benzyl-(4-cyano-benzolsulfonyl)-amino]-pyrrolidin (99)



Unter Verwendung der AAV5 mit 2.53 g (4.75 mmol) Sulfonamid **76**, 1.35 ml (11.40 mmol) Benzylbromid, 1.97 g K₂CO₃ und einer katalytischen Menge KI in 35 ml CH₃CN (4h, Reflux) wurden nach FC (Hexan:EtOAc 2:1) 2.26 g (67%) von **99** in Form farbloser Kristalle erhalten. Schmelzpunkt 208°C

¹H-NMR (CDCl₃, 21.3°C, 500.16 MHz):

δ _H (ppm) = 7.92	<i>sbr</i> , 2H, SO ₂ C <u>CH</u> *
7.85-7.69	<i>sbr</i> , 6H, SO ₂ C <u>CH</u> , SO ₂ CCH <u>CH</u>
7.34-7.18	<i>mbr</i> , 6H, H _{Bn}
7.17-7.02	<i>mbr</i> , 4H, H _{Bn}
4.83	<i>sbr</i> , 1H, <u>CH</u> ₂ Ph
4.41	<i>sbr</i> , 3H, <u>CH</u> ₂ Ph
4.05-3.92	<i>mbr</i> , 1H, C(3)H

3.89-3.77	<i>mbr</i> , 1H, C(3)H
3.35	<i>sbr</i> , 1H, C(2)H ₂
3.16-2.96	<i>mbr</i> , 3H, C(2)H ₂
1.39	<i>s</i> , 9H, C(CH ₃) ₃

¹³C-NMR (CDCl₃, 23.7°C, 125.77 MHz):

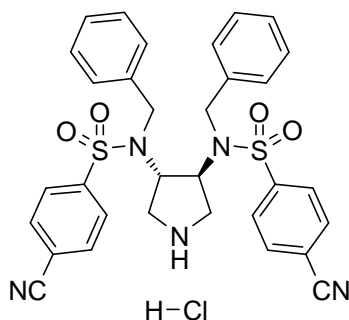
δ _C (ppm) = 153.5	C=O
144.2	SO ₂ C _{Ar}
135.3	CH ₂ C _{Ar}
133.1	SO ₂ CCHCH
129.0	CH ₂ CCHCH*
128.5	CH ₂ CCH*
128.4	CH ₂ CCHCHCH
128.2, 127.9	SO ₂ CCH (Rotamere)
117.3	CN*
116.8	C _{Ar} CN*
80.8	OC(CH ₃) ₃
61.5, 59.9	C3 (Rotamere)
50.0, 49.1	C2 (Rotamere)
47.2, 46.0	CH ₂ Ph (Rotamere)
28.4	OC(CH ₃) ₃

MS (ES⁺, RT):

m/z (%) 734 (67, [M+Na]⁺), 1445 (100, [2M+Na]⁺)

EA	C ₃₇ H ₃₇ N ₅ O ₆ S ₂	711.87		
Ber.:	C: 62.43%	H: 5.24%	N: 9.84%	
Gef.:	C: 62.11%	H: 5.37%	N: 9.88%	

(3S,4S)-3,4-Bis-[benzyl-(4-cyano-benzolsulfonyl)-amino]-pyrrolidin Hydrochlorid (101)



Die Verwendung der AAV7 mit 78 mg (0.11 mmol) des BOC-geschützten Pyrrolidins **99** in 3 ml 2M HCl in Et₂O ergab 51 mg (71%) des Hydrochlorids **101** in Form farbloser Kristalle. Schmelzpunkt 214°C

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0°C, 500.16 MHz):

δ _H (ppm) = 8.02	<i>dt</i> , 4H, ³ <i>J</i> = 8.7 Hz, ⁴ <i>J</i> = 1.8 Hz, SO ₂ CCH*
7.80	<i>dt</i> , 4H, ³ <i>J</i> = 8.5 Hz, ⁴ <i>J</i> = 1.8 Hz, SO ₂ CCHCH*
7.36-7.23	<i>mbr</i> , 10H, CH ₂ CCH, CH ₂ CCHCH, CH ₂ CCHCHCH
4.47	<i>d</i> , 2H, ² <i>J</i> = 16.3 Hz, CH ₂ Ph
4.32	<i>smul</i> , 2H, C(3)H

4.25	<i>d</i> , 2H, $^2J = 16.3$ Hz, $\underline{\text{CH}_2\text{Ph}}$
2.58	<i>dd</i> , 2H, $^2J = 10.7$ Hz, $^3J = 7.2$ Hz, $\text{C}(2)\text{H}_2$
2.27	<i>dd</i> , 2H, $^2J = 11.1$ Hz, $^3J = 5.1$ Hz, $\text{C}(2)\text{H}_2$

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 30.0°C, 125.77 MHz):

$\delta_{\text{C}}(\text{ppm}) =$	143.5	$\text{SO}_2\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}$
	137.3	$\text{CH}_2\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}$
	133.4	$\text{SO}_2\text{CCH}\underline{\text{C}}\text{H}^*$
	128.3	$\text{CH}_2\text{CCH}\underline{\text{C}}\text{H}^*$
	128.0	$\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{CH}^*$
	127.7	$\text{SO}_2\underline{\text{C}}\text{CH}^*$
	127.4	$\text{CH}_2\text{CCHCH}\underline{\text{C}}\text{H}^*$
	117.6	$\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}\text{CN}^*$
	115.3	CN^*
	61.9	C_3
	48.2	C_2
	40	$\underline{\text{CH}_2\text{Ph}}$ vom DMSO-Signal überlagert

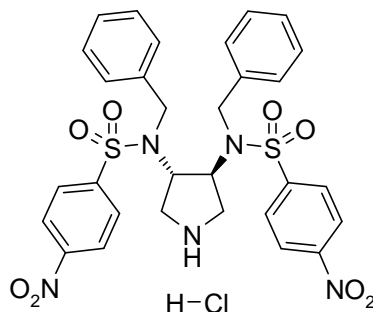
MS (ES+, RT):

m/z (%) 612 (100, $[M+H]^+$)

HRMS (ES+):

m/z berechnet für $\text{C}_{32}\text{H}_{30}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}_2$: 612.173923
 gefunden : 612.174667

(3*S*,4*S*)-3,4-Bis-[benzyl-(4-nitro-benzolsulfonyl)-amino]-pyrrolidin Hydrochlorid (100)



Unter Verwendung von 150 mg (0.20 mmol) des BOC-geschützten Pyrrolidins **96** in 5 ml 2M HCl in Et_2O konnten 109 mg (79%) des Hydrochlorids **100** in Form beiger Kristalle erhalten werden. Schmelzpunkt 198°C (Zersetzung)

^1H -NMR (DMSO- d_6) 30.0°C, 500.16 MHz):

$\delta_{\text{H}}(\text{ppm}) =$	9.79-9.59	<i>m</i> , 1H, $^+\text{NH}_2$
	8.30	<i>d</i> , 4H, $^3J = 8.9$ Hz, NO_2CCH
	7.94	<i>d</i> , 4H, $^3J = 8.7$ Hz, SO_2CCH
	7.31-7.24	<i>mbr</i> , 6H, $\text{CH}_2\text{CCHCHCH}$, CH_2CCHCH
	7.23-7.18	<i>mbr</i> , 4H, CH_2CCH^*
	5.00	<i>smul</i> , 2H, $\text{C}(3)\text{H}$
	4.61	<i>d</i> , 2H, $^2J = 16.3$ Hz, $\underline{\text{CH}_2\text{Ph}}$
	4.27	<i>d</i> , 2H, $^2J = 16.3$ Hz, $\underline{\text{CH}_2\text{Ph}}$
	3.29	<i>dd</i> , 2H, $^2J = 11.0$ Hz, $^3J = 7.6$ Hz, $\text{C}(2)\text{H}_2$
	2.98	<i>dd</i> , 2H, $^2J = 10.9$ Hz, $^3J = 8.4$ Hz, $\text{C}(2)\text{H}_2$

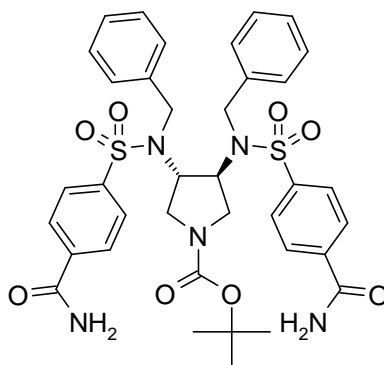
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0°C, 125.77 MHz):

δ _C (ppm) = 149.8	NO ₂ <u>C</u> _{Ar}
145.1	SO ₂ <u>C</u> _{Ar}
135.9	CH ₂ <u>C</u> _{Ar}
128.6	SO ₂ C <u>CH</u> *
128.4	CH ₂ C <u>CH</u> CH*
128.3	CH ₂ C <u>CH</u> *
127.6	CH ₂ C <u>CH</u> CH <u>CH</u>
124.5	NO ₂ C <u>CH</u> *
57.5	C3
48.2	C2
43.3	<u>CH</u> ₂ Ph

MS (ES+, RT):

m/z (%) 652 (100, [M+H]⁺)

EA	C ₃₀ H ₂₉ N ₅ O ₈ S ₂ * HCl * H ₂ O	706.19	
Ber.:	C: 51.02%	H: 4.57%	N: 9.92%
Gef.:	C: 51.07%	H: 4.48%	N: 9.55%

(3*S*,4*S*)-1-BOC-3,4-Bis-[benzyl-(4-carbamoyl-benzoyl)-amino]-pyrrolidin (103)

Unter Verwendung der AAV6 mit 250 mg Nitril **99**, 1.6 ml 30% H₂O₂ und 233 mg (1.69 mmol) K₂CO₃ in 3.2 ml DMSO wurden 241 mg (92%) des Amids **103** in Form farbloser Kristalle erhalten. Schmelzpunkt 124°C

¹H-NMR (MeOH-*d*₄, 23.7°C, 500.16 MHz):

δ _H (ppm) = 8.08-7.95	<i>mbr</i> , 4H, SO ₂ C <u>CH</u>
7.87-7.73	<i>mbr</i> , 4H, SO ₂ C <u>CH</u> CH
7.34-7.13	<i>mbr</i> , 10H, H _{Bn}
4.64	<i>sbr</i> , 1H, <u>CH</u> ₂ Ph
4.59-4.49	<i>mbr</i> , 3H, <u>CH</u> ₂ Ar
3.94-3.86	<i>mbr</i> , 1H, C(3)H
3.82-3.74	<i>mbr</i> , 1H, C(3)H
3.18-3.06	<i>mbr</i> , 1H, C(2)H ₂
3.03-2.81	<i>mbr</i> , 3H, C(2)H ₂
1.33	<i>s</i> , 9H, C(<u>CH</u> ₃) ₃

$^{13}\text{C-NMR}$ (MeOH- d_4 , 25.9°C, 125.77 MHz):

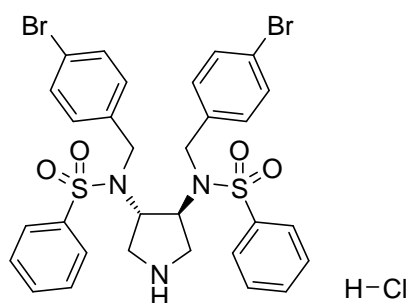
δ_{C} (ppm) = 170.3	<u>C</u> ONH ₂
155.0	<u>C</u> OO'Bu
144.0	SO ₂ <u>C</u> Ar
139.2	<u>C</u> ArCONH ₂
137.9	CH ₂ <u>C</u> Ar
129.8	SO ₂ CCH <u>C</u> H*, CH ₂ CCH <u>C</u> H*
129.4	CH ₂ C <u>C</u> H*
129.0	CH ₂ CCH <u>C</u> H <u>C</u> H*
128.5	SO ₂ C <u>C</u> H*
81.6	OC(<u>C</u> H ₃) ₃
62.1, 61.0	C3 (Rotamere)
50.1, 49.9	C2 (Rotamere)
47.9, 47.1	<u>C</u> H ₂ Ph (Rotamere)
28.5	OC(<u>C</u> H ₃) ₃

MS (ES+, RT):

m/z (%) 770 (100, [M+Na]⁺), 1517 (40, [2M+Na]⁺)

EA	C ₃₇ H ₄₁ N ₅ O ₈ S ₂ * 0.5 H ₂ O	756.89		
Ber.:	C: 58.71%	H: 5.59%	N: 9.25%	
Gef.:	C: 58.43%	H: 5.70%	N: 9.08%	

(3S,4S)-3,4-Bis-[benzolsulfonyl-(4-brom-benzyl)-amino]-pyrrolidin Hydrochlorid (86)



Unter Anwendung der AAV7 konnten mit 164 mg (0.20 mmol) des BOC-geschützten Pyrrolidins **81** in 2 M HCl in Et₂O 109 mg (72%) des Hydrochlorids **86** in Form beiger Kristalle erhalten werden. Schmelzpunkt 214°C (Zersetzung)

