

Strukturbasiertes Design, Synthese und Affinitätsbestimmung neuartiger HIV-1-Protease- Inhibitoren

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

Dem

Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Nina Klee
aus Marburg

Marburg 2013

Vom Fachbereich Pharmazie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 23.01.2013
angenommen.

Erstgutachter: Prof. Wibke Diederich

Zweitgutachter: Prof. Gerhard Klebe

Tag der mündlichen Prüfung am 24.01.2013

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden auf Anregungen von Frau Prof. Dr. Wibke E. Diederich am Institut für Pharmazeutische Chemie des Fachbereiches Pharmazie der Philipps-Universität Marburg in der Zeit von Dezember 2008 bis November 2012 durchgeführt.

1	EINLEITUNG	1
1.1	Strukturbasiertes Wirkstoffdesign	1
1.2	HIV und AIDS	3
1.3	Antiretrovirale Therapie	5
1.4	Resistenzentwicklungen des HI-Virus	12
1.5	Die HIV-Protease	12
1.6	HIV-Protease-Inhibitoren - Stand der Forschung	16
2	VORARBEITEN UND AUFGABENSTELLUNG	24
2.1	Pyrrolidine als neues Grundgerüst zur Inhibition der HIV-Protease	24
2.2	Ziel der Arbeit	27
3	DREIARMIGE PYRROLIDIN-BASIERTE-INHIBITOREN DER HIV-PROTEASE	30
3.1	Docking	30
3.2	Synthese	40
3.2.1	Möglichkeiten zur Desymmetrisierung	40
3.2.2	Syntheserouten zur effizienten Variation aller drei Substituenten der Inhibitoren	44
3.3	Testung der Enzymhemmung	49
3.4	Röntgenstrukturanalyse	52
3.5	Optimierung der einzelnen Substituenten	57
3.5.1	Optimierung R1	57
3.5.1.1	Design	57
3.5.1.2	Synthese	58
3.5.1.3	Affinitätsbestimmung	58
3.5.1.4	Kristallstrukturanalyse	59
3.5.2	Optimierung R2	62
3.5.2.1	Design	62
3.5.2.2	Synthese	62
3.5.2.3	Affinitätsbestimmung	63
3.5.3	Optimierung R3	64
3.5.3.1	Design	64
3.5.3.2	Synthese	66
3.5.3.3	Affinitätsbestimmung	66
3.5.3.4	Kristallstrukturanalyse	67
3.5.4	Ersatz des exozyklischen Stickstoffs durch ein Schwefel-Atom	68
3.5.4.1	Design	68
3.5.4.2	Synthese	69
3.5.4.3	Affinitätsbestimmung	73
3.5.5	Kombination der besten Arme	74
3.5.5.1	Design	74
3.5.5.2	Synthese	77
3.5.5.3	Affinitätsbestimmung	78
3.6	Zellassays	79
3.7	Zusammenfassung und Ausblick: Dreiarmige Pyrrolidin-basierte Inhibitoren der HIV-Protease	80

4	PYRROLIDIN-BASIERTE BICYCLEN ALS INHIBITOREN DER HIV-PROTEASE.....	83
4.1	Design.....	83
4.1.1	Docking.....	85
4.2	Synthese.....	93
4.3	Testung der Enzymhemmung.....	97
4.4	Röntgenstrukturanalyse.....	98
4.5	Adressierung der S1-Bindetasche.....	101
4.5.1	Design.....	101
4.5.2	Synthese.....	103
4.5.3	Testung der Enzymhemmung.....	105
4.5.4	Kristallstrukturanalyse.....	107
4.6	Eliminierung einer der beiden Carbonyl-Funktion.....	109
4.6.1	Design.....	109
4.6.2	Synthese.....	111
4.6.3	Testung der Enzymhemmung.....	111
4.6.4	Kristallstrukturanalyse.....	112
4.7	Zellassay.....	113
4.7.1	Bestimmung der Zellaktivität.....	113
4.7.2	Carbamat-Prodrugs.....	114
4.7.2.1	Synthese.....	114
4.7.2.2	Bestimmung der Zellaktivität der Carbamat-Prodrugs.....	115
4.8	Zusammenfassung und Ausblick: Bizyclische Inhibitoren der HIV-Protease.....	117
5	FRAGMENTE IN DER HIV-PROTEASE.....	122
5.1	Ausgangspunkt und Idee.....	122
5.2	Dockingexperimente.....	123
5.3	Affinitätsbestimmung.....	125
5.4	Kristallstrukturanalyse.....	126
5.5	Fragment 106.....	129
5.6	Zusammenfassung und Ausblick: Fragmente in der HIV-Protease.....	130
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	134
7	EXPERIMENTAL TEIL.....	136
7.1	Allgemeine Anmerkungen.....	136
7.2	Arbeitsvorschriften und Charakterisierung der synthetisierten Verbindungen.....	139
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	313
9	LITERATURVERZEICHNIS.....	316
10	ANHANG.....	322
10.1	Erklärung.....	322
10.2	Danksagung.....	323
10.3	Lebenslauf.....	325

1 EINLEITUNG

1.1 Strukturbasiertes Wirkstoffdesign

Das strukturbasierte Wirkstoffdesign ist ein wichtiges Werkzeug der Medizinischen Chemie, dessen Ziel es ist, einen möglichst potenten Liganden für ein bestimmtes Protein zu entwerfen, um diesen dann in einem iterativen Prozess aus Computer-gestütztem Design, Synthese und biologischer Testung zu optimieren. Essentielle Voraussetzung für das strukturbasierte Wirkstoffdesign sind Kenntnisse über die Struktur des Zielproteins. Im Idealfall existiert bereits eine dreidimensionale Struktur des Zielproteins in Komplex mit einem Liganden. Alternativ kann man auf eine ligandenfreie Struktur oder ein Modell zurückgreifen, welches sich von einer dreidimensionalen Struktur eines nah verwandten Homologen des Zielproteins ableitet. [1] Da solche Strukturinformationen den Ausgangspunkt des strukturbasierten Wirkstoffdesigns bilden, war die Entwicklung der Protein Data Bank (PDB) im Jahr 1971 eine entscheidende Voraussetzung für den Erfolg der Methode. Die PDB ist eine frei zugängliche Datenbank mit experimentell bestimmten dreidimensionalen Strukturen von großen Biomolekülen wie Proteinen und Nukleinsäuren. Seit ihrer Erstellung ist die Anzahl der hinterlegten Strukturen nahezu exponentiell gewachsen (Abbildung 1) [2]

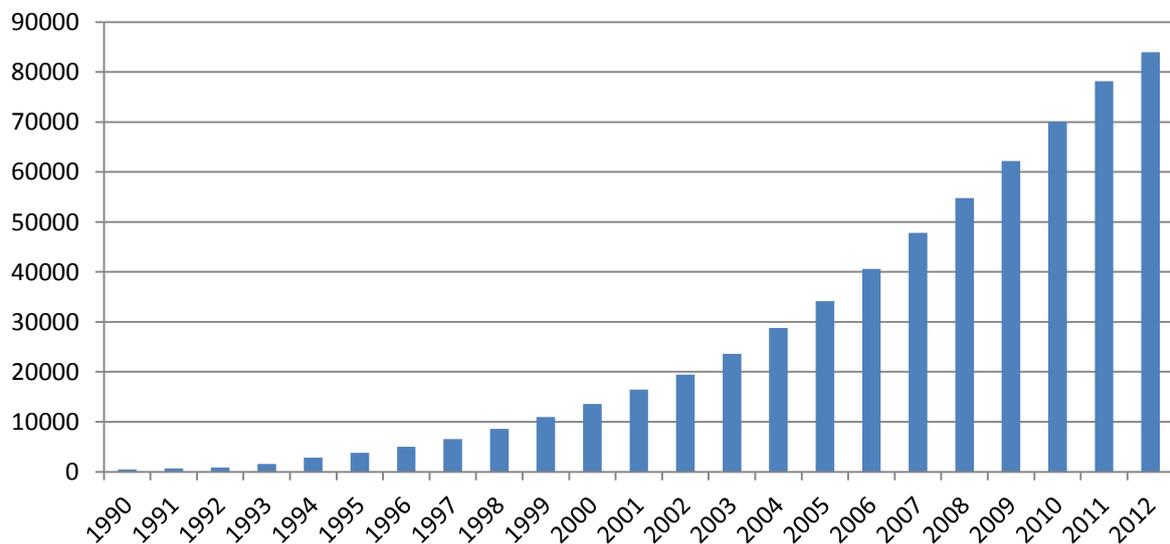


Abbildung 1: Anzahl hinterlegter Strukturen in der PDB von 1990 bis 2012 [2]

Existiert eine dreidimensionale Struktur des Zielproteins, kann im Rahmen des strukturbasierten Wirkstoffdesigns ein so genanntes virtuelles Screening, ein *de novo*-Design oder eine Variation bereits vorhandener Leitstrukturen zur Ermittlung geeigneter Liganden herangezogen werden. Im ersten Fall werden große Molekül-Datenbanken mit Hilfe von

Computerprogrammen in kurzer Zeit in die Bindetasche des Zielproteins eingepasst (Docking) und nach ihrer Eignung als Liganden bewertet (Scoring). Dadurch werden neue Ideen für Leitstrukturen erhalten. Beim *de novo*-Design wird die Bindetasche des Zielproteins auf mögliche Wechselwirkungen hin untersucht und völlig neue Strukturen entworfen, die diese Wechselwirkungen ausbilden können. [1]

Existiert bereits eine Leitstruktur für ein Protein, kann diese durch gezielte Variation, Docking und Scoring solange optimiert werden, bis ein neuartiger und vielversprechender Ligand gefunden ist. Hierbei wird vorhandenes Wissen über die Interaktion zwischen Ligand und Protein, wie Struktur-Wirkungs-Beziehungen und Kristallstrukturen, für das Design genutzt.

Sind die potentiellen Liganden *in silico* optimiert, beginnt der experimentelle Teil des strukturbasierten Wirkstoffdesigns. Die Verbindungen werden synthetisiert, in einem biologischen Assay auf ihre Affinität zum Zielprotein hin untersucht und die Struktur, in der Regel über eine Kristallstruktur, des Liganden in Komplex mit seinem Zielprotein aufgeklärt. Mit den so gewonnenen Informationen werden die Liganden erneut computergestützt optimiert. Diesen iterativen Prozess nennt man Designzyklus (Abbildung 2). Sind hochaffine Verbindungen gefunden, schließen sich Zellassays und Tierversuche zur Bioverfügbarkeit, Wirksamkeit und Unbedenklichkeit an. Ist eine Verbindung auch hier erfolgreich, entsteht ein neuer Arzneistoffkandidat für die klinische Prüfung.

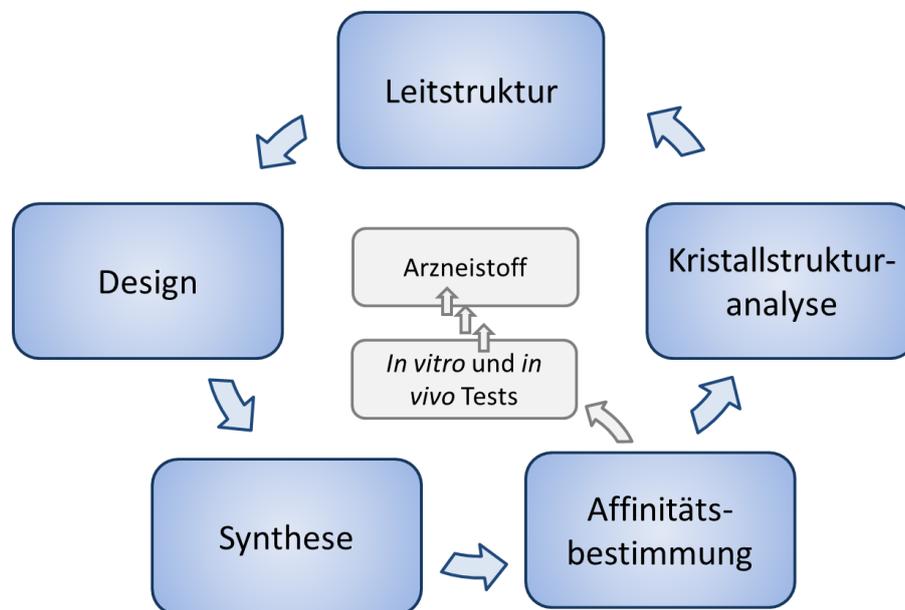


Abbildung 2: Grafische Darstellung des Designzyklus für das strukturbasierte Wirkstoffdesign

1.2 HIV und AIDS

1981 wurde erstmals das erworbene Immunschwäche Syndrom, zu Englisch Acquired Immunodeficiency Syndrom (AIDS), beschrieben. Heute sind weltweit 34 Millionen Menschen mit dem humanen Immunschwäche Virus (HIV) infiziert, welcher die Krankheit AIDS verursacht. [3-5]

HIV infiziert die Zellen des Immunsystems, vornehmlich T-Lymphozyten, aber auch Makrophagen und dendritische Zellen sind betroffen. Makrophagen, einschließlich solcher in der Mikroglia des Gehirns, stellen ein wichtiges Reservoir für das Virus dar und erschweren so die Therapie. Dendritische Zellen transportieren HIV bis in die Lymphknoten. In allen Stadien der Infektion treten hohe Raten von Virusreplikation und Zellzerstörung auf. Bei der akuten Infektion, welche meist grippeähnliche Symptome hervorruft, kommt es zu einer Reduktion der Anzahl an CD4-Zellen, deren Zahl sich nach einigen Monaten aber wieder oberhalb des Normbereichs einpendelt. Danach sind die Patienten häufig jahrelang beschwerdefrei aber infektiös, bis die Anzahl der CD4-Lymphozyten unter den Grenzwert von 200/ μ l fällt. Erst dann kommt es zu einer symptomatischen Beeinträchtigung des Immunsystems und die Krankheit AIDS bricht aus. [6, 7] Der HI-Virus wird in zwei Gruppen unterschieden: HIV-1 und HIV-2. Weltweit ist HIV-1 der Hauptverursacher von AIDS, während HIV-2 nur in einigen Regionen West- und Zentralafrikas vorkommt. [8, 9] Im Gegensatz zu HIV-1 ist HIV-2 weniger virulent, zeigt aber, wegen einer veränderten Aminosäuresequenz eine natürliche Resistenz gegen einige Medikamente, welche bei HIV-1 wirksam sind. [10]

In dieser Arbeit wird ausschließlich HIV-1 betrachtet. Die Epidemie hat in den letzten 30 Jahren erschreckende Ausmaße angenommen. Obwohl die Zahl der Neuinfektionen seit Ende der 90er Jahre sinkt, steigt die Zahl der Menschen, die mit HIV leben weiterhin an, da die Lebenserwartung durch die verbesserte Therapie ebenfalls ansteigt. Ende 2010 betrug die Zahl der mit HIV infizierten Personen insgesamt 34 Millionen. [4, 5]

Problematisch ist weiterhin, dass die Infektion vor allem in Gebieten mit relativ niedrigem Einkommen, wie in den subsaharischen Ländern Afrikas, auftritt. Die Versorgung von Patienten ist in diesen Regionen besonders schwierig. [3, 11] Für die Therapie sind hier preiswerte Medikamente notwendig, welche möglichst wenige *Compliance* Probleme verursachen. [3] Neben den Kosten und der *Compliance* stellen vor allem die gravierenden Nebenwirkungen der Medikamente und die zunehmende Resistenzentwicklung der HI-Viren gegen die zugelassenen Wirkstoffe ein großes Problem in der Therapie von HIV dar. Die ideale Lösung wäre ein Impfstoff. Obwohl schon einige aussichtsreiche Impfstoffkandidaten entwickelt wurden, zeigten die bisherigen klinischen Studien ausschließlich enttäuschende Er-

gebnisse und die Entwicklung eines wirksamen Impfstoffes ist in den nächsten Jahren unwahrscheinlich. [12] Man ist deshalb auf die Erforschung immer neuer Chemotherapeutika angewiesen, die gegen die resistenten Virusstämme weiterhin wirksam sind.

Aktuell kommen verschiedene Arzneistoffe zur Therapie HIV-positiver Patienten zum Einsatz, die alle in den Replikationszyklus (Abbildung 3 [13]) des Virus eingreifen und so dessen Vermehrung hemmen.

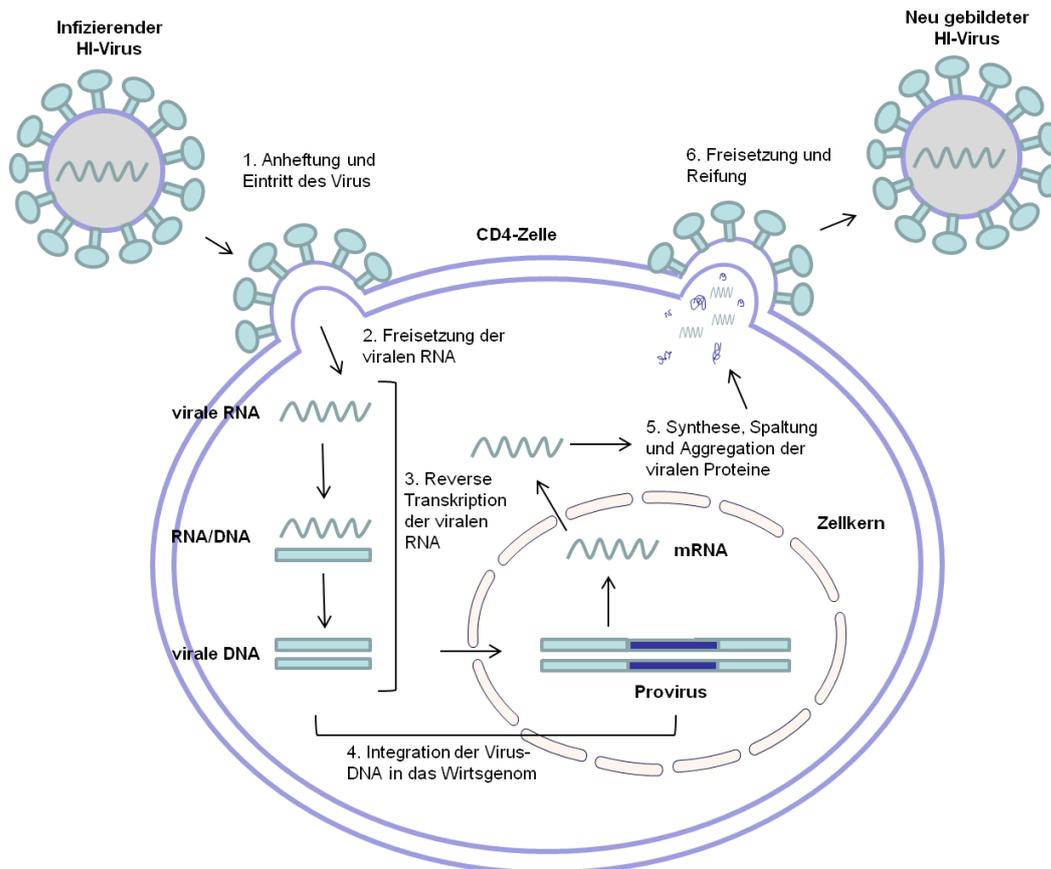


Abbildung 3: Der Replikationszyklus des HI-Virus, unterteilt in sechs Schritte: 1) Anheftung und Eintritt des Virus in die Wirtszelle, 2) Freisetzung der viralen RNA, 3) reverse Transkription der viralen RNA, 4) Integration der Virus-DNA in das Wirtsgenom, 5) Synthese und Aggregation der viralen Proteine, 6) Freisetzung und Reifung. [11]

Im ersten Schritt erfolgt zunächst die Anheftung und dann der Eintritt des Virus in die Zelle. Die viralen Hüllproteine gp120 und pg41 sind essentiell für diesen Schritt. Gp120 bindet an CD4, ein Glykoprotein, welches auf der Oberfläche von etwa 60 % aller im Blutkreislauf befindlichen T-Lymphozyten, sowie auf T-Vorläuferzellen im Rückenmark und im Thymus, in Monozyten, Makrophagen, eosinophilen Granulozyten, dendritischen Zellen und Mikrogliazellen des ZNS vorkommt. Wenn gp120 an das CD4-Protein bindet, vollzieht sich eine Konformationsänderung. Dabei werden Domänen des gp120 nach außen gekehrt, welche in der Lage sind, Chemokin-Rezeptoren auf der Zellmembran der Wirtszelle zu binden. Diese

fungieren dann als Co-Rezeptoren beim Eintritt von HIV in die Zelle. Die zwei wichtigsten Vertreter dieser Rezeptoren sind CXCR4 und CCR5. Einige HIV-Stämme bevorzugen den CCR5-Rezeptor, während andere den CXCR4-Rezeptor bevorzugen. Manche Isolate sind in der Lage, an beide Rezeptoren zu binden. Ist das Virus über CD4 und einen Co-Rezeptor fest an die Wirtszelle gebunden, kann das Fusionspeptid gp41 durch eine Konformationsänderung die Fusion der Membranen bewirken und somit das virale Kapsid in die Zelle bringen. [13]

Anschließend wird die virale RNA freigesetzt (Schritt 2) und diese RNA in DNA durch die viruseigene reverse Transkriptase umgeschrieben (Schritt 3). Schritt 4: Die Integrase fügt die entstandene DNA in das Wirtsgenom ein. Schritt 5: Der wirtseigene Transkriptionsprozess führt zur Synthese von regulatorischen HIV-Proteinen wie *Tat* und *Rev*. Diese Proteine manipulieren den zelleigenen Transkriptionsprozess und fördern somit die Bildung von reifen Viruspartikeln. Schritt für Schritt werden neue Viruspartikel zusammengebaut. Zwei virale RNA Stränge assoziieren mit Replikationsenzymen. Kernproteine lagern sich darüber und formen so das virale Kapsid, welches dann zur Zelloberfläche wandert. Nun beginnt die HIV-Protease die Vorläufermoleküle in funktionelle Einheiten zu spalten. Sie spaltet unter anderem gp160 zu gp120 und gp41, sowie die Vorläufermoleküle *gag* und *gag-pol* in Strukturproteine und funktionelle Proteine wie die Protease, die reverse Transkriptase und die Integrase. Schritt 6: Während die Viruspartikel durch die Zellmembran austreten und so ihre Hülle erlangen, wird die in Schritt 5 begonnene Reifung fortgeführt, wodurch infektiöse Viruspartikel entstehen. [13, 14]

1.3 Antiretrovirale Therapie

Vor 27 Jahren erhielt Zidovudin als erster wirksamer Arzneistoff gegen HIV die Zulassung der FDA (*Food and Drug Administration*, amerikanische Zulassungsbehörde für Arzneimittel) [15]. Seit dem hat sich die HIV-Infektion, zumindest in den Industrienationen, zu einer kontrollierbaren, chronischen, letztendlich aber immer noch unheilbaren Krankheit entwickelt. Sowohl die Lebenserwartung als auch die Lebensqualität der Patienten hat sich durch die medikamentöse Therapie erheblich verbessert. [11, 16]

Trotzdem gibt es weiterhin Probleme bei der Therapie von HIV-Infektionen. Hierzu gehören Nebenwirkungen, von denen einige erst jetzt bei den ersten Langzeitpatienten zum Vorschein kommen. Ein weiteres Problem ist das Auftreten von Mehrfachresistenzen, welche die Wirksamkeit der aktuell auf dem Markt befindlichen Arzneistoffe beeinträchtigt. [11, 16]

Um die Resistenzprobleme zu minimieren, werden in der Antiretroviralen Therapie (ART) drei bis vier verschiedene antiretrovirale Substanzen verabreicht. Diese Kombinationstherapie wird teilweise auch als *highly active antiretroviral therapy* (HAART) bezeichnet. [17, 18]

Mangelnde *Compliance* ist einer der Hauptgründe für Therapieversagen, weshalb eine weitere Vereinfachung der Therapie und wirksamere Arzneistoffkombinationen mit weniger Nebenwirkungen benötigt werden. [11, 16]

Aktuell befinden sich 26 zugelassene Wirkstoffe gegen HIV aus sechs verschiedenen Wirkstoffklassen, nämlich die CCR5-Antagonisten, die Eintritts-/Fusions- Inhibitoren, die nukleosidischen und nukleotidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTIs), die nicht nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTIs), die Integrase-Inhibitoren und die Protease-Inhibitoren, auf dem Markt. Die Wirkmechanismen und die als Medikamente zugelassenen Vertreter dieser Wirkstoffklassen seien im Folgenden kurz dargestellt. [11, 16, 19]

CCR5-Antagonisten

Der erste Schritt im Replikationszyklus des HI-Virus ist die Anheftung des Virus an die Zelle. Genau hier greifen die CCR5-Antagonisten ein, sodass es gar nicht erst zum Eintritt in die Zelle kommt. Selbstverständlich sind die CCR5-Antagonisten nur gegen solche Virusstämme wirksam, die den CCR5-Rezeptor und nicht den CXCR4-Rezeptor zum Anheften an die Zelle nutzen. Zurzeit ist Maraviroc (Abbildung 4) der einzige zugelassene Vertreter dieser Wirkstoffklasse. Maraviroc zeigt eine ausgesprochen hohe Potenz und kann die Viruslast bis zu 10 Tage nach der letzten Gabe signifikant senken. Häufige Nebenwirkungen sind zum Beispiel Anämie, Depressionen und gastrointestinale Störungen. Durch die Möglichkeit alternativ über den CXCR4-Rezeptor an die Wirtszelle anzudocken, ist die Gefahr der Resistenzbildung bei dieser Klasse besonders groß. In der Forschung befinden sich neue CCR5-Inhibitoren sowie Inhibitoren für andere Co-Rezeptoren wie den CXCR4-Rezeptor. [19, 20]

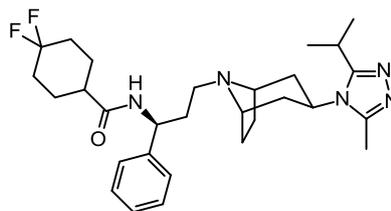


Abbildung 4: Strukturformel von Maraviroc

Eintritts-/Fusions-Inhibitoren:

Nach der Anheftung des HI-Virus an die Wirtszelle fusionieren die Membranen mit Hilfe des Fusionsproteins gp41, sodass das Virus in die Zelle eintreten kann. Peptidomimetika von gp41, welche ursprünglich für die Impfstoffforschung entwickelt wurden, können das Eintreten in die Zelle verhindern und zeigen eine gute Aktivität gegen das HI-Virus. Enfuvirtid ist ein solches Peptidomimetikum und bislang der einzige zugelassene Fusionsinhibitor. In der

klinischen Phase III zeigte Enfuvirtid bei einer 24 Wochen andauernden Behandlung einen signifikanten antiretroviralen und immunologischen Nutzen. Als Nachteil ist die Notwendigkeit zu nennen, dass der Arzneistoff zweimal täglich subkutan zu injizieren ist, was zu Irritationen an der Einstichstelle führt. Auch schränken die Nebenwirkungen und die hohen Produktionskosten des 5000 Da Peptids den Nutzen von Enfuvirtid ein. Häufige bis sehr häufige Nebenwirkungen sind zum Beispiel periphere Neuropathie, Angstzustände und Hämaturie. Zudem treten unter Monotherapie mit Enfuvirtid verschiedene Mutationen auf, die zu Resistenzentwicklung führen können. Aktuell wird an nicht-peptidischen Fusionsinhibitoren geforscht. [19, 20]

Nukleosidische und nukleotidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTIs):

Der erste Arzneistoff, welcher gegen die HIV-Infektion zum Einsatz kam, war Zidovudin und gehörte dieser Wirkstoffklasse an. Vertreter dieser Klasse stellen Nukleotid- und Nukleosid-Analoga dar, die von wirtseigenen Kinasen zu Triphosphat-Derivaten phosphoryliert und anschließend während der reversen Transkription in den wachsenden DNA-Strang eingebaut werden. Wegen des Fehlens einer 3'-Hydroxy-Gruppe führt dieser Einbau zum Abbruch der Transkription und zur Blockierung der reversen Transkriptase. Die NRTIs gehören zu den Medikamenten der 1. Wahl zur Therapie einer HIV-Infektion, wobei zwei NRTIs in der Regel mit einem Arzneistoff aus einer anderen Wirkstoffklasse kombiniert werden, um die Resistenzbildung einzudämmen. Abgesehen von der Resistenzbildung stellen die Nebenwirkungen das größte Problem der NRTIs dar. Zu den sehr häufigen Nebenwirkungen zählen zum Beispiel Kopfschmerzen, Erhöhung der Kreatinkinase, Schwindelgefühl, Hautausschlag und gastrointestinale Störungen. Insbesondere die gastrointestinalen Störungen führen zu mangelnder *Compliance*. So kommt es bei 1 % der Patienten, die mit Tenofovir behandelt werden, zu Therapieabbrüchen auf Grund von gastrointestinalen Störungen. In Abbildung 5 sind alle acht zugelassenen NRTIs gezeigt. [19, 20]

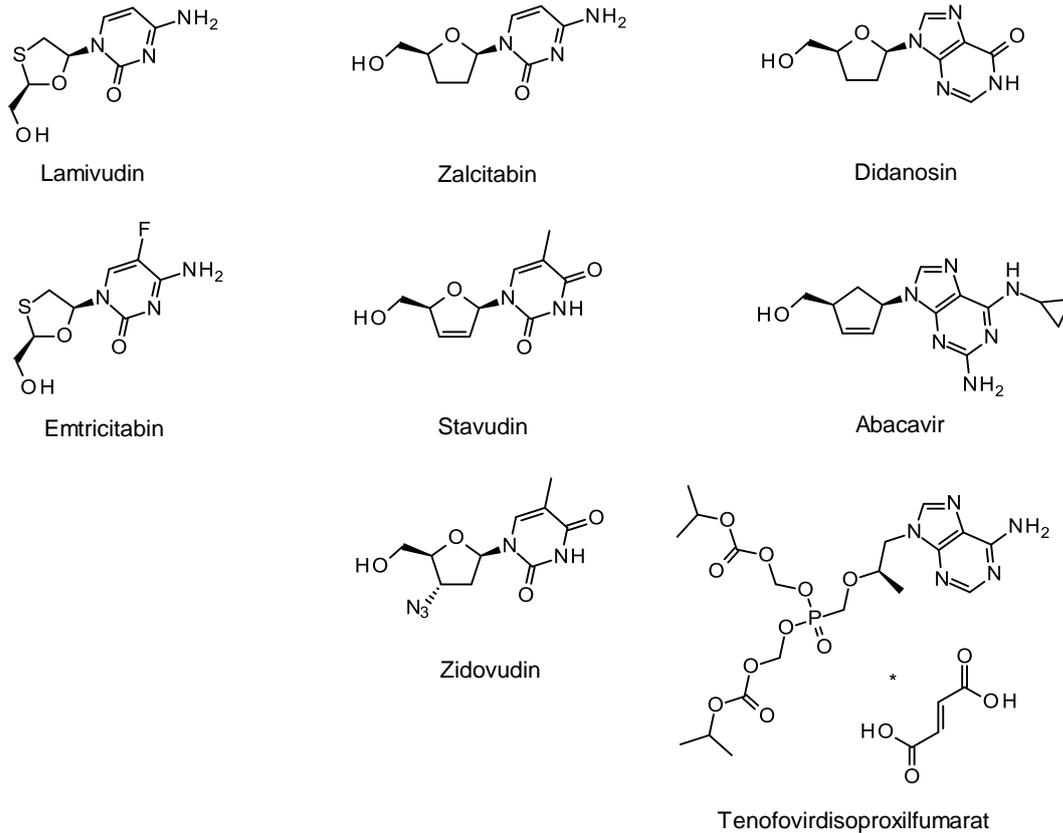


Abbildung 5: Strukturformeln zugelassener nukleosidischer und nukleotidischer Reverse-Transkriptase-Inhibitoren

Nicht nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTIs):

Im Gegensatz zu den NRTIs inhibieren die NNRTIs die reverse Transkriptase, indem sie nichtkompetitiv in eine allosterische Tasche binden, die direkt neben dem katalytischen Zentrum lokalisiert ist. Diese Substanzen müssen nicht erst von zelleigenen Kinasen phosphoryliert werden, jedoch treten leichter Resistenzen auf, da eine Mutation in der allosterischen Bindetasche, die zum Wirkverlust des Inhibitors führt, die Aktivität der reversen Transkriptase nur unwesentlich beeinflusst. Die aktuelle Forschung konzentriert sich auf NNRTIs, welche verstärkt Wechselwirkungen mit konservierten Regionen der reversen Transkriptase ausbilden können und deshalb weniger mutationsanfällig sind. Derzeit sind fünf NNRTIs zugelassen (Abbildung 6). Als häufige bis sehr häufige Nebenwirkungen treten bei diesen unter anderem Kopfschmerzen, Hautausschlag, gastrointestinale Störungen, Gleichgewichtsstörungen, Myokardinfarkt und Hypertonie auf. [19-21]

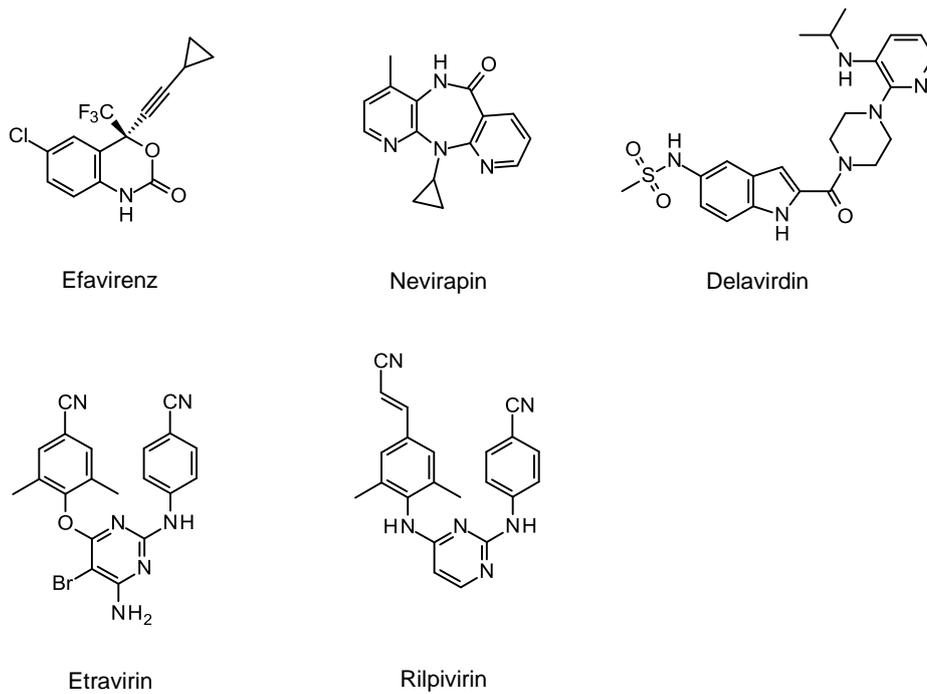


Abbildung 6: Zugelassene nicht nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren

Integrase-Inhibitoren:

Die Integrase-Inhibitoren greifen in den nächsten Schritt des Replikationszyklus ein. Sie verhindern die Integration der durch die reverse Transkriptase synthetisierten viralen DNA in die Wirts-DNA. Die Integrase gilt als eins der vielversprechendsten neuen Zielenzyme im Kampf gegen HIV. Trotzdem wurde auch hier schon Resistenzbildung durch eine Tripelmutante beobachtet. Die Verträglichkeit von dem einzigen eingesetzten Integrase-Inhibitor Raltegravir (Abbildung 7) ist vergleichsweise gut. Zu den häufigen Nebenwirkungen zählen zum Beispiel gastrointestinale Störungen und Hautausschlag. [19, 20]

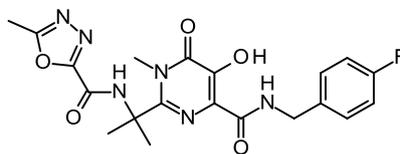


Abbildung 7: Raltegravir

Protease-Inhibitoren:

Die Arzneistoffklasse der Protease-Inhibitoren greift in Schritt 5 und 6 des Replikationszyklus ein und ist essentiell für die Vermehrungsfähigkeit des Virus. Die Inhibitoren verhindern, dass die HIV-Protease Polyproteine in funktionelle Einheiten wie die HIV-Protease selbst, die

reverse Transkriptase und die Integrase spaltet, wodurch die Reifung der noch nicht infektiösen Pro-Viren zu vermehrungsfähigen Viruspartikeln verhindert wird. [14] Zusammen mit zwei NRTIs werden die Protease-Inhibitoren häufig zur Therapie von HIV-positiven Patienten eingesetzt. Um die Plasmahalbwertszeit des Protease-Inhibitors zu verlängern, wird außerdem ein zweiter Protease-Inhibitor, Ritonavir, in geringer Dosis als CYP450-3A4-Inhibitor (*booster*) beigefügt. Zurzeit sind 10 HIV-Protease-Inhibitoren zugelassen (Abbildung 8). Mit Ausnahme von Tipranavir stellen alle zugelassenen Vertreter dieser Wirkstoffklasse Peptidomimetika dar und weisen somit eine schlechte Bioverfügbarkeit auf. Weitere Probleme der zugelassenen HIV-Protease-Inhibitoren sind die während der Therapie auftretende ausgeprägte Entwicklung von Resistenzen und Kreuzresistenzen sowie die starken Nebenwirkungen. Zu den häufigen und sehr häufigen Nebenwirkungen gehören unter anderem Lipodystrophie, Nephrolithiasis, Anämie, Diabetes mellitus, Muskelspasmen, Hautausschlag und gastrointestinale Störungen. Wegen dieser Nachteile konzentriert man sich im Moment auf die Erforschung neuartiger, nicht-peptidischer HIV-Protease-Inhibitoren. [19, 20]

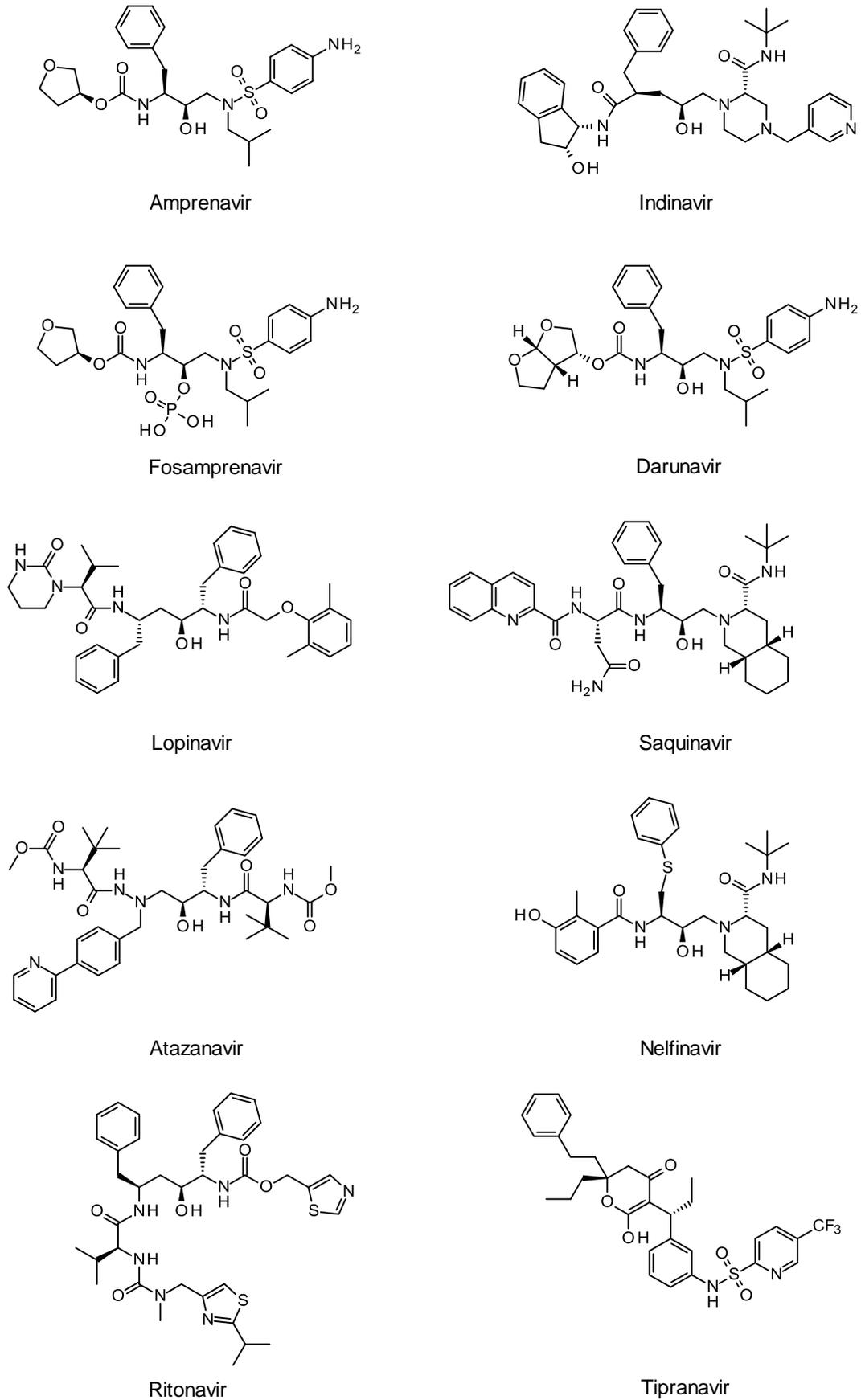


Abbildung 8: Zugelassene HIV-Protease-Inhibitoren

1.4 Resistenzentwicklungen des HI-Virus

Der Hauptgrund sowohl für die schnelle Resistenzentwicklung als auch für die Schwierigkeit einen effizienten Impfstoff zu finden, liegt in der hohen Variabilität des HI-Virus. Verantwortlich hierfür sind drei spezielle Eigenschaften des Virus: [13]

1. Die viruseigene reverse Transkriptase, welche die virale RNA in DNA umschreibt, hat keine Korrekturlesefunktion und baut im Durchschnitt in jedem Replikationszyklus eine falsche Base in das Genom ein.
2. Das Virus vermehrt sich extrem schnell mit durchschnittlich 1010 neuen Viren pro Tag in einem infizierten Individuum.
3. Zusätzlich kommen Rekombinationen zwischen verschiedenen HI-Viren in einem Wirt vor.

Im Abschnitt 1.6 wird genauer auf die Resistenzbildung speziell gegen HIV-Protease-Inhibitoren eingegangen.

1.5 Die HIV-Protease

Die erste Struktur der HIV-Protease wurde 1989 von Navia et al. veröffentlicht. [22] Ein Jahrzehnt später waren über 100 und heute sind bereits über 600 Strukturen der HIV-Protease in der PDB hinterlegt. Darunter befinden sich verschiedene Mutanten der Protease, einige *apo*-Strukturen und eine Vielzahl verschiedener Inhibitoren in Komplex mit dem Enzym. Somit ist die HIV-Protease eins der am besten kristallographisch untersuchten Enzyme mit medizinischer Relevanz. [23]

Die HIV-Protease gehört zu der Familie der Aspartylproteasen. Sie ist in ihrer aktiven Form ein C_2 -symmetrisches Dimer aus jeweils 99 Aminosäuren. Zwischen den beiden Monomeren bildet sich eine tiefe Tasche aus, an deren unteren Ende sich die katalytische Diade aus zwei zueinander koplanaren Aspartyl-Seitenketten befindet. Das obere Ende der Bindetasche bilden zwei beta-Haarnadel Schleifen, die sogenannte *Flap*. Diese ist flexibel und schließt sich erst vollständig, wenn sich ein Substrat oder ein Inhibitor in der Bindetasche befindet (Abbildung 9). [24, 25]

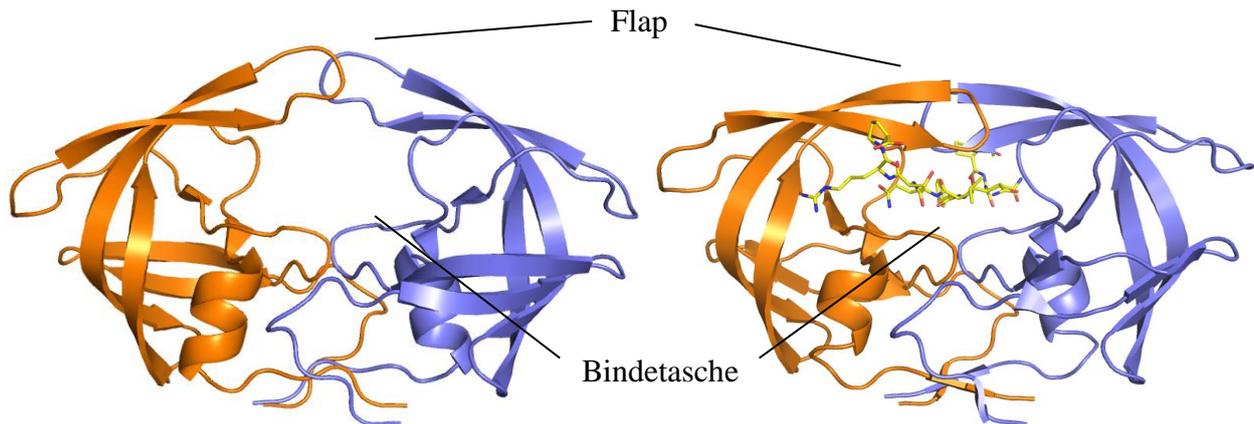


Abbildung 9: Links: apo-Struktur der HIV-Protease mit halb geöffneter Flap (PDB-Code: 2PC0). Rechts: Katalytisch inaktive Asparagin Mutante der HIV-Protease mit gebundenem Substrat und geschlossener Flap (PDB-Code: 1MT9).

Um die Spaltung des Substrats während der Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse zu verhindern, wurden bei 1MT9 die Aspartate Asp25 und Asp25' durch Asparagine ersetzt. Dadurch lässt sich der Bindungsmodus mit einer Substratsequenz beobachten. Bei näherer Betrachtung wird deutlich, dass der Carbonyl-Sauerstoff der zu spaltenden Peptidbindung an eins der beiden Asparagine koordiniert und die benachbarten Carbonyl-Sauerstoffe über ein Wasser (das sogenannte *Flap-Wasser*) an die *Flap* binden (Abbildung 10).

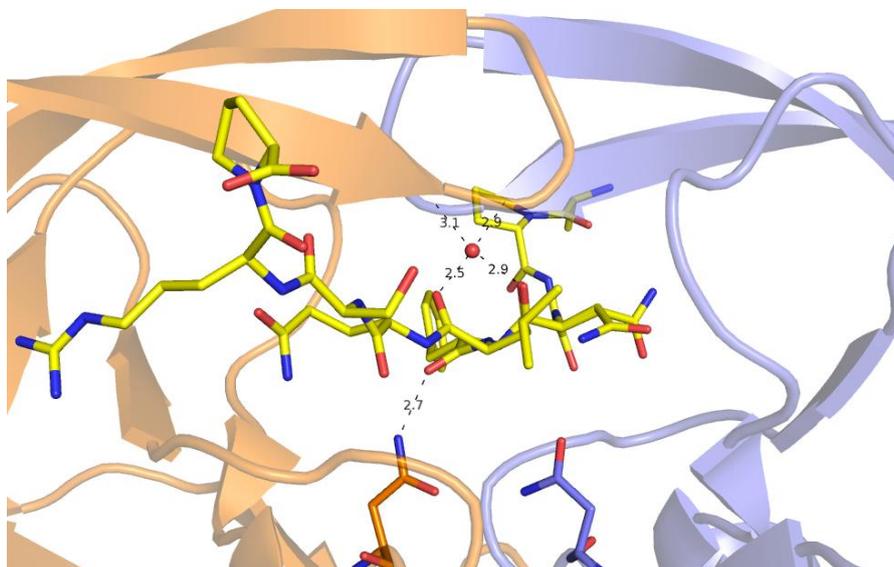


Abbildung 10: HIV-Protease mit gebundenem Substrat in Gelb und dem Flap-Wasser als rote Sphäre (PDB-Code: 1MT9)

Abgesehen von den katalytischen Aspartaten Asp25 und Asp25' sind bei den Aspartylproteasen die Aminosäuren Thr26 und Gly27 konserviert. Sie sorgen als Teil der Dimergrenzfläche für die Stabilität des Dimers über ein Wasserstoffbrückennetzwerk, welches als *fireman's grip* bezeichnet wird (Abbildung 11). [26]

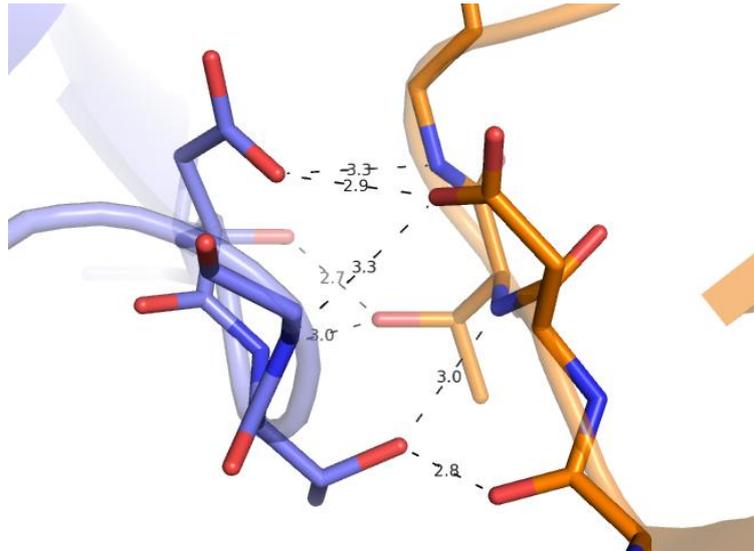


Abbildung 11: Fireman's grip der HIV-Protease (PDB-Code: 3OXC)

Der Mechanismus der Peptidspaltung durch die HIV-PR ist in Abbildung 12 gezeigt. Es wird allgemein angenommen, dass ein Aspartat protoniert und das andere deprotoniert vorliegt. [27]

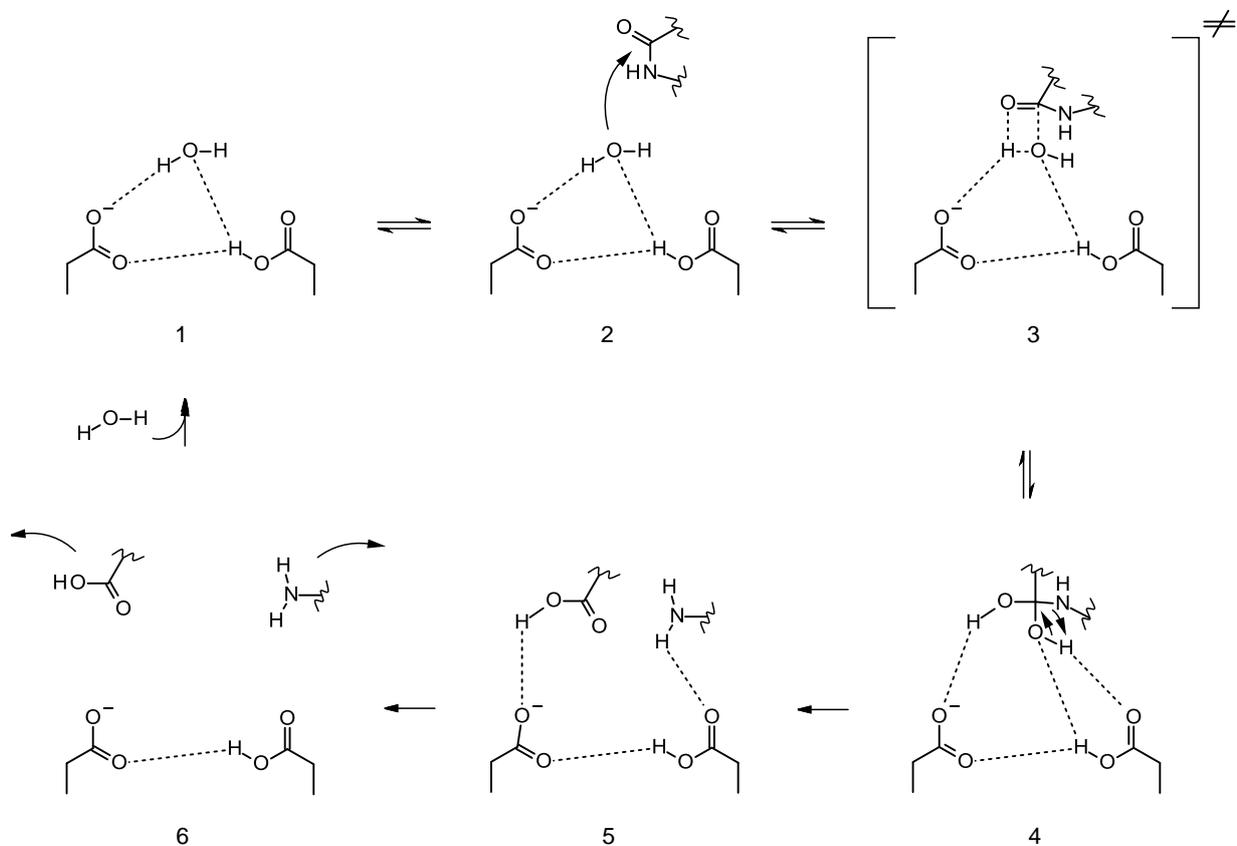


Abbildung 12: Vorgeschlagerener Mechanismus der katalytischen Peptidspaltung durch die HIV-Protease

Im Ausgangszustand (1) ist das lytische Wasser an die monoprotonierten Aspartate Asp25 und Asp25' koordiniert. Diese Anordnung begünstigt den Angriff des lytischen Wassers auf die Peptidbindung (2). Diesem Angriff folgt ein Übergangszustand, wobei sich das Wasser und die Carbonyl-Bindung räumlich sehr nahe kommen und die planare Anordnung der Carbonyl-Gruppe in eine tetraedrische übergeht (3). Schließlich entsteht ein metastabiles tetraedrisches *gem*-Diol-Amin-Intermediat (4). Das Intermediat 4 wird durch die monoprotonierten Aspartate perfekt stabilisiert und ist Ausgangspunkt für das Design der meisten Protease-Inhibitoren. Als nächstes erfolgt die Rückbildung des sp^2 -hybridisierten Kohlenstoffes unter Protonierung des Stickstoffes und Spaltung der C-N Bindung (5). Die beiden Spaltprodukte werden nun freigesetzt und ein neues Wassermolekül wird aufgenommen (6). Somit ist der Ausgangszustand (1) wieder hergestellt und ein neuer Katalyse-Zyklus kann beginnen. Zusammenfassend kann man sagen, dass die HIV-Protease mit ihrer katalytischen Diade sowohl ein Wassermolekül für den Angriff auf eine Peptidbindung aktiviert als auch den entstehenden Übergangszustand und das Übergangsintermediat über Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert. [27] Die Spezifität der Protease wird über die Spezifitätstaschen (S3', S2', S1', S1, S2, S3), welche vor und hinter der katalytischen Diade lokalisiert sind, determiniert. Sie sind dafür verantwortlich, dass ausschließlich die richtigen Peptide an der richtigen Stelle gespalten werden und somit funktionelle Proteine des HI-Virus entstehen.

In Abbildung 13 sind die Spezifitätstaschen mit ihren Aminosäuren dargestellt. Zur Veranschaulichung wurde ein Ausschnitt eines natürlichen Substrats eingezeichnet.

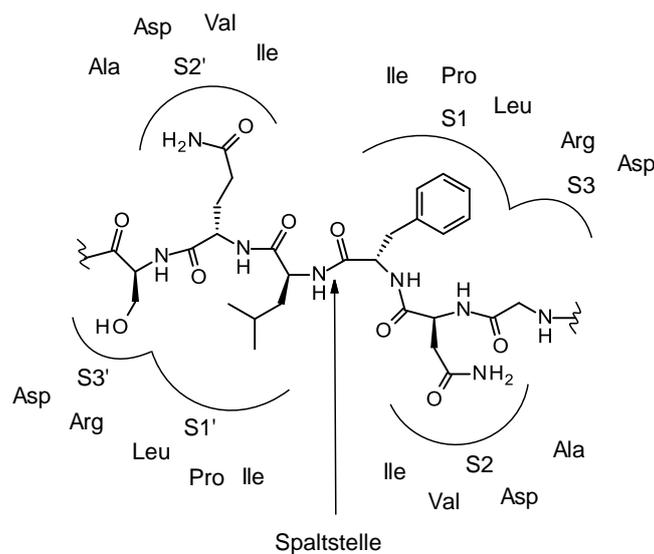


Abbildung 13: Ausschnitt eines natürlichen Substrats in Komplex mit der HIV-Protease. Zweidimensionale Darstellung des Bindungsmodus und der beteiligten Aminosäuren nach 1MT9 (PDB).

Die HIV-Protease spaltet das *gag-pol*-Polyprotein an acht Stellen. Die Aminosäuren, die dabei von den Spezifitätstaschen erkannt werden sind in Abbildung 14 aufgelistet: [28]

P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'
Gln	Asn	Tyr	Pro	Ile	Val
Arg	Val	Leu	Ala	Glu	Ala
Thr	Ile	Met	Met	Gln	Arg
Gly	Asn	Phe	Leu	Gln	Ser
Phe	Asn	Phe	Pro	Gln	Ile
Leu	Asn	Phe	Pro	Ile	Ser
Glu	Thr	Phe	Tyr	Val	Asp
Lys	Ile	Leu	Phe	Leu	Asp

Abbildung 14: Natürliche Spaltstellen der HIV-Protease

Schaut man sich die an der Erkennung beteiligten Aminosäuren der HIV-Protease an, verwundert es nicht, dass besonders in der S1-Tasche fast ausschließlich hydrophobe Aminosäuren erkannt werden. Die S2- und S3-Tasche hingegen erlauben auch hydrophile Wechselwirkungen.

1.6 HIV-Protease-Inhibitoren - Stand der Forschung

Die zehn aktuell zugelassenen HIV-Protease-Inhibitoren wurden in Abschnitt 1.3 bereits kurz vorgestellt. Trotz der bisherigen Erfolge der Protease-Inhibitoren gibt es eine Vielzahl von Gründen, warum sowohl die akademische als auch die industrielle Forschung ihre Anstrengungen zur Entwicklung neuer, besserer Inhibitoren fortsetzen sollte. [29]

Zum ersten seien die Resistenzen genannt. Dass es besonders zwischen den Protease-Inhibitoren zur Bildung von Kreuzresistenzen kommt, wird verständlich, wenn man sich den Bindungsmodus der zugelassenen Wirkstoffe ansieht. Alle Wirkstoffe binden mit einem sekundären Alkohol an die katalytische Diade. Bis auf Tipranavir sind alle Verbindungen Peptidomimetika und koordinieren genau wie die natürlichen Substrate über ein Wassermolekül an die *Flap* (Abbildung 15). [2, 29]

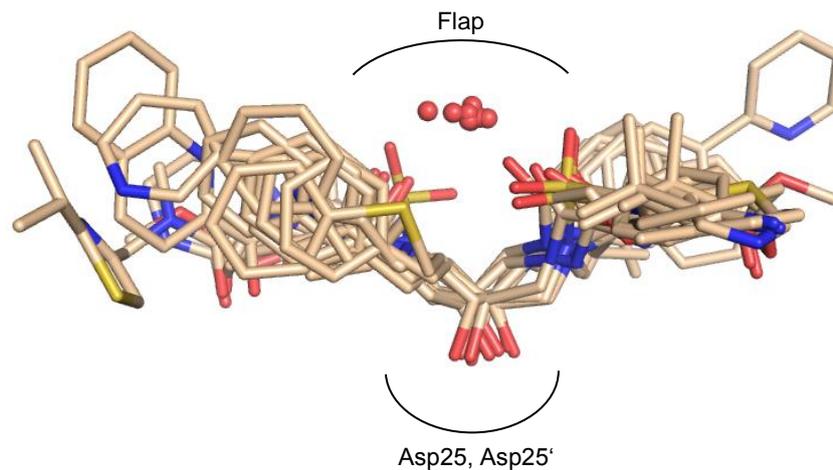


Abbildung 15: Bindungsmodus aller zugelassenen HIV-Protease-Inhibitoren außer von Tipranavir. (PDB-Codes: 3OXW, 1HXW, 1HPV, 1OHR, 2BPX, 3QOZ, 2Q5K, 3EKY)

Tipranavir hat ein anderes Grundgerüst als alle anderen zugelassenen Wirkstoffe. Es verdrängt das *Flap*-Wasser und koordiniert stattdessen über einen Carbonyl-Sauerstoff an die *Flap* (Abbildung 16). [29]

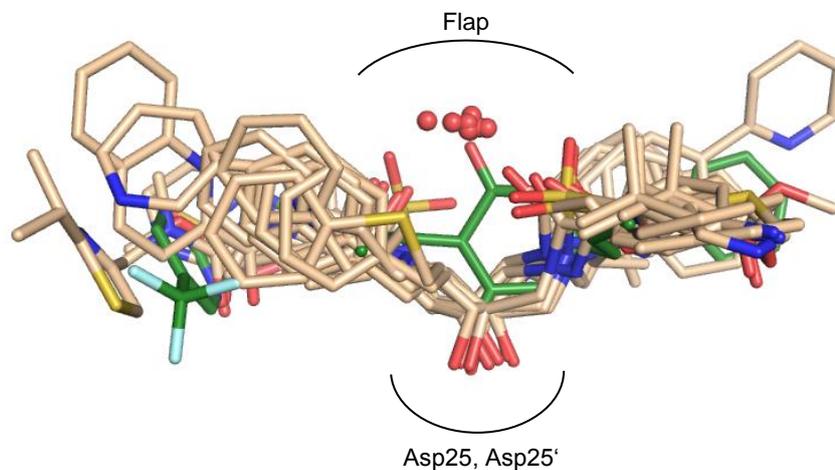


Abbildung 16: Bindungsmodus aller zugelassenen HIV-Protease-Inhibitoren mit Tipranavir in Grün. (PDB-Codes: 1D4Y, 3OXW, 1HXW, 1HPV, 1OHR, 2BPX, 3QOZ, 2Q5K, 3EKY)

Die Besetzung der Spezifitätstaschen ist allerdings bei den peptidischen HIV-Protease-Inhibitoren und dem nicht-peptidischen HIV-Protease-Inhibitor Tipranavir sehr ähnlich (Abbildung 17). [2]

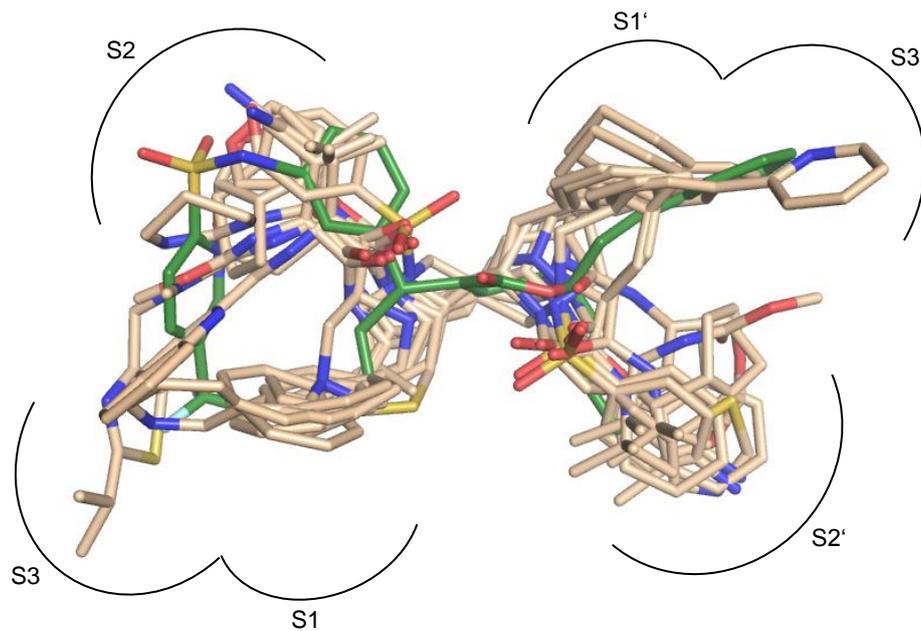


Abbildung 17: Bindungsmodus aller zugelassenen HIV-Protease-Inhibitoren mit Tipranavir in Grün. (PDB-Codes: 1D4Y, 3OXW, 1HXW, 1HPV, 1OHR, 2BPX, 3QOZ, 2Q5K, 3EKY)

Der alles in allem sehr ähnliche Bindungsmodus der zurzeit auf dem Markt befindlichen HIV-Protease Inhibitoren erklärt das Auftreten von Kreuzresistenzen. Die Resistenzbildung der HIV-Protease ist aber hoch komplex. Nicht nur Mutationen in der Bindetasche, sondern auch außerhalb, führen zu Resistenzen. Neben dem gewöhnlichen Austausch einer Aminosäure kommen auch Aminosäure-Insertionen vor. Zusätzlich können Mutationen im Substrat *gag* Resistenzen verursachen, ohne dass die HIV-Protease selbst verändert ist. [29] Man unterscheidet zwischen so genannten Haupt- (*major*) und Neben- (*minor*) Resistenzen. Erstere verringern direkt die Affinität der Inhibitoren können aber zu einer Verschlechterung der viralen Replikation führen, letztere treten häufig erst später in der Therapie auf und verbessern die Vermehrungsfähigkeit von Viren, welche bereits Haupt-Resistenzen besitzen. [30] Resistente Viren finden sich nicht nur bei bereits behandelten Patienten, bei denen man von sekundären Resistenzen spricht, sondern auch bei unbehandelten Patienten (primäre Resistenz). Letztere haben sich in den meisten Fällen mit bereits resistenten Viren infiziert. [31]

Die häufig bei resistenten Viren mutierten Aminosäuren sind in Abbildung 18 in Violett hervorgehoben. Man kann erkennen, dass es sehr viele Aminosäuren sind und dass sie sich nicht alle in räumlicher Nähe zu den in Beige abgebildeten Wirkstoffen befinden. Das gezielte Inhibitor-design im Hinblick auf die Aktivität gegen resistente Viren ist somit nur eingeschränkt möglich. [2, 29]

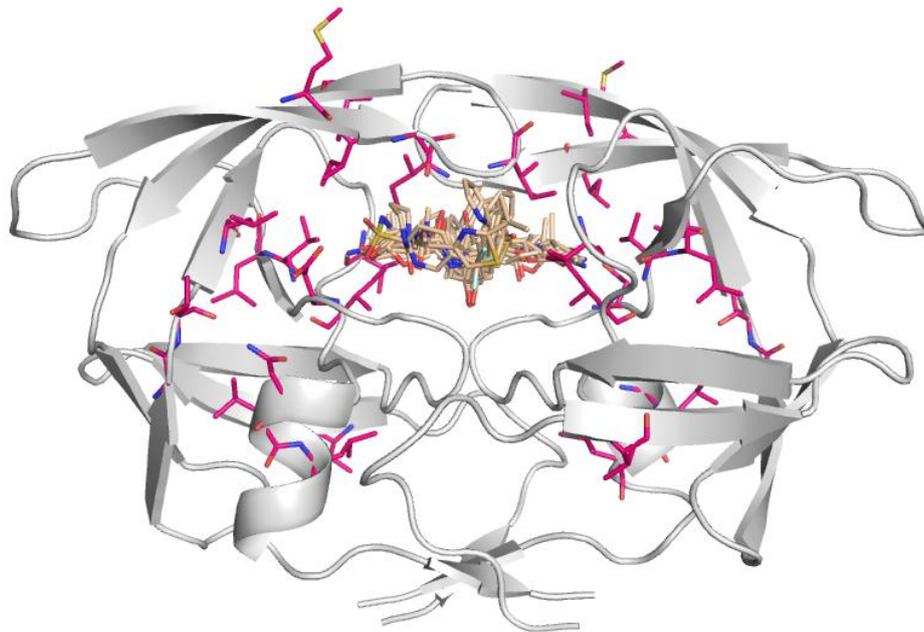


Abbildung 18: Die HIV-Protease (PDB-Code: 2BPX). Häufig zu Resistenzen führende Mutationen sind als magentafarbene Sticks dargestellt. Im Zentrum sind alle zugelassenen Inhibitoren in Beige zu sehen.

Abgesehen von der Resistenzentwicklung ist die Forschung auf dem Gebiet der HIV-Protease-Inhibitoren gefragt, die Probleme der schlechten Verträglichkeit zu lösen. Die schlechte Verträglichkeit führt unter anderem zu einer verringerten *Compliance*, was wiederum die Resistenzbildung begünstigt. Deshalb gehört die Suche nach Verbindungen mit weniger gravierenden Nebenwirkungen zu den obersten Zielen der Protease-Inhibitor Forschung. Die Notwendigkeit, die Protease-Inhibitoren mit Ritonavir als CYP450-3A4-Inhibitor zu verstärken (boosten) führt zu problematischen Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten, weshalb ein weiteres Ziel die Verbesserung der Bioverfügbarkeit der Einzelstoffe darstellt. [29]

Die HIV-Protease-Inhibitor-Forschung der letzten Jahre führte zur Entwicklung einiger interessanter neuer Verbindungen. Manche Projekte mussten jedoch vor oder nach Eintritt in die klinische Phase I oder II gestoppt werden, andere befinden sich noch in der präklinischen Phase. Aktuell gibt es drei vielversprechende Kandidaten in der klinischen Prüfung Phase I und II. Im Folgenden werden die wichtigsten Vertreter dieser neuartigen HIV-Protease-Inhibitoren kurz vorgestellt. [32, 33]

Inhibitoren mit einem ganz neuen Grundgerüst stellen die zyklischen Harnstoffe dar, welche 1994 von Lam et al. veröffentlicht wurden (siehe Abbildung 19). [34] Obwohl es seitdem kein zyklischer Harnstoff bis in die klinische Prüfung geschafft hat, soll diese Klasse hier genannt werden, denn das Grundgerüst wird weiterhin für das Design neuer Inhibitoren genutzt. Wie Tipranavir sind die zyklischen Harnstoffe nicht-peptidisch und verdrängen das *Flap*-Wasser durch eine Carbonyl-Gruppe. Leider gibt es bei dieser Klasse von Inhibitoren Probleme mit

der Bioverfügbarkeit. Dieser Umstand erklärt den fehlenden Erfolg der Verbindungsklasse. [29, 35, 36]

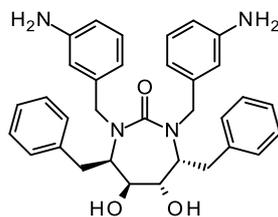


Abbildung 19: DMP450 als Vertreter der zyklischen Harnstoffe

Der Inhibitor PL-100 (Abbildung 20), ein Lysin-Sulfonamid mit neuartigem Bindungsmodus, ist gegen viele der bekannten Mutanten der HIV-PR aktiv und zeigt selbst eine hohe genetische Barriere für die Entstehung resistenter Virenstämme. Zudem inhibiert er zusätzlich CYP450-3A4, was es ermöglichen könnte, diesen Wirkstoff ohne Zusatz von Ritonavir einzusetzen, die Nachteile einer CYP450-3A4-Inhibition würden allerdings bestehen bleiben. Trotz der vorteilhaften Eigenschaften von PL-100 hat Merck 2008 die Entwicklung der Verbindung gestoppt, um sich auf andere Derivate aus der Serie zu konzentrieren. 2011 wurden pharmakokinetisch optimierte Derivate von PL-100 publiziert. Über einen Eintritt in die klinische Phase I wurde aber bis heute nichts berichtet. [29, 32, 37, 38]

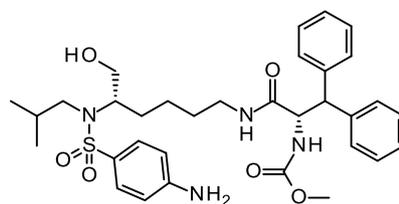


Abbildung 20: PL-100

Brecanavir (Abbildung 21) wurde von GSK und Vertex entwickelt. Der Inhibitor zeichnet sich durch eine geringe Plasmaeiweißbindung aus und hat von allen Protease-Inhibitoren die höchste antivirale Potenz *in vitro* mit einem K_i von 15 fM. Auch gegen viele resistente Mutanten ist er aktiv. Allerdings wurde die Entwicklung 2006 auf Grund von unüberwindbaren Problemen in der Formulierung gestoppt. Damals befand sich der Wirkstoff schon in der klinischen Phase II. Tibotec Pharmaceuticals meldete 2011 ein Patent auf eine parenterale Zubereitung von Brecanavir an. [39, 40]

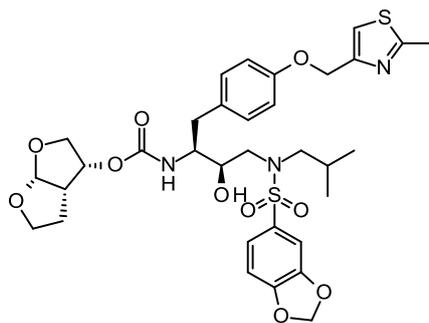


Abbildung 21: Brecanavir

Durch strukturbasiertes Wirkstoffdesign wurde SPI-256 von Sequoia Pharma (Abbildung 22) entdeckt, welches speziell mit den konservierten Bereichen der HIV-Protease in optimale Wechselwirkungen treten sollte. Tatsächlich ist es gegen multiresistente HIV-Protease aktiv und hat eine hohe genetische Barriere für die Resistenzbildung. SPI-256 befindet sich in der klinischen Phase I, jedoch wurde seit 2008 nicht mehr über Fortschritte berichtet. [29, 33]

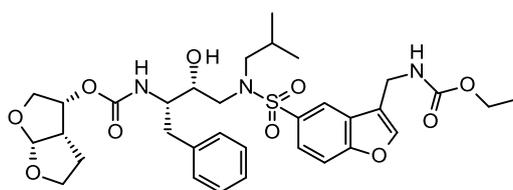


Abbildung 22: SPI-256

GS 8374 (Abbildung 23) wurde bei Gilead Science entwickelt und ähnelt Darunavir. Die Verbindung zeigt eine hohe Affinität zur HIV-PR, eine hohe antiretrovirale Aktivität und ein vorteilhaftes Kreuzresistenzprofil. GS 8374 befindet sich derzeit noch in der präklinischen Phase. [29, 41]

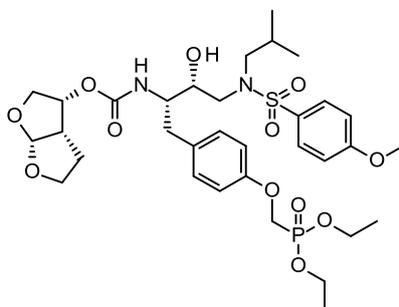


Abbildung 23: GS 8374

Saquinavir-NO₂ (Abbildung 24): Obwohl der Mechanismus noch nicht vollständig aufgeklärt ist, ist seit längerem bekannt, dass HIV-Protease-Inhibitoren *in vitro* und *in vivo* gegen Krebs

wirksam sind. Für diesen Zweck wurde Saquinavir und sein Salpetersäureester von Maksimovic-Ivanic et al. auf seine antitumorale Wirkung und seine Toxizität hin untersucht. [42] Durch die Veresterung mit Salpetersäure erhoffte man sich eine verringerte Toxizität. Es zeigte sich, dass die Toxizität wie geplant stark zurückging und die antitumoralen Eigenschaften erhalten blieben. Zwei Jahre später wurden Ergebnisse zu den antiretroviralen Eigenschaften dieser neuen Verbindung publiziert. [27] Trotz der verminderten Toxizität ergaben sich praktisch keine Unterschiede im antiretrovirale Profil. Somit könnte in Zukunft ein potenter Protease-Inhibitor mit stark verringerten Nebenwirkungen zur Verfügung stehen. Allerdings wird noch nicht über einen möglichen Eintritt in die klinische Prüfung berichtet. [29, 32, 42, 43]

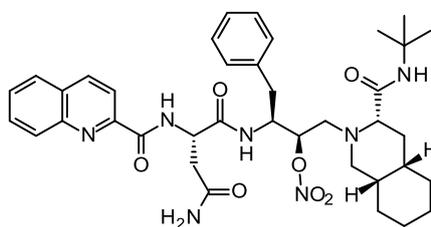


Abbildung 24: Saquinavir-NO₂

CTP-518 und CTP-298 wurden von Concert Pharmaceuticals entwickelt und stellen an bestimmten Positionen deuterierte Derivate von Atazanavir dar. Concert konnte in präklinischen Studien zeigen, dass das antivirale Profil von Atazanavir erhalten bleibt, aber der Metabolismus stark verlangsamt ist. Dadurch erhöhen sich die Plasmaspiegel und die Halbwertszeit wird verlängert. Das Boosten mit Ritonavir wird dadurch überflüssig. In Zusammenarbeit mit GSK werden aktuell klinische Studien der Phase I zu CTP-518 und CTP-298 durchgeführt. Die Wirkstoffe stellen zurzeit zwei der drei vielversprechendsten Kandidaten aus der Pipeline der neuen HIV-Protease-Inhibitoren dar. [29, 32, 33, 44, 45]

TMC310911 (Abbildung 25) von Tibotec ist der am weitesten entwickelte Vertreter der neuen HIV-Protease-Inhibitoren und befindet sich bereits in der klinischen Phase II. Es handelt sich um ein Derivat von Darunavir, welches gegen multiresistente Stämme aktiv ist und eine hohe genetische Barriere für die Resistenzbildung aufweist. Die bisherigen Ergebnisse lassen hoffen, dass TMC310911 ein geeigneter Kandidat zur Behandlung einer großen Gruppe von HIV-Patienten ist, einschließlich solcher mit multipler Protease-Inhibitor-Resistenz. [29, 33, 46]

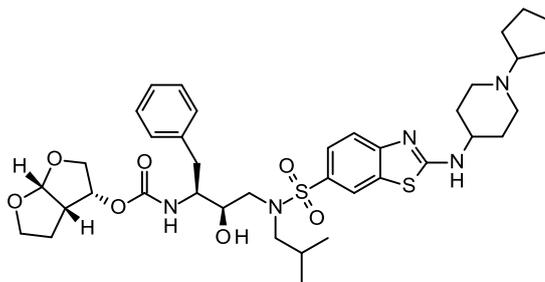


Abbildung 25: TMC310911

Natürlich stellen die gezeigten Verbindungen nur eine Auswahl aus der HIV-Protease-Inhibitor-Pipeline dar. Neben weiteren organischen Kleinmolekül-Inhibitoren wird an C60-Fullerenen und Metallocarboranen gearbeitet, welche das aktive Zentrum der HIV-Protease blockieren. [29]

Die Metallocarborane gehören zu den wenigen Verbindungen, welche die HIV-Protease bei geöffneter *Flap* inhibieren. Da alle zugelassenen Wirkstoffe die geschlossene Konformation adressieren, könnten so Probleme mit Kreuzresistenzen umgangen werden. Ein weiteres Beispiel für Inhibitoren der offenen Konformation sind im Arbeitskreis Diederich synthetisierte Pyrrolidine. [29, 47]

Des Weiteren wird an Verbindungen geforscht, welche die Dimerisation zum aktiven Dimer der HIV-Protease verhindern, sogenannte Dimerisations-Inhibitoren. Ein beeindruckendes Beispiel hierfür ist ein Tripeptid (Leu-Glu-Tyr), welches am N-Terminus einen Palmitoyl-Rest trägt und in subnanomolaren Konzentrationen die Dimer-Bildung unterbindet. [29]

Trotz der zahlreichen und diversen Forschungsprojekte auf dem Gebiet der HIV-Protease-Inhibitoren befinden sich zurzeit nur drei vielversprechende Vertreter in der Klinischen Prüfung Phase I und II, was die Notwendigkeit weiterer Forschungsaktivitäten verdeutlicht. [32, 33]

2 VORARBEITEN UND AUFGABENSTELLUNG

2.1 Pyrrolidine als neues Grundgerüst zur Inhibition der HIV-Protease

Als neuartige Leitstruktur für Aspartylprotease-Inhibitoren wurden vor über 10 Jahren zyklische Amine entdeckt. Im *High-Throughput-Screening* bei der Roche AG fielen substituierte Piperidin-Derivate auf, deren gezielte Weiterentwicklung zu nanomolaren Renin-Inhibitoren führte. [48] Die Firma Vertex stellte ebenfalls ein zyklisches Amin als Inhibitor der Aspartylprotease BACE vor. [49] In der Arbeitsgruppe Klebe wurden in Zusammenarbeit mit der Bayer AG racemische 3,4-disubstituierte Pyrrolidine als Inhibitoren der HIV-Protease entwickelt. Die Inhibitoren zeigen einen sehr interessanten und neuartigen Bindungsmodus. Der beste Inhibitor aus einer Serie von fünf Verbindungen weist einen moderaten K_i von 2,2 μM auf. [50, 51]

Das Potential dieser neuartigen Leitstruktur wurde im Arbeitskreis Diederich erkannt und die 3,4-disubstituierten Pyrrolidine von Andreas Blum weiterentwickelt (Abbildung 26). Der *N,N*-Abstand wurde verkürzt, die Substituenten wurden optimiert und es wurde eine enantio-selektive Synthese mit Hilfe eines *Chiral-Pool* Ansatzes entwickelt. [52-54] Durch struktur-basiertes Design konnte die Affinität der Verbindungen gegenüber der HIV-Protease bis in den zweistellig nanomolaren Bereich gesteigert werden.