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 30.0°C, 500.16 MHz):

δ_{H} (ppm) = 9.61	<i>sbr</i> , 2H, ⁺ NH ₂
7.76	<i>dd</i> , 4H, ³ J = 7.8 Hz, ⁴ J = 1.2 Hz, SO ₂ C <u>C</u> H
7.72	<i>tt</i> , 2H, ³ J = 7.8 Hz, ⁴ J = 1.2, SO ₂ CCH <u>C</u> H <u>C</u> H
7.59	<i>t</i> , 4H, ³ J = 7.9 Hz, SO ₂ CCH <u>C</u> H
7.45	<i>d</i> , 4H, ³ J = 8.5 Hz, BrC <u>C</u> H <u>C</u> H
7.26	<i>d</i> , 4H, ³ J = 8.5 Hz, BrC <u>C</u> H
4.78	<i>smul</i> , 2H, C(3)H
4.40	<i>d</i> , 2H, ² J = 16.7 Hz, <u>C</u> H ₂ Ar
4.23	<i>d</i> , 2H, ² J = 16.7 Hz, <u>C</u> H ₂ Ar
3.06	<i>dd</i> , 2H, ² J = 11.7 Hz, ³ J = 7.9 Hz, C(2)H ₂
2.75	<i>dd</i> , 2H, ² J = 11.7 Hz, ³ J = 7.8 Hz, C(2)H ₂

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 30.0°C, 125.77 MHz):

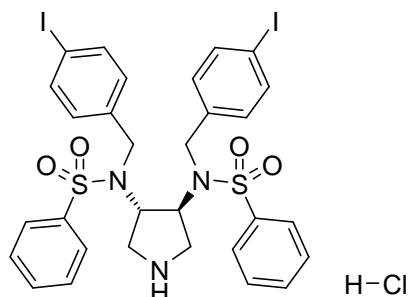
δ_{C} (ppm) = 138.5	$\text{SO}_2\text{C}_{\text{Ar}}$
136.3	$\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}}$
133.4	$\text{SO}_2\text{CCHCHCH}^*$
130.9	BrCCH^*
130.1	BrCCHCH^*
129.4	$\text{SO}_2\text{CCHCH}^*$
127.2	SO_2CCH
120.5	BrC
57.7	C_3
47.2	C_2
42.9	CH_2Ar

MS (ES+, RT):

m/z (%)	718 (48, [$^{79}\text{Br}^{79}\text{BrM}+H$] $^+$), 720 (100, [$^{79}\text{Br}^{81}\text{BrM}+H$] $^+$),
	722 (58, [$^{81}\text{Br}^{81}\text{BrM}+H$] $^+$), 1436 (14, [$^{79}\text{Br}^{79}\text{Br}^{79}\text{Br}^{81}\text{Br}2M+H$] $^+$),
	1438 (14, [$^{79}\text{Br}^{79}\text{Br}^{81}\text{Br}^{81}\text{Br}2M+H$] $^+$), 1440 (11, [$^{79}\text{Br}^{81}\text{Br}^{81}\text{Br}^{81}\text{Br}2M+H$] $^+$)

EA	$\text{C}_{30}\text{H}_{29}\text{Br}_2\text{N}_3\text{O}_4\text{S}_2 \cdot \text{HCl}$	755.98		
Ber.:	C: 47.66%	H: 4.00%	N: 5.56%	
Gef.:	C: 47.72%	H: 4.25%	N: 5.68%	

(3S,4S)-3,4-Bis-[benzolsulfonyl-(4-iod-benzyl)-amino]-pyrrolidin Hydrochlorid (87)



Nach Verwendung der AAV7 mit 183 mg (0.20 mmol) des BOC-geschützten Pyrrolidin **82** in 5 ml 2M HCl in Et₂O konnten 138 mg (81%) des Hydrochlorids **87** in Form beiger Kristalle erhalten werden. Schmelzpunkt 211°C (Zersetzung)

$^1\text{H-NMR}$ (MeOH- d_4 , 22.3°C, 500.16 MHz):

δ_{H} (ppm) = 7.87	<i>dd</i> , 4H, $^3J = 7.1$, $^4J = 1.1$, SO_2CCH
7.74	<i>t</i> , 2H, $^3J = 7.4$ Hz, $\text{SO}_2\text{CCHCHCH}$
7.63	<i>t</i> , 4H, $^3J = 7.7$ Hz, SO_2CCHCH
7.62	<i>d</i> , 4H, $^3J = 8.3$ Hz, ICCHCH
6.89	<i>d</i> , 4H, $^3J = 8.3$ Hz, ICCH
4.68	<i>smul</i> , 2H, C(3)H
4.34	<i>d</i> , 2H, $^2J = 16.0$ Hz, CH_2Ar
3.92	<i>d</i> , 2H, $^2J = 16.3$ Hz, CH_2Ar
3.46-3.38	<i>m</i> , 2H, C(2)H ₂
3.34-3.24	<i>m</i> , 2H, C(2)H ₂ vom Methanol-Signal überlagert

¹³C-NMR (MeOH-*d*₄, 25.6°C, 125.77 MHz):

δ _C (ppm) = 140.5	SO ₂ <u>C</u> _{Ar}
139.2	IC <u>CH</u>
136.9	CH ₂ <u>C</u> _{Ar}
135.0	SO ₂ C <u>CHCH</u> <u>CH</u>
131.4	SO ₂ C <u>CH</u> <u>CH</u>
130.9	SO ₂ C <u>CH</u>
128.8	IC <u>CH</u> <u>CH</u>
94.6	I <u>C</u>
62.2	C <u>3</u>
51.1	C <u>2</u>
47.5	CH ₂ <u>Ar</u>

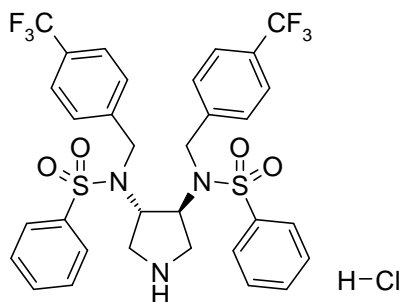
MS (ES+, RT):

m/z (%) 814 (100, [M+H]⁺)

EA C₃₀H₂₉I₂N₃O₄S₂ * HCl 849.98

Ber.:	C: 42.39%	H: 3.56%	N: 4.94%
Gef.:	C: 42.38%	H: 3.74%	N: 5.13%

(3*S*,4*S*)-3,4-Bis-[benzolsulfonyl-(4-trifluormethyl-benzyl)-amino]-pyrrolidin Hydrochlorid (88)



Unter Verwendung der AAV7 mit 177 mg (0.22 mmol) des BOC-geschützten Pyrrolidins **91** in 5 ml 2M HCl in Et₂O wurden 115 mg (71%) des Hydrochlorids **88** in Form farbloser Kristalle erhalten. Schmelzpunkt 184°C (Zersetzung)

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0°C, 500.16 MHz):

δ _H (ppm) = 9.90	<i>sbr</i> , 2H, ⁺ NH ₂
8.84-7.39	<i>mbr</i> , 18H, SO ₂ <u>Ph</u> , CH ₂ C <u>CH</u> , CF ₃ C <u>CH</u>
4.85	<i>sbr</i> , 2H, C(3)H
4.56	<i>sbr</i> , 4H, CH ₂ <u>Ph</u>
3.04	<i>sbr</i> , 2H, C(2)H ₂
2.72	<i>sbr</i> , 2H, C(2)H ₂

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0°C, 125.77 MHz):

δ _C (ppm) = 141.9	SO ₂ <u>C</u> _{Ar}
138.1	CH ₂ <u>C</u> _{Ar}
133.5	SO ₂ C <u>CHCH</u> <u>CH</u>
129.4	CH ₂ C <u>CH</u> *
128.4	SO ₂ C <u>CH</u> <u>CH</u> *

127.6	$q, {}^2J_{C,F} = 33.6 \text{ Hz}, F_3CC_{Ar}$
127.2	SO_2CCH
124.7	CF_3CCH
124.1	$q, {}^1J_{C,F} = 271.6 \text{ Hz}, F_3C$
57.8	$C3$
47.2	$C2$
42.3	CH_2Ar

MS (ES+, RT):

m/z (%) 698 (100, $[M+H]^+$)

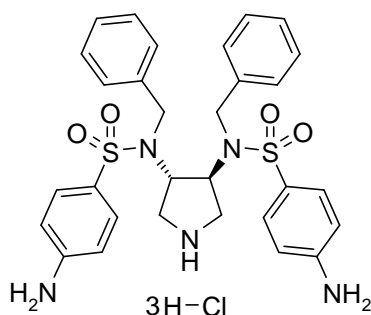
HRMS (ES+):

m/z berechnet für $C_{32}H_{30}F_6N_3O_4S_2$: 698.158195
 gefunden : 698.162265

EA

$C_{32}H_{29}F_6N_3O_4S_2 \cdot HCl$ 734.18
 Ber.: C: 52.35% H: 4.12% N: 5.72%
 Gef.: C: 53.68% H: 4.45% N: 6.01%

(3S,4S)-3,4-Bis-[benzyl-(4-amino-benzolsulfonyl)-amino]-pyrrolidin Trihydrochlorid (89)



608 mg (0.81 mmol) des Nitrosulfonamids **97** wurden in 30 ml EtOAc gelöst und mit 1.82 g $SnCl_2 \cdot 2 H_2O$ versetzt. Die Suspension wurde 2 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wurden 10 ml ges. $NaHCO_3$ -Lsg. zugegeben, die aq. Phase abgetrennt und mit EtOAc (3×10 ml) extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden mit ges. $NaCl$ -Lsg. gewaschen, über $NaSO_4$ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt. Der Rückstand wurde in 5 ml trockenem Et_2O gelöst und mit 5 ml 2M HCl in Et_2O versetzt. Nach 12 h wurde vom Rückstand abdekantiert, dieser mit trockenem Et_2O gewaschen (3×5 ml) und im HV getrocknet. Es wurden 445 mg (79%) des Trihydrochlorids **89** in Form gelber Kristalle erhalten. Schmelzpunkt 176°C

1H -NMR (MeOH- d_4 , 24.0°C, 500.16 MHz):

δ_H (ppm) = 7.43	$d, 4H, {}^3J = 8.3 \text{ Hz}, SO_2CCH^*$
7.37-7.25	$m, 6H, CH_2CCHCH, CH_2CCHCHCH$
7.07	$d, 4H, {}^3J = 6.6 \text{ Hz}, CH_2CCH$
6.71	$d, 4H, {}^3J = 8.5 \text{ Hz}, SO_2CCHCCH^*$
4.59	$sbr, 2H, C(3)H$
4.12	$d, 2H, {}^2J = 15.4 \text{ Hz}, CH_2Ph$

3.85 *d*, 2H, $^2J = 15.6$ Hz, $\underline{\text{CH}_2\text{Ph}}$
 3.48-3.36 *m*, 4H, $\text{C}(2)\text{H}_2$

^{13}C -NMR (MeOH- d_4 , 26.7°C, 125.77 MHz):

$\delta_{\text{C}}(\text{ppm}) =$ 154.9 $\text{SO}_2\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}$
 134.5 $\text{CH}_2\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}$
 131.0 $\text{SO}_2\text{CCH}\underline{\text{C}}\text{H}$
 129.9 $\text{CH}_2\text{CCH}\underline{\text{C}}\text{H}$
 129.6 $\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{CH}$
 129.2 $\text{CH}_2\text{CCHCH}\underline{\text{C}}\text{H}$
 125.1 $^+\text{NH}_3\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}$
 114.7 $\text{SO}_2\underline{\text{C}}\text{CH}$
 62.3 C_3
 51.9 C_2
 48.2 $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$

MS (ES+, RT):

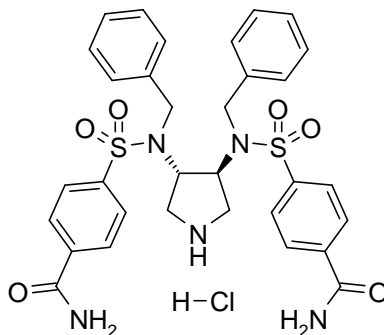
m/z (%) 592 (100, $[M+H]^+$)

HRMS (ES+):

m/z berechnet für $\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}_2$: 592.205224
 gefunden : 592.206319

EA	$\text{C}_{30}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}_2 * 3 \text{HCl} * 4 \text{H}_2\text{O}$	728.18		
Ber.:	C: 46.85%	H: 5.24%	N: 9.11%	Cl: 13.83%
Gef.:	C: 46.68%	H: 5.62%	N: 8.74%	Cl: 11.16%

(3S,4S)-3,4-Bis-[benzyl-(4-carbamoyl-benzosulfonyl)-amino]-pyrrolidin Hydrochlorid (90)