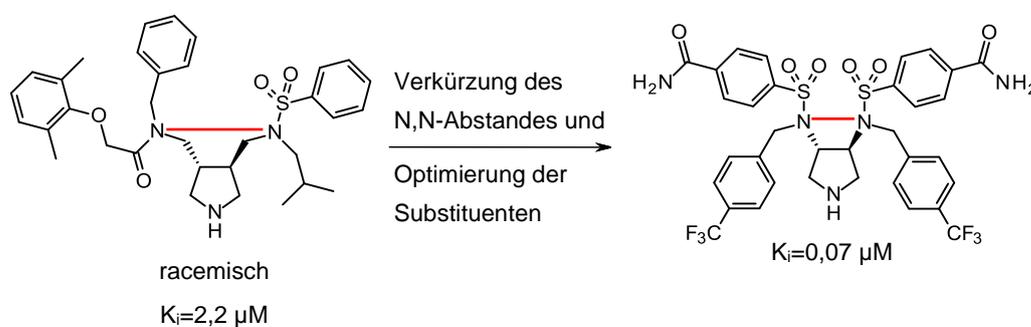


Abbildung 26: Optimierung der 3,4-disubstituierten Pyrrolidine durch Verkürzung des *N,N*-Abstands (als rote Linie gekennzeichnet) und Optimierung der Substituenten. Gezeigt sind jeweils die aktivsten Verbindungen der dargestellten Serien.

Der Bindungsmodus des aktivsten Inhibitors (AB111) ist im Komplex mit der HIV Protease in Abbildung 27 schematisch gezeigt. Man erkennt hier, dass AB111, anders als alle zugelassenen Wirkstoffe mit einem sekundären Amin und nicht mit einer Hydroxy-Funktionalität an die Aspartate bindet.

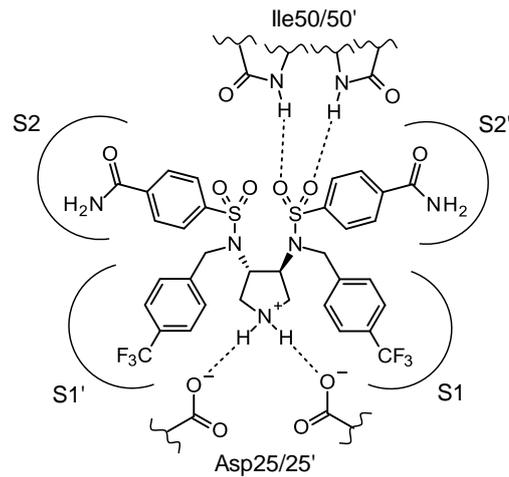


Abbildung 27: Schematische Darstellung des Bindungsmodus von AB111 in Komplex mit der HIV-Protease

Bei genauer Betrachtung fällt auf, dass der C_2 -symmetrische Inhibitor unsymmetrisch in der Bindetasche zu liegen kommt. Nur eine der beiden Sulfonamid-Gruppen des Inhibitors interagiert mit den Isoleucinen 50 und 50' der *Flap*-Region und verdrängt dabei das *Flap*-Wasser (Abbildung 28).

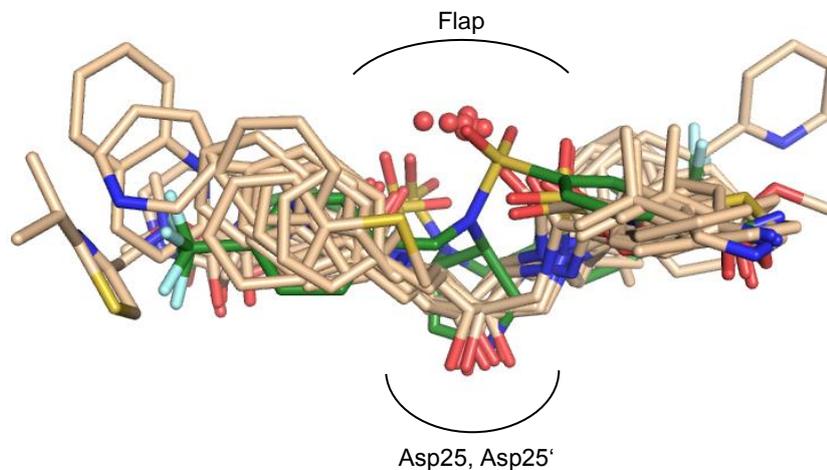


Abbildung 28: Bindungsmodus aller zugelassenen peptidischen HIV-Protease-Inhibitoren mit AB111 in Grün - Seitenansicht. (PDB-Codes: 1D4Y, 3OXW, 1HXW, 1HPV, 1OHR, 2BPX, 3QOZ, 2Q5K, 3EKY)

Auch die Substituenten an den exozyklischen Stickstoffen ragen unterschiedlich weit in die Spezifitätstaschen hinein und bilden somit unterschiedliche Wechselwirkungen zu den Asparataten 29 und 30 aus (siehe Abbildung 29). [53]

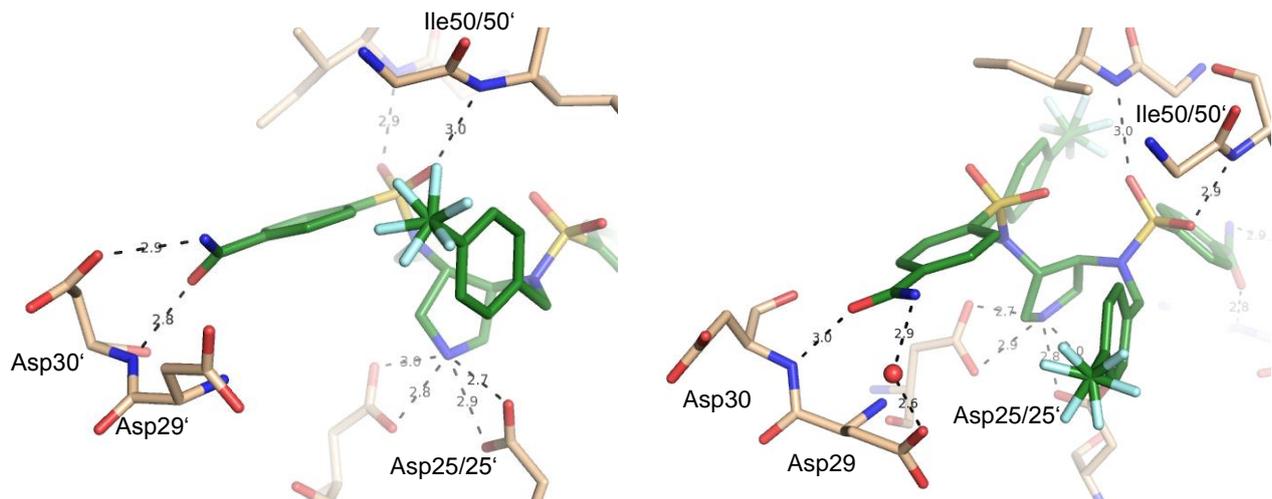


Abbildung 29: Bindungsmodus von AB111 in Komplex mit der HIV-Protease. Links: Wechselwirkungen in der S2'-Tasche, rechts: Wechselwirkungen in der S2-Tasche. (PDB-Code: 2QNN)

Insgesamt weicht der Bindungsmodus dieser neuen, auf 3,4-Diaminopyrrolidinen basierenden Inhibitoren deutlich von dem aller anderen derzeit auf dem Markt befindlichen Inhibitoren ab. [52-54] In Abbildung 30 ist AB111 überlagert mit den zugelassenen HIV-Protease-Inhibitoren gezeigt, wodurch der Unterschied im Bindungsmodus deutlich wird. [52]

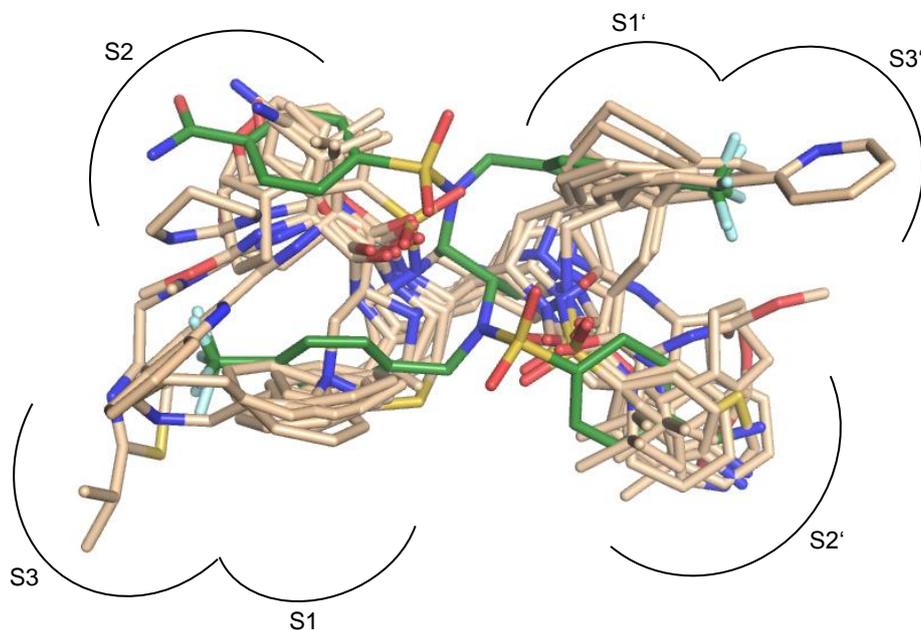


Abbildung 30: Bindungsmodus aller zugelassenen, peptidischen HIV-Protease-Inhibitoren mit AB111 in Grün. (PDB-Codes: 1D4Y, 3OXW, 1HXW, 1HPV, 1OHR, 2BPX, 3QOZ, 2Q5K, 3EKY)

Ausgehend von einem der beiden substituierten Stickstoff-Atome wird durch AB111 die S2- und die S1'-/S3'-Tasche besetzt und ausgehend von dem Anderen die S2'- und die S1-/S3-Tasche. Dadurch ergibt sich für AB111 eine H-förmige Anordnung und nicht, wie bei den zugelassenen HIV-Protease-Inhibitoren, eine X-förmige (Abbildung 31).

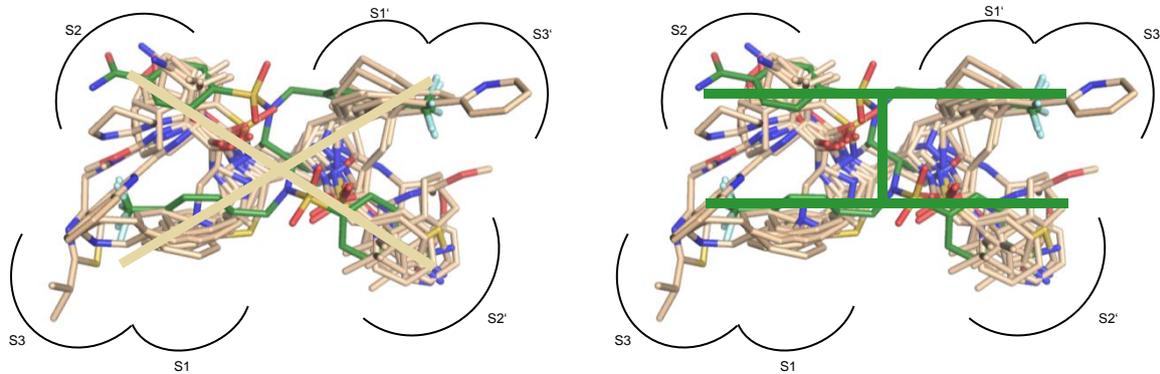


Abbildung 31: Veranschaulichung des X-förmigen Bindungsmodus der zugelassenen, peptidischen HIV-Protease-Inhibitoren (links) und des H-förmigen Bindungsmodus von AB111 (rechts).

Da die S1- und S3-Tasche bei der HIV-Protease direkt ineinander übergehen, wird der Einfachheit halber im Folgenden nur noch von der S1-Tasche gesprochen.

2.2 Ziel der Arbeit

AB111 weist mit einem K_i von 74 nM eine hohe Affinität zur HIV-Protease auf. Nachteil des vierarmigen Inhibitors ist jedoch sein hohes Molekulargewicht von 784 g/mol, welches weit über dem Zielwert von unter 500 g/mol für einen Arzneistoff-Kandidaten liegt. Ein Maß für das Potential einer Leitstruktur ist die Ligandeneffizienz (Δg). Sie erlaubt einen Vergleich zwischen Molekülen unterschiedlichen Molekulargewichts, indem sie das Verhältnis der freien Bindungsenergie (ΔG) zur Anzahl der Schweratome ($N_{\text{Schweratome}}$) nach Formel 1 abbildet. Die freie Bindungsenergie errechnet sich aus der Inhibitionskonstante K_i nach Formel 2. [55, 56] In der Literatur werden unterschiedliche Definitionen der Ligandeneffizienz verwendet, in dieser Arbeit wird jedoch von den in den Formeln 1 und 2 gegebenen Definitionen Gebrauch gemacht.

$$\Delta g = \frac{\Delta G}{N_{\text{Schweratome}}}$$

Formel 1: Berechnung der Ligandeneffizienz Δg

$$\Delta G = RT * \ln K_i$$

Formel 2: Berechnung der freien Bindungsenergie ΔG

Der Zielwert für die Ligandeneffizienz einer arzneistoffartigen (im Englischen *druglike*) Verbindung beträgt -0,29 kcal/mol, was in etwa einem 10 nM Inhibitor mit einem Molekulargewicht von ca. 500 g/mol entspricht. Indinavir, mit einem Molekulargewicht von 614 und einem K_i von 0,4 nM liegt ebenfalls genau bei dieser Ligandeneffizienz. [55, 57] Die Ligandeneffizienz von AB111 beträgt -0,19 kcal/mol. Es besteht somit die Hoffnung, durch gezielte strukturelle Abwandlung von AB111 diesen Wert zu optimieren, was sich zum einen über die Reduktion des Molekulargewichts, zum anderen über eine Verbesserung der Affinität erreichen ließe.

Um bei einem niedrigen Molekulargewicht eine gute Affinität zu erreichen, ist es essentiell, für jede besetzte Spezifitäts-Tasche optimal passende Substituenten zu finden. Da der Bindungsmodus der von Andreas Blum synthetisierten C_2 -symmetrischen Inhibitoren unsymmetrisch ist (vergleiche Abbildung 29), erfordert eine passende Dekoration des Grundgerüsts ebenfalls unsymmetrische Inhibitoren. [53]

Aus der Tatsache, dass eine der beiden Sulfonamid-Gruppen keine Interaktion zum Protein zeigt, entstand die Idee, durch Elimination dieser Gruppe das Molekulargewicht zu reduzieren und gleichzeitig die Effizienz zu steigern. Abbildung 32 (links) stellt den Ausgangspunkt für das Design der neuen Inhibitoren dar. Die durch das Pyrrolidin-Grundgerüst gut ausgebildeten Wechselwirkungen zu den Aspartaten 25 und 25' sowie jene zu den Isoleucinen 50 und 50' durch eine der beiden Sulfonamid-Gruppen sollten erhalten bleiben, das zweite Sulfonamid sollte ersetzt und gleichzeitig sollten optimale Substituenten zur Besetzung der Spezifitätstaschen entworfen werden (Abbildung 32, rechts).

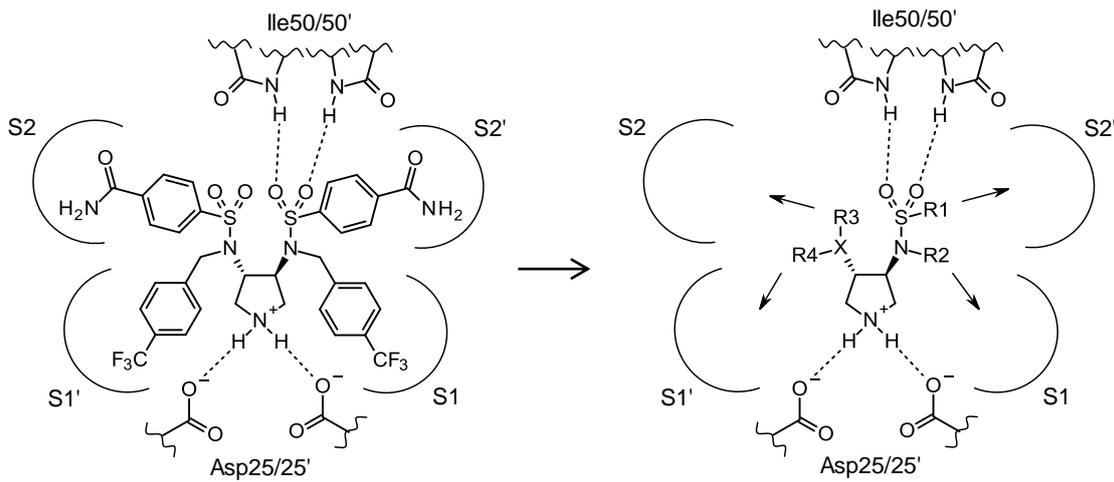


Abbildung 32: Das Grundgerüst von AB111 als Ausgangspunkt für neue Inhibitoren der HIV-Protease

Ziel dieser Arbeit war es also, basierend auf den Vorarbeiten von Andreas Blum unsymmetrische Inhibitoren für die HIV-Protease mit optimaler Taschenbesetzung, verringertem Molekulargewicht und einer erhöhten Ligandeneffizienz zu entwerfen, zu synthetisieren und ihre Affinität gegenüber dem Enzym zu bestimmen.

3 DREIARMIGE PYRROLIDIN-BASIERTE-INHIBITOREN DER HIV-PROTEASE

3.1 Docking

Wie im vorherigen Abschnitt ausführlich diskutiert und in Abbildung 32 veranschaulicht, bietet sich zur Verbesserung von AB111 zum einen die Eliminierung der nicht wechselwirkenden Sulfonamid-Gruppe und zum anderen die Optimierung der Substituenten für die Spezifitätstaschen an. Um aus der Vielzahl denkbarer Moleküle nur die vielversprechendsten darzustellen, sollte die Auswahl der entsprechenden Substituenten für die Synthese computer-gestützt mit Hilfe eines Dockingprogramms erfolgen. Zunächst sollte für das computer-gestützte Design der Pyrrolidin-basierten Inhibitoren ein geeignetes Dockingprogramm gewählt werden. Hierfür wurden die acht vorhandenen Kristallstrukturen [2, 52, 53] der von Andreas Blum dargestellten, Pyrrolidin-basierten Inhibitoren in Komplex mit der HIV-Protease untersucht. Für einen Inhibitor konnten zwei unterschiedliche Bindungsmodi röntgenkristallographisch beobachtet werden. Da sich jedoch nicht abschließend klären ließ, welcher Bindungsmodus der biologisch relevante ist, wurden diese Strukturen nicht weiter berücksichtigt. [58] Für die verbleibenden sechs Strukturen wurde ein so genanntes Redocking zur Evaluation der beiden Docking-Programme FlexX [59] und GOLD [60] durchgeführt¹. Hierbei wurde unter Verwendung der Standardeinstellungen versucht, die Liganden in die entsprechenden Bindetaschen einzupassen (Docking). Nach anschließender Bewertung (Scoring) wurden die erstellten Lösungen mit den experimentell bestimmten Kristallstrukturen verglichen (PDB-Codes: 2PQZ, 2PWC, 2PWR, 2QNN, 2QNP, 2QNQ). Als richtig wurde der Bindungsmodus angesehen, wenn die Wechselwirkungen des Pyrrolidins zu den Aspartaten 25 und 25' sowie die Wechselwirkung der beiden Sauerstoffatome von einer der beiden Sulfonamide zu den Isoleucinen 50 und 50' gefunden wurden und sich die auf Seite 27 beschriebene H-förmige Anordnung wieder fand.

Nach dieser Definition fand sich bei FlexX bei vier der sechs Verbindungen der richtige Bindungsmodus auf Rang 1. Bei GOLD wurde der richtige Bindungsmodus bei keiner der sechs Strukturen auf Rang 1 gefunden. In Abbildung 33 links ist die Rang-1-Dockinglösung von AB111 durch FlexX gezeigt. In Abbildung 33 rechts die Rang-1-Lösung von GOLD. Erst auf Rang 9 findet sich bei GOLD der richtige Bindungsmodus.

¹ Verwendete Versionen: FlexX 3.1.3, GOLD 4.0

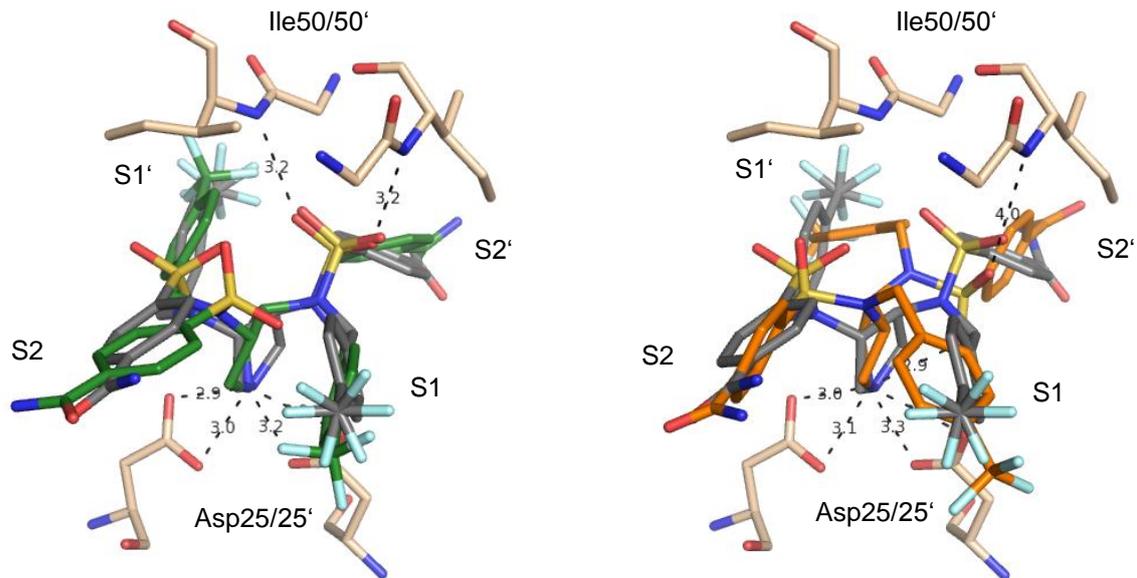
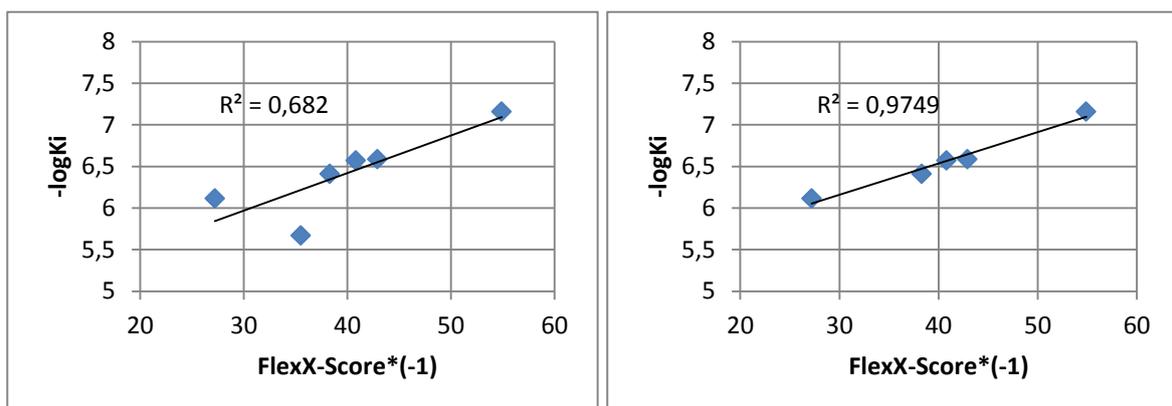


Abbildung 33: Links: Von FlexX vorhergesagter Bindungsmodus für AB111 in Grün, Ligand aus der Kristallstruktur in Grau (PDB-Code: 2QNN). Rechts: Von GOLD vorhergesagter Bindungsmodus für AB111 in Orange, Ligand aus der Kristallstruktur in Grau (PDB-Code: 2QNN).

Auch die Bewertung durch die FlexX eigene Scoringfunktion stimmt sehr gut mit den experimentell bestimmten Daten überein. Die Inhibitoren aus den sechs Kristallstrukturen (PDB-Codes: 2PQZ, 2PWC, 2PWR, 2QNN, 2QNP, 2QNQ) wurden im Komplex mit ihrer Binde-tasche durch FlexX bewertet. Die Korrelation des FlexX-Scores zu dem experimentell bestimmten $-\log K_i$ ist mit einem quadrierten Korrelationsfaktors von 0,68 zufriedenstellend. Bezieht man den Inhibitor mit der geringsten Affinität nicht mit ein, beträgt das Quadrat des Korrelationsfaktors 0,97 und ist somit als sehr gut zu bewerten (siehe Grafik 1).



Grafik 1: Links: Der FlexX-Score (*-1) aufgetragen gegen $-\log K_i$ der Inhibitoren von Andreas Blum (PDB-Codes: 2PQZ, 2PWC, 2PWR, 2QNN, 2QNP, 2QNQ). Rechts: FlexX-Score(*-1) aufgetragen gegen $-\log K_i$ der Inhibitoren von Andreas Blum ohne den Inhibitor mit der geringsten Affinität (PDB-Codes: 2PWC, 2PWR, 2QNN, 2QNP, 2QNQ).

Auf Grund dieser Ergebnisse wurde FlexX als Dockingprogramm für die weiteren Studien verwendet.

Bevor nun mit FlexX geeignete Substituenten für R1-4 (Abbildung 32, rechts) bestimmt werden konnten, musste zunächst ein passender Linker für X (Abbildung 32, rechts) gefunden werden. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Linker (Stickstoff, Sauerstoff, Amid und Tetrazol) mit einer Methylgruppe dekoriert und gedockt.¹ Es zeigte sich, dass das Amin von FlexX am besten bewertet wird, da die Ausbildung einer zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindung möglich ist. (Abbildung 34).

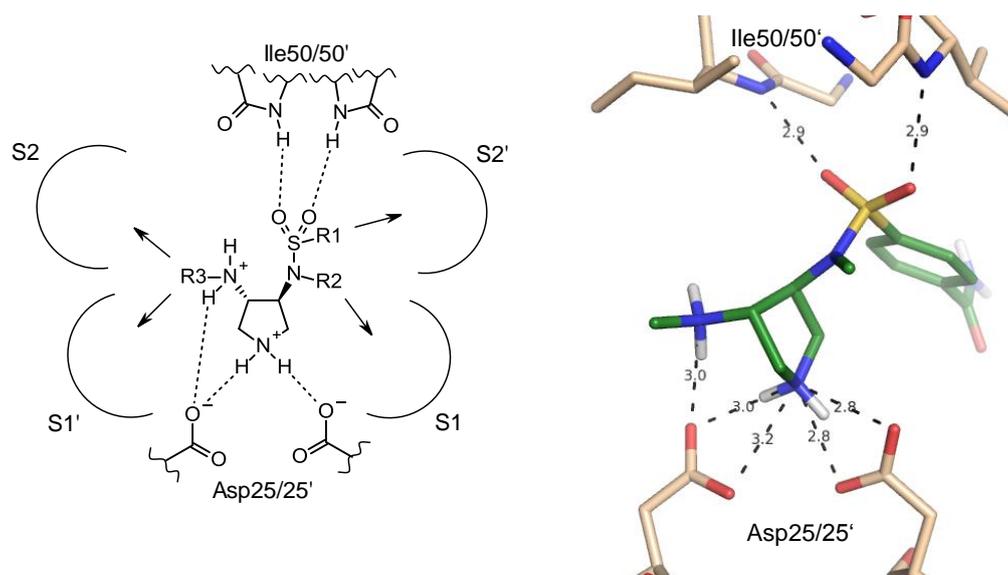


Abbildung 34: Schematische Darstellung (links) und Dockinglösung (rechts) des von FlexX vorhergesagten Bindungsmodus für dreiarmige Pyrrolidin-basierte Inhibitoren mit einem Stickstoff als Linker.

Um die Substituenten für R1 bis R3 gegenüber jenen von AB111 zu optimieren, wurde die Komplexstruktur von AB111 mit allen in der PDB verfügbaren HIV-Protease-Strukturen überlagert und die ca. 500 Liganden im Hinblick auf die Wechselwirkungen zum Protein einer genauen Betrachtung unterzogen. Hierbei wurde gezielt nach Möglichkeiten gesucht, neue Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden oder mehr Oberfläche des Liganden effizient zu vergraben. Bei der Auswahl neuer Substituenten wurde zusätzlich auf die kommerzielle Verfügbarkeit der entsprechenden Synthese-Edukte geachtet. Insgesamt wurden 26 Substituenten für R1-3 ausgewählt und gedockt², wobei immer nur einer der drei Reste variiert und die übrigen beiden beibehalten wurden. Daraus wurden unter Berücksichtigung des FlexX-

¹ Verwendete FlexX-Version: FlexX 3.1.3

² Verwendete FlexX-Version: Leadit 2.0.2

Scores und visueller Auswertung neun Inhibitoren für die Synthese ausgewählt. Die Ideen und Überlegungen bezüglich des Designs und die Dockinglösungen der ausgewählten Substituenten seien im Folgenden kurz vorgestellt.

Substituenten für R1:

Der Carboxamid-Substituent, welcher bereits von Andreas Blum als gut geeigneter Substituent für die S2'-Tasche identifiziert wurde [52], erwies sich im Docking der dreiarmligen Verbindungen als optimal für R1, weshalb dieser zunächst beibehalten werden sollte. Die Interaktionen der Carboxamid-Gruppe in der S2'-Tasche zeigt bereits Abbildung 29 auf Seite 26.

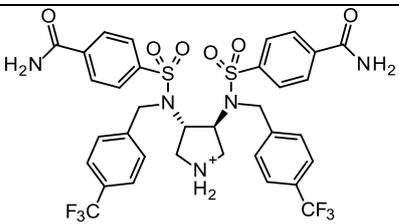
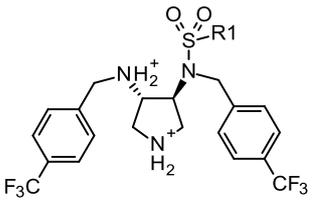
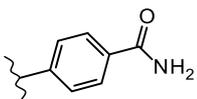
Konstanter Molekülteil	Verbindung	R1	FlexX-Score
	AB111		-46
	1		-45

Tabelle 1: Für die Synthese ausgewählter Substituent für R1

Verbindung 1 ist auch deshalb interessant, da sie einen guten Vergleich mit AB111 erlaubt. Alle Substituenten entsprechen denen von AB111 nur der Sulfonamid-Rest wurde eliminiert. Es ist bemerkenswert, dass der FlexX-Score für beide Verbindungen etwa gleich ist, obwohl Verbindung 1 wesentlich kleiner ist. Das zeigt, wie gut FlexX die mögliche neue Wasserstoffbrückenbindung des exozyklischen sekundären Amins bewertet.

Substituenten für R2:

Auch für diese Position erwies es sich als schwierig, Substituenten zu identifizieren, welche von FlexX besser bewertet werden als die Ausgangsverbindung 1. Dennoch konnten auf Grund von vorhandenem Wissen aus den Arbeiten von Andreas Blum und zwei interessanten Kristallstrukturen aus der PDB (PDB-Codes: 1HWR, 1T7K) fünf neue Substituenten (Verbindung 2-6) für die Synthese ausgewählt werden (Tabelle 2). Die Substituenten für R1 und R3 wurden für eine gute Vergleichbarkeit analog zu denen von AB111 gewählt.

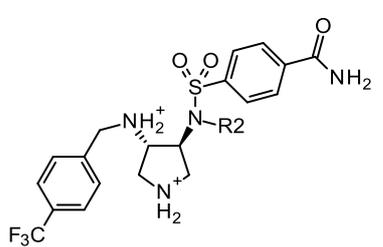
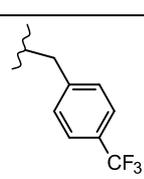
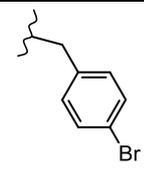
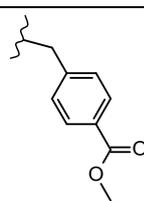
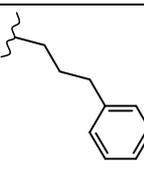
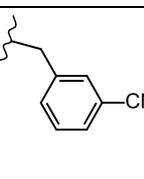
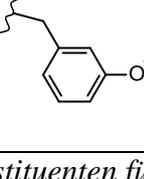
Konstanter Molekülteil	Verbindung	R2	FlexX-Score
	1		-45
	2		-45
	3		-43
	4		-43
	5		-42
	6		-44

Tabelle 2: Für die Synthese ausgewählte Substituenten für R2

Der Brom-Substituent (Verbindung 2) stellt nur eine leichte Abwandlung der schon in AB111 vorhandenen CF₃-Gruppe (Verbindung 1) dar und wurde ausgewählt, da bei den von Andreas Blum dargestellten Verbindungen der Austausch der CF₃-Gruppen gegen einen Brom-Substituenten eine Verbesserung der Affinität um den Faktor zwei zur Folge hatte. Es erschien daher sinnvoll zu überprüfen, ob sich dieser Trend auch bei den dreiarmigen Inhibitoren bestätigt. Wie die CF₃-Gruppe, kann der Brom-Substituent mit dem positiv geladenen Arginin 8 interagieren (siehe Abbildung 35).

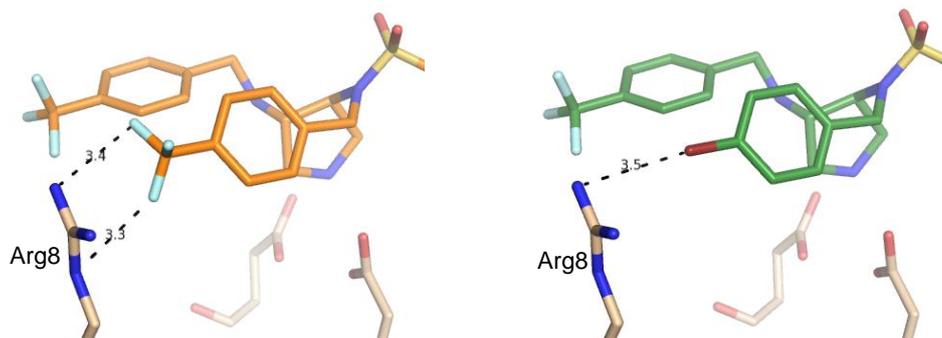


Abbildung 35: Links: Dockinglösung für Verbindung 1 und 2: Die partial negativ geladene CF_3 -Gruppe der Verbindung 1 (links, Orange) und der ebenfalls partial negativ geladene Brom-Substituent der Verbindung 2 (rechts, Grün) befinden sich in räumlicher Nähe zum positiv geladenen Arginin 8.

Wie zu erwarten ist, wird Verbindung 2 von FlexX ähnlich gut bewertet wie Verbindung 1.

Eine andere Möglichkeit mit der Seitenkette des Arginins 8 zu interagieren, bietet eine Ester-Gruppe. Bei gleicher Anordnung des Arginins 8 kann der Ester zwar nicht optimal mit dem Arginin interagieren, weshalb er von FlexX auch nur mit einem Score von -43 bewertet wird. Es ist jedoch aus anderen Kristallstrukturen bekannt, dass dieses Arginin 8 flexibel ist. Überlagert man die generierte Dockinglösung nun mit anderen Kristallstrukturen der HIV-Protease (hier PDB-Code: 1HWR) wird deutlich, dass die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung möglich sein sollte (Abbildung 36).

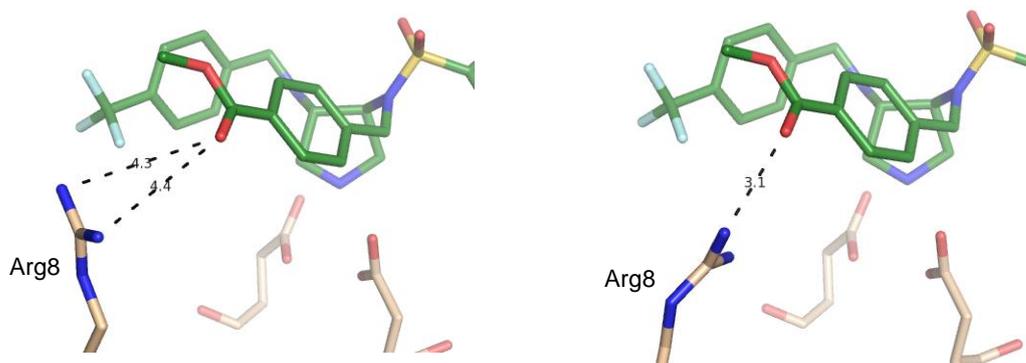


Abbildung 36: Dockinglösung für Verbindung 3. Bei Anordnung des Arginin 8 wie in der Struktur 2QNN (links), ist der Abstand zum Inhibitor zu groß. Nimmt die Seitenkette dieses Arginins jedoch eine Orientierung an, die sich stärker der Bindetasche nähert, wie bei der Struktur 1HWR (rechts), könnte sich eine Wasserstoffbrückenbindung zum Inhibitor ausbilden.

Des Weiteren wurde ein Propylphenyl-Substituent zur Synthese ausgewählt. Der Nachteil dieser Gruppe ist ein ungünstiger entropischer Beitrag bei Bindung an das Enzym, da er zwei zusätzliche freidrehbare Bindungen enthält. Die erhöhte Anzahl an freidrehbaren Bindungen

resultiert auch in einem geringfügig verschlechterten FlexX-Score im Vergleich zur Ausgangsverbindung 1. Die erhöhte Flexibilität könnte aber auch von Vorteil sein, da sich für die dreiarmligen Inhibitoren eventuell eine leicht veränderte Position des Grundgerüsts ergeben könnte, an die sich möglicherweise die flexibleren Substituenten besser anpassen können. Deshalb wurde dieser Substituent trotz der vergleichsweise schlechten Bewertung für die Synthese ausgewählt.

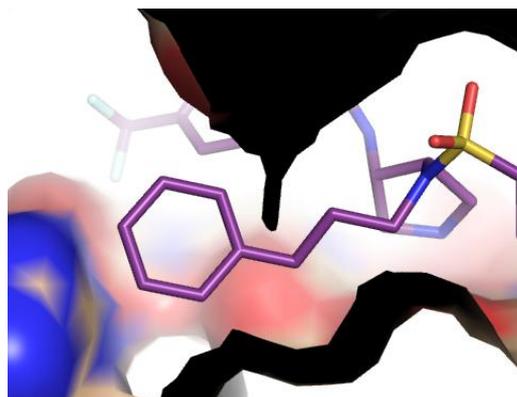


Abbildung 37: Dockinglösung für Verbindung 4

Bei dem Vergleich mit vorhandenen Strukturen der HIV-Protease fiel eine weitere Struktur (PDB-Code: 1T7K) besonders auf. Die Struktur enthält einen Inhibitor vom Typ der zyklischen Harnstoffe (Abbildung 38), welcher mit einer Nitril-Gruppe eine kleine Mulde in der S1-Bindetasche ausfüllt. Um diese Vertiefung zu adressieren, wurden für die dreiarmligen Pyrrolidin-basierten Inhibitoren ebenfalls eine Nitril-Funktionalität und als Alternative ein Methylether ausgewählt. Die Dockinglösung zeigt, dass beide Substituenten die kleine Vertiefung der S1-Tasche besetzen können (Abbildung 39). Auch diese Lösungen werden zwar nicht besser bewertet als die Ausgangsverbindung 1, da der Nitril-substituierte zyklische Harnstoff aber einen Hemmwert von 1,4 nM aufweist [2], erschien dieser Ansatz dennoch vielversprechend.

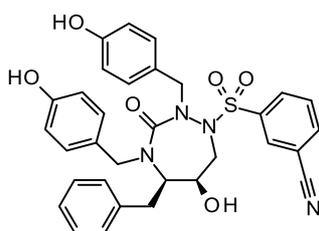


Abbildung 38: Ligand der Struktur 1T7K

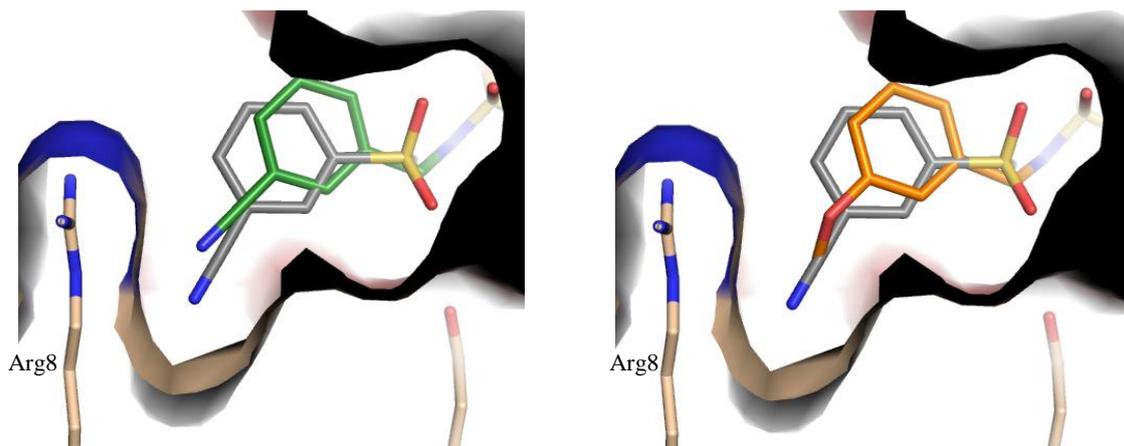


Abbildung 39: Dockinglösungen für Verbindung 5 (links, Grün) und Verbindung 6 (rechts, Orange) überlagert mit dem Liganden aus IT7K (Grau)

Substituenten für R3:

Für die Position R3 konnten im ersten Design-Zyklus vier besonders interessante Substituenten identifiziert werden, welche durch FlexX im Vergleich zu der Ausgangsverbindung 1 wesentlich besser bewertet werden (Tabelle 3). Auch hier wurden zur besseren Vergleichbarkeit die Substituenten für R1 und R2 analog zu AB111 gewählt. Beim Docking mit FlexX fiel auf, dass das Programm ab der Version LeadIt 1.0.0 den dritten Arm, fast immer in der S2-Bindetasche platziert. Bei der vorherigen Version FlexX 3.1.4 fand sich unter den besten fünf Lösungen sowohl die Platzierung in der S1'- als auch in der S2-Tasche und eine klare Präferenz konnte mit der älteren Version nicht abgeleitet werden. Alle in dieser Arbeit zur Synthese ausgewählten Verbindungen wurden daher mit der Version LeadIt 2.0.2 gedockt, sodass die gezeigten Scores alle vergleichbar sind. Vor diesem Hintergrund war vor allem das Ergebnis für den CF₃-Substituenten interessant, da die neue Version von FlexX diesen Rest in der S2-Tasche platziert, er aber in der Kristallstruktur von AB111 in der S1'-Tasche zum Liegen kommt.

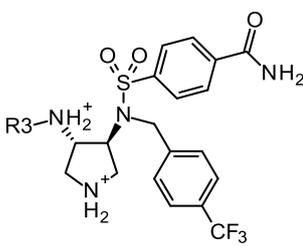
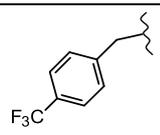
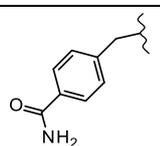
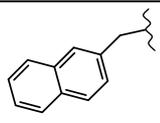
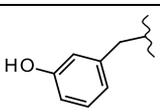
Konstanter Molekülteil	Verbindung	R3	FlexX-Score
	1		-45
	7		-53
	8		-52
	9		-51

Tabelle 3: Für die Synthese ausgewählte Substituenten für R3

Die ersten beiden ausgewählten Substituenten (Verbindung 1 und 7) finden sich bereits in AB111 und ermöglichen deshalb den direkten Vergleich mit den vierarmigen Inhibitoren. Der CF₃-Substituent kann in der S2-Tasche als Wasserstoffbrücken-Akzeptor für das Rückgrat der Aspartate 29 und 30 dienen (Abbildung 40).

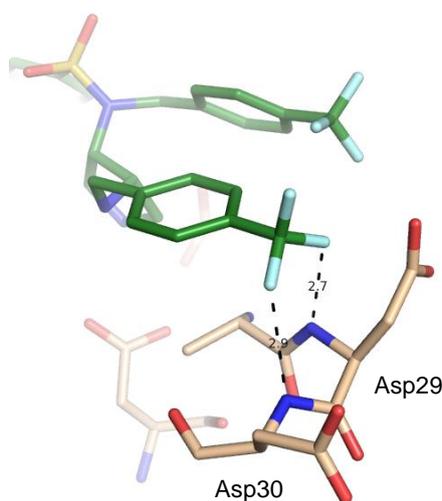


Abbildung 40: Dockinglösung für Verbindung 1

Der Carboxamid-Substituent kann sowohl als Wasserstoffbrückenakzeptor mit dem Rückgrat von Aspartat 30 interagieren als auch als Wasserstoffbrückendonator mit der Seitenkette von Aspartat 29. Wie Verbindung 1 bildet Verbindung 7 in der Dockinglösung zwei Wasserstoff-

brückenbindungen zum Protein aus (Abbildung 41). Allerdings sind Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Stickstoff und Sauerstoff stärker als die zwischen Fluor und Stickstoff [61], was sich auch in dem stark verbesserten Score von -53 für Verbindung 7 niederschlägt.

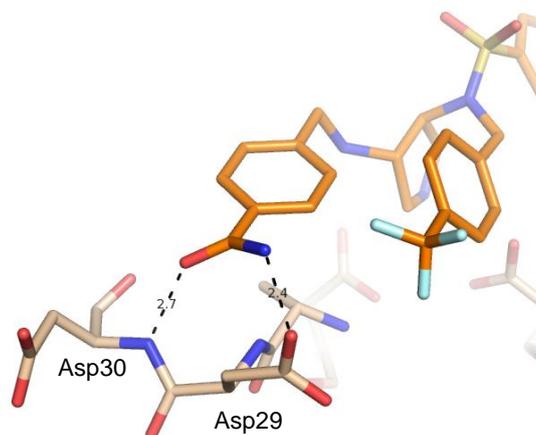


Abbildung 41: Dockinglösung für Verbindung 7

Es wurde weiterhin ein Substituent ausgewählt, welcher zusätzliche lipophile Wechselwirkungen eingehen kann. Der Naphthyl-Rest fügt sich gut in die S2-Tasche ein (Abbildung 42), sollte aber ebenfalls die S1-Tasche ausfüllen können, falls sich diese in der Praxis als bevorzugte Bindetasche für die dreiarmigen Inhibitoren herauskristallisieren sollte. Auch der Naphthyl-Substituent wird mit einem Score von -52 sehr gut bewertet.

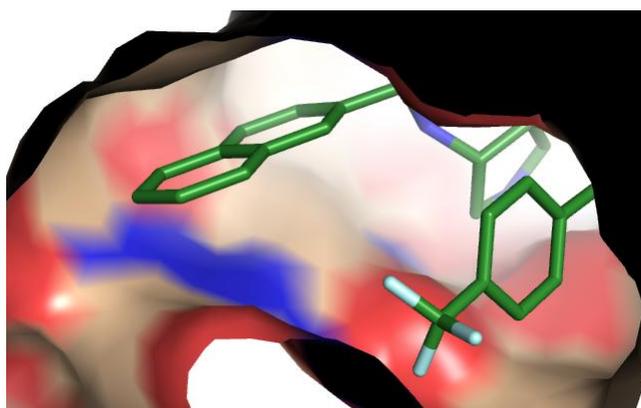


Abbildung 42: Dockinglösung Verbindung 8

Eine im Vergleich zu AB111 neuartige Wechselwirkung zum Carbonyl-Sauerstoff des Rückgrats von Aspartat 30 kann möglicherweise der Hydroxy-Substituent (Verbindung 9) ausbilden. Als zusätzliche Wechselwirkung wird eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Stickstoff-

Atom des Rückgrats von Aspartat 30 und der Hydroxy-Gruppe vorhergesagt (Abbildung 43). FlexX bewertet die Verbindung 9 ebenfalls sehr gut mit einem Score von -51.

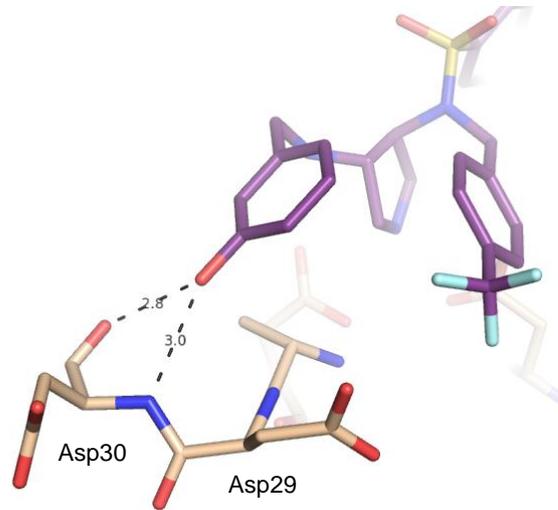


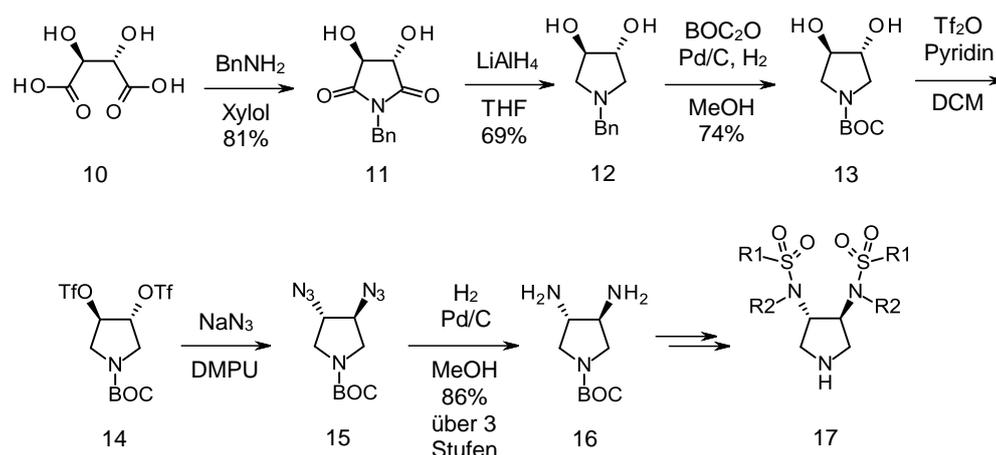
Abbildung 43: Dockinglösung für Verbindung 9

Insgesamt sollten also neun mögliche Inhibitoren synthetisiert werden, wobei die Variation an R3 besonders vielversprechend erschien.

3.2 Synthese

3.2.1 Möglichkeiten zur Desymmetrisierung

Im Gegensatz zu AB111 und den anderen von Andreas Blum synthetisierten Derivaten weisen die dreiarmligen Pyrrrolidine keine C_2 -Symmetrie auf. Synthetisch bestand also die Herausforderung in der Desymmetrisierung der Verbindungen. Die Darstellung der dreiarmligen Pyrrrolidine sollte solange wie möglich der von Andreas Blum entwickelten und optimierten Synthesesequenz folgen, welche in Schema 1 skizziert ist. [52, 53]



Schema 1: Im Arbeitskreis Diederich entwickelte Synthese zur Darstellung der C₂-symmetrischen vierarmigen Pyrrolidine

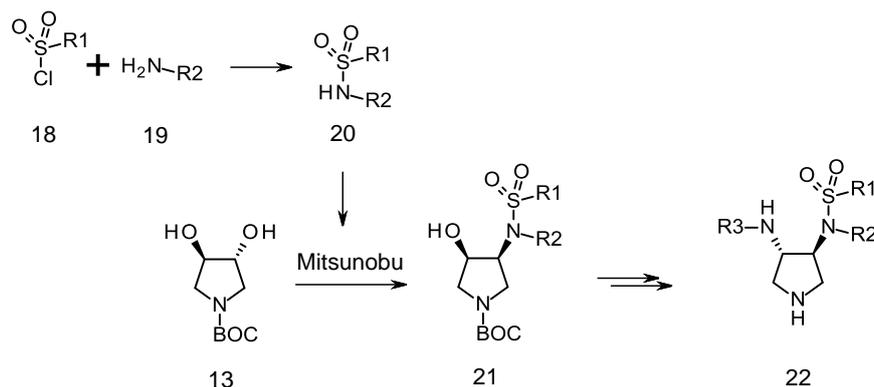
Zur Desymmetrisierung bieten sich in dieser Sequenz vor allem Verbindung 13 und 15 (Schema 1) an, da, wie aus früheren Arbeiten bekannt, die Abspaltung der Benzyl-Schutzgruppe von Verbindung 12 nach Derivatisierung Schwierigkeiten bereitet und Verbindung 14 zu instabil ist. Zuerst sollte versucht werden, das Diol 13 zu desymmetrisieren, da das Azid 15 eine potentiell explosive Verbindung darstellt. Nach einer Faustregel gelten organische Azide als potentiell explosiv, wenn der Quotient aus der Anzahl der Kohlenstoff- und Sauerstoff-Atome ($n_C + n_O$) und der Anzahl der Stickstoff-Atome (n_N) einen Wert unter drei ergibt (Formel 3). [62]

$$\frac{n_C + n_O}{n_N} < 3$$

Formel 3: Organische Azide sind potentiell explosiv, wenn diese Bedingung erfüllt ist.

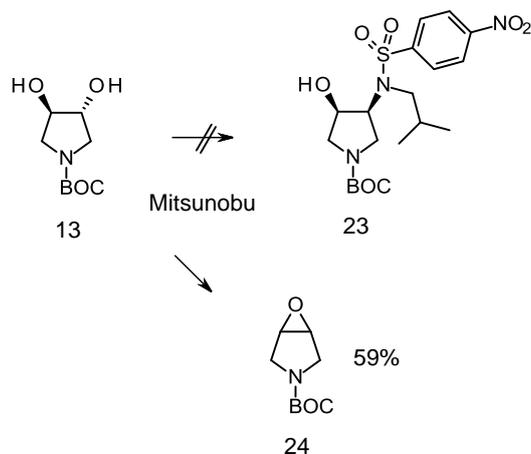
Gelänge die Desymmetrisierung auf der Stufe des Diols 13 könnte das Arbeiten mit dem potentiell explosiven Bisazid 15 ($n_C + n_O / n_N = 1,57$) vermieden werden.

Daher wurden zunächst Versuche unternommen, durch eine Mitsunobu-Reaktion mit einem Sulfonamid (Verbindung 20, Schema 2) eine der beiden Alkohol-Gruppen zu substituieren. [63, 64] Die verbleibende Alkohol-Funktion des Produkts wäre sterisch wahrscheinlich ausreichend abgeschirmt, um eine unerwünschte Zweitsubstitution zu verhindern. Zusätzlich wäre dieser Syntheseweg besonders kurz und würde eine konvergente Route darstellen (Schema 2).



Schema 2: Synthesepfad zur Desymmetrisierung mittels Mitsunobu-Reaktion

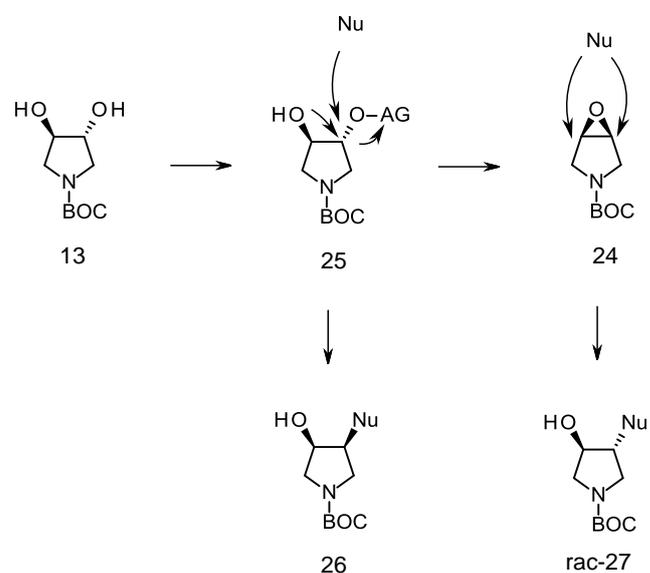
Die Reaktion wurde mit einem Test-Sulfonamid aus einer internen Substanzbibliothek durchgeführt. Als Reagenzien kamen Triphenylphosphin (TPP) und DIAD in THF zum Einsatz. Wider Erwarten erfolgte der Angriff auf die aktivierte Hydroxy-Gruppe durch die zweite Alkohol-Funktion und nicht wie gewünscht durch das zugesetzte Sulfonamid. Somit konnte lediglich das achirale Epoxid isoliert werden (Schema 3).



Schema 3: Versuch 1 zur Desymmetrisierung mittels Mitsunobu-Reaktion

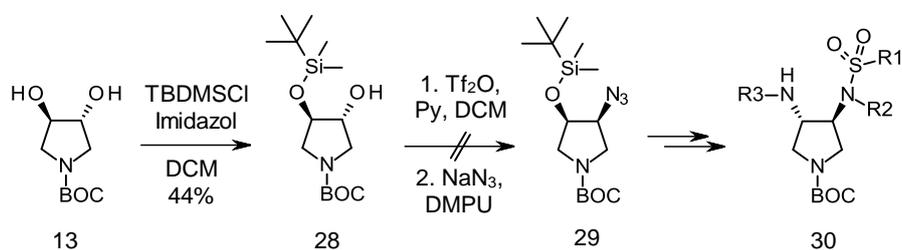
Diese Reaktion wird wahrscheinlich durch die *trans*-Anordnung der Alkohol-Gruppen begünstigt und ist deshalb bei allen Reaktionen zu erwarten, bei denen selektiv nur eine Hydroxy-Gruppe in eine Abgangsgruppe überführt wird (Schema 4). Selbst für den Fall, dass das zugesetzte Nukleophil schnell genug angreift, um das gewünschte Produkt zu bilden, wäre die Bildung des Epoxids 24 als Nebenprodukt möglich. Dieses könnte wiederum von dem Nukleophil geöffnet werden. Eine Trennung des so entstehenden racemischen *trans*-Produkts 27 vom gewünschten enantiomerenreinen *cis*-Produkt 26 wäre voraussichtlich, vor allem vor

dem Hintergrund der für die weitere Synthese benötigten Mengen von Verbindung 26, problematisch.



Schema 4: Mögliche Nebenreaktion bei Einsatz anderer Abgangsgruppen und Nukleophile

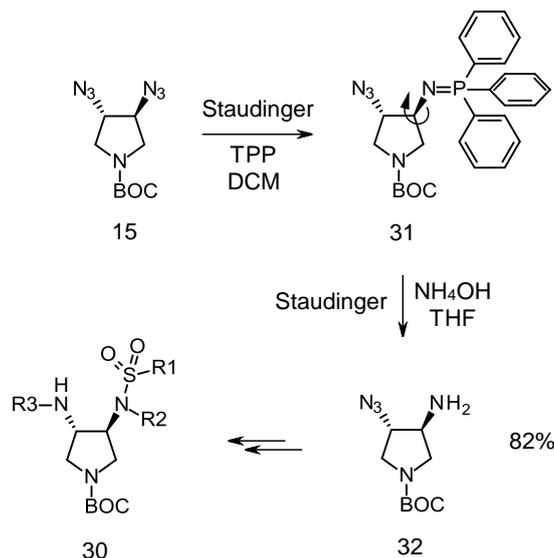
Um die Bildung dieses unerwünschten Nebenprodukts zu unterbinden, wurde im nächsten Schritt versucht, eine der beiden Alkohol-Gruppen zu schützen (Schema 5). [65] Die Schützungsung mit der sterisch anspruchsvollen Schutzgruppe TBDMS erfolgte mit einer mäßigen Ausbeute von 44 %. Darüber hinaus gelang die weitere Umsetzung zum Azid 29, der Vorstufe des benötigten Amins trotz Variation der Reaktionsbedingungen nicht (vergleiche Schema 5). Der Grund könnte in der sterischen Abschirmung durch die TBDMS-Gruppe liegen, wobei sowohl Triflat als Abgangsgruppe als auch Azid als Nukleophil relativ klein sind. Versuche mit anderen, größeren Nukleophilen erschienen deshalb nicht aussichtsreich.



Schema 5: Versuch 2 zur Desymmetrisierung durch eine sterisch anspruchsvolle Silyl-Schutzgruppe

Im nächsten Schritt wurden Versuche unternommen, die Staudinger-Reduktion zur Desymmetrisierung des Bisazids zu nutzen. [66] Idealerweise sollte durch den sterischen Anspruch

des verwendeten Triphenylphosphins (TPP) nur eins der beiden Azide zum Amin reduziert werden. [67] Nach Optimierung der Reaktionsparameter ($T < -10\text{ }^{\circ}\text{C}$) gelang die Darstellung des gewünschten Monoazids in sehr guten Ausbeuten. In Schema 6 ist die Reaktionssequenz und die Abschirmung des zweiten Azids durch TPP gezeigt.



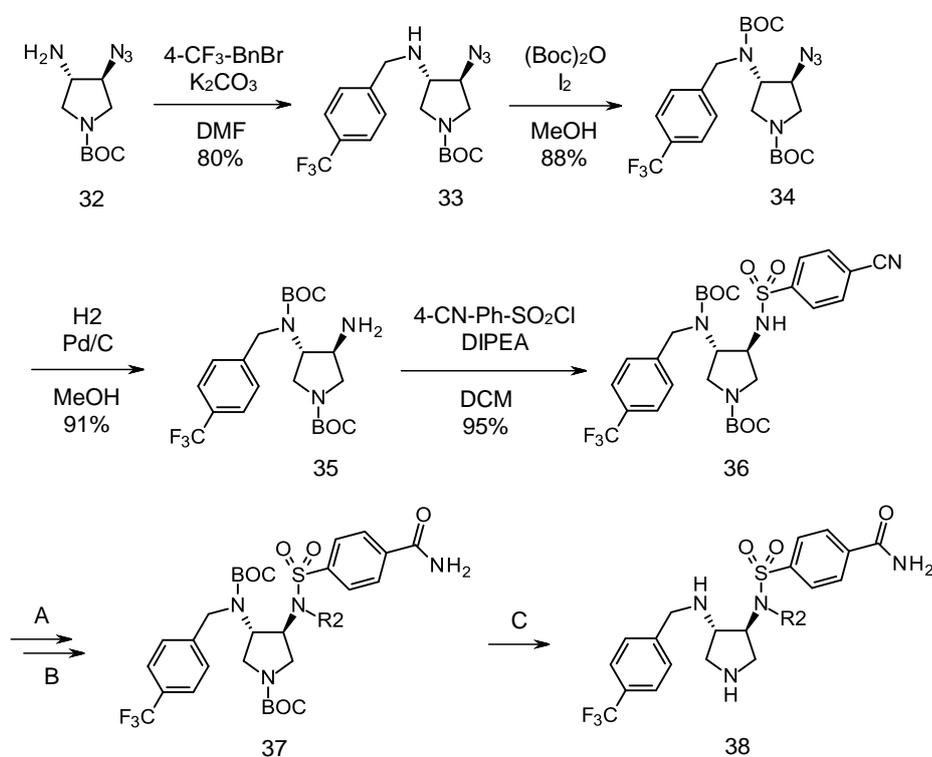
Schema 6: Versuch 3 zur Desymmetrisierung mittels Staudinger-Reduktion

Somit konnte die Verbindung 32 in sehr guten Ausbeuten und auf relativ kurzem Weg erhalten werden. Die Gesamtausbeute für 32 beträgt 28 % über sechs Stufen ausgehend von Weinsäure. Nachteil dieser Route ist, dass sie das Arbeiten mit der potentiell explosiven Verbindung 15 erfordert. Um die Gefahr zu minimieren wurde daher das Bisazid 15 nach säulenchromatografischer Aufreinigung nicht vollständig getrocknet, sondern das Lösungsmittelvolumen bei Raumtemperatur nur auf ein Viertel eingengt und direkt mit dem für die Staudinger-Reaktion erforderlichen Lösungsmittel DCM versetzt. Die Menge an reinem Azid wurde durch Extrapolation bestimmt, indem von einem kleinen Anteil der vereinigten Säulenfraktionen das Lösungsmittel vollständig entfernt, das Produkt anschließend getrocknet und gewogen wurde. Als weitere Sicherheitsmaßnahme wurden maximal 6,6 g (26 mmol) des Bisazids 15 synthetisiert und das Rohprodukt in mindestens zwei Teilmengen (maximal 13 mmol) aufgereinigt und aufkonzentriert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden so insgesamt etwa 56 g (0,22 mol) des Bisazids dargestellt, ohne dass eine spontane Zersetzung beobachtet wurde. Das daraus hergestellte Monoazid 32 diente im Folgenden als Grundbaustein für die Synthese aller dreiarmigen Pyrrolidin-basierten Inhibitoren.

3.2.2 Syntheserouten zur effizienten Variation aller drei Substituenten der Inhibitoren

Ausgehend von dem Monoazid 32 sollten nun die aus dem Docking ausgewählten Substituenten eingeführt werden (Schema 7). Um einen besseren Vergleich der Verbindungen

untereinander zu ermöglichen, sollte dabei nur jeweils ein Rest variiert und die beiden anderen konstant gehalten werden. Um die Reste R1 und R2 (vergleiche Abbildung 32, rechts) möglichst spät in der Synthese einführen zu können, wurde zuerst das primäre Amin mit 4-(Trifluormethyl)benzylbromid und Kaliumcarbonat als Base alkyliert. Die Alkylierung erfolgte mit guten Ausbeuten von 80 %. Im nächsten Schritt wurde das sekundäre Amin mit einer Boc-Gruppe geschützt. Um hier eine vollständige Umsetzung zu erreichen musste Iod als Katalysator eingesetzt werden. [68] Mit dieser Methode konnten sehr gute Ausbeuten von 88 % erzielt werden. Im Anschluss wurde das zweite Azid mit ebenfalls sehr guten Ausbeuten (91 %) unter Verwendung von Wasserstoff und Palladium auf Aktivkohle zum primären Amin hydriert. Ausgehend von der Verbindung 36 konnten nun die verschiedenen Substituenten für R2 eingeführt werden. Hierfür wird zunächst das Sulfonamid dargestellt (Verbindung 35 zu 36). Dieses wurde dann mit dem entsprechenden Arylbromid alkyliert (Schritt A). Danach wurde das Nitril aus R1 mit Wasserstoffperoxid und Kaliumcarbonat hydrolysiert (Schritt B). Diese Reihenfolge ergab die besten Ausbeuten. In dem Fall, in dem R2 ebenfalls eine Nitril-Gruppe trägt, wurden die Schritte A und B in umgekehrter Reihenfolge durchgeführt. Im letzten Schritt folgte die Entschützung der beiden Amine mit Salzsäure in Diethylether (Schritt C).



Schema 7: Syntheseroute für die Variation an R2

Versuche zunächst R2 und anschließend R1 einzuführen misslingen, vermutlich weil der Angriff des Sulfonylchlorids sterisch ungünstig ist. Da FlexX die Variation von R2 jedoch aussichtsreicher bewertete als die von R1, war eine weitere Optimierung hinsichtlich der späteren Einführung von R1 nicht notwendig.

In der Tabelle 4 sind die verwendeten Reagenzien und Ausbeuten der Schritte A bis C aufgeführt. Da es sich hier um eine 13-stufige Synthese handelt, wurden die Ausbeuten der beiden letzten Schritte nicht optimiert.

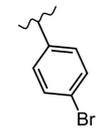
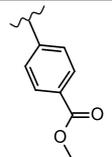
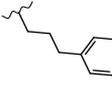
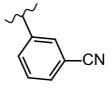
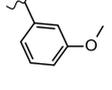
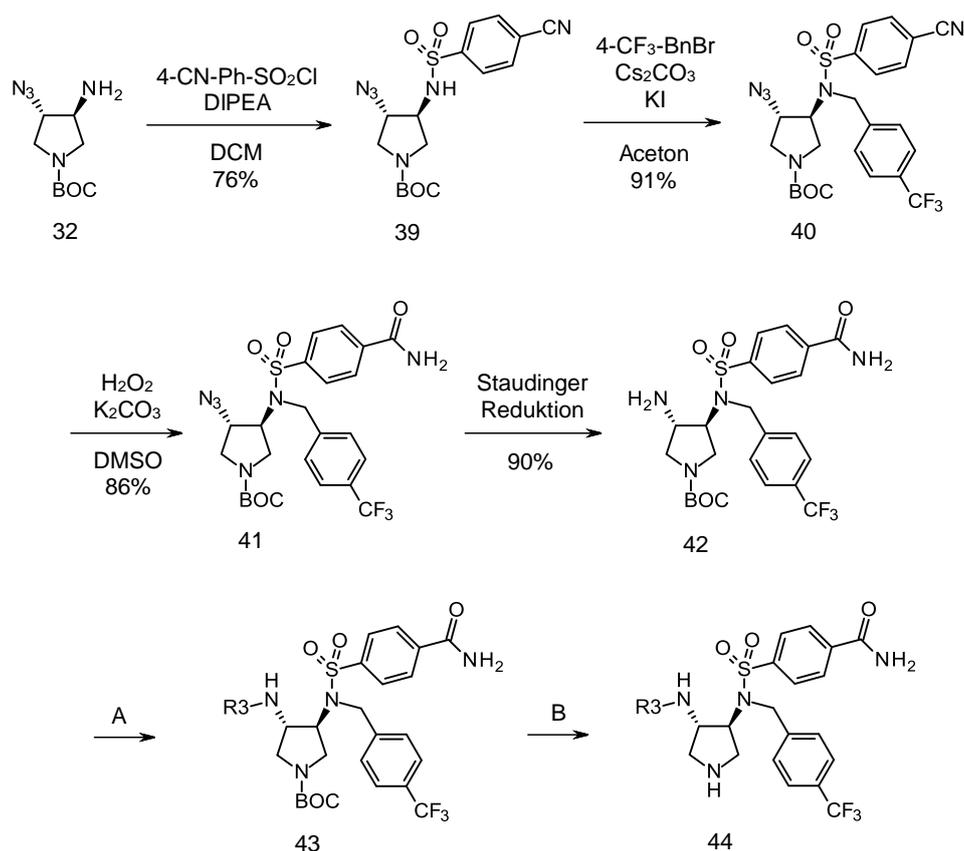
	R2	Schritt A		Schritt B		Schritt C	
		Reagenzien	Ausbeute	Reagenzien	Ausbeute	Reagenzien	Ausbeute
2		1-Brom-4-(Bromomethyl)-benzen, Cs ₂ CO ₃ , MeCN	76 %	K ₂ CO ₃ , H ₂ O ₂ , DMSO	*	HCl in Et ₂ O, EtOAc	59 % (über 2 Stufen)
3		Methyl-4-(Bromomethyl)-benzoat, Cs ₂ CO ₃ , MeCN	*	K ₂ CO ₃ , H ₂ O ₂ , DMSO	55 % (über 2 Stufen)	HCl in Et ₂ O, EtOAc	94 %
4		3-Bromo-propylbenzen, Cs ₂ CO ₃ , MeCN	*	K ₂ CO ₃ , H ₂ O ₂ , DMSO	78 % (über 2 Stufen)	HCl in Et ₂ O, EtOAc	96 %
5		K ₂ CO ₃ , H ₂ O ₂ , DMSO	94 %	3-(Bromomethyl)-Benzonitril, Cs ₂ CO ₃ , MeCN	60 %	HCl in Et ₂ O, EtOAc	55 %
6		1-(Bromomethyl)-3-methoxy-benzen, Cs ₂ CO ₃ , MeCN	*	K ₂ CO ₃ , H ₂ O ₂ , DMSO	65 % (über 2 Stufen)	HCl in Et ₂ O, EtOAc	95 %

Tabelle 4: Reagenzien und Ausbeuten der Schritte A bis C. * Das Produkt wurde nicht vollständig charakterisiert sondern direkt weiter umgesetzt.

Zur Optimierung von R3 bedurfte es einer anderen Sequenz, um diesen Rest möglichst spät einführen zu können. Die Syntheseroute zur Variation von R3 ausgehend von dem Monoazid 35 ist in Schema 8 im Detail gezeigt. Zuerst wurde deshalb R1 eingeführt, indem das Amin mit

4-Cyanobenzensulfonylchlorid in Gegenwart von Hünig-Base zum Sulfonamid 39 umgesetzt wurde. Im Anschluss wurde dieses Sulfonamid mit 4-(Trifluoromethyl)benzylbromid, einer katalytischen Menge Kaliumiodid und Cäsiumcarbonat als Base alkyliert (Verbindung 40). Mit der Hydrolyse des Nitrils zum Carboxamid durch Wasserstoffperoxid und Kaliumcarbonat war die Dekoration mit den Resten R1 und R2 abgeschlossen. Diese drei Stufen erfolgten analog der Synthese der vierarmigen Pyrrolidin-basierten Inhibitoren [52, 53] und verliefen auch hier in guten bis sehr guten Ausbeuten von 76 %, 91 % und 86 %. Um R3 einführen zu können, musste nun das Azid 41 in das Amin 42 überführt werden. Die Hydrierung von 41 mit Wasserstoff und Palladium auf Aktivkohle, verlief unsauber und die Aufreinigung bereitete Schwierigkeiten. Deshalb wurde zur Umwandlung des Azids 41 zum Amin 42 erneut die Staudinger-Methode, die mit sehr guten Ausbeuten (90 %) verlief, angewendet. Die Verbindung 42 konnte so mit einer Gesamtausbeute von 15 % über 10 Stufen, ausgehend von Weinsäure, dargestellt werden. Von dieser Zwischenstufe aus konnten nun die verschiedenen Substituenten für R3 eingeführt werden. Zur Synthese des sekundärenamins wurde je nach Verfügbarkeit der Edukte entweder eine reduktive Aminierung mit einem Aldehyd oder eine Alkylierung mit einem Arylbromid durchgeführt. Als letzter Schritt folgte daraufhin die Entschützung des Boc-geschützten Amins mit Salzsäure in Diethylether. Die Edukte und Ausbeuten der letzten beiden Reaktionen sind in Tabelle 5 angegeben. Da es sich auch hier um eine relativ lange Synthese mit 12 Stufen handelt, wurden die Ausbeuten der beiden letzten Schritte nicht optimiert.



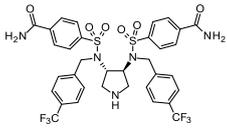
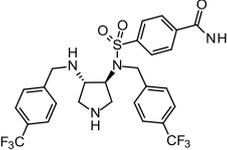
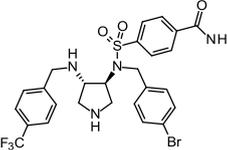
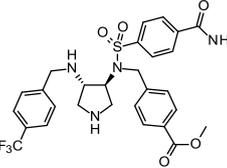
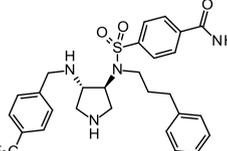
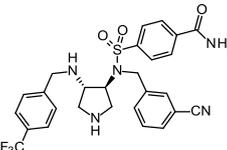
Schema 8: Syntheseroute zur Variation von R3

	R3	Schritt A		Schritt B	
		Reagenzien	Ausbeute	Reagenzien	Ausbeute
1		4-(Trifluoromethyl)benzylbromid, K ₂ CO ₃ , DMF	49 %	HCl in Et ₂ O, DCM, EtOAc	88 %
7		4-(Bromomethyl)benzonnitril, K ₂ CO ₃ , DMF	47 %	HCl in Et ₂ O, EtOAc	24 %
8		2-(Bromomethyl)naphthalen, K ₂ CO ₃ , DMF	45 %	HCl in Et ₂ O, DCM, EtOAc	75 %
9		3-Hydroxybenzaldehyd, Molsieb 4Å, NaBH ₄ , MeOH	65 %	HCl in Et ₂ O, DCM, EtOAc	59 %

Tabelle 5: Reagenzien und Ausbeuten der Schritte A und B für die verschiedenen Inhibitoren

3.3 Testung der Enzymhemmung

Die Affinität gegenüber der HIV-Protease wurde mit einem kompetitiven Fluoreszenz-basierenden Assay bestimmt. Tabelle 6 zeigt die Ergebnisse dieser Messung, das Molekulargewicht der Verbindungen und die daraus ermittelte Ligandeneffizienz.

Name	Formel	K _i (μM)	MW (g/mol)	LE (kcal/mol)
Ausgangsverbindung				
AB111		0,07	784	-0,19
Entfernen des einen SO ₂ -Arms				
1		5,1	601	-0,18
Variation an R2				
2		6,8	611	-0,19
3		7,1	591	-0,17
4		12,6	561	-0,17
5		2,6	558	-0,20

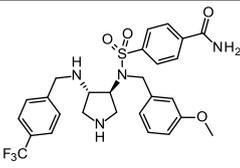
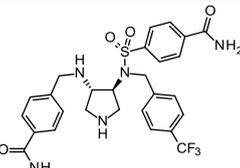
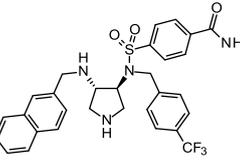
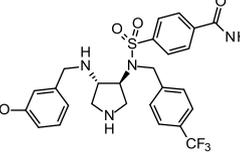
6		11,6	563	-0,17
Variation an R3				
7		5,3	576	-0,18
8		2,8	583	-0,19
9		0,86	549	-0,22

Tabelle 6: Ergebnisse der Affinitätsbestimmung der ersten Serie der dreiarmligen Pyrrolidin-basierten Inhibitoren gegenüber der HIV-Protease

Zunächst fällt auf, dass der mögliche Affinitätsgewinn durch das zweite sekundäre Amin und die vorhergesagte Wasserstoffbrücke den Verlust durch Eliminierung eines Substituenten und somit die Nicht-Besetzung der vierten Spezifitätstasche nicht ausgleichen kann. Der Affinitätsverlust bei Entfernung des einen Sulfonamid-Substituenten liegt bei Faktor 70 (Verbindung 1). Allerdings lässt sich auch beobachten, dass die Optimierung der einzelnen Reste wie im Fall von Verbindung 9 diesen Verlust teilweise ausgleichen kann. Der Affinitätsverlust zur Ausgangsverbindung liegt hier nur noch bei Faktor 10. Da dieser Inhibitor aber nun wesentlich kleiner ist, zeigt er eine deutliche Verbesserung in der Ligandeneffizienz gegenüber der Ausgangsverbindung. Auch für R2 wurde ein verbesserter Substituent gefunden (Verbindung 5) allerdings ist hier die Affinitätssteigerung nicht so deutlich wie bei Verbindung 9.

Aufgrund der Genauigkeit des Assays, kann eine Differenz der Messwerte um den Faktor zwei als signifikante Verbesserung oder Verschlechterung interpretiert werden. Kleinere Fak-

toren liegen im Bereich der Messunsicherheit. Die Genauigkeit des Assays wurde anhand der Messwerte für AB111, PepstatinA und Verbindung 78 bestimmt.

Für AB111 (K_i : 74 nM) wurde acht Mal der K_i bestimmt. Die relative Standardabweichung betrug dabei 17 %. Für PepstatinA (K_i : 0,98 μ M) wurde drei Mal der K_i bestimmt. Die relative Standardabweichung betrug dabei 18 %. Für Verbindung 78 (K_i : 6,4 μ M) wurde sieben Mal die Prozent-Inhibition bei 10 μ M bestimmt. Die relative Standardabweichung betrug dabei 17 %.

Um sicher zu gehen, dass bei den Verbindungen 5 und 9 tatsächlich eine signifikante Verbesserung der Affinität vorliegt, wurden diese Verbindungen zusätzlich zum Fluoreszenz-Assay von Maren Kuhnert in einem Thermal Shift Assay vermessen. Beim Thermal Shift Assay untersucht man, ab welcher Temperatur ein Protein denaturiert. Wird dieses Protein von einer Verbindung, wie zum Beispiel einem Inhibitor stabilisiert, erhöht sich die Temperatur, bei der die Denaturierung beginnt. Bestimmt wird dies durch die Anlagerung eines in Wasser gequellten Fluoreszenzfarbstoffs an die hydrophoben Bereiche des Proteins, die bei Denaturierung nach außen gekehrt werden. Durch das Binden an diese hydrophoben Bereiche kommt es zu einem Fluoreszenzanstieg, der dann detektiert wird. [69]

Die Verbindungen 1, 5 und 9, welche sich nach den Ergebnissen des kompetitiven Fluoreszenz-Assays jeweils um den Faktor 2-3 im K_i unterscheiden, zeigen im Thermal Shift Assay denselben Trend: $1 < 5 < 9$ (Abbildung 44).

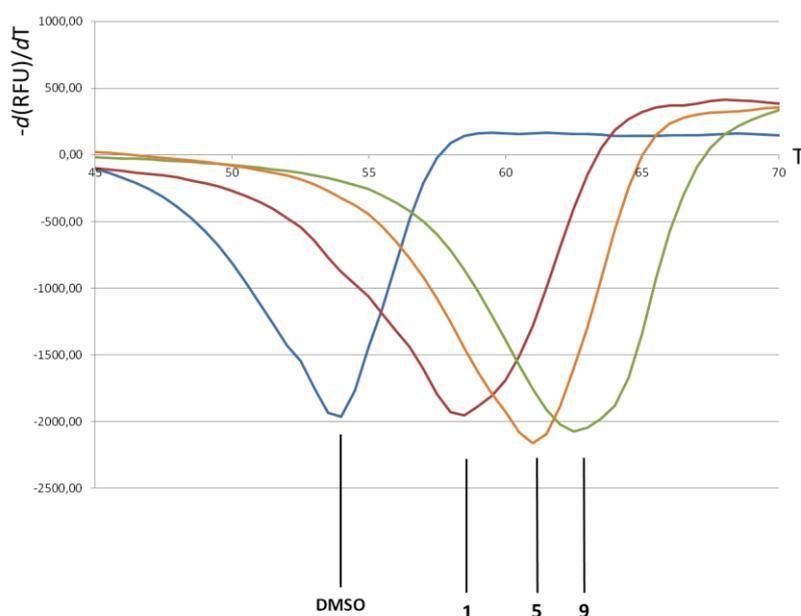


Abbildung 44: Ergebnisse des Thermal Shift Assays für die HIV-Protease ohne Inhibitor (DMSO) und mit Zusatz der Verbindungen 1, 5 und 9.