Unter Anwendung der AAV7 mit 135 mg (0.18 mmol) des BOC-geschützten Pyrrolidins **103** in 5 ml 2M HCl in Et₂O konnten 100 mg (81%) des Hydrochlorids **90** in Form farbloser Kristalle erhalten werden. Schmelzpunkt 176°C (Zersetzung)

^1H -NMR (DMSO- d_6) 30.0°C, 500.16 MHz):

$\delta_{\text{H}}(\text{ppm}) =$ 8.21 *sbr*, 1H, CONH_2
 8.02 *d*, 4H, $^3J = 8.5$ Hz, $\text{SO}_2\text{CCH}\underline{\text{H}}^*$
 7.75 *d*, 4H, $^3J = 8.5$ Hz, $\text{SO}_2\text{CCHCH}\underline{\text{H}}^*$
 7.62 *sbr*, 1H, CONH_2
 7.35-7.24 *mbr*, 10H, $\text{CH}_2\text{CCH}\underline{\text{H}}$, $\text{CH}_2\text{CCHCH}\underline{\text{H}}$, $\text{CH}_2\text{CCHCHCH}\underline{\text{H}}$
 4.47 *d*, 2H, $^2J = 16.3$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$

4.33	<i>sbr</i> , 2H, C(3)H
4.17	<i>d</i> , 2H, $^2J = 16.3$ Hz, $\underline{\text{CH}_2\text{Ph}}$
2.59-2.51	<i>m</i> , 2H, C(2)H ₂ vom DMSO-Signal überlagert
2.25	<i>dd</i> , 2H, $^2J = 10.6$ Hz, $^3J = 4.7$ Hz, C(2)H ₂

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO-*d*₆, 30.0°C, 125.77 MHz):

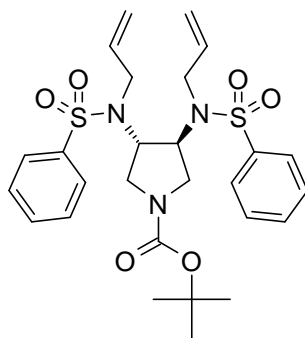
δ_{C} (ppm) = 166.3	$\text{C}_{\text{Ar}}\underline{\text{CONH}_2}$
141.5	$\text{SO}_2\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}$
137.9	$\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}\text{CONH}_2$
137.5	$\underline{\text{CH}_2}\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}$
128.3	$\text{CH}_2\underline{\text{CCHCH}}^*$
128.1	$\text{SO}_2\underline{\text{CCHCH}}^*$
127.8	$\text{CH}_2\underline{\text{CCHCH}}\underline{\text{C}}^*$
127.2	$\text{CH}_2\underline{\text{CCH}}$
126.9	$\text{SO}_2\underline{\text{CCH}}$ (Rotamere)
61.7	C3
48.2	C2
47.6	$\underline{\text{CH}_2}\text{Ar}$

MS (ES+, RT):

m/z (%) 648 (100, $[M+H]^+$), 1295 (10, $[2M+H]^+$)

EA	$\text{C}_{32}\text{H}_{33}\text{N}_5\text{O}_6\text{S}_2 \cdot \text{HCl} \cdot 0.5 \text{H}_2\text{O}$	692.23	
Ber.:	C: 55.52%	H: 4.95%	N: 10.12%
Gef.:	C: 55.42%	H: 5.24%	N: 9.91%

(3S,4S)-1-BOC-3,4-Bis-(allyl-benzolsulfonyl-amino)-pyrrolidin (104)



Unter Verwendung der AAV5 mit 241 mg (0.5 mmol) des Sulfonamids **76**, 104 μL (1.2 mmol) Allylbromid und 208 mg K_2CO_3 in 4 ml CH_3CN (2 h 0°C, 64 h RT) konnten nach FC (Hexan:EtOAc 2:1) 201 mg (72%) des *N*-alkylierten Sulfonamids **104** in Form farbloser Kristalle erhalten werden. Schmelzpunkt 114°C

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-*d*₆, 30.0°C, 500.16 MHz):

δ_{H} (ppm) = 7.88	<i>dbr</i> , 4H, $^3J = 7.3$ Hz, $\text{SO}_2\underline{\text{CCH}}$
7.70	<i>dt</i> , 2H, $^3J = 7.4$ Hz, $^4J = 1.4$ Hz, $\text{SO}_2\underline{\text{CCHCHCH}}$
7.62	<i>t</i> , 4H, $^3J = 7.6$ Hz, $\text{SO}_2\underline{\text{CCHCH}}$
5.76-5.55	<i>mbr</i> , 2H, $\text{NCH}_2\underline{\text{CH}}=\text{CH}_2$
5.20	<i>tbr</i> , 2H, $^3J = 16.0$ Hz, $\text{NCH}_2\underline{\text{CH}}=\text{CHH}_{\text{cis}}$

5.07	<i>tbr</i> , 2H, $^3J = 9.6$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}=\text{CHH}_{\text{trans}}$
4.69-4.55	<i>mul</i> , 2H, C(3)H
3.91-3.73	<i>mbr</i> , 4H, $\text{NCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$
3.14	<i>t</i> , 2H, $^2J = 9.0$ Hz, C(2)H ₂
2.93-2.80	<i>smul</i> , 2H, C(2)H ₂
1.31	<i>s</i> , 9H, C(CH ₃) ₃

¹H-NMR (MeOH-*d*₄, 22.9°C, 500.16 MHz):

$\delta_{\text{H}}(\text{ppm}) = 7.90$	<i>smul</i> , 2H, SO ₂ CCH
7.67	<i>t</i> , 2H, $^3J = 7.1$ Hz, SO ₂ CCHCHCH
7.60	<i>t</i> , 4H, $^3J = 7.4$ Hz, SO ₂ CCHCH
5.80-5.62	<i>mbr</i> , 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$
5.23	<i>tbr</i> , 2H, $^3J = 16.5$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}=\text{CHH}_{\text{cis}}$
5.07	<i>tbr</i> , 2H, $^3J = 11.3$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}=\text{CHH}_{\text{trans}}$
4.75-4.63	<i>smul</i> , 2H, C(3)H
3.96-3.76	<i>mbr</i> , 4H, $\text{NCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$
3.37	<i>dd</i> , 2H, $^2J = 11.3$ Hz, $^3J = 8.3$ Hz, C(2)H ₂
3.12-3.02	<i>smul</i> , 2H, C(2)H ₂
1.40	<i>s</i> , 9H, C(CH ₃) ₃

¹H-NMR (CDCl₃, 22.3°C, 500.16 MHz):

$\delta_{\text{H}}(\text{ppm}) = 7.92$	<i>sbr</i> , 2H, SO ₂ CCH
7.82	<i>sbr</i> , 2H, SO ₂ CCH
7.65-7.46	<i>mbr</i> , 6H, SO ₂ CCHCH, SO ₂ CCHCHCH
5.82	<i>sbr</i> , 1H, $\text{NCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$
5.56	<i>sbr</i> , 1H, $\text{NCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$
5.37-5.03	<i>mbr</i> , 4H, $\text{NCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$
4.74	<i>sbr</i> , 1H, C(3)H _s
4.58	<i>sbr</i> , 1H, C(3)H
3.95	<i>sbr</i> , 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$
3.71	<i>sbr</i> , 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$
3.54	<i>sbr</i> , 1H, C(2)H ₂
3.40	<i>sbr</i> , 1H, C(2)H ₂
3.16	<i>sbr</i> , 1H, C(2)H ₂
3.02	<i>sbr</i> , 1H, C(2)H ₂
1.41	<i>s</i> , 9H, C(CH ₃) ₃

¹³C-NMR (CDCl₃, 26.6°C, 125.77 MHz):

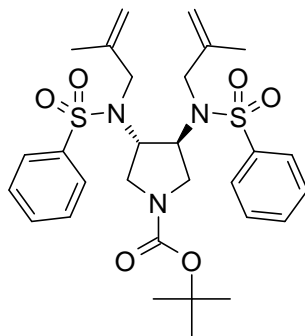
$\delta_{\text{C}}(\text{ppm}) = 154.0$	C=O
140.1	SO ₂ C _{Ar}
134.9, 134.4	C=CH ₂ (Rotamere)
133.2	SO ₂ CCHCH*
129.4	SO ₂ CCHCHCH*
127.7, 127.4	SO ₂ CCH* (Rotamere)
118.8	CH=CH ₂
80.4	OC(CH ₃) ₃
57.8, 57.1	C3 (Rotamere)
47.7, 47.3	CH ₂ C=CH ₂ * (Rotamere)
46.4, 44.7	C2* (Rotamere)
28.5	OC(CH ₃) ₃

MS (ES⁺, RT):

m/z (%) 584 (100, [M+Na]⁺), 1145 (36, [2M+Na]⁺)

EA	C ₂₇ H ₃₅ N ₃ O ₆ S ₂	561.72		
	Ber.:	C: 57.37%	H: 6.28%	N: 7.48%
	Gef.:	C: 57.39%	H: 6.12%	N: 7.43%

(3S,4S)-1-BOC-3,4-Bis-[benolsulfonyl-(2-methyl-allyl)-amino]-pyrrolidin (105)



Die Ausführung der AAV5 mit 241 mg (0.5 mmol) des Sulfonamids **76**, 121 µL (1.2 mmol) 2-Methylallylbromid und 208 mg K₂CO₃ in 4 ml CH₃CN (2 h 0°C, 64 h RT) ergab nach FC (Hexan:EtOAc 2:1) 215 mg (73%) des *N*-alkylierten Sulfonamids **105** in Form farbloser Kristalle. Schmelzpunkt 110°C

¹H-NMR (CDCl₃, 23.3°C, 500.16 MHz):

δ _H (ppm) = 7.91	<i>sbr</i> , 2H, SO ₂ CCH
7.81	<i>sbr</i> , 2H, SO ₂ CCH
7.66-7.46	<i>mbr</i> , 6H, SO ₂ CCHCH, SO ₂ CCHCHCH
5.01-4.71	<i>mbr</i> , 5H, CH ₃ C=CH ₂ , C(3)H
4.61-4.50	<i>mbr</i> , 1H, C(3)H
3.91-3.41	<i>mbr</i> , 6H, NCH ₂ CCH ₃ =CH ₂ , C(2)H ₂
3.25-3.04	<i>mbr</i> , 2H, C(2)H ₂
1.67	<i>sbr</i> , 3H, CH ₃ C=CH ₂
1.61	<i>sbr</i> , 3H, CH ₃ C=CH ₂
1.40	<i>s</i> , 9H, C(CH ₃) ₃

¹³C-NMR (CDCl₃, 24.7°C, 125.77 MHz):

δ _C (ppm) = 153.6	C=O
141.2	SO ₂ C _{Ar} *
139.9	CH ₃ C=CH ₂ *
133.1	SO ₂ CCHCH*
129.4	SO ₂ CCHCHCH*
127.7, 127.4	SO ₂ CCH* (Rotamere)
115.0, 114.9	CH ₃ C=CH ₂ (Rotamere)
80.3	OC(CH ₃) ₃
61.2, 60.1	C3 (Rotamere)
52.2, 51.5	C2 (Rotamere)
47.8, 46.6	CH ₂ C=C (Rotamere)
28.5	OC(CH ₃) ₃
20.1	CH ₃ C=C

MS (ES⁺, RT):

m/z (%) 490 (100, [M-BOC+H]⁺), 590 (47, [M+H]⁺), 612 (57, [M+Na]⁺),
628 (37, [M+K]⁺)

EA

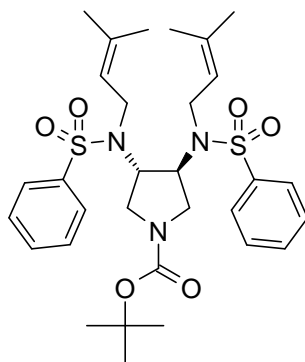
C₂₉H₃₉N₃O₆S₂

589.78

Ber.: C: 59.06% H: 6.67% N: 7.12%

Gef.: C: 59.01% H: 6.64% N: 7.19%

(3S,4S)-1-BOC-3,4-Bis-[benzolsulfonyl-(3-methyl-but-2-enyl)-amino]-pyrrolidin (106)



Unter Verwendung der AAV5 mit 241 mg (0.5 mmol) des Sulfonamids **76**, 139 µL (1.2 mmol) 3,3-Dimethylallylbromid und 208 mg K₂CO₃ in 4 ml CH₃CN (2 h 0°C, 64 h RT) konnten nach FC (Hexan:EtOAc 2:1) 209 mg (68%) des *N*-alkylierten Sulfonamids **106** in Form farbloser Kristalle erhalten werden. Schmelzpunkt 112°C

¹H-NMR (CDCl₃, 22.9°C, 500.16 MHz):