Im ersten Designzyklus konnte also eine Verbesserung der Affinität von Verbindung 5 gegenüber Verbindung 1 um den Faktor zwei und eine Verbesserung der Affinität von Verbindung 9 gegenüber Verbindung 1 um den Faktor sechs erreicht werden. Diese Ergebnisse ließen hoffen, dass durch weitere Optimierung der Substituenten die Affinität bis in den zweistelligen nanomolaren Bereich gesteigert werden könnte ohne das Molekulargewicht zu erhöhen. Dreidimensionale Strukturinformationen über die dreiarmigen Inhibitoren sollten helfen dieses Ziel zu erreichen.

3.4 Röntgenstrukturanalyse

Ina Lindemann und Martin Stieler gelang es von sechs der neun synthetisierten Verbindungen eine Kristallstruktur in Komplex mit der HIV-Protease aufzuklären. [70, 71]

Zunächst fällt auf, dass der Bindungsmodus grundsätzlich dem von AB111 gleicht. Die Taschenbesetzung des dritten Arms (R3) ist in allen gelösten Strukturen die S2-Tasche, wie im Docking mit den verwendeten FlexX-Versionen ab LeadIT 1.0.0 vorhergesagt wurde.

Verbindung 1 ist der dreiarmige Inhibitor, der AB111 am ähnlichsten ist. Die Überlagerung mit der Struktur von AB111 bestätigt den grundsätzlich gleichen Bindungsmodus (Abbildung 45, links), weshalb hier auch nicht erneut die Wechselwirkungen von R1 und R2 dieses Inhibitors diskutiert werden (vergleiche hierfür Abbildung 29 und [52]). Der CF₃-Substituent kommt, wie bei allen untersuchten dreiarmigen Inhibitoren, nicht in der S1'-, sondern in der S2-Bindetasche zum Liegen. Im Gegensatz zu der im Docking vorhergesagten Lage ist der Substituent etwas verschoben, sodass er nicht mit den Stickstoffatomen des Rückgrats von Aspartat 29 und 30 interagiert, sondern mit dem Rückgrat und der Seitenkette von Aspartat 30. Der geringe Abstand von 2,8 Å des einen Fluor-Atoms zu der Seitenkette von Aspartat 30 gibt einen Hinweis darauf, dass das Aspartat in dieser Struktur sehr wahrscheinlich protoniert vorliegt. Es ist bekannt, dass der pK_a-Wert von titrierbaren Gruppen in Proteinen durch die Umgebung stark beeinflusst wird. So ist zum Beispiel der pK_a des Aspartats im Protein Intein um zwei Einheiten auf einen pK_a von 6,1 verschoben. [72] Die leicht sauren Kristallisationsbedingungen (pH 5,5) und die Tatsache, dass die Seitenkette des Aspartats 30 flexibel ist und sich ebenfalls wegrehen könnte (vergleiche Abbildung 51) bekräftigen diese Vermutung. Das dritte Fluor-Atom koordiniert an ein Wasser, was seinerseits mit Glycin 48 wechselwirkt. Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass Wasserstoffbrückenbindungen von organisch gebundenem Fluor aufgrund der schlechten Orbitalüberlappung relativ schwach sind [61], sodass hier trotz der drei beobachteten Wechselwirkungen zum Protein Raum für eine Optimierung besteht.

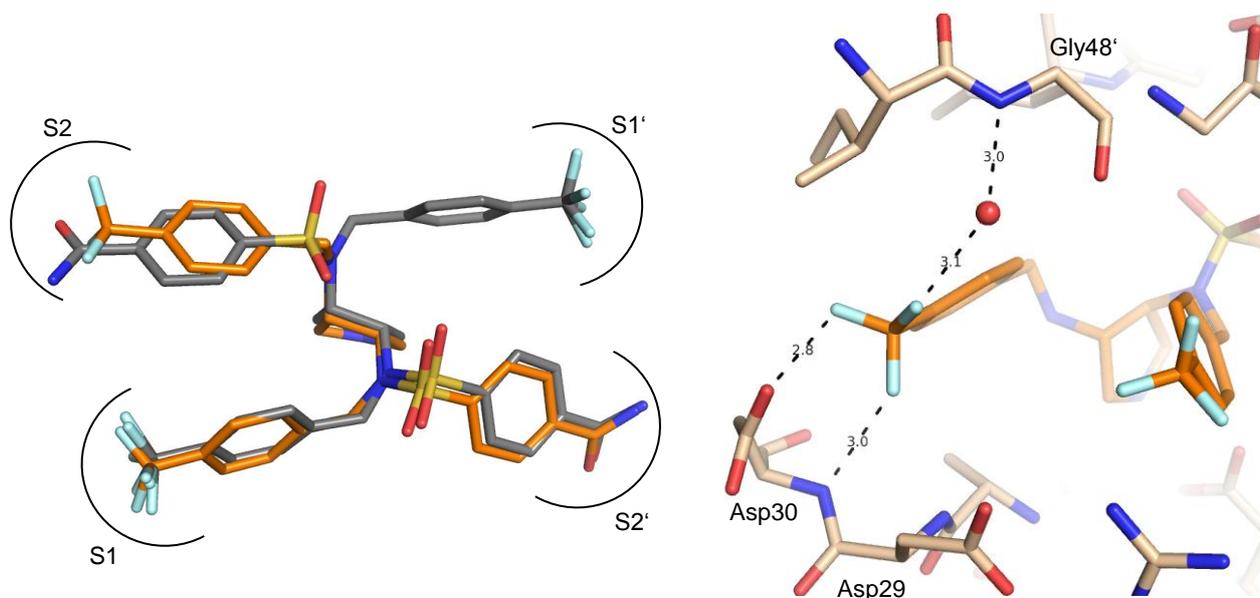


Abbildung 45: Links: Kristallstruktur von Verbindung 1 in Orange (PDB-Code 3QRM) überlagert mit der Kristallstruktur von AB111 in Grau (PDB-Code: 2QNN). Rechts: Wechselwirkungen von Verbindung 1 mit der HIV-Protease in der S2-Tasche.

Die von FlexX vorhergesagte Wechselwirkung des exozyklischen sekundären Amins zum Aspartat 25 zeigt sich in allen Kristallstrukturen. Allerdings ergibt sich für die Wasserstoffbrückenbindung ein etwas ungünstiger Winkel von $64,4^\circ$, was den Beitrag dieser Wechselwirkung zur Bindungsenergie verringern dürfte. Gezeigt ist dies in Abbildung 46 ebenfalls am Beispiel der Struktur von Verbindung 1.

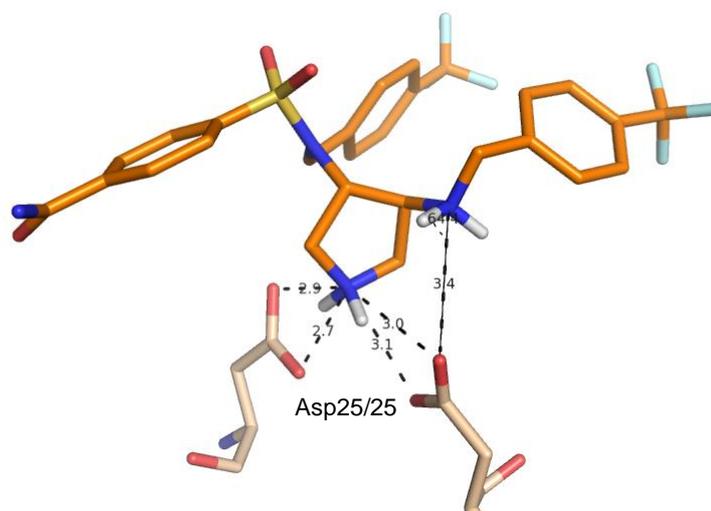


Abbildung 46: Bindungswinkel der Interaktion des exozyklischen sekundären Amins der Verbindung 1 zum Aspartat 25 (PDB-Code: 3QRM).

Von Verbindung 2 wurde ebenfalls eine Röntgenstruktur in Komplex mit der HIV-Protease erhalten, welche eine zur Dockinglösung sehr ähnliche Anordnung des Inhibitors zeigt (Ab-

bildung 47, links). Der Brom-Substituent interagiert, wie erwartet, mit dem Arginin 8 (Abbildung 47, rechts), diese Wechselwirkung bringt aber leider, wie der Affinitätswert zeigt, keinen Vorteil gegenüber der CF_3 -Gruppe.

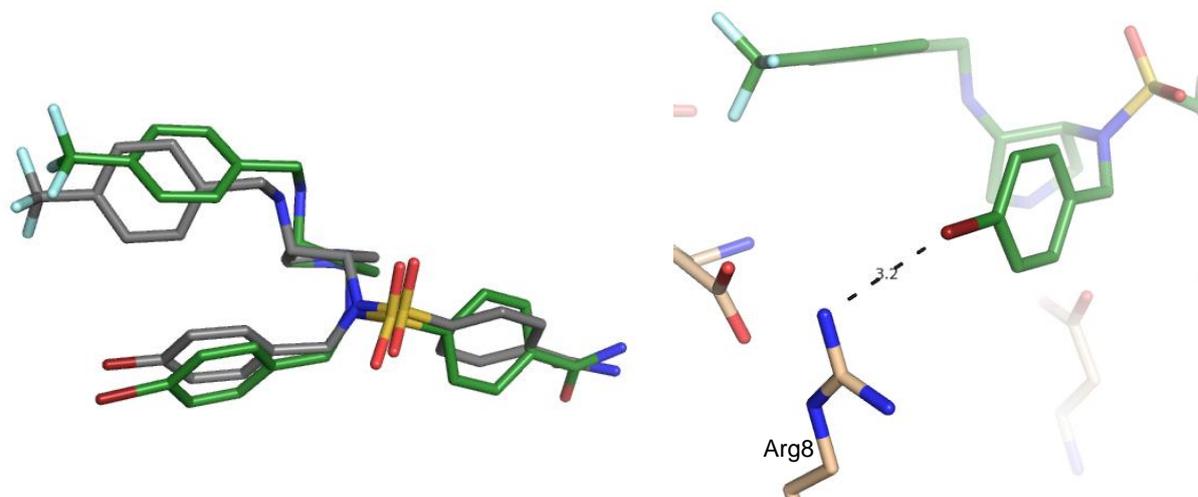


Abbildung 47: Links: Kristallstruktur von Verbindung 2 in Grün überlagert mit der Dockinglösung in Grau. Rechts: Wechselwirkungen von Verbindung 2 mit der HIV-Protease in der S1'-Tasche.

Der flexible Propylphenyl-Substituent der Verbindung 4 kommt in der Röntgenstruktur, wie im Docking vorhergesagt, der Länge nach in der S1-Tasche zum Liegen (Abbildung 48). Er verschlechtert den K_i um einen Faktor von zwei, was vermutlich durch einen Entropieverlust durch die zwei zusätzlichen freidrehbaren Bindungen zu erklären ist.

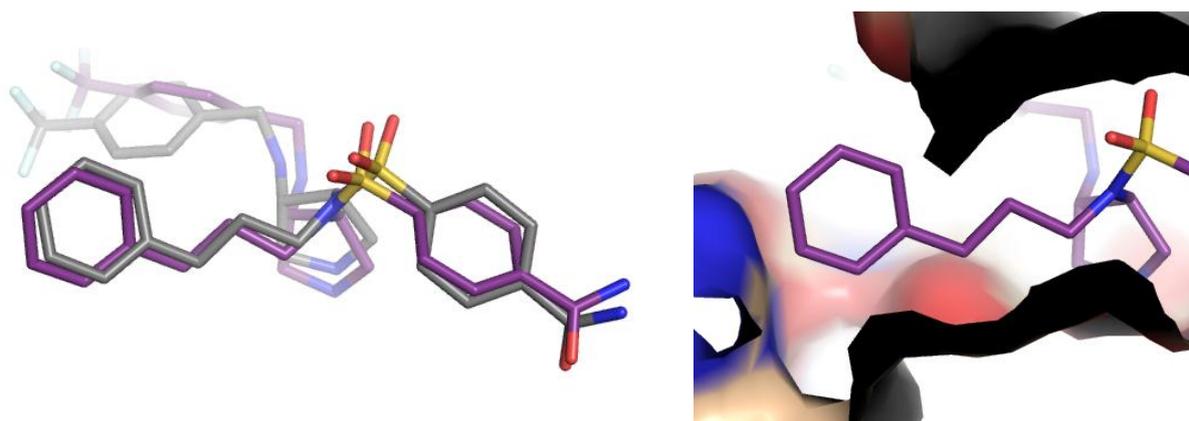


Abbildung 48: Links: Kristallstruktur von Verbindung 4 in Violett (PDB-Code: 3QBF) überlagert mit der Dockinglösung in Grau. Rechts: Lage von Verbindung 4 in der S1-Tasche.

Verbindung 5 zeigt eine Verbesserung des Hemmwerts um den Faktor zwei. Wie die Röntgenstruktur zeigt, ist dies vermutlich auf zusätzliche van der Waals Interaktionen in der Mulde der S1-Tasche und eine Kationen- π -Wechselwirkung des Nitrils mit dem Arginin 8

zurückzuführen. Im Vergleich mit dem Nitril-substituierten zyklischen Harnstoff (Abbildung 38) fällt jedoch auf, dass hier der Substituent aus einem leicht veränderten Winkel noch etwas tiefer in die Subtasche ragt. Von dem Methylether, der ebenfalls zur Besetzung dieser Mulde synthetisiert wurde, konnte bisher keine Röntgenstruktur erhalten werden. Da er aber einen um den Faktor vier schlechteren Hemmwert aufweist als Verbindung 5, ist es unwahrscheinlich, dass er die kleine Subtasche besetzen kann.

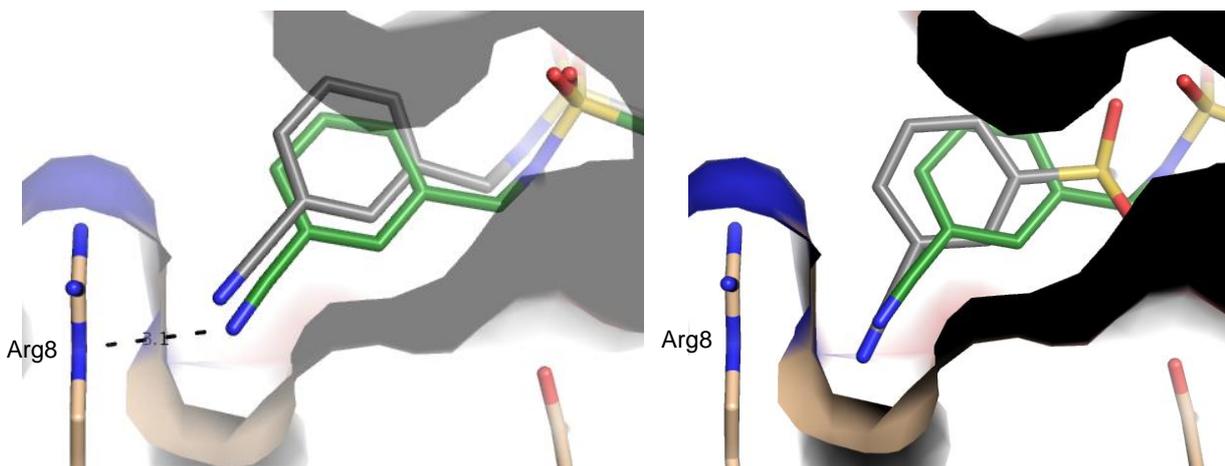


Abbildung 49: Links: Kristallstruktur von Verbindung 5 in Grün überlagert mit der Dockinglösung in Grau; Rechts: Kristallstruktur von Verbindung 5 in Grün überlagert mit dem Liganden aus der Kristallstruktur von IT7K in Grau.

Für Verbindung 7 konnte ebenfalls eine Kristallstruktur gelöst werden. Der Carboxamid-Substituent befindet sich hier, wie bei AB111, in der S2-Tasche und besetzt dort nahezu die gleiche Position. Bei dem dreiarmigen Inhibitor ragt der Arm minimal weniger weit in die S2-Tasche hinein, was aber nicht zu einer Verschlechterung des Wasserstoffbrückennetzwerks führt.

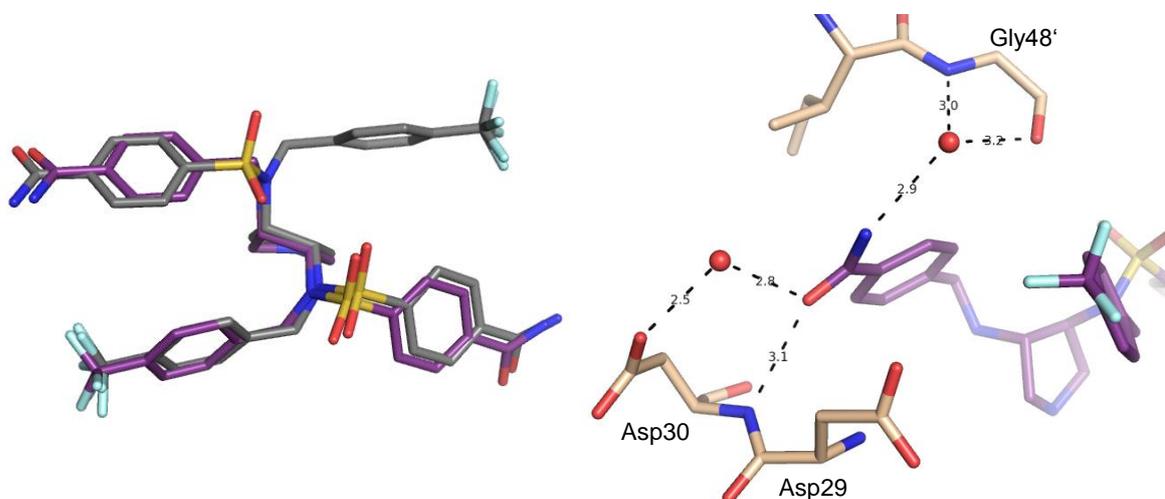


Abbildung 50: Links: Kristallstruktur von Verbindung 7 in Violett (PDB-Code: 3QRS) überlagert mit der Kristallstruktur von AB111 in Grau; Rechts: Wechselwirkungen von Verbindung 7 mit der HIV-Protease in der S2-Tasche.

Der aktivste Inhibitor dieser Serie, Verbindung 9, zeigt in der Röntgenstruktur die im Docking vorhergesagten günstigen Wasserstoffbrückenbindungen. Es ist verblüffend, dass der Inhibitor durch diese beiden Wasserstoffbrückenbindungen eine sechsfach bessere Affinität aufweist als Verbindung 1 und Verbindung 7. Das liegt vermutlich daran, dass bei Verbindung 1 die CF_3 -Gruppen nur schwache Wasserstoffbrückenbindungen bilden und bei Verbindung 7 nur eine Wasserstoffbrückenbindung direkt zum Protein besteht. Die anderen beiden Interaktionen werden über Wasser vermittelt und könnten deshalb von schwächerer Natur sein. Auch ist zu erwähnen, dass die Bindungswinkel von Verbindung 9 zum Aspartat 30 nahezu ideal sind. Um dies zu verdeutlichen, ist in Abbildung 51 der Bindungsmodus des Inhibitors aus zwei verschiedenen Perspektiven dargestellt.

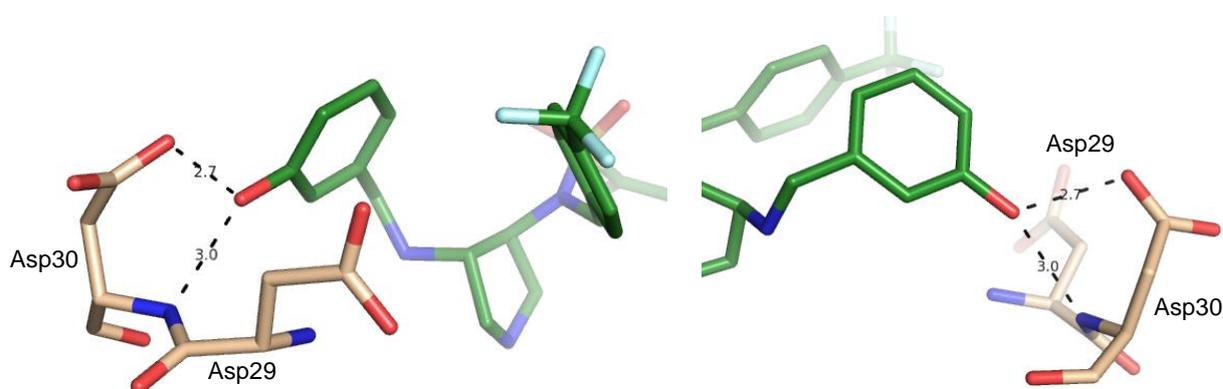


Abbildung 51: Wechselwirkungen von Verbindung 9 mit der HIV-Protease in der S2-Tasche aus zwei unterschiedlichen Perspektiven der Kristallstruktur (PDB-Code: 3QPJ).

Anhand von Verbindung 1 ist der allgemeine Bindungsmodus der dreiarmigen Pyrrolidin-basierten Inhibitoren in Abbildung 52 schematisch gezeigt.

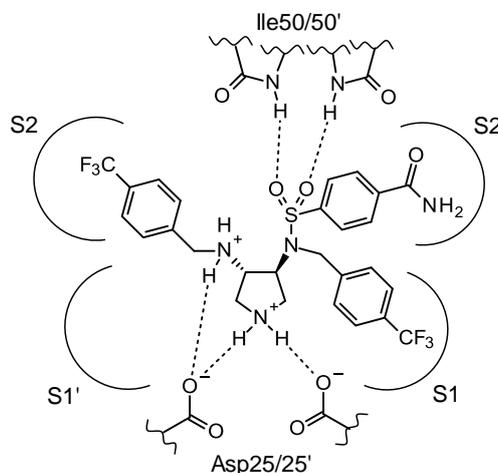


Abbildung 52: Schematische Darstellung des Bindungsmodus der dreiarmigen Pyrrolidin-basierten Inhibitoren am Beispiel von Verbindung 1.

3.5 Optimierung der einzelnen Substituenten

3.5.1 Optimierung R1

3.5.1.1 Design

Da aus den Kristallstrukturen ersichtlich wurde, dass die S1'-Bindetasche unbesetzt bleibt, sollte im nächsten Designzyklus versucht werden, ausgehend von R1 einen Teil dieser Tasche zu adressieren ohne jedoch das Molekulargewicht signifikant zu erhöhen. Auf Grund der kommerziellen Verfügbarkeit und einfachen Darstellbarkeit bot es sich zunächst an, einen Chlor-Substituenten in *ortho*-Position des Phenylsulfonamids einzuführen. Die Carboxamid-Gruppe in *para*-Position sollte beibehalten werden. Andreas Blum konnte mit der Einführung eines Chloratoms bereits eine Affinitätssteigerung innerhalb seiner Serie um den Faktor drei erreichen. Da die von ihm synthetisierten Moleküle symmetrisch sind, ist allerdings unklar, welches der beiden Chlor-Atome zu der Affinitätssteigerung in welchem Umfang beiträgt. Auch wurde der *ortho*-Chlor-Substituent zuvor nicht mit der *para*-Carboxamid-Gruppe kombiniert.

Vergleicht man die Struktur von Verbindung 1 mit der Struktur des von Andreas Blum synthetisierten Chlor-substituierten Inhibitors (Abbildung 54), wird deutlich, dass der neu einzuführende Chlor-Substituent ausgehend von der S2'-Tasche in die freie S1'-Tasche zeigen sollte. Die durchgeführten Dockingexperimente bestätigen diese Annahme. Die in Abbildung 53 rechts gezeigte Dockinglösung wird von FlexX mit einem Score von -47 bewertet und somit etwas besser als die Ausgangsverbindung 1.

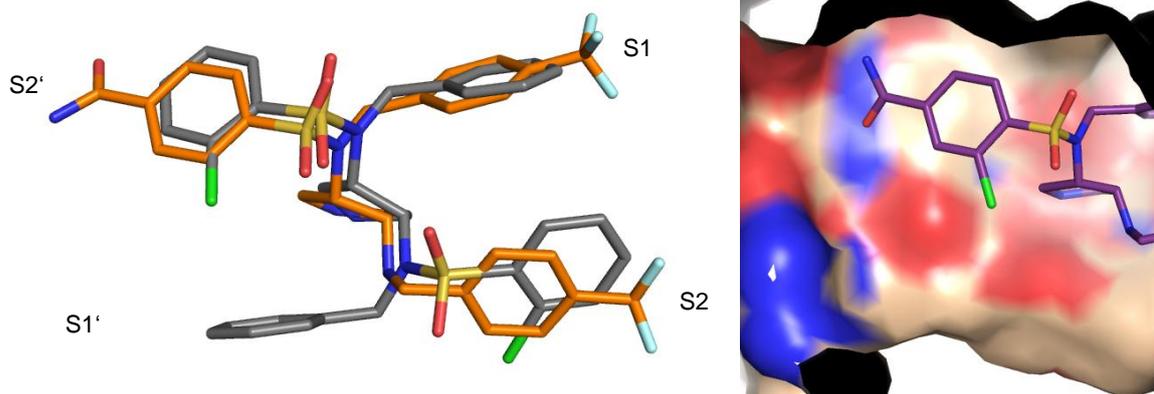


Abbildung 53: Links: Kristallstruktur von Verbindung 1 in Orange (PDB-Code: 3QMR) überlagert mit der Kristallstruktur des von Andreas Blum dargestellten Chlor-substituierten-Inhibitors (PDB-Code: 2QNQ) in Grau; Rechts: Dockinglösung für die *ortho*-Chlor-*para*-Carboxamid-substituierte Verbindung 45.

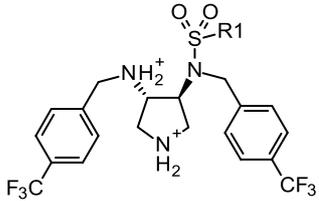
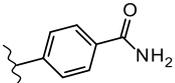
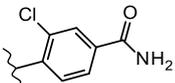
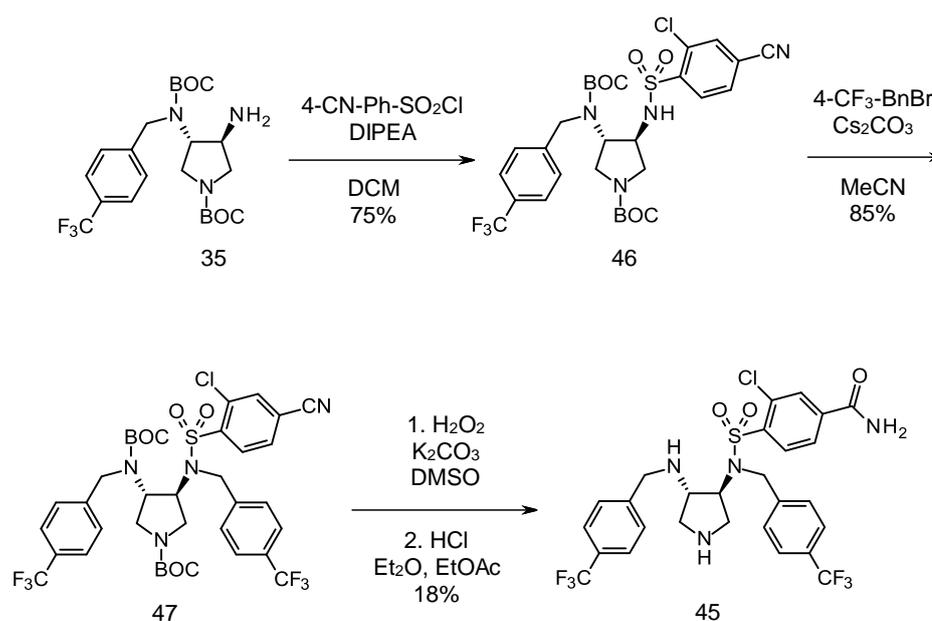
Konstanter Molekülteil	Verbindung	R1	FlexX-Score
	1		-45
	45		-47

Tabelle 7: Im zweiten Designzyklus für die Synthese ausgewählter Substituent für R1

3.5.1.2 Synthese

Die Synthese der Verbindung 45 erfolgte analog der Synthese auf Seite 45, Schema 7 und ist in folgendem Schema mit Reagenzien und Ausbeuten gezeigt.



Schema 9: Syntheseroute zur Darstellung von Verbindung 45

3.5.1.3 Affinitätsbestimmung

Die Einführung des Chlor-Substituenten bringt eine Affinitätssteigerung um den Faktor zwei mit sich. Da es sich nur um ein neu eingefügtes Atom handelt, wird auch die Ligandeneffizienz minimal gesteigert.

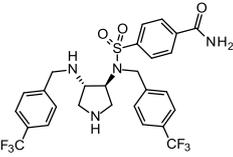
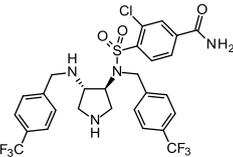
Name	Formel	K _i (μM)	MW (g/mol)	LE (kcal/mol)
Ausgangsverbindung				
1		5,1	601	-0,18
Optimierung R1				
45		2,1	635	-0,19

Tabelle 8: Ergebnisse der Affinitätsbestimmung für Verbindung 45 gegenüber der HIV-Protease

3.5.1.4 Kristallstrukturanalyse

Martin Stieler gelang es, von Verbindung 45 eine Kristallstruktur zu lösen, die zu einigen überraschenden Erkenntnissen führte. Es zeigte sich, dass der Chlor-Substituent nicht wie erwartet in Richtung der S1-Tasche zeigt sondern das gesamte Benzensulfon in Richtung dieser Tasche verschoben ist und sich der Chlor-Substituent zum Isoleucin 84' ausrichtet (Abbildung 54). Dadurch kommt auch ein anderes Wasserstoffbrückennetzwerk in der S2'-Tasche zu Stande. Leider bildet bei dieser Anordnung nur der Stickstoff der Carboxamid-Gruppe eine Wasserstoffbrückenbindung zum Protein aus. Der Carbonyl-Sauerstoff bleibt ohne Bindungspartner. Dass die Verbindung trotzdem eine gesteigerte Affinität aufweist, zeigt, wie vorteilhaft der Chlor-Substituent für die Affinität sein muss.

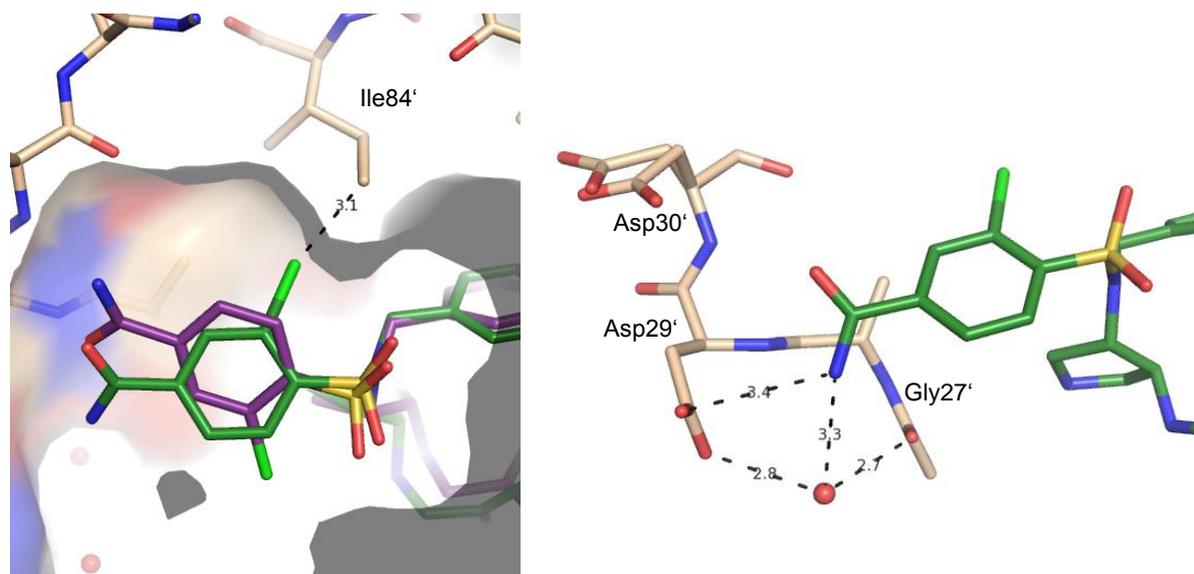


Abbildung 54: Röntgenstruktur der Verbindung 45 (grün) in Komplex mit der HIV-Protease. Links: Überlagert mit der Dockinglösung in Violett. Rechts: Interaktionen des Carboxamids in der S2'-Tasche.

Die gesteigerte Affinität könnte allerdings auch noch einen anderen Grund haben. In der Kristallstruktur befindet sich noch ein anderer, um etwa 180° gedrehter Bindungsmodus für den Inhibitor mit einer Besetzung von etwa 38 % (Abbildung 55 und 56). [71] Der zweite Bindungsmodus ermöglicht keine Wechselwirkungen der Sulfonamid-Gruppe zu den Isoleucinen 50 und 50'. Auch der exozyklische sekundäre Stickstoff findet keine Wechselwirkungen zum Protein.

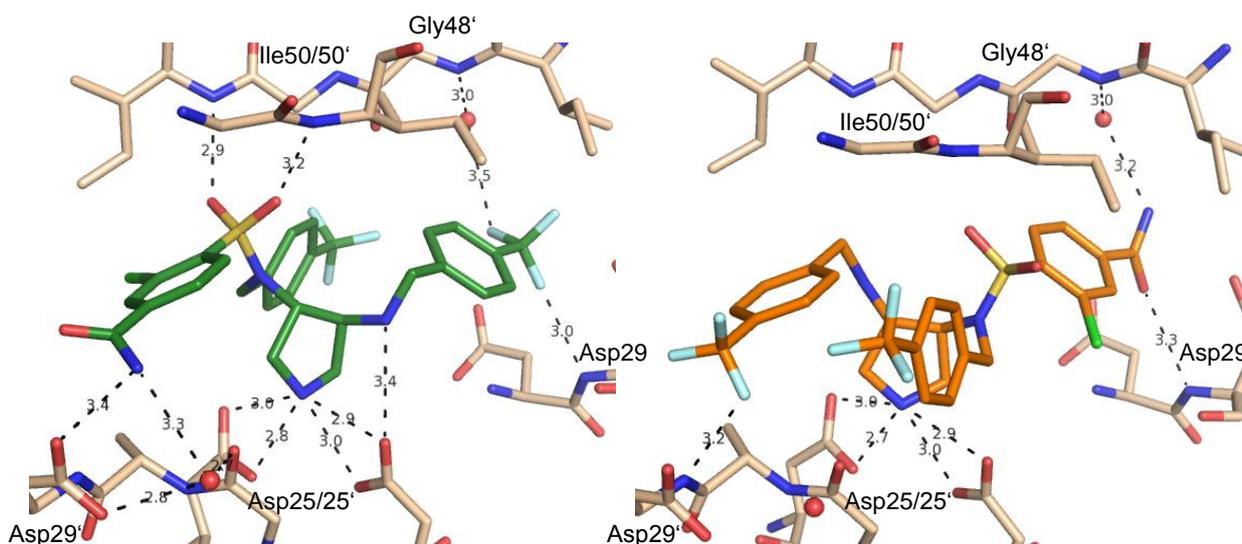


Abbildung 55: Röntgenstruktur der Verbindung 45 in Komplex mit der HIV-Protease. Links: Bindungsmodus 1 mit 62 % Besetzung und zahlreichen Wechselwirkungen zum Protein. Rechts: Bindungsmodus 2 mit 38 % Besetzung und vergleichsweise wenigen Wechselwirkungen zum Protein.

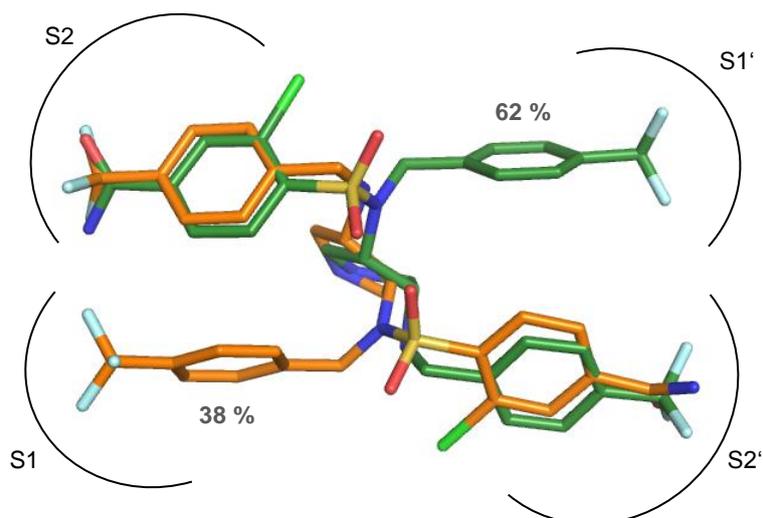


Abbildung 56: Überlagerung der beiden Bindungsmodi in der Röntgenstruktur von Verbindung 45 in Komplex mit der HIV-Protease unter Angabe der Besetzung in Prozent.

Dass diese Anordnung zu 38 % auftritt, könnte durch die optimale Lage des Chloratoms, in Bezug auf die Form der Bindetasche, bei dieser Konformation erklärt werden. (Abbildung 57).

Es sei erwähnt, dass der zweite Bindungsmodus nur bei den Verbindungen 45 beobachtet wird. Weder die Inhibitoren von Andreas Blum noch andere dreiarmige Inhibitoren zeigen einen zweiten Bindungsmodus, wobei die entsprechenden Strukturen eine ausreichende Auflösung besitzen, um einen solchen erkennen zu können.

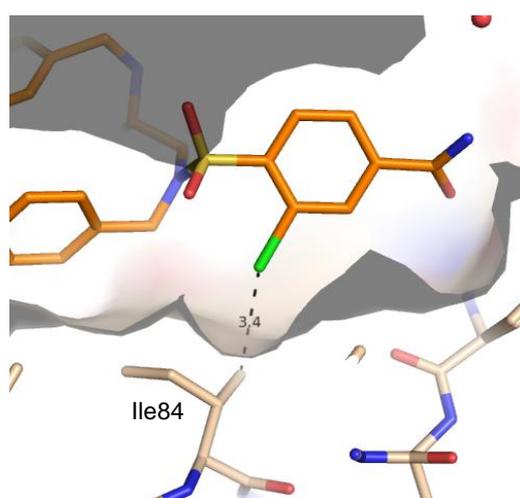


Abbildung 57: Röntgenstruktur der Verbindung 45 in Komplex mit der HIV-Protease. Lage des Chlor-Substituenten der Konformation 2.

3.5.2 Optimierung R2

3.5.2.1 Design

Mit Hilfe der gewonnenen Informationen aus der Kristallstruktur von Verbindung 5 sollte der Substituent R2 weiter verbessert werden. Da das Nitril nach unten in eine Mulde der S1-Tasche zeigt, ist die freie *para*-Position des Aromaten genau auf das Arginin 8 gerichtet. Die Idee war nun, einen Substituenten mit negativer Partialladung einzuführen, um an Affinität zu gewinnen. Ein Fluor-Substituent bot sich an, da das entsprechende Edukt kommerziell erhältlich war. Im Docking zeigte sich, dass die gewünschte Wechselwirkung zum Arginin 8 möglich ist (Abbildung 58). Die Bewertung der Pose durch FlexX mit einem Score von -44 ist etwas besser als bei der Vergleichsverbindung 5, welche einen Score von -42 aufwies (Tabelle 9).