δ _H (ppm) = 7.98-7.87	<i>mbr</i> , 2H, SO ₂ CCH
7.82-7.73	<i>mbr</i> , 2H, SO ₂ CCH
7.63-7.45	<i>mbr</i> , 6H, SO ₂ CCHCH, SO ₂ CCHCH
5.15	<i>sbr</i> , 1H, HC=C(CH ₃) ₂
4.83	<i>sbr</i> , 1H, HC=C(CH ₃) ₂
4.77-4.65	<i>mbr</i> , 1H, NCH ₂ CCH=C(CH ₃) ₂
4.63-4.53	<i>mbr</i> , 1H, NCH ₂ CCH=C(CH ₃) ₂
4.09-3.83	<i>mbr</i> , 2H, NCH ₂ CCH=C(CH ₃) ₂
3.75-3.51	<i>mbr</i> , 3H, C(3)H, C(2)H ₂
3.47-3.38	<i>mbr</i> , 1H, C(2)H ₂
3.29-3.20	<i>mbr</i> , 1H, C(2)H ₂
3.13-3.01	<i>mbr</i> , 1H, C(2)H ₂
1.74-1.51	<i>m</i> , 12H, CH=C(CH ₃) ₂
1.43	<i>s</i> , 9H, C(CH ₃) ₃

¹³C-NMR (CDCl₃, 25.7°C, 125.77 MHz):

δ _C (ppm) = 154.1	C=O
140.7	SO ₂ C _{Ar}
136.0	C=C(CH ₃) ₂
132.8	SO ₂ CCHCH*
129.2	SO ₂ CCHCHCH*
127.7, 127.3	SO ₂ CCH* (Rotamere)
121.3, 120.6	HC=C(CH ₃) ₂ (Rotamere)

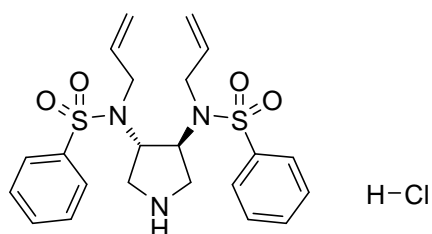
80.4	OC(CH ₃) ₃
57.9, 57.3	C3 (Rotamere)
46.1, 44.8	C2 (Rotamere)
42.9, 42.4	NCH ₂ C=C (Rotamere)
28.5	OC(CH ₃) ₃
25.8	C-HC=C(CH ₃) ₃ <i>trans</i>
17.9	C-HC=C(CH ₃) ₃ <i>cis</i>

MS (ES+, RT):

m/z (%) 618 (33, [M+H]⁺), 640 (100, [M+Na]⁺), 656 (30, [M+K]⁺)

EA	C ₃₁ H ₄₃ N ₃ O ₆ S ₂	617.83		
	Ber.:	C: 60.27%	H: 7.02%	N: 6.80%
	Gef.:	C: 60.35%	H: 7.02%	N: 6.82%

(3S,4S)-3,4-Bis-(allyl-benzolsulfonyl-amino)-pyrrolidin Hydrochlorid (107)



Die Ausführung der AAV7 mit 103 mg (0.19 mmol) des BOC-geschützten Pyrrolidins **104** in 4 ml 2M HCl in Et₂O ergab 72 mg (76%) des Hydrochlorids **107** in Form beiger Kristalle. Schmelzpunkt 178°C

¹H-NMR (CDCl₃, 23.9°C, 500.16 MHz):

δ _H (ppm) = 9.80	<i>sbr</i> , 2H, ⁺ NH ₂
7.88	<i>sbr</i> , 4H, SO ₂ CCH
7.60	<i>sbr</i> , 2H, SO ₂ CCHCHCH
7.53	<i>sbr</i> , 4H, SO ₂ CCHCH
5.68	<i>sbr</i> , 2H, NCH ₂ CH=CH ₂
5.34	<i>sbr</i> , 2H, NCH ₂ CH=CH ₂
5.12	<i>sbr</i> , 2H, NCH ₂ CH=CH ₂
4.83	<i>sbr</i> , 2H, C(3)H
3.85	<i>sbr</i> , 4H, NCH ₂ CH=CH ₂
3.61-3.09	<i>mbr</i> , 4H, C(2)H ₂

¹³C-NMR (CDCl₃, 25.0°C, 125.77 MHz):

δ _C (ppm) = 139.3	SO ₂ C _{Ar}
134.1	CH ₂ CH=CH ₂
133.5	SO ₂ CCHCHCH
129.7	SO ₂ CCHCH
127.7	SO ₂ CCH
119.9	CH ₂ CH=CH ₂
57.3	C3
48.1	C2
44.5	NCH ₂ CH=CH ₂

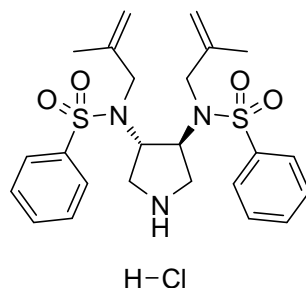
MS (ES+, RT):

m/z (%) 462 (100, [M+H]⁺), 923 (15, [2M+H]⁺)

EA

C ₂₂ H ₂₇ N ₃ O ₄ S ₂ * HCl * H ₂ O	516.08		
Ber.:	C: 51.20%	H: 5.86%	N: 8.14%
Gef.:	C: 50.86%	H: 5.53%	N: 7.90%

(3S,4S)-3,4-Bis-[benzolsulfonyl-(2-methyl-allyl)-amino]-pyrrolidin Hydrochlorid (108)



Die Anwendung der AAV7 mit 124 mg (0.21 mmol) des BOC-geschützten Sulfonamids **105** in 4 ml 2M HCl in Et₂O ergaben 78 mg (71%) des Hydrochlorids **108** in Form farbloser Kristalle. Schmelzpunkt: 107°C

¹H-NMR (CDCl₃, 23.4°C, 500.16 MHz):

δ _H (ppm) = 9.87	<i>sbr</i> , 2H, ⁺ NH ₂
7.88	<i>sbr</i> , 4H, SO ₂ CCHCH
7.61	<i>sbr</i> , 2H, SO ₂ CCHCHCH
7.54	<i>sbr</i> , 4H, SO ₂ CCH
4.97	<i>sbr</i> , 2H, CH ₃ C=CH ₂
4.85	<i>sbr</i> , 2H, CH ₃ C=CH ₂
4.78	<i>sbr</i> , 2H, C(3)H
3.83	<i>d</i> , 2H, ² J = 15.6 Hz, NCH ₂ CCH ₃ =CH ₂
3.73	<i>d</i> , 2H, ² J = 15.1 Hz, NCH ₂ CCH ₃ =CH ₂
3.65-3.44	<i>m</i> , 2H, C(2)H ₂
3.36-3.13	<i>sbr</i> , 2H, C(2)H ₂
1.57	<i>sbr</i> , 6H, CH ₃ C=CH ₂

¹³C-NMR (CDCl₃, 27.3°C, 125.77 MHz):

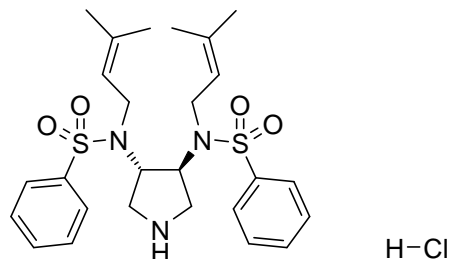
δ _C (ppm) = 140.4	SO ₂ C _{Ar}
139.2	CH ₂ CCH ₃ =CH ₂
133.6	SO ₂ CCHCHCH
129.7	SO ₂ CCHCH
127.8	SO ₂ CCH
115.7	CH ₂ CCH ₃ =CH ₂
59.4	C3
52.1	C2
46.1	NCH ₂ CCH ₃ =CH ₂
20.2	NCH ₂ CCH ₃ =CH ₂

MS (ES+, RT):

m/z (%) 490 (100, [M+H]⁺)

EA	$C_{24}H_{31}N_3O_4S_2 \cdot HCl \cdot 1.5 H_2O$	553.14		
Ber.:	C: 52.11%	H: 6.38%	N: 7.60%	
Gef.:	C: 51.81%	H: 6.00%	N: 7.56%	

(3S,4S)-3,4-Bis-[benzolsulfonyl-(3-methyl-but-2-enyl)-amino]-pyrrolidin Hydrochlorid (109)



Unter Anwendung der AAV7 mit 91 mg (0.15 mmol) des BOC-geschützten Pyrrolidins **106** in 4 ml 2M HCl in Et₂O wurden 65 mg (78%) des Hydrochlorids **109** in Form farbloser Kristalle erhalten. Schmelzpunkt 191°C

¹H-NMR (MeOH-*d*₄, 24.7°C, 500.16 MHz):

$\delta_H(\text{ppm}) = 7.89$	<i>dd</i> , 4H, $^3J = 8.0 \text{ Hz}$, $^4J = 1.4 \text{ Hz}$, SO_2CCH
7.68	<i>t</i> , 2H, $^3J = 7.4 \text{ Hz}$, $\text{SO}_2\text{CCHCHCH}$
7.60	<i>t</i> , 4H, $^3J = 7.7 \text{ Hz}$, SO_2CCHCH
4.92	<i>smul</i> , 2H, $^3J = 6.9 \text{ Hz}$, $\text{HC}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$
4.79	<i>smul</i> , 2H, $^3J = 6.2 \text{ Hz}$, C(3)H
3.85	<i>d</i> , 4H, $^3J = 6.6 \text{ Hz}$, $\text{NCH}_2\text{CCH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$
3.49	<i>dd</i> , 2H, $^2J = 11.9 \text{ Hz}$, $^3J = 8.0 \text{ Hz}$, C(2)H ₂
3.35-3.28	<i>m</i> , 2H, C(2)H ₂
1.66	<i>s</i> , 6H, $\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$
1.60	<i>s</i> , 6H, $\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$

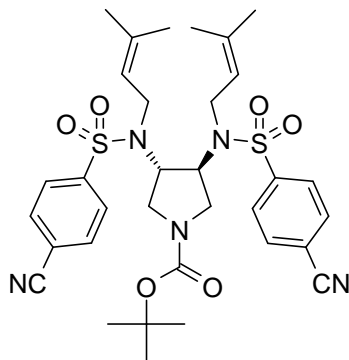
¹³C-NMR (MeOH-*d*₄, 26.2°C, 125.77 MHz):

$\delta_C(\text{ppm}) = 141.7$	$\text{SO}_2\text{C}_{\text{Ar}}$
138.2	$\text{CH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$
134.4	$\text{SO}_2\text{CCHCHCH}$
130.5	SO_2CCHCH
128.6	SO_2CCH
121.1	$\text{CH}_2\text{CCH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$
59.1	C3
45.2	$\text{NCH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2^*$
44.6	C2*
25.9	$\text{C-HC}=\text{C}(\text{CH}_3)_3 \text{ trans}$
18.1	$\text{C-HC}=\text{C}(\text{CH}_3)_3 \text{ cis}$

MS (ES⁺, RT):

m/z (%)	518 (100, [M+H] ⁺)
---------	--------------------------------

EA	$C_{26}H_{35}N_3O_4S_2 \cdot HCl \cdot H_2O$	572.18		
Ber.:	C: 54.58%	H: 6.69%	N: 7.34%	
Gef.:	C: 54.78%	H: 6.36%	N: 7.30%	

(3S,4S)-1-BOC-3,4-Bis-[(4-cyano-benzolsulfonyl)-(3-methyl-but-2-enyl)-amino]-pyrrolidin (113)

Die Anwendung der AAV6 mit 266 mg (0.50 mmol) Sulfonamid **98**, 129 μ l (1.20 mmol) 3,3-Dimethylallylbromid und 208 mg (1.50 mmol) K_2CO_3 in 4 ml CH_3CN (3 h, $0^\circ C$) lieferte nach FC (Hexan:EtOAc 1:1) 320 mg **113** (96%) in Form farbloser Kristalle. Schmelzpunkt $92^\circ C$

1H -NMR ($CDCl_3$, $21.5^\circ C$, 500.16 MHz):

$\delta_H(\text{ppm}) = 8.04$	<i>sbr</i> , 2H, H_{Ar}
7.86	<i>sbr</i> , 6H, H_{Ar}
5.05	<i>sbr</i> , 1H, $\underline{HC}=\underline{C}(\underline{CH}_3)_2$
4.80	<i>sbr</i> , 1H, $\underline{HC}=\underline{C}(\underline{CH}_3)_2$
4.71	<i>sbr</i> , 2H, NCH_2
4.07-3.76	<i>mbr</i> , 3H, NCH_2 , C(3)H
3.72-3.63	<i>mbr</i> , 1H, C(3)H
3.62-3.48	<i>m</i> , 2H, C(2)H ₂
3.33-3.10	<i>m</i> , 2H, C(2)H ₂
1.84-1.52	<i>mbr</i> , 12H, $\underline{C}=\underline{C}(\underline{CH}_3)_2$
1.47	<i>s</i> , 9H, $\underline{C}(\underline{CH}_3)_3$

^{13}C -NMR ($CDCl_3$, $24.4^\circ C$, 125.77 MHz):

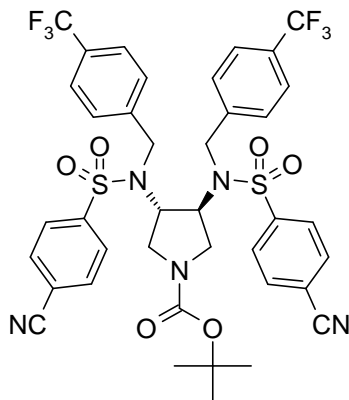
$\delta_C(\text{ppm}) = 153.9$	$\underline{C}=\underline{O}$
145.0	$\underline{SO}_2\underline{C}_{Ar}$
137.4, 137.2	$\underline{C}=\underline{C}(\underline{CH}_3)_2$ (Rotamere)
132.3	\underline{CHCCN}
128.1, 127.9	$\underline{SO}_2\underline{CCH}$ (Rotamere)
120.2, 119.5	$\underline{HC}=\underline{C}(\underline{CH}_3)_2$ (Rotamere)
117.3	\underline{CN}^*
116.5	\underline{CCN}^*
80.8	$\underline{OC}(\underline{CH}_3)_3$
58.3, 57.5	C3 (Rotamere)
45.7, 44.7	C2 (Rotamere)
43.0, 42.8	NCH_2 (Rotamere)
28.4	$\underline{OC}(\underline{CH}_3)_3$
25.8	$\underline{C}-\underline{HC}=\underline{C}(\underline{CH}_3)_2$ <i>trans</i>
17.9	$\underline{C}-\underline{HC}=\underline{C}(\underline{CH}_3)_2$ <i>cis</i>

MS (ES⁺, RT):

m/z (%) 690 (56, [M+Na]⁺), 1357 (100, [2M+Na]⁺)

EA	C ₃₃ H ₄₅ N ₅ O ₆ S ₂	667.85		
	Ber.:	C: 59.35%	H: 6.19%	N: 10.49%
	Gef.:	C: 59.08%	H: 6.23%	N: 10.21%

(3S,4S)-1-BOC-3,4-Bis-[(4-cyano-benzolsulfonyl)-(4-trifluormethyl-benzyl)-amino]-pyrrolidin (112)



Nach AAV5 mit 448 mg (0.84 mmol) Sulfonamid **98**, 483 mg (2.02 mmol) 4-Trifluormethylbenzylbromid und 348 mg (2.52 mmol) K₂CO₃ in 10 ml Acetonitril (7h, Reflux) wurden nach FC (Hexan:EtOAc 3:1) 324 mg (45%) des *N*-alkylierten Sulfonamids **112** in Form farbloser Kristalle erhalten. Schmelzpunkt 117°C

¹H-NMR (CDCl₃, 23.0°C, 500.16 MHz):

δ _H (ppm) = 8.02-7.65	<i>mbr</i> , 8H, SO ₂ CCH, SO ₂ CCHCH
7.50	<i>sbr</i> , 4H, CF ₃ CCH*
7.23	<i>sbr</i> , 4H, CF ₃ CCHCH
4.91-4.60	<i>mbr</i> , 1H, CH ₂ Ar
4.46	<i>dbr</i> , 2H, ² J = 16.0 Hz, CH ₂ Ar
4.31	<i>sbr</i> , 1H, CH ₂ Ar
4.22-3.89	<i>mbr</i> , 2H, C(3)H
3.59-3.21	<i>mbr</i> , 2H, C(2)H ₂
3.13	<i>sbr</i> , 2H, C(2)H ₂
1.41	<i>s</i> , 9H, C(CH ₃) ₃

¹³C-NMR (CDCl₃, 25.3°C, 125.77 MHz):

δ _C (ppm) = 153.5	C=O
143.7	SO ₂ C _{Ar}
139.3	CH ₂ C _{Ar}
133.3	SO ₂ CCHCH
130.9,	<i>q</i> , ² J _{C,F} = 33.6 Hz, F ₃ CC _{Ar}
128.6	CH ₂ CCH*
128.0	SO ₂ CCH*
125.9	CF ₃ CCH*
123.9	<i>q</i> , ¹ J _{C,F} = 272.3 Hz, F ₃ C
117.2	CN*

117.0	$\underline{C}_{Ar}CN^*$
81.3	$\underline{OC}(\underline{CH}_3)_3$
62.0, 60.7	C3 (Rotamere)
49.7, 48.5	C2 (Rotamere)
47.1, 46.3	\underline{CH}_2Ar (Rotamere)
28.4	$\underline{OC}(\underline{CH}_3)_3$

^{19}F -NMR (CDCl₃, 22.7°C, 470.62 MHz):

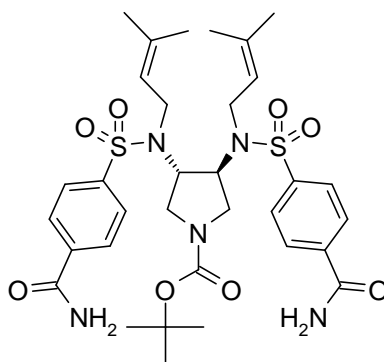
δ_F (ppm) = -62.5 CF₃

MS (ES⁺, RT):

m/z (%) 870 (72, [M+Na]⁺), 1717 (100, [2M+Na]⁺)

EA	C ₃₉ H ₃₅ F ₆ N ₅ O ₆ S ₂	847.86		
Ber.:	C: 55.25%	H: 4.16%	N: 8.26%	
Gef.:	C: 55.27%	H: 4.42%	N: 8.15%	

(3S,4S)-1-BOC-3,4-Bis-[(4-carbamoyl-benzolsulfonyl)-(3-methyl-but-2-enyl)-amino]-pyrrolidin (114)



Unter der Anwendung von AAV6 mit 203 mg (0.30 mmol) des Nitrils **113**, 1.5 ml 30% aq. H₂O₂ und 200 mg (1.50 mmol) K₂CO₃ in 3 ml DMSO konnten 190 mg (86%) des Amids **114** in Form farbloser Kristalle erhalten werden. Schmelzpunkt 117°C

1H -NMR (CDCl₃, 21.3°C, 500.16 MHz):

δ_H (ppm) = 8.03-7.83	<i>m</i> , 6H, SO ₂ CCH, SO ₂ CCH
7.76	<i>sbr</i> , 2H, SO ₂ CCH*
7.03	<i>sbr</i> , 2H NH ₂
6.75	<i>sbr</i> , 2H NH ₂
5.04	<i>sbr</i> , 1H, HC=C(CH ₃) ₂
4.80	<i>sbr</i> , 1H, HC=C(CH ₃) ₂
4.66	<i>sbr</i> , 2H, NCH ₂
4.09-3.81	<i>m</i> , 2H, NCH ₂
3.69	<i>sbr</i> , 2H, C(3)H
3.62-3.43	<i>m</i> , 2H, C(2)H ₂
3.29	<i>sbr</i> , 1H, C(2)H ₂
3.14	<i>sbr</i> , 1H, C(2)H ₂
1.74-1.49	<i>mbr</i> , 12H, C=C(CH ₃) ₂
1.44	<i>s</i> , 9H, C(CH ₃) ₃

¹³C-NMR (CDCl₃, 23.3°C, 125.77 MHz):

δ _C (ppm) = 168.5	<u>C</u> ONH ₂
154.1	O= <u>C</u> OC(CH ₃) ₃
143.6	SO ₂ <u>C</u> _{Ar}
137.6	C= <u>C</u> (CH ₃) ₂
136.9	<u>C</u> _{Ar} CONH ₂
133.0	SO ₂ CCH <u>C</u> H
128.5, 127.7	SO ₂ C <u>C</u> H
120.5, 120.0	<u>H</u> C=C(CH ₃) ₂ (Rotamere)
80.7	OC(CH ₃) ₃
58.4, 57.6	C3 (Rotamere)
46.3, 45.2	C2 (Rotamere)
43.1, 42.9	N <u>C</u> H ₂ (Rotamere)
28.5	OC(<u>C</u> H ₃) ₃
25.8	C-HC=C(<u>C</u> H ₃) ₂ <i>trans</i>
17.9	C-HC=C(<u>C</u> H ₃) ₂ <i>cis</i>

MS (ES⁺, RT):

m/z (%) 726 (100, [M+Na]⁺)

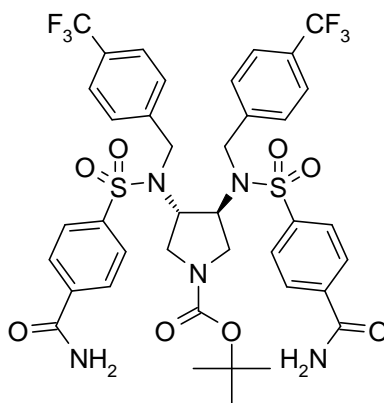
HRMS (ES⁺):

m/z berechnet für C₃₃H₄₅N₅NaO₆S₂ : 726.260727
 gefunden : 726.257679

EA

C ₃₃ H ₄₅ N ₅ O ₈ S ₂ * 1.5 H ₂ O	730.90		
Ber.:	C: 54.23%	H: 6.62%	N: 9.58%
Gef.:	C: 54.34%	H: 6.50%	N: 9.30%

(3*S*,4*S*)-1-BOC-3,4-Bis-[(4-carbamoyl-benzolsulfonyl)-(4-trifluormethyl-benzyl)-amino]-pyrrolidin (115)



Die Anwendung der AAV6 mit 253 mg (0.30 mmol) des Nitrils **112**, 1.5 ml 30% aq. H₂O₂ und 200 mg K₂CO₃ in 3 ml DMSO ergab 190 mg (71%) des Amids **115** in Form farbloser Kristalle. Schmelzpunkt 157°C

¹H-NMR (MeOH-*d*₄, 22.4°C, 500.16 MHz):

$\delta_{\text{H}}(\text{ppm}) =$	8.04-7.92	<i>mbr</i> , 4H, SO ₂ CCH*
	7.89-7.72	<i>mbr</i> , 4H, SO ₂ CCHCH*
	7.53	<i>sbr</i> , 4H, CF ₃ CCH*
	7.46-7.29	<i>mbr</i> , 4H, CF ₃ CCHCH*
	4.78-4.53	<i>mbr</i> , 4H, CH ₂ Ar
	4.31-4.01	<i>mbr</i> , 2H, C(3)H
	3.37-3.12	<i>mbr</i> , 2H, C(2)H ₂
	2.97	<i>sbr</i> , 2H, C(2)H ₂
	1.34	<i>s</i> , 9H, C(CH ₃) ₃

¹³C-NMR (MeOH-*d*₄, 25.4°C, 125.77 MHz):

$\delta_{\text{C}}(\text{ppm}) =$	170.2	C _{CONH₂}
	155.5	C _{COO^tBu}
	143.9	SO ₂ C _{Ar}
	142.6	C _{Ar} CONH ₂
	139.5	CH ₂ C _{Ar}
	131.0,	<i>q</i> , ² <i>J</i> _{C,F} = 31.7 Hz, F ₃ CC _{Ar}
	129.9	CH ₂ CCH*
	129.8	SO ₂ CCHCH*
	128.6	SO ₂ CCH*
	126.5	CF ₃ CCH*
	125.5	<i>q</i> , ¹ <i>J</i> _{C,F} = 271.6 Hz, F ₃ C
	81.8	OC(CH ₃) ₃
	61.8, 61.0	C3 (Rotamere)
	49.6, 48.5	C2 (Rotamere) vom Methanol-Signal überdeckt
	47.6, 47.0	CH ₂ Ar (Rotamere)
	28.5	OC(CH ₃) ₃

¹⁹F-NMR (CDCl₃, 22.0°C, 470.62 MHz):

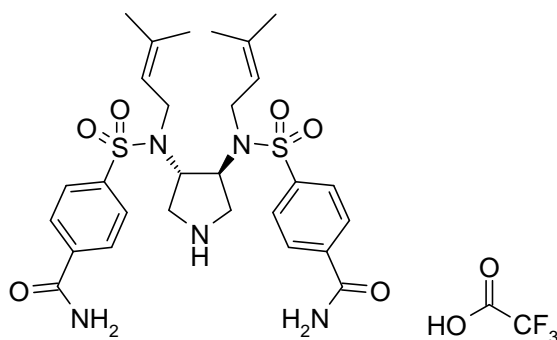
$\delta_{\text{F}}(\text{ppm}) =$	- 63.0	CF ₃
-----------------------------------	--------	-----------------

MS (ES⁺, RT):

<i>m/z</i> (%)	906 (100, [M+Na] ⁺)
----------------	---------------------------------

EA	C ₃₉ H ₃₉ F ₆ N ₅ O ₈ S ₂	883.89		
Ber.:	C: 53.00%	H: 4.45%	N: 7.92%	
Gef.:	C: 52.80%	H: 4.68%	N: 7.63%	

**(3S,4S)-3,4-Bis-[-(4-carbamoyl-benzoylsulfonyl)-(3-methyl-but-2-enyl)-amino]-pyrrolidin
Trifluoracetat (110)**



Unter Verwendung der AAV7 mit 120 mg (0.17 mmol) des BOC-geschützten Pyrrolidins **114** in 5 ml Et₂O ergaben nach Aufreinigung über präparative HPLC das Trifluoracetat **110** in Form farbloser Kristalle; Schmelzpunkt 183°C