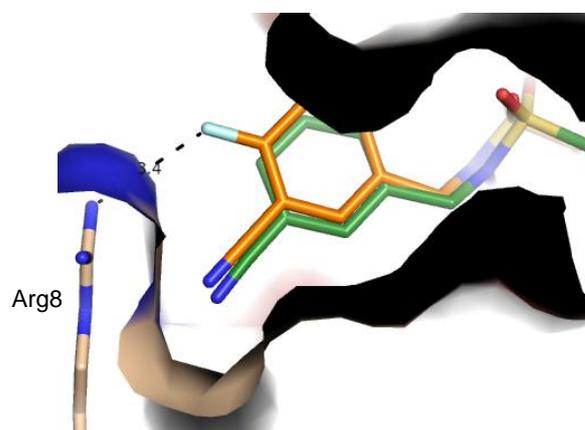


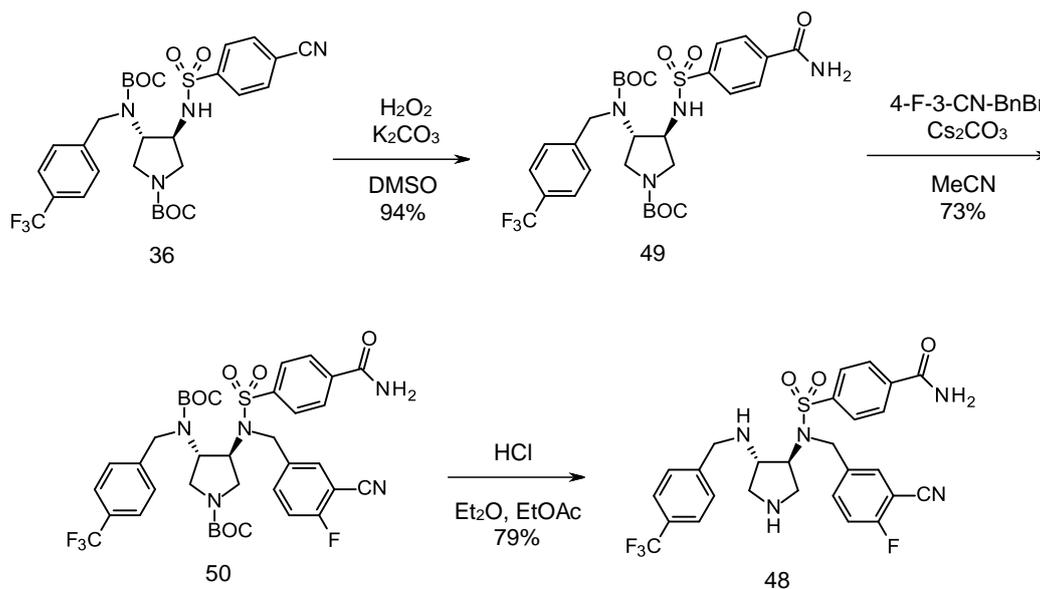
Abbildung 58: Dockinglösung der um ein Fluor-Atom ergänzten Verbindung in Orange überlagert mit der Kristallstruktur von Verbindung 5 in Grün.

Konstanter Molekülteil	Verbindung	R2	FlexX-Score
	5		-42
	48		-44

Tabelle 9: Im zweiten Designzyklus für die Synthese ausgewählter Substituent für R2

3.5.2.2 Synthese

Die Synthese von Verbindung 48 erfolgte nach Schema 7 (Seite 45). Die entsprechenden Reagenzien und Ausbeuten der letzten vier Stufen sind in Schema 10 gezeigt.



Schema 10: Syntheseroute zur Darstellung von Verbindung 48

3.5.2.3 Affinitätsbestimmung

Leider ergab sich durch die Einführung des Fluorsubstituenten eine Verschlechterung der Affinität um den Faktor zwei (Tabelle 10).

Name	Formel	K_i (μM)	MW (g/mol)	LE (kcal/mol)
Ausgangsverbindung				
5		2,6	558	-0,20
Optimierungsversuch R2				
48		5,0	576	-0,18

Tabelle 10: Ergebnisse der Affinitätsbestimmung für Verbindung 48 gegenüber der HIV-Protease

Das könnte an einer durch das Fluor-Atom erhöhten Desolvatations-Energie liegen. Leider konnte bisher keine Kristallstruktur dieses Inhibitors in Komplex mit der HIV-Protease erhalten werden.

3.5.3 Optimierung R3

3.5.3.1 Design

Den mit Abstand vielversprechendsten Substituenten für die R3-Position stellt die Hydroxy-Gruppe dar. Die Kristallstruktur von Verbindung 9 in Komplex mit der HIV-Protease zeigt, dass durch Einführung einer zweiten *meta*-Hydroxy-Gruppe am Aromaten zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen zum Glycin 48 und zu einem Wassermolekül möglich sein sollten. Im Docking werden diese von FlexX gefunden (Abbildung 59) und die Dockinglösung mit einem sehr guten Score von -58 bewertet (Tabelle 11). Die Vergleichsverbindung 9 hatte mit -51 einen deutlich niedrigeren Score gezeigt.

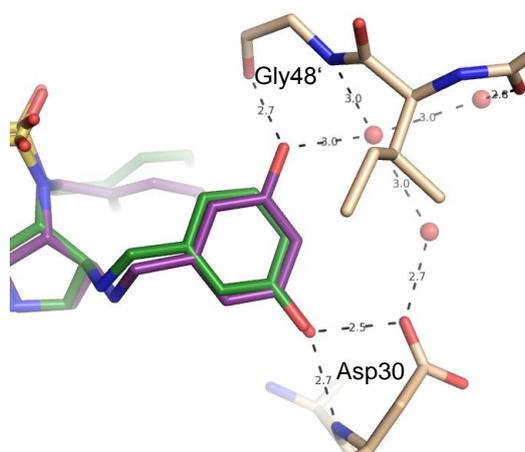


Abbildung 59: Dockinglösung der um eine weitere Hydroxy-Gruppe ergänzten Verbindung in Violett überlagert mit der Kristallstruktur von Verbindung 9 in Grün.

Eine weitere Idee Verbindung 9 zu optimieren, ergab sich aus der Kristallstruktur von Verbindung 45. Überlagert man die zweite Konformation der Kristallstruktur von Verbindung 45 mit der Kristallstruktur von Verbindung 9 zeigt sich, dass das Einführen eines Chlor-Substituenten in Verbindung 9 vorteilhaft sein könnte. Zwar liegen die Aromaten der beiden Verbindungen nicht optimal übereinander (Abbildung 60, links), jedoch ergaben Dockingexperimente, dass eine sinnvolle Ausrichtung eines *ortho*-Chlor-*meta*-Hydroxy-Aromaten in der S2-Tasche möglich wäre (Abbildung 60, rechts). Allerdings können nun nicht mehr die gleichen Wasserstoffbrückenbindungen von der Hydroxy-Gruppe zum Protein gebildet wer-

den wie in Verbindung 9. Anstelle der Wechselwirkung zur Seitenkette des Aspartats 30 tritt eine zweite Wechselwirkung zu dem Rückgrat dieser Aminosäure auf. Der Score ist mit -50 gegenüber Verbindung 9 (Score von -51) allerdings nicht verbessert (Tabelle 11). Die Verbindung 52 wurde dennoch dargestellt, um experimentell zu klären, ob eine gewinnbringende Wechselwirkung hier möglich ist.

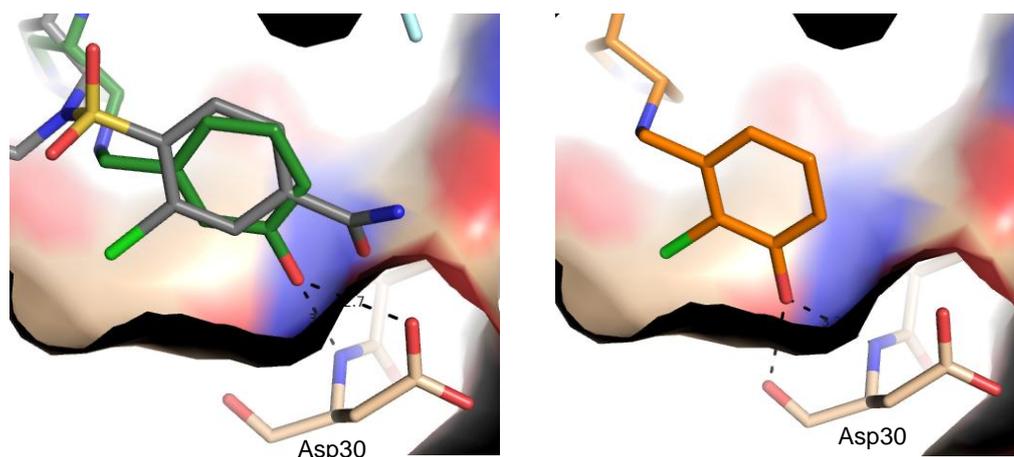


Abbildung 60: Links: Überlagerung der Kristallstrukturen von Verbindung 9 in Grün mit der von Verbindung 45 in Grau. Rechts: Dockinglösung der um ein Chlor-Atom ergänzten Verbindung in Orange.

Konstanter Molekülteil	Verbindung	R3	FlexX-Score
	9		-51
	51		-58
	52		-50

Tabelle 11: Im zweiten Designzyklus für die Synthese ausgewählte Substituenten für R3

3.5.3.2 Synthese

Die Synthese von Verbindung 51 und 52 erfolgte nach Schema 8 (Seite 47). Die Reagenzien und Ausbeuten der reduktiven Aminierung und der Entschützung sind in Tabelle 12 für die beiden neuen Verbindungen aufgeführt.

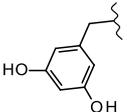
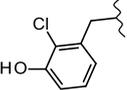
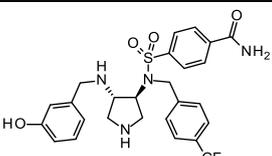
	R3	Schritt A		Schritt B	
		Reagenzien	Ausbeute	Reagenzien	Ausbeute
51		3,5-Dihydroxybenzaldehyd, Molsieb 4Å, NaBH ₄ , MeOH	*	HCl in Et ₂ O, EtOAc	26 % (über 2 Stufen)
52		2-Chloro-3-Hydroxy- benzaldehyd, Molsieb 4Å, NaBH ₄ , MeOH	53 %	HCl in Et ₂ O, DCM	67 %

Tabelle 12: Reagenzien und Ausbeuten der Schritte A und B. * Das Produkt wurde nicht charakterisiert, sondern direkt weiter umgesetzt.

3.5.3.3 Affinitätsbestimmung

Leider führten die Variationen an R3 nicht zu einer Steigerung der Affinität (Tabelle 13). Bei Verbindung 52 erklärt sich das relativ einfach, da der Affinitätsgewinn durch das Chlor-Atom den Affinitätsverlust durch die veränderte Lage der Hydroxy-Gruppe (vergleiche Abbildung 60) vermutlich nicht ausgleichen kann. Bei Verbindung 51 lässt die Dockinglösung keine Erklärung für einen Affinitätsverlust zu, selbst wenn man die erhöhte Desolvatationsenergie berücksichtigt, sollten die neuen Wasserstoffbrückenbindungen diesen Effekt überkompensieren. Eine Röntgenstruktur sollte helfen dieses überraschende Ergebnis zu erklären.

Name	Formel	K _i (μM)	MW (g/mol)	LE (kcal/mol)
Ausgangsverbindung				
9		0,86	549	-0,22

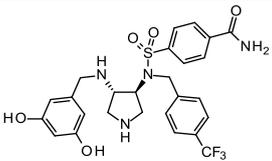
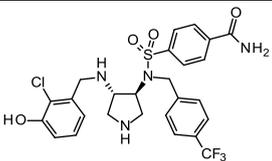
Optimierungsversuche R3				
51		2,2	565	-0,20
52		3,4	583	-0,19

Tabelle 13: Ergebnisse der Affinitätsbestimmung für Verbindung 51 und 52 gegenüber der HIV-Protease

3.5.3.4 Kristallstrukturanalyse

Ina Lindemann gelang es, den Bindungsmodus von Verbindung 51 in Komplex mit der HIV-Protease durch Kristallstrukturanalyse aufzuklären. Die im Docking vorhergesagten Wechselwirkungen kommen zu Stande, sodass eine Affinitätssteigerung zu erwarten wäre. Der Grund für den Verlust an Affinität könnte im Wassernetzwerk des Proteins zu finden sein. Die neu eingeführte Hydroxy-Gruppe kommt einem konservierten Wassermolekül (Abbildung 61, in Blau) sehr nahe, sodass sich Verschiebungen im ursprünglichen Wassernetzwerk ergeben.

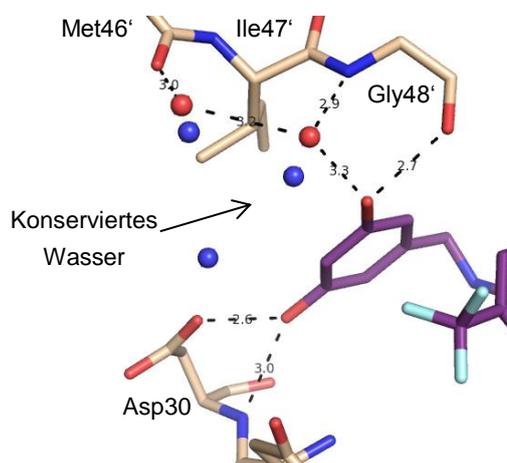


Abbildung 61: Röntgenstruktur von Verbindung 51 in Komplex mit der HIV-Protease (PDB-Code: 3QRO) mit Wassermolekülen in Rot. Wassermoleküle aus der Kristallstruktur von Verbindung 9 sind in Blau zum Vergleich gezeigt. Das mit einem Pfeil gekennzeichnete Wassermolekül ist über alle Strukturen der dreiarmigen Inhibitoren konserviert.

Bisher wird der Beitrag dieser Wassernetzwerke zur Bindungsenergie nicht adäquat in Dockingprogrammen berücksichtigt.

3.5.4 Ersatz des exozyklischen Stickstoffs durch ein Schwefel-Atom

3.5.4.1 Design

Ein Grund dafür, dass sich durch die bisherigen Variationen der Substituenten keine deutliche Affinitätssteigerung erreichen ließ, könnte die relativ große Desolvatationsenergie sein, die benötigt wird, um einen bei dem vorliegenden pH-Wert von 5,5 zweifach positiv geladenen Liganden in der Bindetasche zu vergraben. Auch weist die Wechselwirkung des exozyklischen sekundären Amins zu dem Aspartat 25, wie in Abbildung 46 gezeigt, einen ungünstigen Winkel auf. Deshalb sollte der exozyklische Stickstoff durch ein Schwefel-Atom ersetzt werden (Abbildung 62). Durch die räumliche Nähe zum Aspartat 25 eignet sich ein Schwefelatom, welches weniger elektronegativer ist und eine höhere Polarisierbarkeit aufweist, besser als ein Sauerstoffatom.

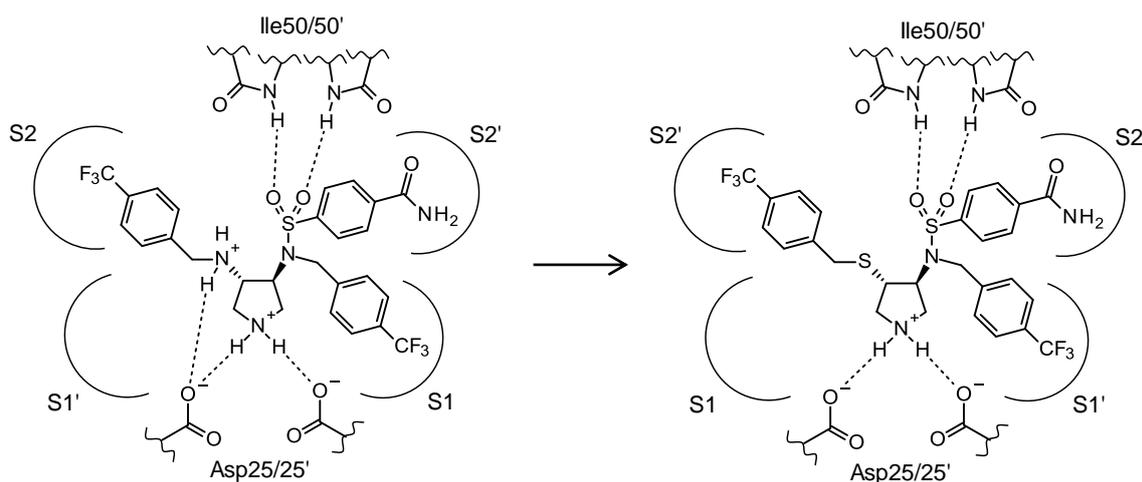


Abbildung 62: Schematische Darstellung des Ersatzes des exozyklischen Stickstoffs (links) durch ein Schwefel-Atom (rechts)

Zur Synthese wurden für R3 der CF_3 -Substituent (Verbindung 54) und der Carboxamid-Substituent (Verbindung 55), sowie ein unsubstituierter und dadurch kleinerer Benzyl-Rest (Verbindung 53) ausgewählt. Dockingexperimente zeigten, dass ein Austausch des exozyklischen Stickstoffs durch ein Schwefel-Atom bei gleicher Taschenbesetzung grundsätzlich möglich sein sollte. Da Schwefel größer als Stickstoff ist kommt R3 nicht genau an derselben Position zum Liegen, findet aber dennoch bei entsprechender Dekoration Wasserstoffbrückenpartner (Abbildung 63). Das Carboxamid könnte in der S2-Tasche zudem ein konserviertes Wassermolekül verdrängen.

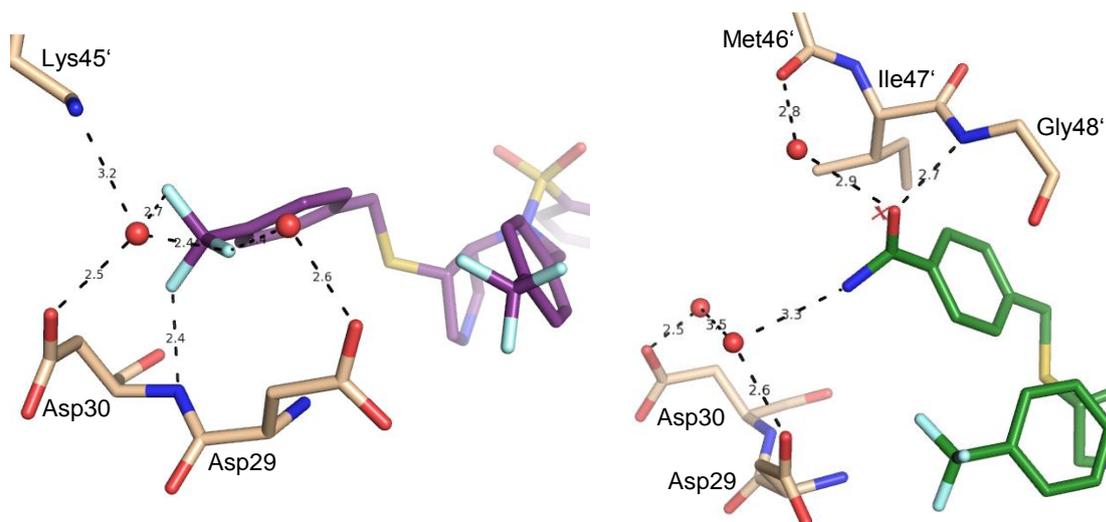


Abbildung 63: Mögliche Interaktionen der Thioether-Derivate in der S2-Bindetasche der HIV-Protease. Links: Dockinglösung für Verbindung 54 in Violett. Rechts: Dockinglösung für Verbindung 55 in Grün. Das möglicherweise von Verbindung 55 verdrängte Wasser ist als Kreuz dargestellt.

Die Dockinglösungen der Thioether-Derivate werden generell schlechter bewertet als die der Vergleichsverbindungen (Tabelle 14), was aber vermutlich daran liegt, dass die Wasserstoffbrückenbindung des exozyklischen Stickstoff-Atoms wegfällt und FlexX die Desolvatationsenergie nicht ausreichend berücksichtigen kann.

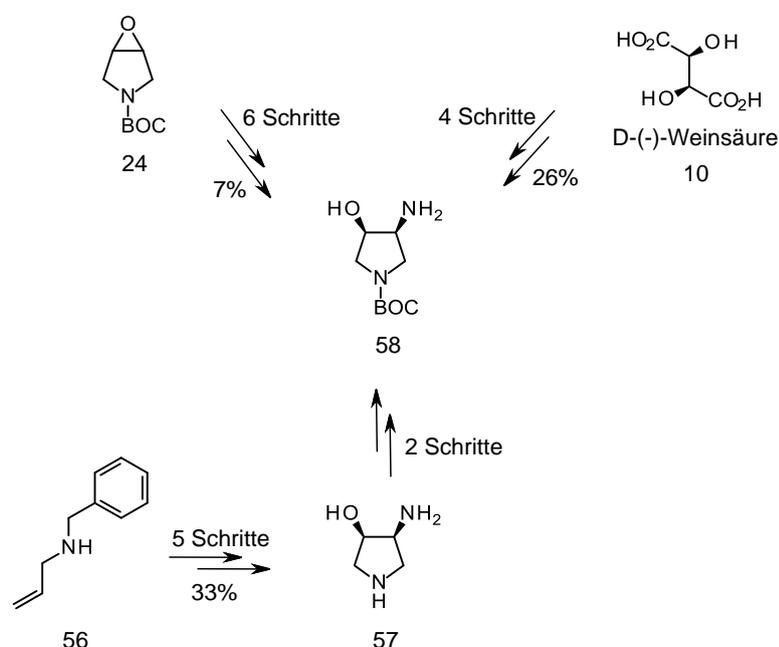
Konstanter Molekülteil	Verbindung	R3	FlexX-Score
	53		-47
	54		-41
	55		-45

Tabelle 14: Im zweiten Designzyklus für die Synthese ausgewählte Substituenten für R3 der Thioether-Derivate

3.5.4.2 Synthese

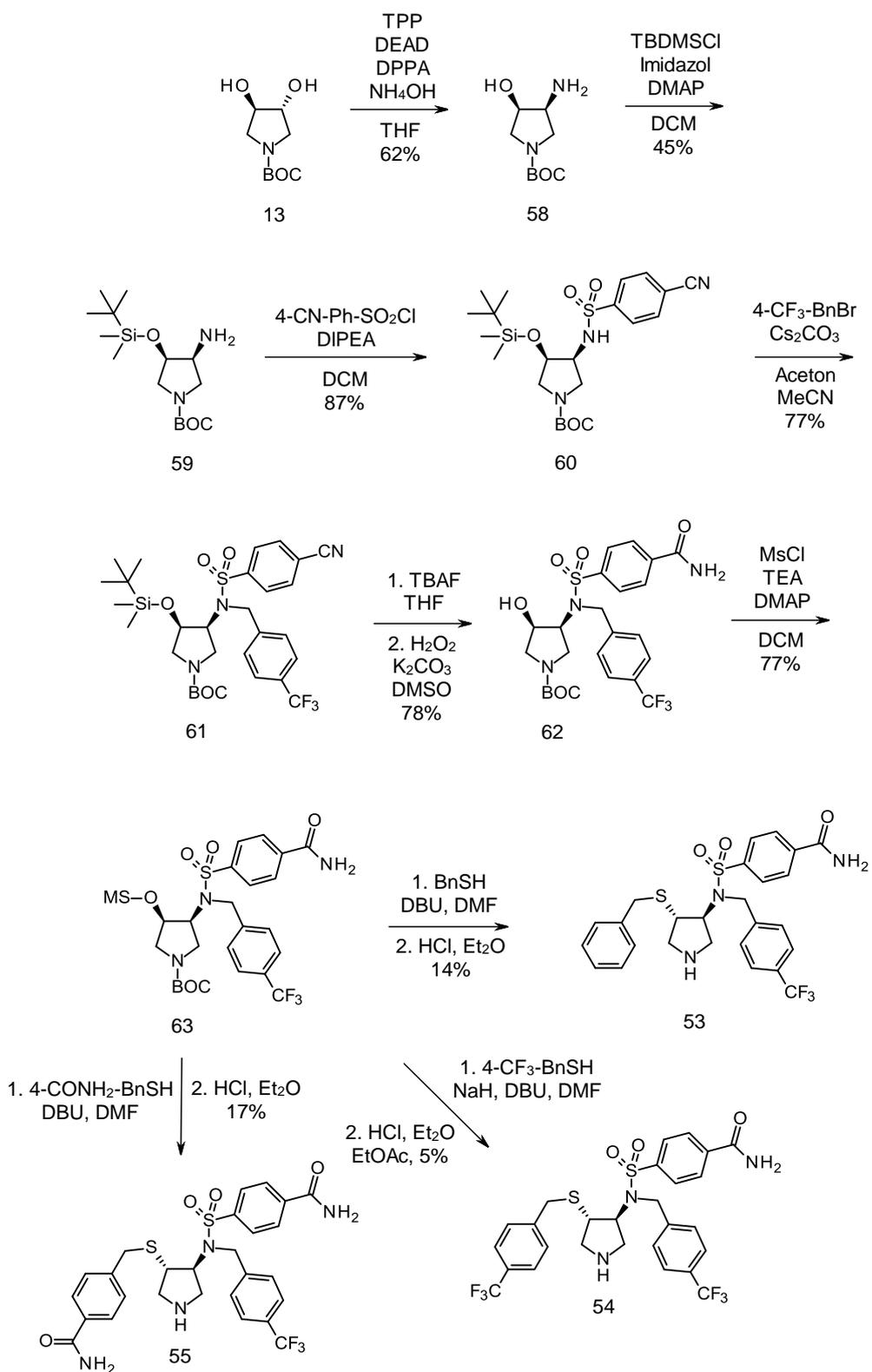
Die bisher verwendete Synthese zur Desymmetrisierung ist auf unterschiedlich dekorierte Stickstoff-Atome festgelegt. Um eine Thioether-Funktionalität einzufügen, bedurfte es daher

einer neuen Syntheseroute. In Zusammenarbeit mit Kerstin Linde wurde eine Methode entwickelt, die es ermöglicht, mittels einer Eintopf Mitsunobu-Staudinger Reaktion einen Alkohol in ein Amin zu überführen (Schema 12). [73] Ähnlich wie bei der Umsetzung des Bisazids 15 zum Monoazid 32 (Schema 6, Seite 43) mittels Staudinger-Reaktion, ergibt sich hier aus der sterischen Hinderung eine Selektivität für die Umsetzung nur eines Sauerstoffs. Die Ausbeuten waren allerdings mit 62 % etwas schlechter. Dennoch ist die hier entwickelte Methode zur Darstellung des (3*S*,4*R*)-3-Amino-4-Hydroxy-Pyrrolidins (Verbindung 58) den literaturbekannten Synthesewegen in Bezug auf die Anzahl der Stufen und die Gesamtausbeute überlegen. Unserem Wissen nach gibt es bisher nur eine veröffentlichte Syntheseroute, welche von kommerziell erhältlichen Edukten ausgeht. Diese sechsstufige Sequenz verwendet verhältnismäßig teure Ausgangsmaterialien und hat eine Gesamtausbeute von nur 7 % [74], während die für diese Arbeit entwickelte Route ausgehend von Weinsäure die Zielverbindung 58 in vier Stufen und einer Gesamtausbeute von 26 % liefert. Weiterhin existieren in der Literatur einige Methoden, welche das am Stickstoff ungeschützte Derivat, Verbindung 57, ergeben. Die effizienteste Route liefert Verbindung 57 fünf Schritten mit einer Ausbeute von 33 %. [75] Allerdings wären für die selektive Schützung des sekundärenamins zwei weitere Schritte notwendig [76, 77], die für dieses Molekül bisher nicht beschrieben sind. Schema 11 fasst die Möglichkeiten zur Darstellung des (3*S*,4*R*)-3-Amino-4-Hydroxy-Pyrrolidins nochmal zusammen.



Schema 11: Möglichkeiten zur Darstellung von Verbindung 58

Im nächsten Schritt wurde der Alkohol mit TBDMSCl geschützt und das primäre Amin analog Schema 7 (Seite 45) dekoriert. Anschließend wurde der Alkohol entschützt und mittels Mesylchlorid in eine Abgangsgruppe überführt. Diese Abgangsgruppe wurde gewählt, da sie, wie in der Literatur beschrieben, bei ähnlichen Reaktionen bereits erfolgreich eingesetzt wurde. [78] Die Ausbeuten dieser Route waren bis zu diesem Punkt durchgehend zufriedenstellend. Die letzten beiden Schritte stellen die Substitution der gebildeten Abgangsgruppe durch ein Thiol und die Entschützung dar. Leider konnte trotz mehrerer Versuche unter Variation der Temperatur, des Lösungsmittels und der Base die Ausbeute dieser Schritte nicht signifikant verbessert werden. Sie liegt bei 5-17 % über zwei Stufen. Durch die lange Route von 15 Stufen und die schlechten Ausbeuten, konnten die drei synthetisierten Verbindungen nur mit einer Reinheit von > 80 % dargestellt werden.



Schema 12: Syntheseroute zur Darstellung der Thioether-Derivate

3.5.4.3 Affinitätsbestimmung

Die beiden Thioether-Derivate, zu denen ein Stickstoffanalogon existiert (Verbindung 54 und 55), weisen einen um den Faktor zwei bis drei verbesserten Affinitätswert auf. Da dies aber keine deutliche Verbesserung darstellt und die Synthese der Thioether-Verbindungen Schwierigkeiten bereitet, wurde diese Verbindungsklasse nicht weiter verfolgt. Die K_i -Werte, das Molekulargewicht und die Ligandeneffizienz der Thioether-Verbindungen sowie der Stickstoff-Analoga sind in Tabelle 15 gegenübergestellt.

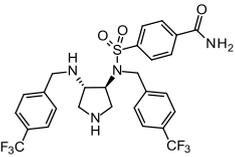
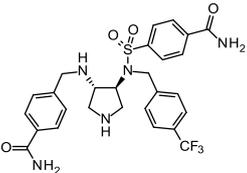
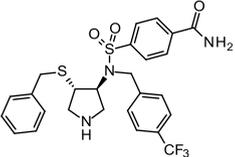
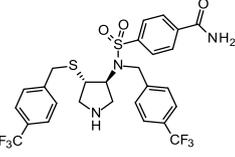
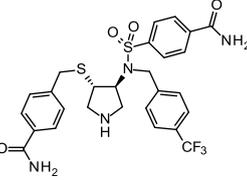
Name	Formel	K_i (μM)	MW (g/mol)	LE (kcal/mol)
Ausgangsverbindungen				
1		5,1	601	-0,18
7		5,3	576	-0,18
Ersatz des Stickstoffatoms durch ein Schwefel-Atom				
53		3,6	550	-0,20
54		1,6	618	-0,19
55		3,3	593	-0,19

Tabelle 15: Ergebnisse der Affinitätsbestimmung für die Thioether-Verbindungen gegenüber der HIV-Protease

Eine Kristallstruktur der Thioether-Derivate konnte trotz mehrerer Versuche bisher leider nicht erhalten werden.

3.5.5 Kombination der besten Arme

3.5.5.1 Design

Da weitere Optimierungen der einzelnen Substituenten wenig vielversprechend erschienen, wurden die besten Substituenten der ersten beiden Designzyklen ausgewählt und in einem Liganden kombiniert. Da der Hydroxy-Substituent an Position R3 zu der mit Abstand größten Affinitätssteigerung geführt hatte, sollte dieser Rest in jedem Fall inkoooperiert werden. Dockingexperimente zeigten weiterhin, dass die Kombination mit dem Nitril-Substituenten für R2 und dem Chlor-Substituenten für R1 gut geeignet sein sollte (Abbildung 64). Auch der Score ist mit -56 gegenüber -51 für Verbindung 9 deutlich besser (Tabelle 16).

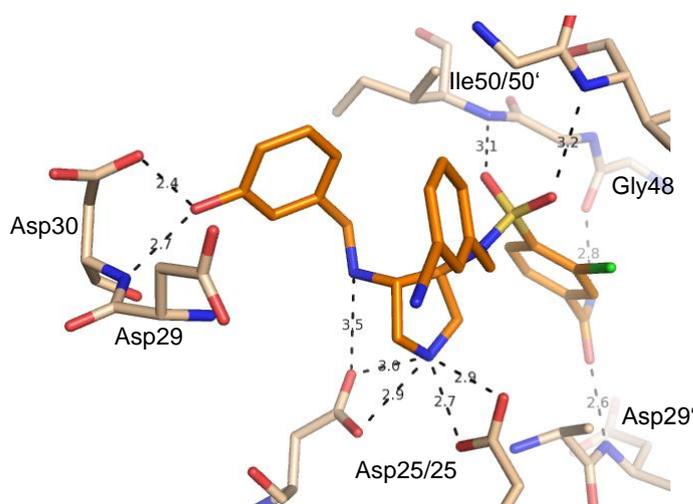


Abbildung 64: Dockinglösung für Verbindung 66 als Kombination der besten Substituenten

Verbindung		FlexX-Score
9		-51

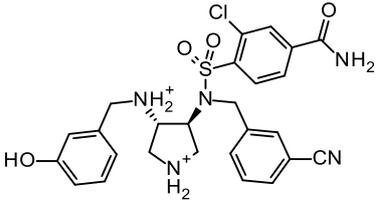
66		-56
----	---	-----

Tabelle 16: Im dritten Designzyklus für die Synthese ausgewählte Verbindung als Kombination der besten Substituenten

Die Substituenten kommen in der Dockinglösung etwa dort zu liegen, wo sie sich auch in der Kristallstruktur befinden (Abbildung 65). Man beachte, dass hier nicht in die Struktur von Verbindung 1 sondern in die Struktur von Verbindung 9 gedockt wurde. Hier fand FlexX auf Rang 2 die Lösung, in der der Chlorsubstituent zum Ile84^c gedreht ist.

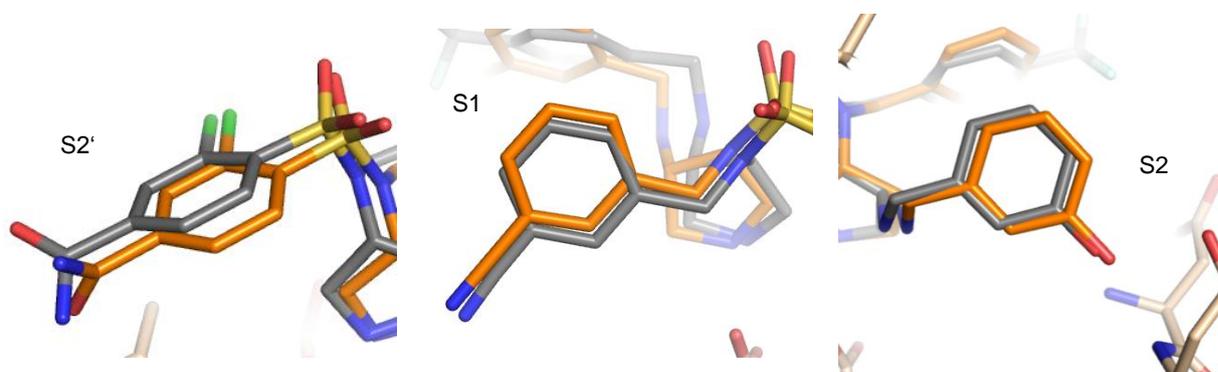
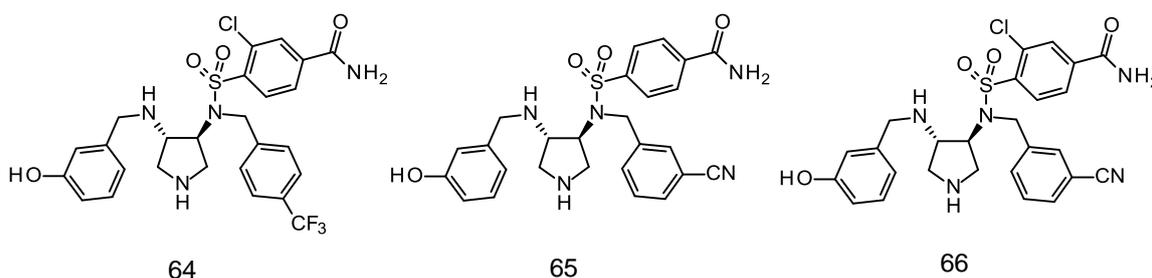


Abbildung 65: Dockinglösung für Verbindung 66 in Orange überlagert mit den entsprechenden Kristallstrukturen von Verbindung 45, 5 und 9 (PDB-Code: 3QPJ) in Grau.

Um sicher zu gehen, dass sich der Chlorsubstituent und der Nitril-Substituent gegenseitig nicht stören, etwa weil eine minimal andere Ausrichtung des Grundgerüsts für die Reste erforderlich ist, wurden auch die Inhibitoren dargestellt, die jeweils nur den Hydroxy-Rest mit einem der beiden Substituenten kombinieren. Somit wurden folgende drei Kombinationen dargestellt:



Sollte die SAR additiv sein, wie im Fall der Verbindungen von Andreas Blum [52], müssten sich Affinitätswerte von etwa 0,36 μM , 0,44 μM und 0,18 μM für diese drei Verbindungen ergeben (Abbildung 66).

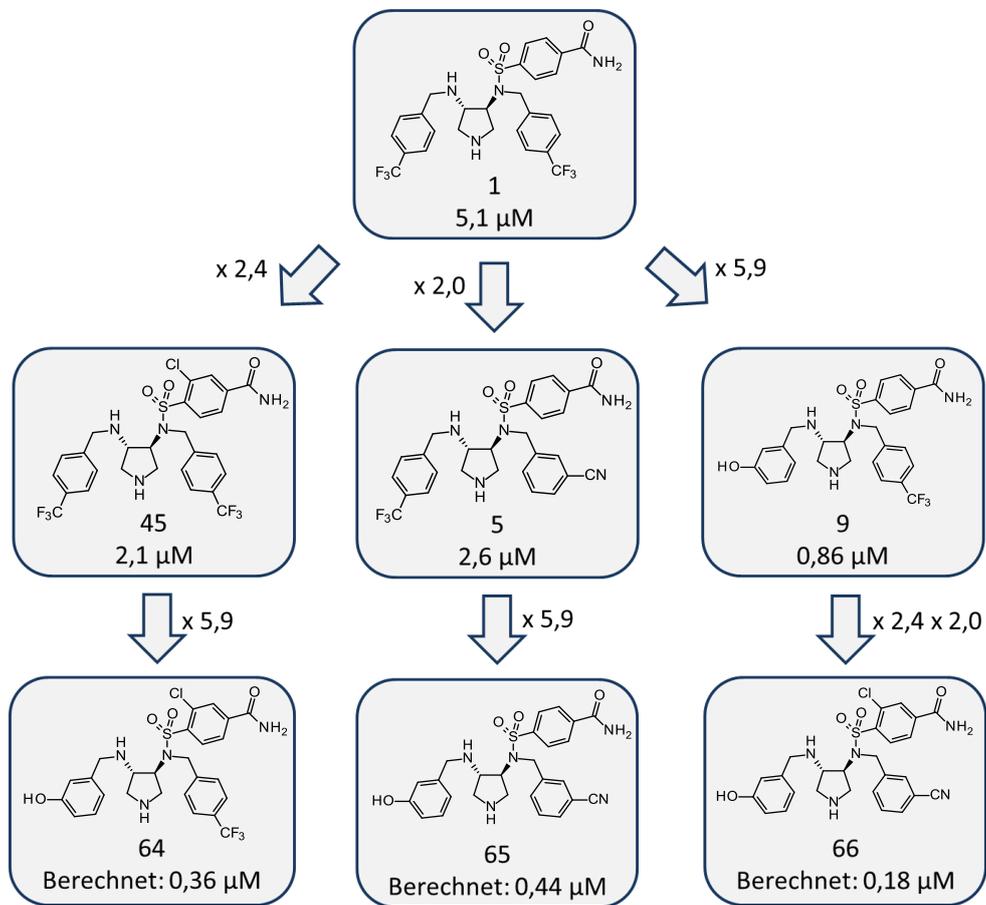
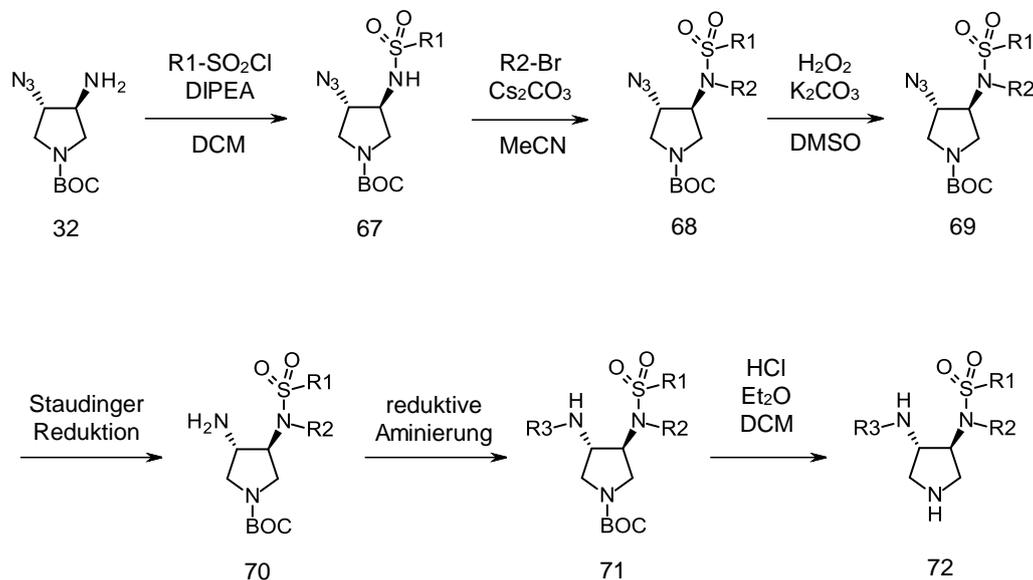


Abbildung 66: Berechnung der K_i -Werte der kombinierten Inhibitoren bei Annahme einer additiven SAR.

3.5.5.2 Synthese

Die Synthese erfolgte analog zur Syntheseroute für die Variation an R3 (Schema 8, Seite 47).



Schema 13: Syntheseroute zur Einführung der besten Substituenten

Da zur Kombination der besten Substituenten aller drei Reste (R1-R3) von Anfang an variiert werden muss (Schema 13), sind in Tabelle 17 aus Gründen der Übersichtlichkeit lediglich die Gesamtausbeuten aufgeführt.

	Inhibitor	Gesamtausbeute
64		3,1 % (über 12 Stufen)
65		0,8 % (über 12 Stufen)
66		0,5 % (über 12 Stufen)

Tabelle 17: Gesamtausbeuten der Darstellung für die Verbindungen 64 bis 66

3.5.5.3 Affinitätsbestimmung

Leider ergab die Affinitätsbestimmung, dass die SAR nicht additiv ist (Tabelle 18).

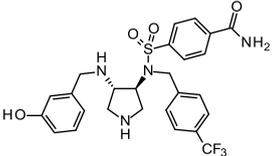
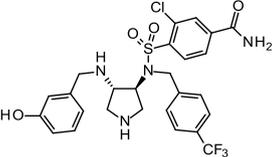
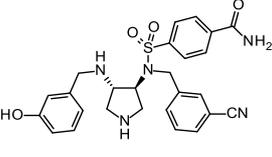
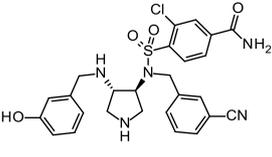
Name	Formel	K_i (μM)	MW (g/mol)	LE (kcal/mol)
Ausgangsverbindung				
9		0,86	549	-0,22
Kombinationen aus Verbindung 45, 5 und 9				
64		3,7	583	-0,19
65		7,3	506	-0,20
66		4,0	540	-0,20

Tabelle 18: Ergebnisse der Affinitätsbestimmung für die Verbindungen 64 bis 66 gegenüber der HIV-Protease

Um einen Fehler bei der Affinitätsmessung mittels kompetitiven Fluoreszenz-basierten Assay auszuschließen, wurden die Verbindungen 65 und 66 im Vergleich zu Verbindung 1 und 9 von Maren Kuhnert mittels Thermal Shift Assay vermessen (Abbildung 67). Auch hier zeigte sich eine deutliche Erniedrigung der Denaturierungs-Temperatur von Verbindung 65 und 66 gegenüber Verbindung 9 und eine etwa gleiche Denaturierungs-Temperatur gegenüber Verbindung 1. Diese Ergebnisse bestätigen die Messwerte aus dem kompetitiven Fluoreszenz-basierten Assay.

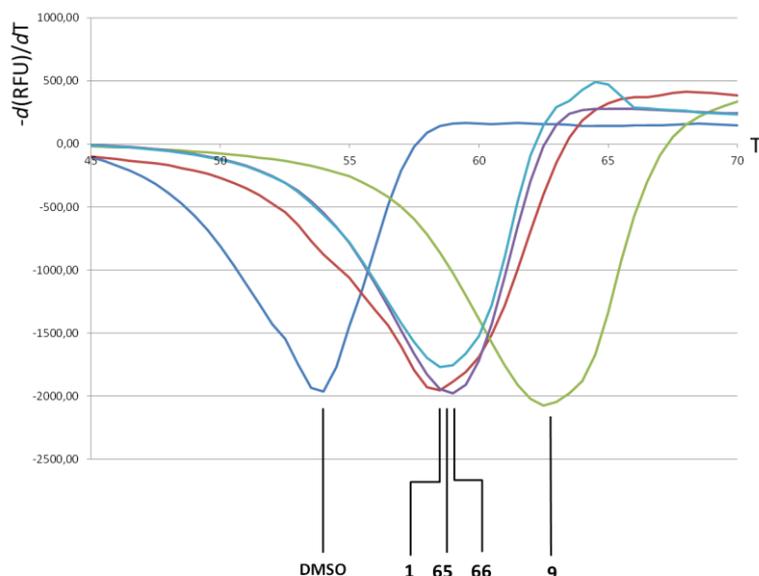
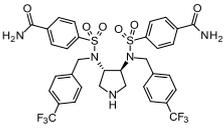


Abbildung 67: Ergebnisse des Thermal Shift Assays für die HIV-Protease ohne Inhibitor (DMSO) und mit Zusatz der Verbindungen 1, 9, 65 und 66.

Eine Erklärung für die nicht vorhandene Additivität der SAR könnte in dem Auftreten verschiedener Bindungsmodi liegen, die allerdings nur bei Verbindung 45 in der Röntgenstruktur beobachtet werden konnten. Es ist unklar, welcher Bindungsmodus tatsächlich zur Affinität beiträgt oder ob gerade die Möglichkeit zwei unterschiedliche Bindungsmodi einnehmen zu können, zu einer guten Affinität führt. Bisher konnte leider keine Kristallstruktur der Verbindungen 64 bis 66 erhalten werden, mit deren Hilfe sich diese überraschenden Ergebnisse vielleicht erklären ließen.

3.6 Zellassays

Aus der Serie der dreiarmigen Pyrrolidin-basierten Inhibitoren wurden drei Verbindungen für einen Zellassay ausgewählt, welcher von Abbas Raza an der University of Minnesota durchgeführt wurde. Die vermessenen Inhibitoren waren Verbindung 1, 9 und 54. Auch AB111 wurde getestet. In nachfolgender Tabelle sind die Ergebnisse aus dem Zellassay aufgeführt.

Name	Formel	K_i [μM] HIV-Protease (Enzymaffinität)	% Inhibition von HIV bei 10 μM (Zellaktivität)	% überlebende Zellen bei 10 μM (Toxizität)
AB111		0,07	5,8	14,8

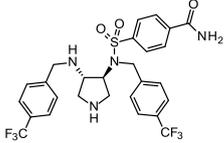
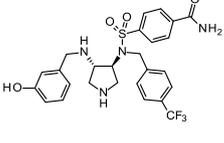
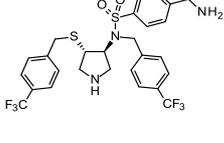
1		5,1	36	98
9		0,86	25	100
54		1,6	0	64

Tabelle 19: Ergebnisse des HIV-Zellassays für die Verbindungen AB111, 1, 9 und 54

Zuerst einmal fällt auf, dass die Affinitätswerte zur HIV-Protease nicht mit den Zellassay-Ergebnissen korrelieren. Obwohl Verbindung 1 und Verbindung 9 eine geringere Affinität zur HIV-Protease haben als die Ausgangs-Verbindung AB111, zeigen sie eine bessere Aktivität im Zellassay und sind im Gegensatz zu AB111 nicht toxisch.

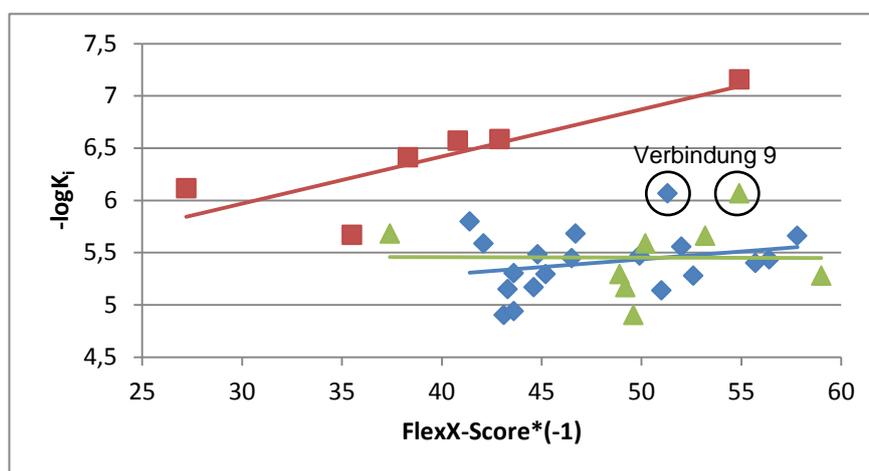
3.7 Zusammenfassung und Ausblick: Dreiarmige Pyrrolidin-basierte Inhibitoren der HIV-Protease

Insgesamt kann der Schluss gezogen werden, dass die Vorhersage des Beitrags einer neu ausgebildeten Wechselwirkung zur Bindungsenergie sehr komplex ist und dass viele Faktoren wie die Entropie, die Desolvatationsenthalpie und die Neuordnung von Wassernetzwerken im Designprozess nur unzureichend vorhergesagt werden können. In Kombination mit weiteren Kristallstrukturen könnte hier ITC-Messungen helfen, die beobachteten Effekte besser erklären zu können.

Für das Grundgerüst der dreiarmigen Pyrrolidin-basierten Inhibitoren erwies es sich als schwierig, in den gewünschten zweistellig nanomolaren Affinitätsbereich zu gelangen und somit eine Ligandeneffizienz von -0,29 kcal/mol zu erreichen.

Obwohl die meisten der zur Synthese ausgewählten Verbindungen von dem Programm FlexX deutlich besser bewertet wurden, als die Ausgangsverbindung 1, konnte keine deutliche Verbesserung der Affinität gegenüber dieser Verbindung erreicht werden. Trägt man die Scoring-Ergebnisse gegen die Messwerte auf (Grafik 2), wird deutlich, dass keine gute Korrelation be-

steht und dass auch wesentlich verbesserte Bewertungen keinen deutlichen Anstieg der Affinität bedeuten. Die Verbindung mit der höchsten Affinität (Verbindung 9) liegt mit der Bewertung durch FlexX im Mittelfeld. Lässt man die experimentell bestimmten Kristallstrukturen durch FlexX bewerten, wird das Ergebnis insgesamt sogar noch schlechter. Die Scoringfunktion FlexX kann die dreiarmigen Inhibitoren also nicht in eine mit dem Experiment vergleichbare Rangfolge bringen, obwohl es bei den strukturell ähnlichen Verbindungen von Andreas Blum hervorragend gelingt. Der Hauptgrund wird die insgesamt geringere Affinität im unteren μM Bereich der dreiarmigen Inhibitoren sein. Erst im nM Bereich scheint FlexX für die Pyrrolidin-basierten HIV-Protease-Inhibitoren gute Ergebnisse zu liefern. Dieser Effekt wurde bereits bei der Validierung des FlexX-Scores unter Verwendungen der Inhibitoren von Andreas Blum beobachtet. Hier wurde der Inhibitor mit der geringsten Affinität ebenfalls zu gut bewertet (vergleiche Seite 29).



Grafik 2: Der FlexX-Score (*-1) aufgetragen gegen $-\log K_i$ der Inhibitoren von Andreas Blum in Rot (Score der Kristallstrukturen) und der dreiarmigen Pyrrolidin-basierten Inhibitoren in Blau (Score der Dockinglösung) und in Grün (Score der Kristallstrukturen).

Verbindung 9 mit einem K_i von $0,86 \mu\text{M}$ besitzt die höchste Affinität der dreiarmigen Pyrrolidin-basierten Inhibitoren gegenüber der HIV-Protease. Im Vergleich zu AB111 konnte die Ligandeneffizienz somit von $-0,19 \text{ kcal/mol}$ auf $-0,22 \text{ kcal/mol}$ verbessert werden. Hervorzuheben ist, dass Verbindung 1 und Verbindung 9, trotz geringerer Affinität, eine bessere Aktivität im Zellassay sowie eine geringere Toxizität als AB111 zeigen.

Um herauszufinden, weshalb die SAR nicht additiv ist, sollen mit den Verbindungen 64 bis 66 ITC-Messungen durchgeführt und die Kristallstruktur aufgeklärt werden.

Nach dem bisherigen Kenntnisstand scheint jedoch mit diesem Grundgerüst die gewünschte Ligandeneffizienz von -0,29 kcal/mol nicht erreichbar zu sein. Deshalb wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit an einem effizienteren Grundgerüst geforscht.

4 PYRROLIDIN-BASIERTE BICYCLEN ALS INHIBITOREN DER HIV-PROTEASE

4.1 Design

Ausgehend von den 4-armigen Pyrrolidin-basierten Inhibitoren, welche von Andreas Blum entwickelt wurden, wurde in Kapitel 3 durch Eliminierung einer der beiden Sulfonyl-Reste die Ligandeneffizienz leicht verbessert. Allerdings konnte sowohl die Ligandeneffizienz als auch die Affinität der dargestellten dreiarmigen Pyrrolidine durch Optimierung der Seitenketten nicht bis in den gewünschten Bereich gesteigert werden. Deshalb sollte unter Beibehaltung der zentralen Interaktion des sekundären Amins mit den katalytischen Aspartaten ein neues Grundgerüst entworfen werden, mit dem sich sowohl die *Flap* als auch die Spezifitätstaschen der HIV-Protease auf eine effizientere Weise adressieren lassen.

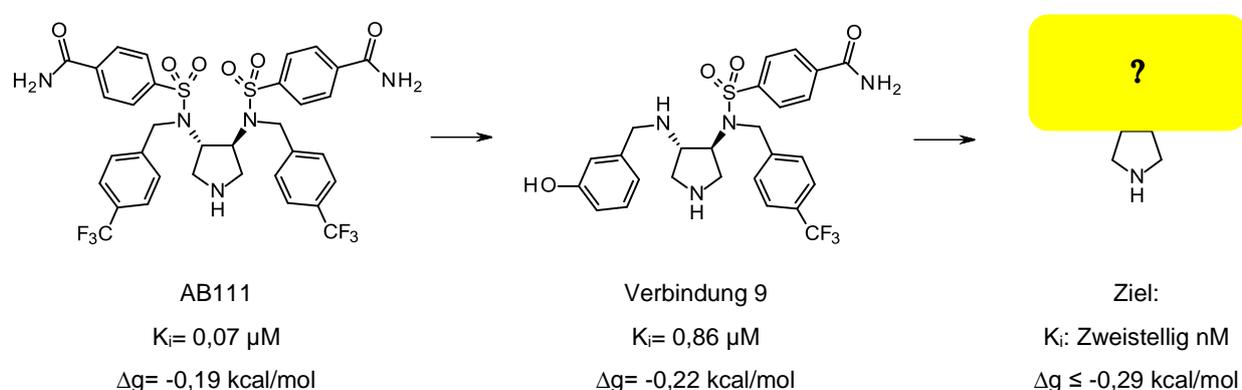


Abbildung 68: Entwurf neuartiger Pyrrolidin-basierter Inhibitoren ausgehend von AB111

Da sowohl AB111 als auch die Verbindung 9 sehr viele freidrehbare Bindungen enthalten, sollte die neue Struktur rigider sein, um bei der Bindung an das Enzym möglichst wenige Freiheitsgrade zu verlieren. Beispiele für HIV-Protease Inhibitoren, welche mit einem rigiden Grundgerüst ausgestattet sind, sind Tipranavir und die zyklischen Harnstoffe. Mit ihrem starren Grundgerüst adressieren sie sowohl die katalytische Diade, als auch die Isoleucin 50 und 50' der *Flap* und verdrängen dabei das *Flap*-Wasser (vergleiche Abbildung 16). Dieses Wasser sollte von der neu zu entwerfenden Inhibitorklasse ebenfalls verdrängt werden, da sich die Freisetzung eines solchen Wassermoleküls häufig günstig auf den entropischen Beitrag zur Bindungsenergie auswirkt. [56]

Betrachtet man die Strukturen von Tipranavir, den zyklischen Harnstoffen und den peptidischen Inhibitoren, wird deutlich, dass der Akzeptor zur Adressierung der Isoleucine 50 und 50' etwa 5-6 Å von dem Donor zur Interaktion mit der katalytischen Diade entfernt sein sollte. Im Fall der peptidischen Inhibitoren erfolgt die Adressierung der *Flap* über ein Wasser-

Molekül, welches als Akzeptor mit den Isoleucinen 50 und 50' in Wechselwirkung tritt. Der Spielraum von etwa einem Ångström begründet sich in der Flexibilität der *Flap*-Region.

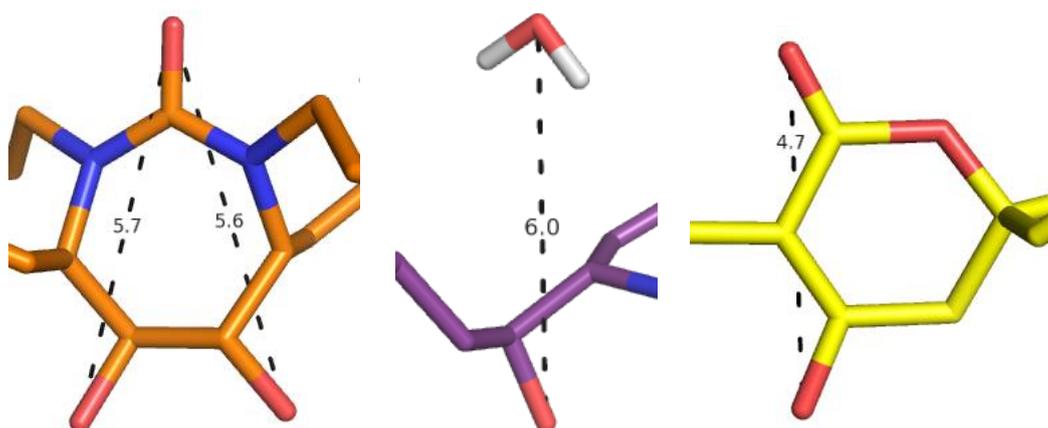


Abbildung 69: Vergleich der Abstände zwischen den Interaktionspartnern für die Adressierung der katalytischen Diade und der beiden Isoleucinen 50 und 50'. Orange: Ausschnitt aus der Struktur eines zyclischen Harnstoffs (PDB-Code: 1HWR). Violett: Ausschnitt aus einer Ritonavir-Struktur (PDB-Code: 1HXW). Gelb: Ausschnitt aus einer Tipranavir-Struktur (PDB-Code: 2O4P)

Gesucht war demnach eine rigide, Pyrrolidin-basierte Struktur mit einem Akzeptor in 5-6 Å Entfernung zum Pyrrolidin-Stickstoff. Diesen Anforderungen entsprechend wurden Oxalensäureamid- und Harnstoff-basierte Bicyklen entworfen, welche ausgehend von dem 3,4-Diaminopyrrolidin (Verbindung 16) durch eine Zyklisierung mit Oxalylchlorid oder Triphosgen darstellbar sein sollten. (Schema 15).

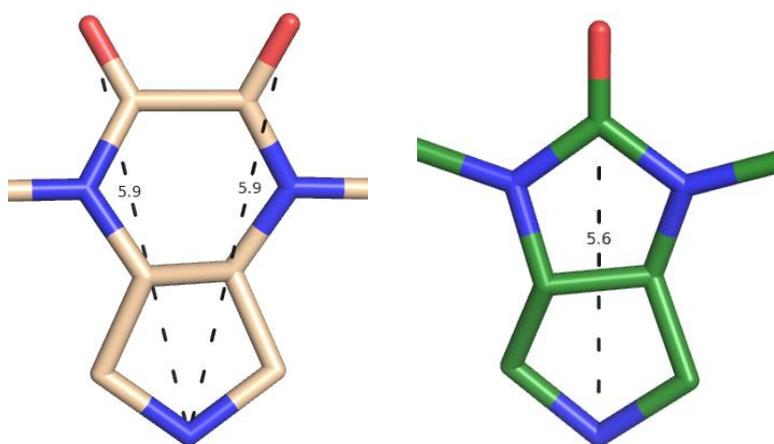
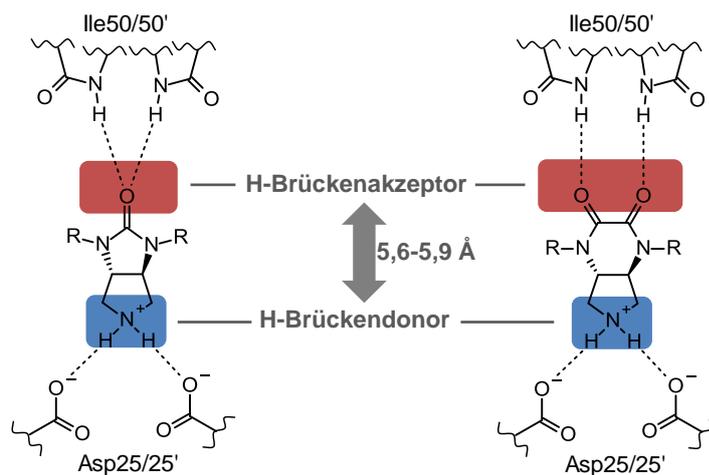


Abbildung 70: Entworfenen rigiden, Pyrrolidin-basierten Strukturen mit einem Akzeptor in 5-6 Å Entfernung zum Pyrrolidin-Stickstoff

In Schema 14 ist der, diesen Designüberlegungen entsprechende Bindungsmodus noch einmal veranschaulicht.



Schema 14: Möglichkeit zur effizienten Adressierung der Isoleucine 50 und 50' ausgehend vom Pyrrolidin-Grundgerüst durch Harnstoff- und Oxalsäureamid-basierte Bicyklen

4.1.1 Docking

Dockingexperimente sollten zeigen, ob sich das bicyklische Ringsystem *in silico* als Grundgerüst zur Inhibition der HIV-Protease eignet und die Auswahl der Substituenten, die sich am besten zur Adressierung der Spezifitätstaschen eignen unterstützen. Obwohl zur Adressierung der katalytischen Diade wie bisher ein Pyrrolidin eingesetzt wird, eignen sich die Röntgenstrukturen der Sulfonamid-substituierten Pyrrolidine nicht für die Dockingexperimente, da hier, wie in Abbildung 71 links gezeigt, die *Flap* in Richtung der interagierenden Sulfon-Gruppe verschoben ist.

Die zyklischen Harnstoffe binden hingegen annähernd symmetrisch ohne Verzerrung der *Flap*-Region und unter Verdrängung des *Flap*-Wassers an die HIV-Protease (Abbildung 71 rechts).

Deshalb wurde die Bindetasche einer Protein-Struktur, welche die HIV-Protease in Komplex mit einem zyklischen Harnstoff abbildet, für das Docking ausgewählt (PDB-Code: 1HWR).

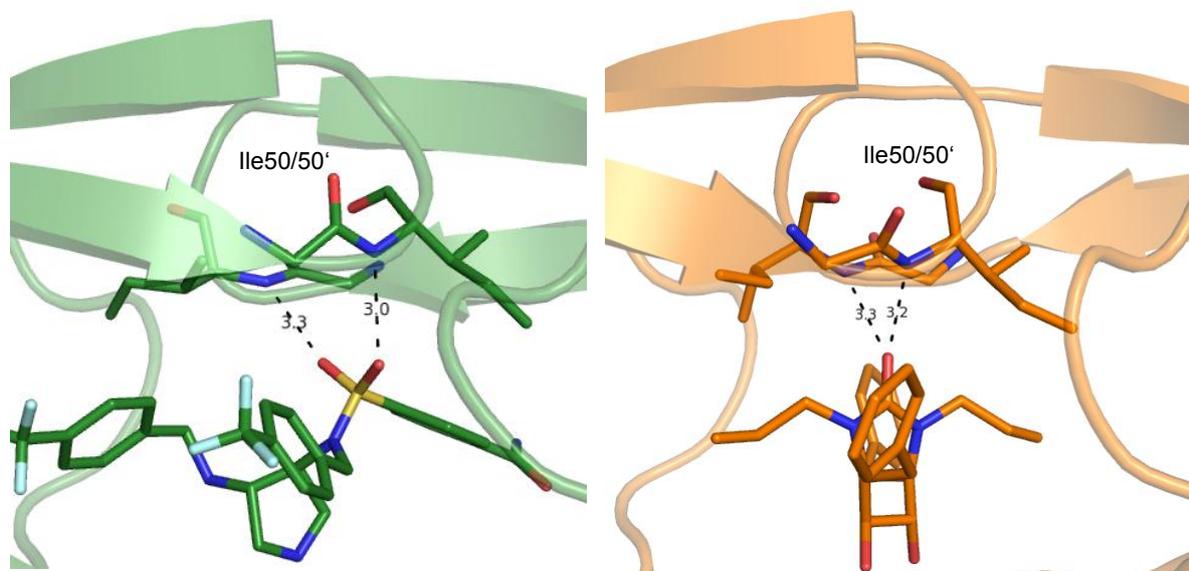


Abbildung 71: Vergleich der Flap-Regionen zwischen einer Struktur mit einem dreiarmigen Inhibitor (links, PDB-Code: 3QRM) und einer Struktur mit einem zyklischen Harnstoff als Inhibitor (rechts, PDB-Code: 1HWR).

Eine vollkommen gleiche Anordnung der *Flap* war für das bityklische Oxalsäureamid-Grundgerüst allerdings nicht zu erwarten, da dieses im Gegensatz zu den zyklischen Harnstoffen nicht eine, sondern zwei Carbonyl-Gruppen zur Adressierung der beiden Isoleucine 50 und 50' enthält. Zur ersten Abschätzung des möglichen Bindungsmodus und für das Design erster Substituenten, sollte dieses Model jedoch ausreichend genau sein.

Um die Vorhersagekraft der Methode zu verbessern, sollten die generierten FlexX-Posen anschließend mit MiniMuDS [79] minimiert und mit Drugscore [80] bewertet werden.¹ Redocking-Experimente mit Kristallstrukturen der zyklischen Harnstoffe (PDB-Codes: 1HWR, 1DMP, 1QBS, 1HVR) zeigen, dass MiniMuDS bei allen vier untersuchten Inhibitoren den RMSD-Wert² der Docking-Pose um bis zu 0,32 verbessern kann (siehe Abbildung 72). [81]

¹ In dieser Arbeit verwendete Versionen: MiniMuDS 0.3.0.1, Drugscore PDB 0.88

² Die RMSD-Werte wurden mit fconv 1.24 bestimmt

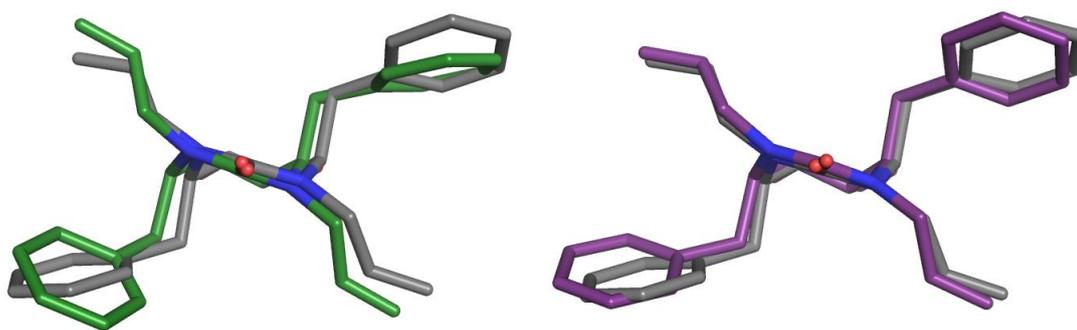


Abbildung 72: Verbesserung der Pose durch MiniMuDS am Beispiel eines zyclischen Harnstoffs (PDB-Code: 1HWR). Links: Dockinglösung von FlexX in Grün überlagert mit der Kristallstruktur in Grau (RMSD: 0,79). Rechts: Pose nach Minimierung mit MiniMuDS in Violett, überlagert mit der Kristallstruktur in Grau (RMSD: 0,47).

Für erste Dockingexperimente wurde für den Rest R zunächst ein Benzyl-Substituent ausgewählt, da ein solcher sowohl bei den dreiarmligen Inhibitoren als auch bei den zyclischen Harnstoffen gut in die Spezifitätstaschen der HIV-Protease passt.

Verbindung		Drugscore
73		-140
74		-141

Tabelle 20: Benzyl-substituierte Oxalsäureamid- und Harnstoff-Bizyklen

Es zeigte sich, dass die beiden entworfenen bizyklischen Grundgerüste, wie erwartet, gut geeignet sind, um sowohl die katalytische Diade als auch die Isoleucine 50 und 50' der *Flap* zu adressieren, wobei die Oxalsäureamid-Bizyklen bei der zum Docking verwendeten *Flap*-Anordnung mit nur einer der beiden Carbonyl-Sauerstoffe eine Wechselwirkung zur *Flap* eingehen können, was zu einer erhöhten Desolvatationsenergie und somit einer verringerten Bindungsaffinität führen könnte. Da die *Flap*-Region aber bekanntermaßen sehr flexibel ist und sich im Experiment dadurch überraschende Wechselwirkungsgeometrien ergeben können, sollten beide Varianten synthetisiert werden.

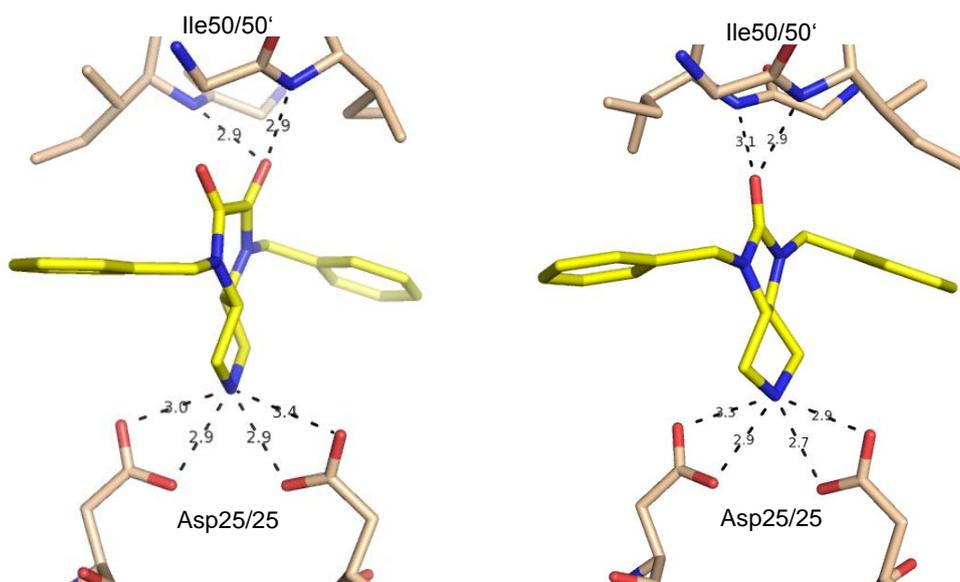


Abbildung 73: Links: Minimiertere Dockinglösungen für Verbindung 73 (links) und Verbindung 74 (rechts)

Es zeigte sich weiterhin, dass sich der verwendete Benzyl-Rest bei beiden Bicyklen gut in die S2-Taschen einfügt und in beiden Fällen die *meta*-Position am Aromaten besonders gut geeignet scheint, um kleine Substituenten (x) für zusätzliche Wechselwirkungen in den S2-Taschen einzuführen. Es sei erwähnt, dass sich auf niedrigeren Rängen auch Lösungen finden, bei denen der Benzyl-Substituent in der S1-Tasche zum Liegen kommt, die S2-Tasche wird jedoch eindeutig bevorzugt.

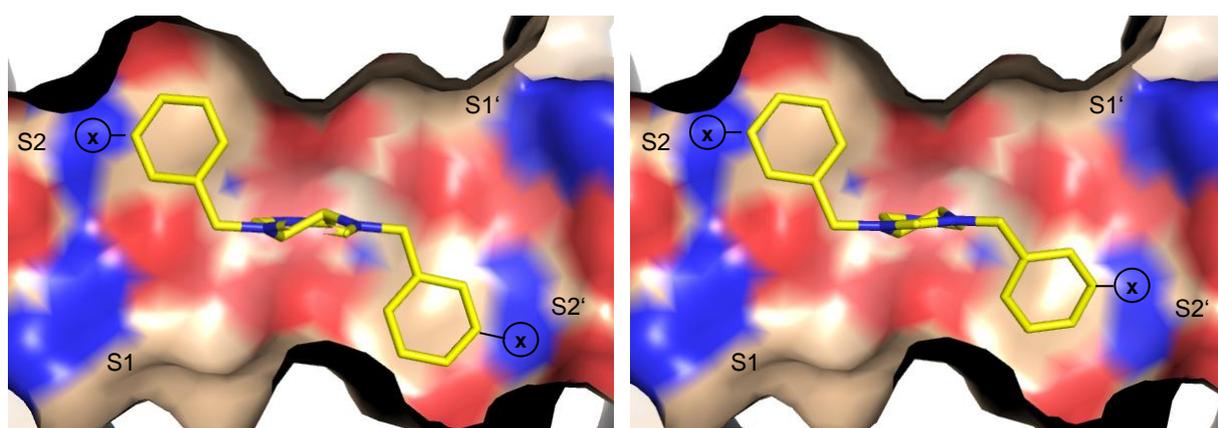


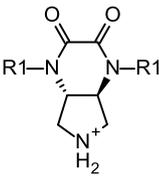
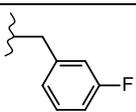
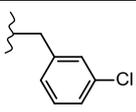
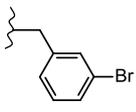
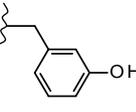
Abbildung 74: Minimiertere Dockinglösungen für Verbindung 73 (links) und 74 (rechts)

Wie in Tabelle 20 gezeigt ergibt sich für die beiden Benzyl-substituierten Bicyklen ein Drug-score von -140 bzw. -141. Der zyklische Harnstoff aus Abbildung 72 weist bei einer Affinität von 5 nM [82] einen Drugscore von -166 auf. Beachtet man, dass die hier entworfenen Verbindung im Gegensatz zu diesem zyklischen Harnstoff nicht vier sondern nur zwei Substi-

tuenten zur Adressierung der Spezifitätstaschen besitzen, sind diese Scores als vielversprechend zu bewerten.

Dass die beiden Verbindungen von Drugscore etwa gleich gut bewertet werden, liegt daran, dass sich das gleiche Wechselwirkungsmuster zum Protein ergibt. Eine eventuell erhöhte Desolvatationsenergie durch den zusätzlichen Carbonyl-Sauerstoff von Verbindung 73, welcher hier nicht mit dem Protein interagiert, wird von Drugscore nicht berücksichtigt.

Um zusätzliche Wechselwirkungen in den S2-Taschen zu ermöglichen, wurden nun an das bicyklische Grundgerüst verschiedene in *meta*-Position substituierte Benzyl-Gruppen angefügt und mit FlexX in die Bindetasche eingepasst. Nach Ermittlung der Drugscores und visueller Auswertung der von MiniMuDS minimierten Docking-Posen, wurden zusätzlich zu dem unsubstituierten Benzyl-Rest fünf weitere Substituenten für die Synthese ausgewählt, wobei aufgrund der leichteren synthetischen Zugänglichkeit zunächst nur symmetrische Inhibitoren dargestellt werden sollten.

Konstanter Molekülteil	Verbindung	R1	Drugscore
	75		-149
	76		-141
	77		-150
	78		-139

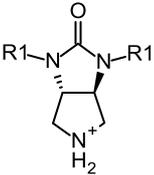
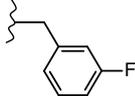
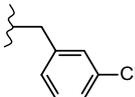
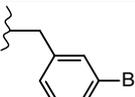
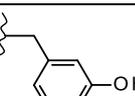
	79		-145
	80		-155
	81		-102
	82		-143

Tabelle 21: Zur Synthese ausgewählte Substituenten für R1 der bicyclischen Inhibitoren

Wie Tabelle 21 zeigt, wurden für die Synthese neben dem *meta*-Hydroxybenzyl-Substituenten auch *meta*-Halogenbenzyl-Substituenten ausgewählt. Die Halogenide können auf zwei unterschiedliche Weisen in der S2-Tasche zum Liegen kommen. Entweder sie interagieren mit den Aspartaten 29/29' und 30/30' in den beiden S2-Bindetaschen oder sie zeigen, ähnlich wie der Chlor-Substituent aus Verbindung 45 (Abschnitt 3.5.1), in Richtung der Seitenkette von Isoleucin 48/48'. Bei der in Abbildung 75 gezeigten Dockinglösung bildet der Fluor-Substituent in der S2-Tasche eine Wasserstoffbrückenbindung zur Seitenkette von Aspartat 29 aus, während der andere Fluor-Substituent in der S2'-Tasche eine Van-der-Waals-Wechselwirkung zur Seitenkette des Isoleucins 48' eingeht. Mit dem Chlor-Substituenten verhält es sich analog.

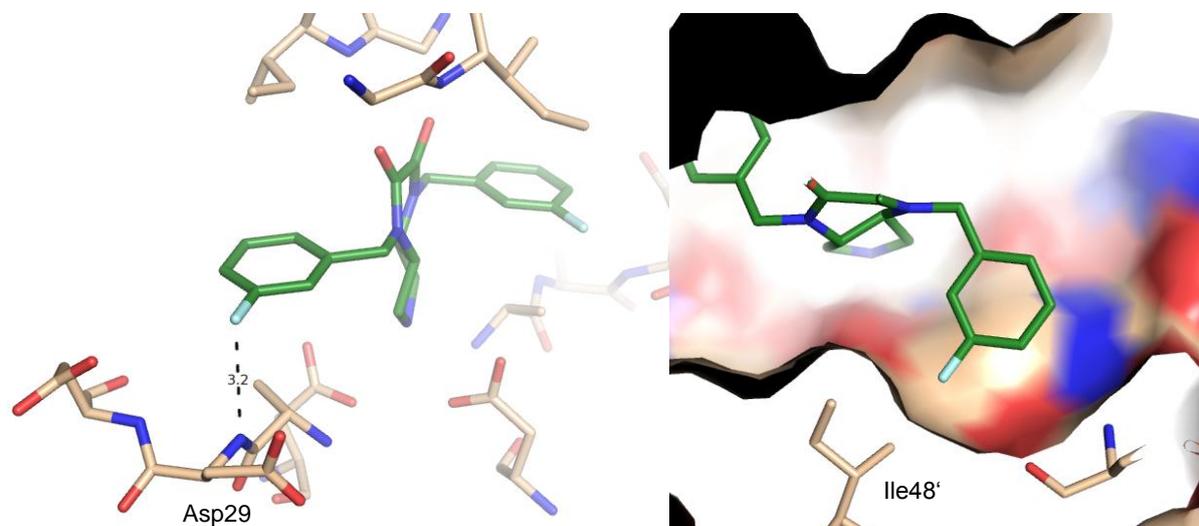


Abbildung 75: Minimierter Dockinglösung für Verbindung 75. Links: Ausrichtung in der S2-Tasche. Rechts: Ausrichtung in der S2'-Tasche

Bei dem Brom-Substituent zeigen beide Brom-Atome in Richtung der Aspartate 29/29' und 30/30', die Abstände sind aber für eine gewinnbringende Wechselwirkung in der S2'-Tasche mit 4,1 Å etwas zu groß (Abbildung 76).

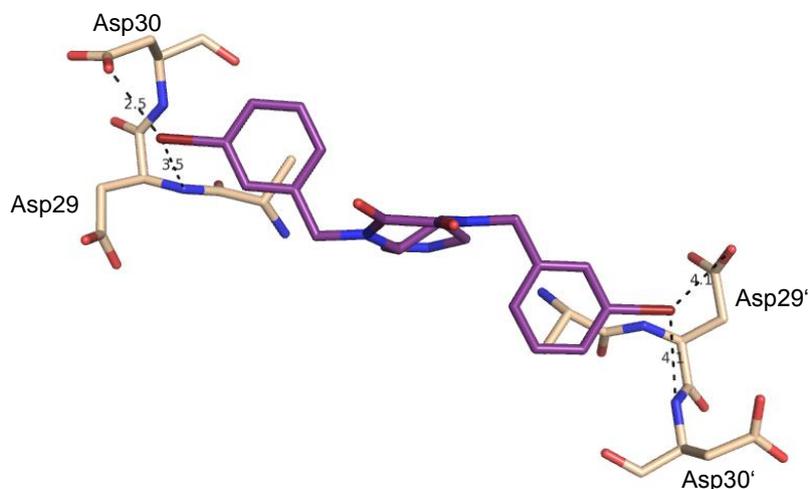


Abbildung 76: Minimierter Docking-Lösung der Verbindung 77

Da der Hydroxy-substituierte Oxalsäureamid-Bizyklus (Verbindung 78) gleichzeitig ein Wasserstoffbrückendonator ist, ergibt sich für diese Gruppe zusätzlich zu der Wechselwirkung mit der Seitenkette von Aspartat 30 in der S2-Tasche die Möglichkeit, mit dem Rückgrat von Glycin 48' in der S2'-Tasche in Interaktion zu treten:

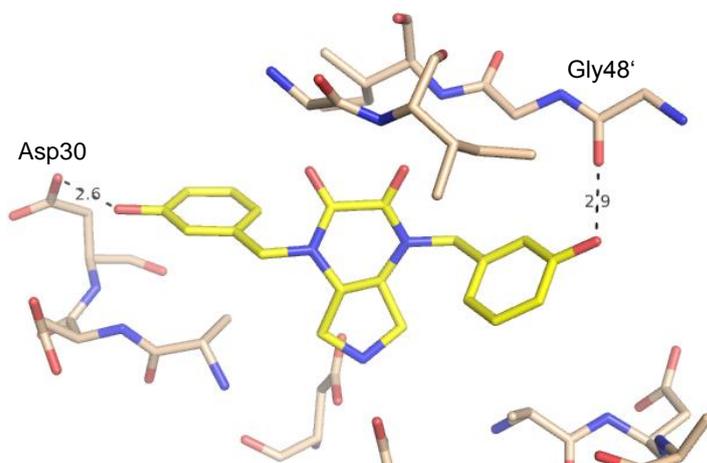


Abbildung 77: Minimierter Docking-Lösung für Verbindung 78. Interaktionen in der S2- und der S2'-Tasche

Nach visueller Auswertung der minimierten Docking-Lösungen erschien dieser Substituent am vielversprechendsten, obwohl der Score mit -139 verhältnismäßig niedrig ist. Der Grund dafür ist, dass die OH-Gruppe der Seitenkette von Isoleucin 47' etwas zu nahe kommt (Abbildung 78, links). Durch Minimierung dieser Seitenkette mit MiniMuDS vergrößert sich der Abstand leicht, sodass sich der Score auf -141 verbessert (Abbildung 78, rechts).