¹H-NMR (MeOH-*d*₄, 24.2°C, 500.16 MHz):

δ _H (ppm) = 8.06	<i>d</i> , 4H, ³ <i>J</i> = 8.7 Hz, SO ₂ CCH ₂ *
7.96	<i>d</i> , 4H, ³ <i>J</i> = 8.5 Hz, SO ₂ CCHCH*
4.90	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> = 6.8 Hz, HC=C(CH ₃) ₂
4.81	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> = 6.2 Hz, C(3)
3.87	<i>smul</i> , 4H, NCH ₂ CCH=C(CH ₃) ₂
3.51	<i>dd</i> , 2H, ² <i>J</i> = 12.0 Hz, ³ <i>J</i> = 8.1 Hz, C(2)H ₂
3.34-3.27	<i>m</i> , 2H, C(2)H ₂
1.67	<i>s</i> , 6H, CH=C(CH ₃) ₂
1.60	<i>s</i> , 6H, CH=C(CH ₃) ₂

¹³C-NMR (MeOH-*d*₄, 26.9°C, 125.77 MHz):

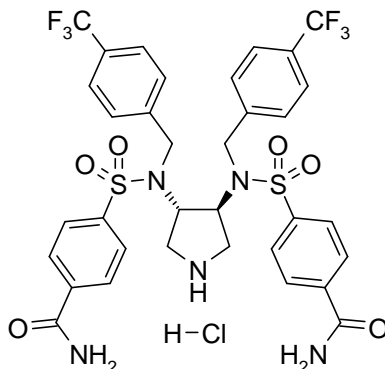
δ _C (ppm) = 170.3	C _{Ar} CONH ₂
144.5	SO ₂ C _{Ar}
139.5	C _{Ar} CONH ₂ *
138.7	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂ *
129.7	SO ₂ CCHCH
128.8	SO ₂ CCHCH
120.9	CH ₂ CCH=C(CH ₃) ₂
59.3	C3
45.4	C2*
44.7	CH ₂ CCH=C(CH ₃) ₂ *
25.9	C-HC=C(CH ₃) ₃ <i>trans</i>
18.0	C-HC=C(CH ₃) ₃ <i>cis</i>

MS (ES+, RT):

m/z (%) 604 (100, [M+H]⁺)

HRMS (ES+):

m/z berechnet für C₂₈H₃₈N₅O₆S₂ : 604.226353
 gefunden : 604.228090

(3S,4S)-3,4-Bis-[(4-carbamoyl-benzolsulfonyl)-(4-trifluoromethyl-benzyl)-amino]-pyrrolidin Hydrochlorid (111)

Die Darstellung erfolgte nach AAV7 mit 148 mg (0.17 mmol) des BOC-geschützten Pyrrolidins **115** in 5 ml 2M HCl in Et₂O und führte zu 110 mg (80%) des Hydrochlorids **111** in Form gelber Kristalle. Schmelzpunkt 194°C (Zersetzung)

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0°C, 500.16 MHz):

δ _H (ppm) = 9.79	<i>sbr</i> , 2H, ⁺ NH ₂
8.23	<i>sbr</i> , 2H, CONH ₂
8.04	<i>sbr</i> , 4H, SO ₂ CCH*
7.83	<i>sbr</i> , 4H, SO ₂ CCHCH*
7.64	<i>sbr</i> , 8H, CH ₂ CCH, CH ₂ CCHCH*
7.60	<i>sbr</i> , 2H, CONH ₂
4.90	<i>sbr</i> , 2H, C(3)H
4.58	<i>sbr</i> , 4H, CH ₂ Ph
3.07	<i>sbr</i> , 2H, C(2)H
2.76	<i>sbr</i> , 2H, C(2)H

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 30.1°C, 125.77 MHz):

δ _C (ppm) = 165.9	C _{Ar} CONH ₂
141.5	SO ₂ C _{Ar}
140.1	C _{Ar} CONH ₂
138.1	CH ₂ C _{Ar}
128.3	CF ₃ CCH*
128.2	SO ₂ CCHCH*
127.5	<i>q</i> , ² J _{C,F} = 32.6 Hz, F ₃ CC _{Ar}
127.1	SO ₂ CCH*
124.5	CH ₂ CCH
123.9	<i>q</i> , ¹ J _{C,F} = 273.5 Hz, F ₃ C
57.6	C3
47.1	C2
42.1	CH ₂ Ar

MS (ES⁺, RT):

m/z (%) 784 (100, [M+H]⁺)

EA	C ₃₄ H ₃₁ F ₆ N ₅ O ₆ S ₂ * HCl * 4 H ₂ O	892.29		
Ber.:	C: 45.77%	H: 4.52%	N: 7.85%	
Gef.:	C: 45.53%	H: 4.32%	N: 7.63%	

6 Literatur

1. Bernstein, F. C. *et al.* The Protein Data Bank: A computer-based Archival File for Macromolecular Structures *Journal of Molecular Biology* **1977**, *112*, 535-542.
2. 2006 Report on the global AIDS epidemic: Executive summary, *UNAIDS*, Genf, **2006**.
3. Coffin, J. *et al.* Human immunodeficiency viruses *Science* **1986**, *232*, 697.
4. Clavel, F. *et al.* Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS *Science* **1986**, *233*, 343-346.
5. Brik, A., Wong, C.-H. HIV-1 protease: mechanism and drug discovery *Organic & Biomolecular Chemistry* **2003**, *1*, 5-14.
6. Ohtaka, H., Schön, A., Freire, E. Multidrug Resistance to HIV-1 Protease Inhibition Requires Cooperative Coupling between Distal Mutations *Biochemistry* **2003**, *42*, 13659-13666.
7. Barre-Sinoussi, F. *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS) *Science* **1983**, *220*, 868-871.
8. Gallo, R. C. *et al.* Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS) *Science* **1983**, *220*, 865-867.
9. Kohl, N. E. *et al.* Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1988**, *85*, 4686-4690.
10. Wlodawer, A. *et al.* Conserved folding in retroviral proteases: crystal structure of a synthetic HIV-1 protease *Science* **1989**, *245*, 616-621.
11. Navia, M. A. *et al.* Three-dimensional structure of aspartyl protease from human immunodeficiency virus HIV-1 *Nature* **1989**, *337*, 615-620.
12. Suguna, K. *et al.* Binding of a reduced peptide inhibitor to the aspartic proteinase from *Rhizopus chinensis*: implications for a mechanism of action *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1987**, *84*, 7009-7013.
13. Prabu-Jeyabalan, M., Nalivaika, E. A., King, N. M., Schiffer, C. A. Viability of a Drug-Resistant Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease Variant: Structural Insights for Better Antiviral Therapy *Journal of Virology* **2003**, *77*, 1306-1315.
14. Prabu-Jeyabalan, M., Nalivaika, E., Schiffer, C. A. How Does a Symmetric Dimer Recognize an Asymmetric Substrate? A Substrate Complex of HIV-1 Protease *Journal of Molecular Biology* **2000**, *301*, 1207-1220.
15. Babine, R. E., Bender, S. L. Molecular Recognition of Protein-Ligand Complexes: Applications to Drug Design *Chemical Reviews* **1997**, *97*, 1359-1472.
16. Randolph, J. T., DeGoey, D. A. Peptidomimetic inhibitors of HIV protease *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2004**, *4*, 1079-1095.
17. Izawa, K., Onishi, T. Industrial Syntheses of the Central Core Molecules of HIV Protease Inhibitors *Chemical Reviews* **2006**, *106*, 2811-2827.
18. Questions and answers of the recall of Viracept, *European Medicines Agency*, Doc. Ref. EMEA/251718/2007, London, **2007**.

19. Chrusciel, R. A., Strohbach, J. W. Non-peptidic HIV protease inhibitors *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2004**, *4*, 1097-1114.
20. Lam, P. Y. *et al.* Rational design of potent, bioavailable, nonpeptide cyclic ureas as HIV protease inhibitors *Science* **1994**, *263*, 380-384.
21. Kaltenbach III, R. F. *et al.* Stereoisomers of Cyclic Urea HIV-1 Protease Inhibitors: Synthesis and Binding Affinities *Journal of Medicinal Chemistry* **1998**, *41*, 5113-5117.
22. Erickson-Viitanen, S. *et al.* Potency and Selectivity of Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Protease by a Small Nonpeptide Cyclic Urea, DMP 323 *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1994**, *38*, 1628-1634.
23. Lam, P. Y. S. *et al.* Cyclic HIV Protease Inhibitors: Synthesis, Conformational Analysis, P2/P2' Structure-Activity Relationship, and Molecular Recognition of Cyclic Ureas *Journal of Medicinal Chemistry* **1996**, *39*, 3514-3525.
24. Victoria A. Johnson *et al.* Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1: Fall 2006 *Topics in HIV Medicine* **2006**, *14*, 125-130.
25. Pomerantz, R. J., Horn, D. L. Twenty years of therapy for HIV-1 infection *Nature Medicine* **2003**, *9*, 867-873.
26. Shehu-Xhilaga, M., Tachedjian, G., Crowe, S. M., Kedzierska, K. Antiretroviral Compounds: Mechanisms Underlying Failure of HAART to Eradicate HIV-1 *Current Medicinal Chemistry* **2005**, *12*, 1705-1719.
27. de Mendoza, C., Soriano, V. Resistance to HIV Protease Inhibitors: Mechanisms and Clinical Consequences *Current Drug Metabolism* **2004**, *5*, 321-328.
28. Ohtaka, H. *et al.* Thermodynamic rules for the design of high affinity HIV-1 protease inhibitors with adaptability to mutations and high selectivity towards unwanted targets *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2004**, *36*, 1787-1799.
29. Jadhav, P. K. *et al.* Cyclic Urea Amides: HIV-1 Protease Inhibitors with Low Nanomolar Potency against both Wild Type and Protease Inhibitor Resistant Mutants of HIV *Journal of Medicinal Chemistry* **1997**, *40*, 181-191.
30. D'Aquila, R. T. *et al.* Drug Resistance Mutations in HIV-1 *Topics in HIV Medicine* **2002**, *10*, 21-25.
31. Specker, E. *et al.* An Old Target Revisited: Two New Privileged Skeletons and an Unexpected Binding Mode For HIV-protease Inhibitors *Angewandte Chemie International Edition in English* **2005**, *44*, 3140-3144.
32. Specker, E. *et al.* Unexpected Novel Binding Mode of Pyrrolidine-Based Aspartyl Protease Inhibitors: Design, Synthesis and Crystal Structure in Complex with HIV Protease *ChemMedChem* **2006**, *1*, 106-117.
33. Tsuge, O., Kanemasa, S., Ohe, M., Takenaka, S. Simple Generation of Nonstabilized Azomethine Ylides through Decarboxylative Condensation of α -Amino Acids with Carbonyl Compounds via 5-Oxazolidinone Intermediates *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **1987**, *60*, 4079-4089.
34. Pandey, G., Banerjee, P., Gadre, S. R. Construction of Enantiopure Pyrrolidine Ring System via Asymmetric [3+2]-Cycloaddition of Azomethine Ylides *Chemical Reviews* **2006**, *106*, 4484-4517.

35. Czodrowski, P., Sotriffer, C. A., Klebe, G. Atypical Protonation States in the Active Site of HIV-1 Protease: A Computational Study *Journal of Chemical Information and Modeling* **2007**, *47*, 1590-1598.
36. Specker, E. *et al.* Hydroxyethylene Sulfones as a New Scaffold To Address Aspartic Proteases: Design, Synthesis, and Structural Characterization *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, *48*, 6607-6619.
37. Kim, E. E. *et al.* Crystal Structure of HIV-1 Protease in Complex with VX-478, a Potent and Orally Bioavailable Inhibitor of the Enzyme *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117*, 1181-1182.
38. Caner, H., Groner, E., Levy, L., Agranat, I. Trends in the development of chiral drugs *Drug Discovery Today* **2004**, *9*, 105-110.
39. Agranat, I., Caner, H., Caldwell, J. Putting Chirality to Work: The Strategy of Chiral Switches *Nature Reviews Drug Discovery* **2002**, *1*, 753-768.
40. Morimoto, Y., Terao, Y., Achiwa, K. Enzymes and Catalysts. I. Pig Liver Esterase-Catalyzed Hydrolysis of Heterocyclic Diesters *Chemical & pharmaceutical bulletin* **1987**, *35*, 2266-2271.
41. Rodríguez Sarmiento, R. M., Wirz, B., Iding, H. Chemoenzymatic preparation of non-racemic *N*-Boc-pyrrolidine-3,4-dicarboxylic acid 3-ethyl esters and their 4-hydroxymethyl derivatives *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 1547-1551.
42. Wang, H., She, J., Zhang, L.-H., Ye, X.-S. Silver(I) Oxide Mediated Selective Monoprotection of Diols in Pyranosides *Journal of Organic Chemistry* **2004**, *69*, 5774-5777.
43. Becker, H. G. O. *et al.* Organikum: organisch-chemisches Grundpraktikum (Wiley-VCH, Weinheim, 2001).
44. Lebel, H., Leogane, O. Boc-Protected Amines via a Mild and Efficient One-Pot Curtius Rearrangement *Organic Letters* **2005**, *7*, 4107-4110.
45. Gothelf, K. V., Jørgensen, K. A. Asymmetric 1,3-Dipolar Cycloaddition Reactions *Chemical Reviews* **1998**, *98*, 863-910.
46. Padwa, A., Chen, Y.-Y., Chiacchio, U., Dent, W. Diastereofacial Selectivity in Azomethine Ylide Cycloaddition Reactions Derived from Chiral α -Cyanoaminosilanes *Tetrahedron* **1985**, *41*, 3529-3535.
47. Wee, A. G. H. π -Facial Selectivity of the 1,3-Dipolar Cycloaddition of the Parent Azomethine Ylide to Homochiral Dipolarophiles *Journal of the Chemical Society - Perkin Transactions 1* **1989**, 1363.
48. Hanessian, S., Yun, H., Hou, Y., Tintelnot-Blomley, M. Stereoselective Synthesis of Constrained Azacyclic Hydroxyethylene Isosteres as Aspartic Protease Inhibitors: Dipolar Cycloaddition and Related Methodologies toward Branched Pyrrolidine and Pyrrolidinone Carboxylic Acids *Journal of Organic Chemistry* **2005**, *70*, 6746-6756.
49. Ferguson, M. L., O'Leary, D. J., Grubbs, R. H. Ring-Closing Metathesis Synthesis of *N*-Boc-3-Pyrroline *Organic Syntheses* **2003**, *80*, 85.
50. Chang, D., Heringa, M. F., Witholt, B., Li, Z. Enantioselective Trans Dihydroxylation of Nonactivated C-C Double Bonds of Aliphatic Heterocycles with *Sphingomonas* sp. HXN-200 *Journal of Organic Chemistry* **2003**, *68*, 8599-8606.

51. Tanner, D. Chiral Aziridines - Their Synthesis and Use in Stereoselective Transformations *Angewandte Chemie International Edition in English* **1994**, *33*, 599-619.
52. Hu, X. E. Nucleophilic ring opening of aziridines *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2701-2743.
53. Huang, J., O'Brien, P. Two-Step Synthesis of *N*-Sulfonyl Aziridines from Epoxides *Synthesis* **2006**, 425-434.
54. Evans, D. A., Bilodeau, M. T., Faul, M. M. Development of the Copper-Catalyzed Olefin Aziridination Reaction *Journal of the American Chemical Society* **1994**, *116*, 2742-2753.
55. Fukuta, Y. *et al.* De Novo Synthesis of Tamiflu via a Catalytic Asymmetric Ring-Opening of *meso*-Aziridines with TMSN₃ *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 6312-6313.
56. Zhao, L., Lu, X., Xu, W. Palladium(II)-Catalyzed Enyne Coupling Reaction Initiated by Acetoxypalladation of Alkynes and Quenched by Protonolysis of the Carbon-Palladium Bond *Journal of Organic Chemistry* **2005**, *70*, 4059-4063.
57. Gawroński, J., Gawrońska, K. Tartaric and Malic Acids in Synthesis: A Source Book of Building Blocks, Ligands, Auxiliaries and Resolving Agents (John Wiley & Sons, New York, 1999).
58. Nagel, U. Asymmetric Hydrogenation of α -(Acetylamino)cinnamic Acid with a Novel Rhodium Complex; the Design of an Optimal Ligand *Angewandte Chemie International Edition in English* **1984**, *23*, 435-436.
59. Nagel, U., Kinzel, E., Andrade, J., Prescher, G. Enantioselektive Katalyse, 4. Synthese *N*-substituierter (*R,R*)-3,4-Bis(diphenylphosphino)-pyrrolidine und Anwendung ihrer Rhodiumkomplexe zur asymmetrischen Hydrierung von α -(Acylamino)acrylsäure-Derivaten *Chemische Berichte* **1986**, *119*, 3326-3343.
60. Skarzewski, J., Gupta, A. Synthesis of C₂ symmetric primary vicinal diamines. Double stereospecific Mitsunobu reaction on the heterocyclic diols derived from tartaric acid *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 1861-1867.
61. Rocha Gonsalves, A. M. d. A. *et al.* Pyrrolidine-based amino alcohols: novel ligands for the enantioselective alkylation of benzaldehyde *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* **2003**, *195*, 1-9.
62. Alimardanov, A. R. *et al.* Use of DOE for Rapid Development of a Red-Al Reduction Process for the Synthesis of 3,4-Isopropylidenedioxypyrrolidine Hydrotosylate *Organic Process Research & Development* **2004**, *8*, 834-837.
63. Mandell, L., Lee, D. E., Courtney, L. F. Protection of a Substituted Catechol Whose Derivatives Are Subject to Steric Labilization *Journal of Organic Chemistry* **1982**, *47*, 731-734.
64. Brooks, P. R. *et al.* Boron Trichloride/Tetra-*n*-Butylammonium Iodide: A Mild, Selective Combination Reagent for the Cleavage of Primary Alkyl Aryl Ethers *Journal of Organic Chemistry* **1999**, *64*, 9719-9721.
65. Herr, J. R. A Whirlwind Tour of Current Mitsunobu Chemistry *Technical Reports Albany Molecular Research Inc* **1999**, *3*, 1-36.
66. Brauer, G., Baudler, M. Handbuch der präparativen anorganischen Chemie (Enke, Stuttgart, 1960).

67. Viaud, M. C., Rollin, P. Zinc Azide Mediated Mitsunobu Substitution. An Expedient Method for the One-Pot Azidation of Alcohols *Synthesis* **1990**, 130-132.
68. Bräse, S., Gil, C., Knepper, K., Zimmermann, V. Organische Azide - explodierende Vielfalt bei einer einzigartigen Substanzklasse *Angewandte Chemie* **2005**, *117*, 5320-5374.
69. Mitsunobu, O. The Use of Diethyl Azodicarboxylate and Triphenylphosphine in Synthesis and Transformation of Natural Products *Synthesis* **1981**, 1.
70. Fukuyama, T., Jow, C.-K., Cheung, M. 2- and 4-Nitrobenzenesulfonamides: Exceptionally Versatile Means for Preparation of Secondary Amines and Protection of Amines *Tetrahedron Letters* **1995**, *36*, 6373-6374.
71. Tsunoda, T. *et al.* Carbon-Carbon Bond Formation with New Mitsunobu Reagents *Tetrahedron Letters* **1995**, *36*, 2531-2534.
72. Olmstead, W. N., Bordwell, F. G. Ion-Pair Association Constants in Dimethyl Sulfoxide *Journal of Organic Chemistry* **1980**, *45*, 3299-3305.
73. Bordwell, F. G., Branca, J. C., Bares, J. E., Filler, R. Enhancement of the Equilibrium Acidities of Carbon Acids by Polyfluoroaryl Substituents *Journal of Organic Chemistry* **1988**, *53*, 780-782.
74. Tsunoda, T., Ozaki, F., Itô, S. Novel Reactivity of Stabilized Methylenetriethylphosphorane: A New Mitsunobu Reagent *Tetrahedron Letters* **1994**, *35*, 5081-5082.
75. Schumacher, K. K., Jiang, J., Joullié, M. M. Synthetic studies toward astins A, B and C. Efficient syntheses of *cis*-3,4-dihydroxyprolines and (-)-(3*S*,4*R*)-dichloroproline esters *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 47-53.
76. Barrett, A. G. M. *et al.* Nucleophilic Substitution Reactions of (Alkoxyethylene)dimethylammonium Chloride *Journal of Organic Chemistry* **1998**, *63*, 6273-6280.
77. Kuppert, D. *et al.* The Coordination Chemistry of *cis*-3,4-Diaminopyrrolidine and Related Polyamines *European Journal of Inorganic Chemistry* **2001**, 2525-2542.
78. Marson, C. M., Melling, R. C. Enantioselective Syntheses of *trans*-3,4-Difluoropyrrolidines and Investigation of Their Applications in Catalytic Asymmetric Synthesis *Journal of Organic Chemistry* **2005**, *70*, 9771-9779.
79. Ryan, K., Gershell, L. J., Still, C. W. A Synthetic Receptor Motif Designed for Extended Peptide Conformations *Tetrahedron* **2000**, *56*, 3309-3318.
80. Diéguez, M. *et al.* Iridium complexes with new 1,2-dithioether chiral ligands containing a rigid cyclic backbone. Application in homogeneous catalytic asymmetric hydrogenation *Journal of the Chemical Society - Dalton Transactions* **1998**, 3517-3511.
81. Popsavin, V. *et al.* A total synthesis of (+)-oxybiotin from D-arabinose *Tetrahedron* **2004**, *60*, 5225-5235.
82. Nyasse, B. *et al.* Synthesis and cathodic cleavage of a set of substituted benzenesulfonamides including the corresponding *tert*-butyl sulfonylcarbamates: p*K*_a of sulfonamides *Journal of the Chemical Society - Perkin Transactions 1* **1995**, 2025-2031.

83. Koppel, I. *et al.* Acidity of Imidodicarbonates and Tosylcarbamates in Dimethyl Sulfoxide. Correlation with Yields in the Mitsunobu Reaction *Journal of Organic Chemistry* **1991**, *56*, 7172-7174.
84. Inoue, T., Liu, J.-F., Buske, D. C., Abiko, A. Boron-Mediated Aldol Reaction of Carboxylic Esters: Complementary Anti- and Syn-Selective Asymmetric Aldol Reactions *Journal of Organic Chemistry* **2002**, *67*, 5250-5256.
85. Gerber, P., Müller, K. MAB, a generally applicable molecular force field for structure modelling in medicinal chemistry *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **1995**, *9*, 251-268.
86. de Meijere, A., Diederich, F. Metal-Catalyzed Cross-Coupling Reactions (Wiley-VCH, Weinheim, 2004).
87. Herrmann, W. A., Böhm, V. P. W., Reisinger, C.-P. Application of palladacycles in Heck type reactions *Journal of Organometallic Chemistry* **1999**, *576*, 23-41.
88. Lee, S., Jørgensen, M., Hartwig, J. F. Palladium-Catalyzed Synthesis of Arylamines from Aryl Halides and Lithium Bis(trimethylsilyl)amide as an Ammonia Equivalent *Organic Letters* **2001**, *3*, 2729-2732.
89. Jaime-Figueroa, S., Liu, Y., Muchowski, J. M., Putman, D. G. Allyl Amines as Ammonia Equivalents in the Preparation of Anilines and Heteroarylamines *Tetrahedron Letters* **1998**, *39*, 1313-1316.
90. Hartwig, J. F. *et al.* Room-Temperature Palladium-Catalyzed Amination of Aryl Bromides and Chlorides and Extended Scope of Aromatic C-N Bond Formation with a Commercial Ligand *Journal of Organic Chemistry* **1999**, *64*, 5575-5580.
91. Kaiser, N.-F. K., Hallberg, A., Larhed, M. In Situ Generation of Carbon Monoxide from Solid Molybdenum Hexacarbonyl. A Convenient and Fast Route to Palladium-Catalyzed Carbonylation Reactions *Journal of Combinatorial Chemistry* **2002**, *4*, 109-111.
92. Wannberg, J., Larhed, M. Increasing Rates and Scope of Reactions: Sluggish Amines in Microwave-Heated Aminocarbonylation Reactions under Air *Journal of Organic Chemistry* **2003**, *68*, 5750-5753.
93. Yamazaki, K., Kondo, Y. Carbonylation Reaction of Aryl Halides on a Polymer Support Using In Situ-Generated Carbon Monoxide without the Assistance of Microwaves *Journal of Combinatorial Chemistry* **2004**, *6*, 121-125.
94. Hyland, L. J., Tomaszek Jr., T. A., Meek, T. D. Human Immunodeficiency Virus-1 Protease. 2. Use of pH Rate Studies and Solvent Kinetic Isotope Effects To Elucidate Details of Chemical Mechanism *Biochemistry* **1991**, *30*, 8454-8463.
95. Ido, E., Han, H.-p., Kezdy, F. J., Tang, J. Kinetic Studies of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease and Its Active-site Hydrogen Bond Mutant A28S *The Journal of Biological Chemistry* **1991**, *266*, 24359-24366.
96. Czodrowski, P. Prediction of protonation states in ligand-protein complexes upon ligand binding, Dissertation Philipps-Universität Marburg, **2006**.
97. Prabu-Jeyabalan, M., Nalivaika, E., Schiffer, C. A. Substrate Shape Determines Specificity of Recognition for HIV-1 Protease: Analysis of Crystal Structures of Six Substrate Complexes *Structure* **2002**, *10*, 369-381.
98. Kettler, K. *et al.* Novel lead structures for antimalarial farnesyltransferase inhibitors *Pharmazie* **2005**, *60*, 323-327.

99. Imamura, S. *et al.* CCR5 antagonists as anti-HIV-1 agents. Part 3: Synthesis and biological evaluation of piperidine-4-carboxamide derivatives *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2005**, *13*, 397-416.
100. Varma, R. S., Naicker, K. P. The Urea-Hydrogen Peroxide Complex: Solid-State Oxidative Protocols for Hydroxylated Aldehydes and Ketones (Dakin Reaction), Nitriles, Sulfides, and Nitrogen Heterocycles *Organic Letters* **1999**, *1*, 189-192.
101. Katritzky, A. R., Pilarski, B., Urogdi, L. Efficient Conversion of Nitriles to Amides with Basic Hydrogen Peroxide in Dimethyl Sulfoxide *Synthesis* **1989**, 949-950.
102. Athanasiou-Malaki, E., Koupparis, M. A., Hadjiioannou, T. P. Kinetic Determination of Primary and Secondary Amines Using a Fluoride-Selective Electrode and Based on Their Reaction with 1-Fluoro-2,4-dinitrobenzene *Analytical Chemistry* **1989**, *61*, 1358-1363.
103. Klotz, I. M., Gruen, D. M. The Isoelectric Nature of Sulfanilamide and p-Aminobenzoic Acid *Journal of the American Chemical Society* **1945**, *67*, 843-846.
104. Knochel, P., Singer, R. D. Preparation and Reactions of Polyfunctional Organozinc Reagents in Organic Synthesis *Chemical Reviews* **1993**, *93*, 2117-2188.
105. Kosugi, M. *et al.* Novel Hydroxymethylation of Aryl Bromides by Means of Organotin Reagents *Chemistry Letters* **1985**, 997-998.
106. Li, Q., Fan, Q.-H., Zhang, L.-H., Ye, X.-S. Selective Reduction of Azido Groups in Monosaccharides with Triphenyl-phosphine *Synlett* **2006**, 2464-2468.
107. Demko, Z. P., Sharpless, K. B. An Intramolecular [2 + 3] Cycloaddition Route to Fused 5-Heterosubstituted Tetrazoles *Organic Letters* **2001**, *3*, 4091-4094.
108. Searles, S., Tamres, M., Block, F., Quarterman, L. A. Hydrogen Bonding and Basicity of Cyclic Imines *Journal of the American Chemical Society* **1956**, *78*, 4917-4920.
109. Vieira, E. *et al.* Substituted piperidines - highly potent renin inhibitors due to induced fit adaptation of the active site *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1999**, *9*, 1397-1402.
110. Güller, R. *et al.* Piperidine-Renin Inhibitors Compounds with Improved Physicochemical Properties *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1999**, *9*, 1403-1408.
111. Prade, L. *et al.* X-ray Structure of Plasmepsin II Complexed with a Potent Achiral Inhibitor *The Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280*, 23837-23843.
112. John, V. *et al.* Human β -Secretase (BACE) and BACE Inhibitors *Journal of Medicinal Chemistry* **2003**, *46*, 4625-4630.
113. Chen, J.-R., Li, X.-Y., Xing, X.-N., Xiao, W.-J. Sterically and Electronically Tunable and Bifunctional Organocatalysts: Design and Application in Asymmetric Aldol Reaction of Cyclic Ketones with Aldehydes *Journal of Organic Chemistry* **2006**, *71*, 8198-8202.
114. Siedlecka, R., Wojaczyńska, E., Skarżewski, J. Chiral pyrrolidine thioethers: effective nitrogen-sulfur donating ligands in palladium-catalyzed asymmetric allylic alkylations *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 1437-1444.
115. Rejman, D. *et al.* Synthesis of diastereomeric 3-hydroxy-4-pyrrolidinyl derivatives of nucleobases *Tetrahedron* **2007**, *63*, 1243-1253.

ERKLÄRUNG

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Strukturbasiertes Design und Synthese von Pyrrolidinen als Inhibitoren der HIV-1-Protease“

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 04.10.2007

.....
(Andreas Blum)

Danksagung

Meinen Betreuern *Prof. Dr. Gerhard Klebe* und *Dr. Wibke E. Diederich* danke ich für die interessante Aufgabenstellung meiner Doktorarbeit. Sie haben mir die Freiheit gelassen eigene Ideen in das Projekt einzubringen und mir die Möglichkeit gegeben, diese schließlich auch umzusetzen. Ihre Diskussionsbereitschaft und Ihr Engagement haben die Arbeit immer wieder vorangebracht. Auch für ihre Unterstützung bei der Interpretation und Präsentation der gewonnenen Erkenntnisse bin ich Ihnen zu großem Dank verpflichtet. *Dr. Wibke E. Diederich* möchte ich noch einmal ganz besonders für Ihre bereitwillige und wertvolle Unterstützung bei der Erstellung dieses Dokumentes danken.

Beim Fonds der Chemischen Industrie bedanke ich mich für die großzügige Unterstützung meiner Arbeit durch ein Stipendium.

Jark Böttcher danke ich für die exzellente und freundschaftliche Zusammenarbeit als HIV-Protease-Team. Diese Kooperation hat die Arbeit in dieser Form erst möglich gemacht.

Meinem Laborkollegen *Hans-Dieter Gerber* danke ich für seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft, das zur Verfügung stellen seines großen Erfahrungsschatzes, seine wertvolle und selbstlose Unterstützung sowie für eine äußerst angenehme und produktive Arbeitsatmosphäre.

Steffi Dörr und *Andreas Schmidt* danke ich für Ihre Unterstützung durch die Synthese von Ausgangsverbindungen. *Steffi* möchte ich ganz besonders für die schnelle und exzellente Ausführung meiner Syntheseaufträge danken.

Meinen Kollegen aus dem Arbeitskreis Diederich *Dr. Sascha Brass* und *Nan-Si Chan* danke ich für die freundliche Aufnahme im Gebäude B und ihre bereitwillige und zuverlässige Unterstützung als Erstsemesterassistenten. *Sascha* danke ich des Weiteren für die Einführung in die Synthese von Pyrrolidin-Derivaten.

Außerdem danke ich den Mitarbeitern der Service-Abteilung des Fachbereichs Pharmazie der Philipps-Universität Marburg für ihre Arbeit, die einen reibungslosen Ablauf der Forschung ermöglichte.

Prof. Dr. Torsten Steinmetzer danke ich für die Einführung in die *reversed-phase* Chromatographie und für das zur Verfügung stellen seiner HPLC.

Den ehemaligen Kollegen aus der Arbeitsgruppe Klebe *Dr. Christof Gerlach* und *Dr. Matthias Zentgraf* danke ich für die Einführung in die Welt des computergestützten Designs und ihre Unterstützung in jeglichen Fragen des Modellings.

Alexander Hillebrecht danke ich für die Einführung in die praktischen Aspekte von QSAR-Methoden und für seine freundschaftliche Unterstützung vor allem beim Erarbeiten und zur Verfügung stellen von zahlreichen Skripten.

Den Mitgliedern der Arbeitskreise Klebe und Diederich danke ich für die gute Atmosphäre, vielen ehemaligen Mitglieder für die Bereitschaft zur kritischen Diskussion die gerade in der Anfangszeit des Projektes eine große Hilfe war.

Prof. Dr. Christoph Sotriffer danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit bei der Organisation des Ersten Semesters. Den Assistentenkollegen danke ich für die gute Zusammenarbeit als Erstsemesterteam.

Angela Scholz danke ich für ihre unermüdliche und professionelle Unterstützung in allen administrativen Belangen.

Meiner Freundin *Astrid Horn* danke ich für ihre vielfältige, unermüdliche Unterstützung und Motivation während meiner Doktorarbeit insbesondere in der Zeit der Erstellung dieses Dokumentes.

Meinen Eltern bin ich zu größtem Dank verpflichtet, da sie mir durch ihre Unterstützung mein Studium und diese Arbeit erst ermöglicht haben.

Veröffentlichungen

Aus der vorliegenden Arbeit sind folgende Publikationen, Vorträge und Posterbeiträge hervorgegangen:

Artikel

- *Structure-Guided Design of C₂-Symmetric HIV-1 Protease Inhibitors Based on a Pyrrolidine Scaffold*

Andreas Blum, Jark Böttcher, Andreas Heine, Gerhard Klebe und Wibke E. Diederich

Journal of Medicinal Chemistry, eingereicht.

Vorträge

- *Structure-based Drug Design to Develop Selective and Resistance-breaking HIV protease Inhibitors*

Andreas Blum, Jark Böttcher, Gerhard Klebe und Wibke E. Diederich

EMBO Workshop on Integrated Approaches in Structural Enzymology - "The chemistry and biochemistry of catalysis by biological systems", Hamburg, Juni 2007.

- *Structure-Based Design of Pyrrolidines as HIV Protease Inhibitors*

Andreas Blum, Jark Böttcher, Gerhard Klebe und Wibke E. Diederich

Annual Meeting "Frontiers in Medicinal Chemistry", Berlin, März 2007.

- *Functionalized Pyrrolidines - A new class of HIV-Protease Inhibitors*

Andreas Blum, Jark Böttcher, Gerhard Klebe und Wibke E. Diederich

1st European Chemistry Congress, Budapest, August 2006.

- *3,4-Disubstituierte Pyrrolidine als HIV-Protease Inhibitoren*

Andreas Blum, Jark Böttcher, Gerhard Klebe und Wibke E. Diederich

Treffen der Stipendiaten des Fonds der Chemischen Industrie, Göttingen, Januar 2006.

Poster

- *Development of 3,4-Disubstituted Pyrrolidines as HIV-Protease Inhibitors*

Andreas Blum, Jark Böttcher, Gerhard Klebe und Wibke E. Diederich

Tetrahedron Symposium 2007: Challenges in Organic Chemistry, Berlin, Juni 2007.

- *Structure-Based Design of Pyrrolidines as HIV Protease Inhibitors*

Andreas Blum, Jark Böttcher, Gerhard Klebe und Wibke E. Diederich

Annual Meeting "Frontiers in Medicinal Chemistry", Berlin, März 2007.

Mit einem Posterpreis ausgezeichnet.

- *Design and Synthesis of tailor-made compounds libraries via a knowledge-based approach - A case study*
Wibke E. Diederich, Christof Gerlach, Andreas Blum, Jark Böttcher, Sascha Brass, Torsten Luksch, Gerhard Klebe
Abstract of Papers, 323rd ACS National Meeting, San Francisco, CA, September 2006.
- *Identification of azacycles as privileged ligand scaffolds for the design and synthesis of aspartic protease inhibitors*
Andreas Blum, Sascha Brass, Nan-Si Chan, Wibke E. Diederich
Abstract of Papers, 323rd ACS National Meeting, San Francisco, CA, September 2006.
- *HIV-Protease Inhibitors based on 3,4-Disubstituted Pyrrolidines*
Andreas Blum, Jark Böttcher, Gerhard Klebe und Wibke E. Diederich
Annual Meeting "Frontiers in Medicinal Chemistry", Frankfurt, März 2006.
- *Development of 3,4-Disubstituted Pyrrolidines as Potent non-peptidic Inhibitors of HIV-protease*
Andreas Blum, Jark Böttcher, Gerhard Klebe und Wibke E. Diederich
DPhG-Jahrestagung Mainz, Oktober 2005.

LEBENS LAUF ANDREAS BLUM

Geburtsdatum: 01.05.1979

Geburtsort: Hannover

Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung

1985 - 1989 Grundschule Wächtersbach

1989 - 1995 Gymnasialer Zweig der Gesamtschule Wächtersbach

1995 - 1998 Grimmelshausen Gymnasium Gelnhausen

06/1998 Abitur (Leistungskurse: Mathematik und Chemie)

10/1999 - 10/2001 Studium der Chemie an der Universität Karlsruhe (TH)

10/2001 Vordiplom in Chemie

10/2001 - 05/2004 Studium der Chemie an der Philipps-Universität Marburg

11/2003 - 05/2004 Diplomarbeit an der Philipps-Universität Marburg bei Prof. Dr. A. Studer, „Stereokontrollierte Synthese von Alkenen und Vinylsilanen mittels homolytischer Substitution am Silizium“

05/2004 Diplom in Chemie

09/2004 - 11/2007 Dissertation an der Philipps-Universität Marburg bei Dr. W. E. Diederich und Prof. Dr. G. Klebe, „Strukturbasiertes Design und Synthese von Inhibitoren der HIV-1-Protease“

09/2005 Teilnahme an der Sommerschule Wirkstoffdesign an der Universität Wien

Lehrtätigkeit

Seit 10/2004 Assistent im Praktikum „Qualitative Analyse anorganischer Stoffe“, 1. Semester Pharmazie

Seit 04/2005 Leitender Assistent des Praktikums

Zivildienst

08/1998 - 09/1999 Zivildienst beim „Malteser Hilfsdienst“ in Gelnhausen, Krankentransport, Fahrdienst und Organisation von „Essen auf Rädern“