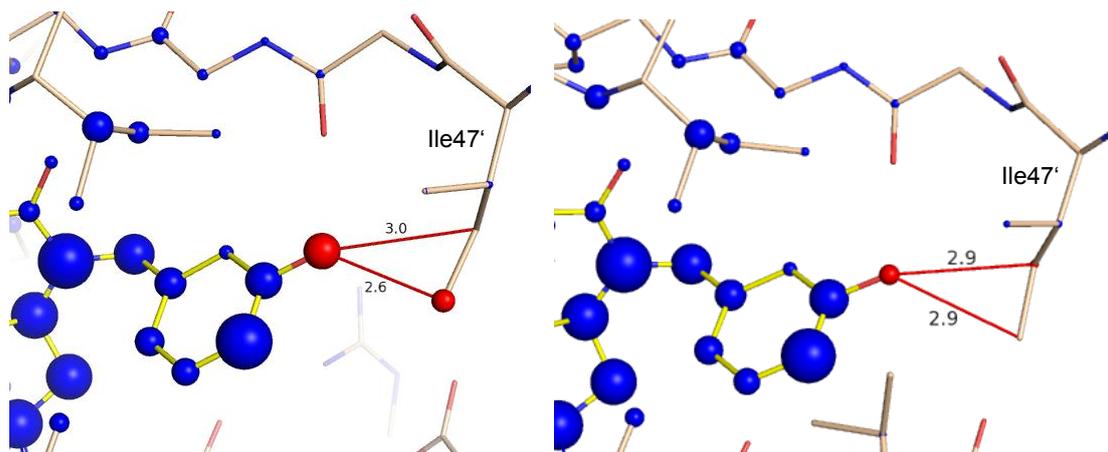


Abbildung 78: Visualisierung der Einzelbeiträge der Drugscore-Bewertung für die minimierte Docking-Pose von Verbindung 78. Blaue Kugeln bedeuten eine gute Interaktion und blaue Linien einen guten Abstand, woraus sich ein günstiger Beitrag ergibt. Analog bedeuten Rote Kugeln eine schlechte Interaktion und rote Linien einen schlechten Abstand woraus sich ein ungünstiger Beitrag ergibt. Links: Anordnung des Isoleucins 47' entsprechend der Kristallstruktur (PDB-Code: 1HWR), rechts: Mit MiniMuDS minimierte Seitenkette.

In der Praxis sollte die Flexibilität des Isoleucins 47' durch die Nachbarschaft zu ebenfalls beweglichen Seitenketten noch höher sein, weshalb die Verbindung trotz des niedrigen Scores zur Synthese ausgewählt wurde.

Die Docking-Lösungen der Harnstoffderivate sind jenen der Oxalylsäureamid-Bizyklen sehr ähnlich. Relevante Unterschiede ergeben sich für die Hydroxy-Verbindung, die wegen des veränderten Winkels in der S2-Tasche zusätzlich mit dem Rückgrat-Stickstoff des Aspartats 29 interagiert und in der S2'-Tasche anstelle der Wechselwirkung mit Glycin 48' nun auch hier den Rückgrat-Stickstoff des Aspartats 29' adressiert.

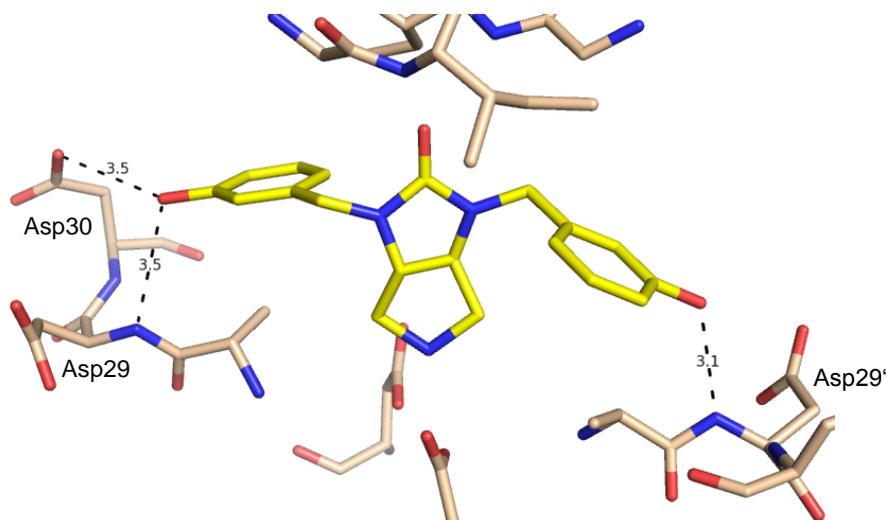


Abbildung 79: Minimierter Dockinglösung für Verbindung 82

Betrachtet man die Scores der Harnstoff-Verbindungen in Tabelle 20 und 21 fällt auf, dass sich für den Brom-Substituenten ein besonders niedriger Score ergibt. Das liegt daran, dass FlexX das Brom zu Isoleucin 84 hin ausrichtet und Drugscore diese Position wegen des geringen Abstands zur Seitenkette als nachteilig bewertet. In der Struktur des Chlor-substituierten dreiarmligen Inhibitors (Verbindung 45, Abschnitt 3.5.1) wurde jedoch die gleiche Position für ein Chlor-Atom beobachtet, wobei sich die entsprechenden Seitenketten von Valin 32 und Isoleucin 84 etwas zur Seite drehen. Deshalb wurde auch diese Verbindung, trotz des niedrigeren Scores für die Synthese ausgewählt.

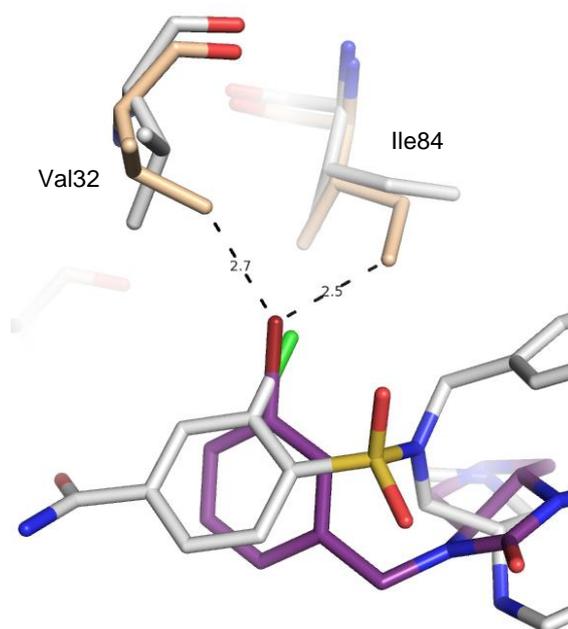


Abbildung 80: Minimierter Dockinglösung für Verbindung 81 in Violett (Protein in Beige), überlagert mit der Kristallstruktur von Verbindung 45 in Grau (Protein in Grau)

4.2 Synthese

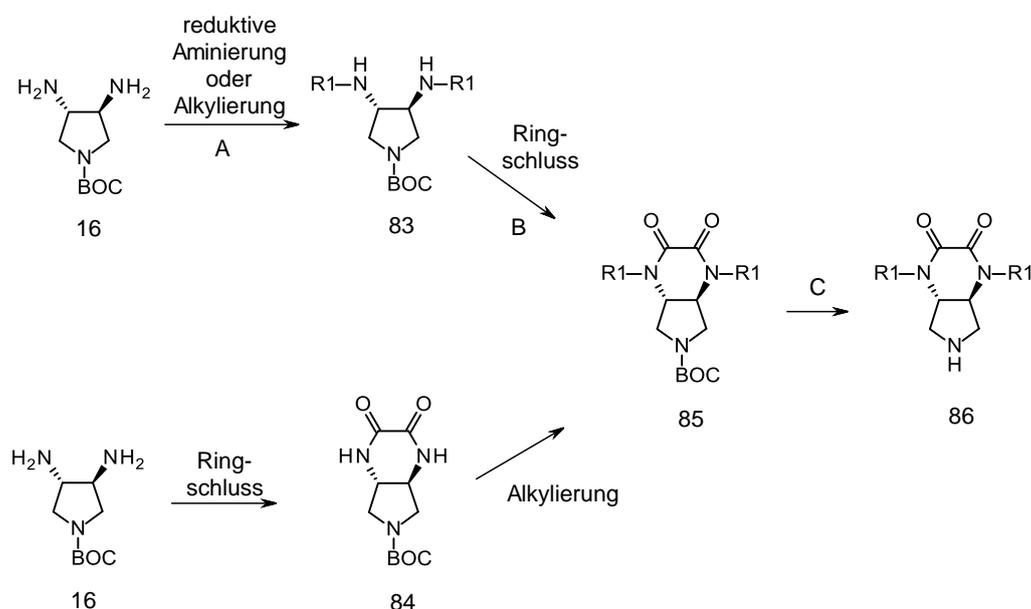
Insgesamt sollten also die in Tabelle 20 und 21 gezeigten 10 Inhibitoren dargestellt werden, deren Synthese im Folgenden erläutert wird.

Synthese der Oxalsäureamid-Bizyklen:

Ausgehend von 3,4-Diaminopyrrolidin (Verbindung 16), dessen Synthese von Andreas Blum bereits entwickelt wurde, boten sich grundsätzlich zwei Wege zur Darstellung der Oxalsäureamid-Bizyklen an.

Der Ringschluss zum Oxalsäureamid-Bizyklus kann entweder als letzter oder als vorletzter Schritt vor der Entschützung des die katalytischen Aspartate adressierenden Stickstoffs durchgeführt werden. Die zweite Variante, bei der als Edukte Benzylhalogenide benötigt werden, bietet den Vorteil, dass die Einführung der verschiedenen Substituenten möglichst spät in der

Synthese erfolgt. Der Vorteil des ersten Wegs ist, dass für die Einführung der Substituenten neben Benzylhalogeniden auch die entsprechenden Aldehyde verwendet werden können und die Anzahl kommerziell erhältlicher Syntheseeedukte dadurch erheblich steigt. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass Verbindung 83 ebenfalls zur Synthese der Harnstoff-Bizyklen verwendet werden kann. Aus diesen Gründen wurde der erste Weg für die Synthese ausgewählt.



Schema 15: Zwei verschiedene Synthesewege zur Darstellung der Oxalsäureamid-Bizyklen

Für Schritt A ist die reduktive Aminierung der Alkylierung vorzuziehen, da bei der Alkylierung auch tertiären Amine als Nebenprodukt entstehen können. Die reduktive Aminierung verlief unter Verwendung von NaBH_4 als Reduktionsmittel mit guten Ausbeuten. Für den Ringschluss wurden verschiedene Zyklisierungs-Reagenzien (Oxalylchlorid, *bis*(4-Nitrophenyl)oxalat, Methyloxalsäurechlorid), verschiedene Lösungsmittel (DCM, Toluol, THF, Aceton, DMSO, DMF, MeOH) und verschiedene Basen (NaH, DBU, DIPEA, Kaliumtertbutanolat) bei verschiedenen Temperaturen (-78 bis 100 °C) getestet [83-86]. Die beste Ausbeute (68 %) wurde mit *bis*(4-Nitrophenyl)oxalat erzielt, unterlag aber auch bei Verwendung der gleichen Edukte sehr großen Schwankungen. Etwas besser ließ sich die Bedingung mit Oxalylchlorid und DIPEA in DCM bei -10 °C reproduzieren. Allerdings schwanken auch hier die Ausbeuten und liegen relativ niedrig bei 14 bis 57 %. Der Grund für die schlechten Ausbeuten der Ringschluss-Reaktionen liegt vermutlich in der relativ hohen Ringspannung des Oxalsäureamid-Bizyklus. Da die Carbonyl-Kohlenstoffe und die Stickstoff-Atome sp^2 -hybridisiert und somit bevorzugt planar vorliegen, die beiden Stickstoff-Atome aber *trans*

zueinander stehen, ergeben sich ungünstige und vom Tetraederwinkel abweichende Winkel für die Brücken-Kohlenstoffe (Abbildung 81). [87]

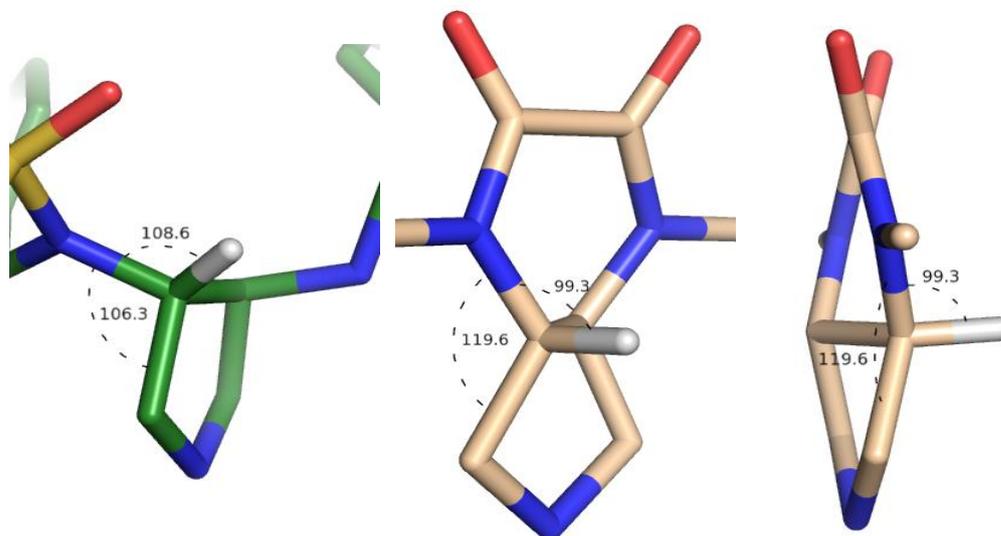
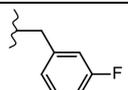
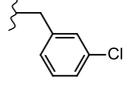


Abbildung 81: Bindungswinkel der Oxalsäureamid-Bizyklen nach Minimierung durch MOE 2011.10 (beige) im Vergleich zu den Bindungswinkeln des Pyrrrolidins bei den dreiarmigen Verbindungen (grün)

Dennoch konnten alle gewünschten Verbindungen dargestellt werden. In Tabelle 22 sind die verwendeten Reagenzien und Ausbeuten für die Schritte A-C der synthetisierten Inhibitoren aufgeführt. Die Ausbeuten des letzten Syntheseschritts der insgesamt neunstufigen Synthese wurden nicht optimiert.

	R1	Schritt A		Schritt B		Schritt C	
		Reagenzien	Ausbeute	Reagenzien	Ausbeute	Reagenzien	Ausbeute
73		Benzaldehyd, Molsieb 4Å, NaBH ₄ , MeOH	59 %	Oxalylchlorid, DIPEA, DCM	20 %	HCl in Et ₂ O, DCM	91 %
75		3-Fluor- benzaldehyd, Molsieb 4Å, NaBH ₄ , MeOH	77 %	bis(4-Nitro- phenyl)oxalat, DBU, DMF	68 %	HCl in Et ₂ O, EtOAc	68 %
76		3-Chlor- benzaldehyd, Molsieb 4Å, NaBH ₄ , MeOH	75 %	Oxalylchlorid, DIPEA, DCM	57 %	HCl in Et ₂ O, DCM	28 %

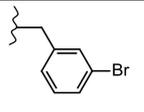
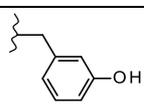
77		3-Brom- benzaldehyd, Molsieb 4Å, NaBH ₄ , MeOH	73 %	Oxalylchlorid, DIPEA, DCM	53 %	HCl in Et ₂ O, DCM	25 %
78		3-[<i>tert</i> -Butyl- (dimethyl)- silyl]oxybenz- aldehyd, Molsieb 4Å, NaBH ₄ , MeOH	97 %	Oxalylchlorid, DIPEA, DCM	14 %	HCl in Et ₂ O, DCM	36 %

Tabelle 22: Reagenzien und Ausbeuten der letzten drei Stufen der Oxalsäureamid-Bizyklus-Synthese

Da schon die Synthese des neun-gliedrigen Oxalsäureamid-Bizyklus Schwierigkeiten bereitete, erschienen die Erfolgsaussichten für den achtgliedrigen, vermutlich noch stärker gespannten bizyklischen Harnstoff gering. Wie die mit MOE gezeichnete und minimierte dreidimensionale Struktur zeigt, ergeben sich hier noch stärker vom Tetraederwinkel abweichende Werte für die Brückenkohlenstoffatome (Abbildung 82). Dadurch könnten anstelle des sonst begünstigten Ringschluss, intermolekulare Reaktionen bevorzugt auftreten.

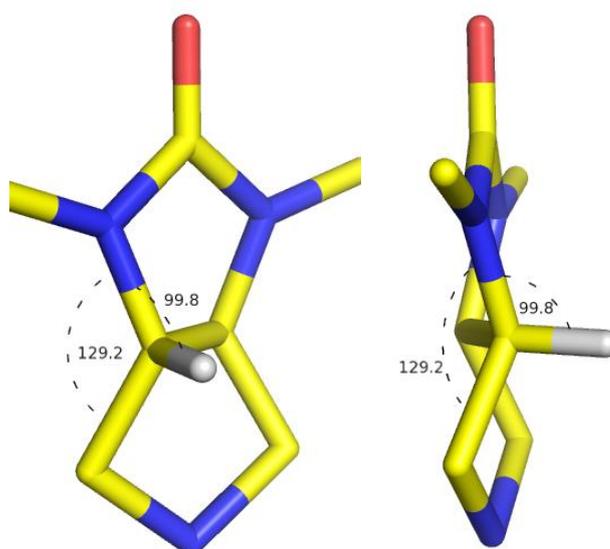


Abbildung 82: Mit MOE 2011.10 berechnete Bindungswinkel der Harnstoff-Bizyklen

Es wurde dennoch versucht, das Bisamin mit Triphosgen oder Chlorameisensäuremethylester umzusetzen. Hier wurden ebenfalls verschiedene Basen (Imidazol, DIPEA) und Lösungsmittel (Dimethoxyethan, Chloroform, DCM) verwendet. Leider bildete sich jedoch

unter keiner der verwendeten Bedingungen das Produkt aus, weshalb dieses Grundgerüst in der vorliegenden Arbeit nicht weiter verfolgt wurde. Im Folgenden werden deshalb die Oxalsäureamid-Bizyklen nur noch als Bizyklen bezeichnet.

4.3 Testung der Enzymhemmung

Der Enzymassay zur Affinitätsbestimmung wurde analog zu den dreiarmligen Inhibitoren durchgeführt. Tabelle 23 zeigt die Ergebnisse der Affinitätsbestimmung, die molare Masse der Verbindungen und die Ligandeneffizienz.

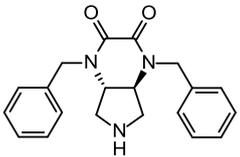
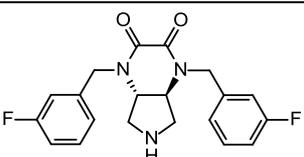
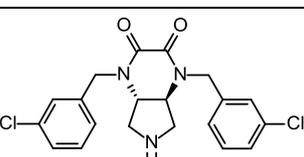
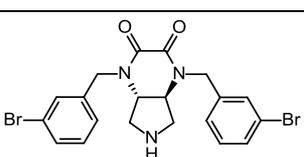
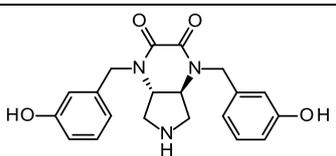
Name	Formel	K_i (μM)	MW (g/mol)	LE (kcal/mol)
Bizyklische Inhibitoren der ersten Serie				
73		35	335	-0,24
75		21	371	-0,24
76		23	404	-0,24
77		7,3	493	-0,26
78		6,4	367	-0,26

Tabelle 23: Ergebnisse der Affinitätsbestimmung für Verbindung 73 bis 78 gegenüber der HIV-Protease

Es fällt sofort auf, dass die Ligandeneffizienz im Vergleich zu den dreiarmligen Inhibitoren stark verbessert werden konnte. Mit einem Wert von -0,26 kcal/mol sind die Verbindungen 77

und 78 nicht mehr weit von dem Zielwert von $-0,29$ kcal/mol entfernt. Es ist bemerkenswert, dass die relativ kleinen und nur zwei Spezifitätstaschen adressierenden Inhibitoren 77 und 78 die HIV-Protease, trotz der Größe der Bindetasche, im einstellig μM Bereich hemmen. Verbindung 78 stellt den besten Inhibitor dieser Serie dar, obwohl diese im Docking von den ausgewählten Oxalsäureamid-Bizyklen am schlechtesten bewertet wurde. Dieses Beispiel zeigt, dass der Score alleine kein ausreichendes Kriterium zur Auswahl von Verbindungen sein sollte. Die visuelle Auswertung, wie sie für Verbindung 78 in Abbildung 77 und 78 gezeigt ist, stellt ein ebenso wichtiges Kriterium dar und sollte immer gemeinsam mit dem Score zur Selektion geeigneter Verbindungen herangezogen werden. Die Hauptursache für die vergleichsweise hohe Affinität von Verbindung 77 und 78 liegt wahrscheinlich in der Rigidität des bicyklischen Grundgerüsts und in der exakten Passform der Inhibitoren. Deshalb sollte dieses Grundgerüst weiter verfolgt und die Inhibitoren in einem zweiten Designzyklus optimiert werden.

4.4 Röntgenstrukturanalyse

Ina Lindemann und Martin Stieler gelang es, von den Verbindungen 77 und 78 eine Kristallstruktur mit beiden Monomeren der HIV-Protease in der asymmetrischen Einheit zu lösen. [70, 71] Die wegen der hohen Affinität bereits vermutete gute Passform der Inhibitoren bestätigt sich in der Röntgenstruktur.

Auf den ersten Blick weicht der Bindungsmodus nicht stark von der generierten Dockinglösung ab. Die beiden Benzylsubstituenten besetzen wie vorhergesagt die S2-Bindetaschen des Enzyms.

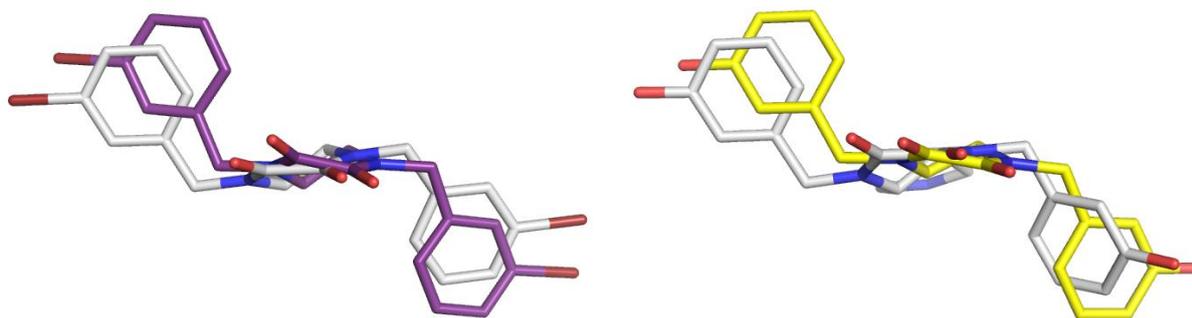


Abbildung 83: Die bipyklischen Inhibitoren 77 (links) und 78 (rechts, PDB-Code 3QN8), wie sie in der HIV-Protease zum Liegen kommen, überlagert mit den jeweiligen Dockinglösungen in Graue.

Dadurch, dass die Bizyklen in der Kristallstruktur im Vergleich zur Dockinglösung etwas im Uhrzeigersinn gedreht sind, ergeben sich veränderte Wechselwirkungen in der S2/S2'-Bindetasche (Abbildung 84). Der größere Brom-Substituent kann sowohl mit dem Rückgrat-

Stickstoff als auch mit der Seitenkette von Aspartat 30/30' interagieren, wobei die Größe und die hohe Polarisierbarkeit des Bromsubstituenten für diese Interaktion entscheidend sind. Zusätzlich koordiniert der Brom-Substituent an ein Wassermolekül, welches wiederum mit Aspartat 29 in Wechselwirkung tritt. Die Wechselwirkungen in der S2- und der S2'-Tasche sind dabei nahezu identisch. Der kleinere Hydroxy-Substituent interagiert ebenfalls mit dem Rückgrat-Stickstoff von Aspartat 30/30' als Wasserstoffbrückenakzeptor, der Abstand zur entsprechenden Seitenkette ist hingegen zu groß für eine Wechselwirkung. Stattdessen bildet sich eine Wasserstoffbrückenbindung zu einem Wassermolekül aus, welches seinerseits sehr gut in ein Wassernetzwerk integriert ist. Auch hier ergibt sich für die S2- und die S2'-Tasche nahezu das gleiche Bild.

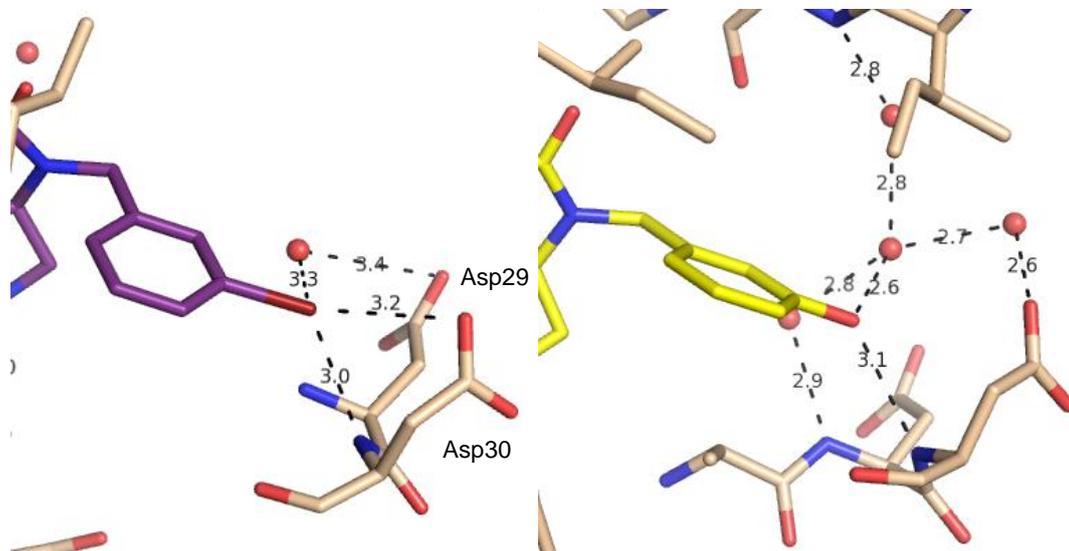


Abbildung 84: In der Röntgenstruktur beobachtete Wechselwirkungen der bicyklischen Inhibitoren Verbindung 77 (links) und Verbindung 78 (rechts, PDB-Code: 3QN8) mit der S2-Tasche der HIV-Protease

Den interessantesten Unterschied zur Dockinglösung stellen aber nicht die Wechselwirkungen in den Spezifitätstaschen dar, sondern die Interaktion mit der *Flap*.

Es ist bekannt, dass die Peptidbindung zwischen Isoleucin 50/50' und Glycin 51/51' einen *Backbone-Flip* vollziehen kann. In den meisten Strukturen zeigt das Rückgrat-Stickstoffatom des einen Glycin 51 in die Bindetasche und der des anderen von der Bindetasche weg, so dass sich eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Carbonyl-Kohlenstoff des einen Glycins 51 und dem Amid-Stickstoff des Anderen ausbilden kann. Diese Anordnung ist in Abbildung 85 links gezeigt und wird zum Beispiel in den Kristallstrukturen von Ritonavir, Tipranavir, dem natürlichen Substrat, den dreiarmligen und den vierarmigen Pyrrolidin-basierten Inhibitoren beobachtet. In Abbildung 85 in der Mitte ist die Anordnung gezeigt, welche die

Flap bei einem zyklischen Harnstoff in Komplex mit der HIV-Protease einnimmt. Die Peptidbindung ist hier so angeordnet, dass beide Carbonyl-Sauerstoffe zur Bindetasche hin zeigen. Bei den bityklischen Inhibitoren findet sich nun eine neuartige Anordnung der *Flap*. In der Kristallstruktur ist die Peptidbindung so angeordnet, dass beide Amid-Stickstoffe der Glycine 51 und 51' zur Bindetasche zeigen und über ein verbrückendes Wassermolekül mit den beiden Carbonyl-Sauerstoffen des bityklischen Inhibitors interagieren. Dieses Wassermolekül zeigt einen mit seiner Umgebung vergleichbaren B-Faktor von 35. Zusätzlich wird eine direkte Wasserstoffbrücke von einem der beiden Carbonyl-Sauerstoffe zu dem Isoleucin 50' ausgebildet. Das Isoleucin 50 kann keine Wechselwirkung zum Inhibitor ausbilden, fixiert jedoch ebenfalls ein Wassermolekül mit einem vergleichsweise niedrigen B-Faktor von 27. Dieses hat seinerseits allerdings keine weiteren Wasserstoffbrückenpartner.

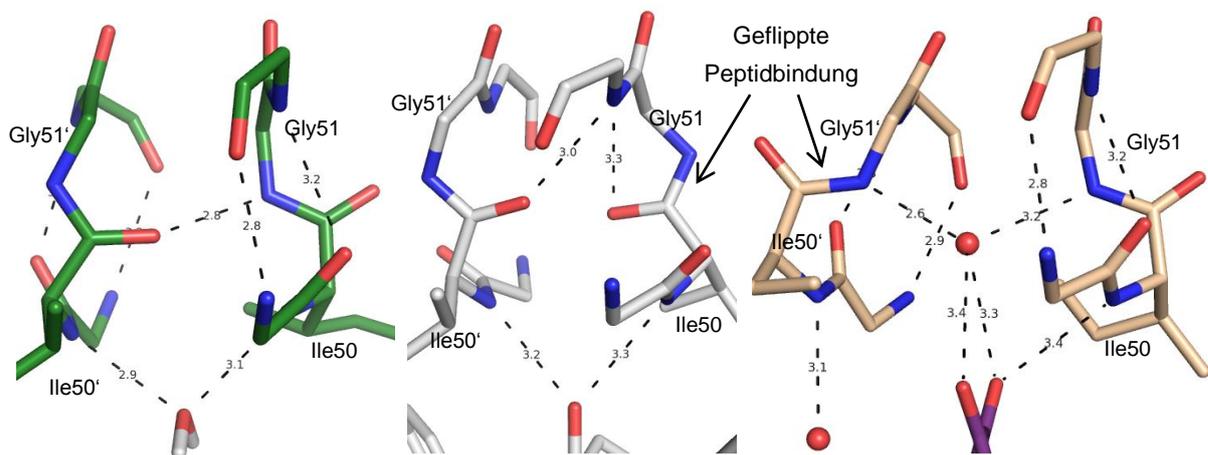


Abbildung 85: Unterschiedliche Konformationen der HIV-Protease-*Flap*, welche in verschiedenen Kristallstrukturen beobachtet wurden. Links: Struktur mit Ritonavir (PDB-Code: 1HXW). Mitte: Struktur mit einem zyklischen Harnstoff (PDB-Code: 1HWR). Rechts: Struktur mit einem bityklischen Inhibitor.

Diese Anordnung von Isoleucin 50/50' und Glycin 51/51' kommt bei der HIV-Protease nur sehr selten vor und die Komplexierung eines Wassers durch die beiden Stickstoff-Atome von Glycin 51 und 51' wurde nach unserem Wissen in Komplexstrukturen der HIV-Protease bisher noch nicht beobachtet. Das *Flap*-Wasser, welches bei den peptidischen Inhibitoren und dem natürlichen Substrat beobachtet wird, wechselwirkt nicht mit den Glycinen 51/51' sondern mit den Isoleucinen 50 und 50', befindet sich somit wesentlich näher an der Bindetasche und wird von den bityklischen Inhibitoren verdrängt. Dieses „klassische“ *Flap*-Wasser ist in Abbildung 85 links als *Sticks* repräsentiert.

Die Röntgenstruktur der Bicyklen zeigt weiterhin, dass entgegen der Docking-Vorhersage, welche mit einem starren Protein erzeugt wurde, beide Carbonyl-Sauerstoffe direkt oder über ein Wassermolekül in Wechselwirkung zum Protein treten. Die erhaltenen Erkenntnisse über den Bindungsmodus des Grundgerüsts sollten nun zur Optimierung der Substituenten des bicyklischen Grundgerüsts herangezogen werden.

4.5 Adressierung der S1-Bindetasche

4.5.1 Design

Betrachtet man die Taschenbesetzung der ersten Serie der bicyklischen Inhibitoren wird ersichtlich, dass die S1- und die S1'-Tasche unbesetzt bleibt. Das größte Potential zur Verbesserung der Affinität lag daher in der Besetzung dieser Taschen, wobei es prinzipiell drei verschiedene Möglichkeiten gab, diese Taschen zu adressieren.

Anknüpfungspunkte für die neuen Substituenten ergeben sich am Benzylkohlenstoff (AP1), und an den beiden nicht äquivalenten *ortho*-Positionen des Aromaten (AP2 und AP3), wie in Abbildung 86 verdeutlicht.

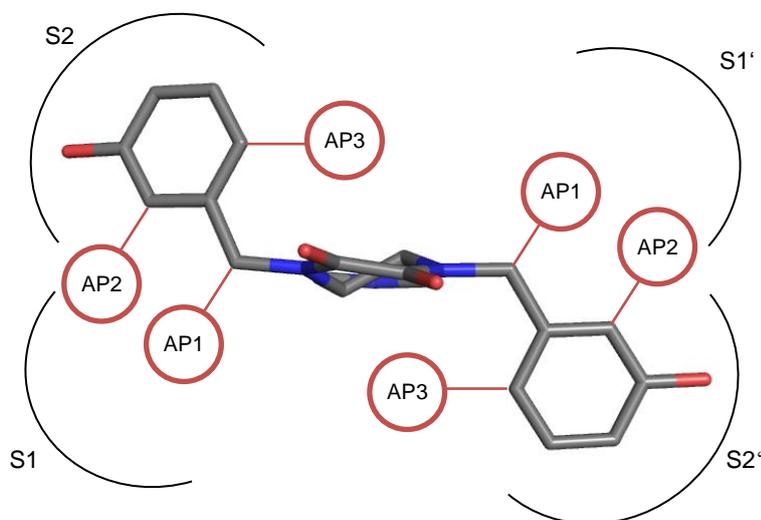


Abbildung 86: Möglichkeiten von dem vorliegenden bicyklischen Inhibitor aus, die S1/S1'-Bindetasche zu adressieren

Bei Einführung eines Substituenten am Anknüpfungspunkt 3 würde dieser dem bicyklischen Grundgerüst räumlich sehr nahe kommen und könnte dadurch zu einer ungewollten Drehung des Aromaten um 180° führen, weshalb diese Variante nicht näher in Betracht gezogen wurde. Für die beiden Anknüpfungspunkte 1 und 2 wurden, unter Berücksichtigung der kommerziellen Erhältlichkeit der Synthese-Edukte, Substituenten entworfen, gedockt und für die Synthese ausgewählt. Das Docking wurde analog des ersten Designzyklus durchgeführt, allerdings wurde diesmal, um die neue *Flap*-Konformation zu berücksichtigen, in die Struktur von

Verbindung 78 gedockt. Um dreiarmlige Verbindungen mit einem geringen Molekulargewicht zugänglich zu machen, wurden diesmal auch unsymmetrische Inhibitoren berücksichtigt.

Die vier ausgewählten Verbindungen sind mit ihrem Molekulargewicht und den Drugscores in Tabelle 24 gezeigt.

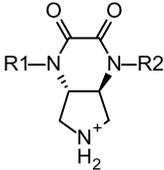
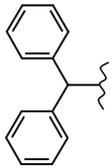
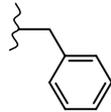
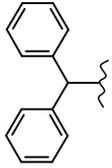
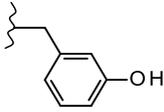
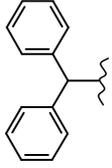
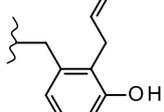
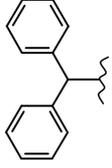
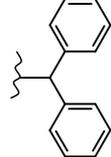
Konstanter Molekülteil	Verbindung	R1	R2	Drugscore
	87			-169
	88			-168
	89			-184
	90			-191

Tabelle 24: Zur Synthese ausgewählte Substituenten für R1 und R2 der bityklischen Inhibitoren

Der Benzhydryl-Substituent erschien besonders vielversprechend, da er ausgesprochen effizient die S1- und die S2- Taschen besetzen kann, deshalb findet er sich auch in allen vier für die Synthese ausgewählten Verbindungen mindestens einmal wieder.

Die einzelnen Docking-Posen seien im Folgenden kurz vorgestellt:

Verbindung 87 sollte vor allem synthetisiert werden, um anhand der Messwerte exakt feststellen zu können, ob die Hydroxy-Gruppe der Verbindung 88 einen Beitrag zur Affinität des Liganden liefert. In der Dockinglösung ergibt sich, analog zu den zweiarmligen Bityklen, eine Wechselwirkung dieser Hydroxy-Gruppe mit dem Aspartat 30.

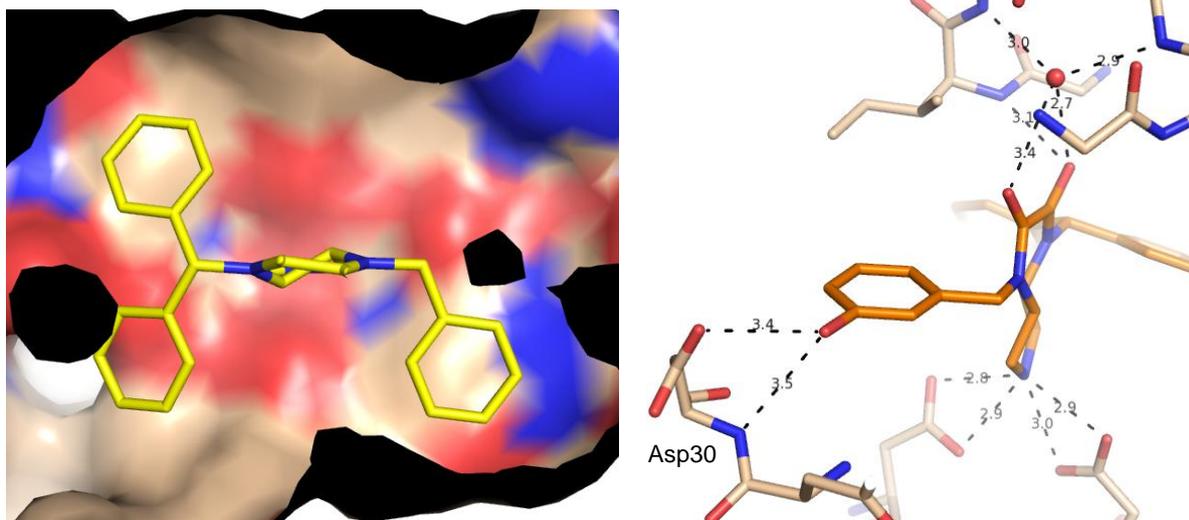


Abbildung 87: Minimiere Dockinglösungen der Verbindung 87 (links) und 88 (rechts) in Komplex mit der HIV-Protease

Die Verbindungen 89 und 90 können alle vier Taschen der HIV-Protease besetzen. Verbindung 89 ausgehend von der Position 2 des Aromaten mit einem Allyl-Substituenten und Verbindung 90 ausgehend von der Benzyl-Position, mittels eines zweiten Phenyl-Rests (Abbildung 88). Bei Verbindung 89 war es synthetisch möglich, die Hydroxy-Gruppe beizubehalten, während ein Hydroxy-substituierter Benzhydryl-Rest aus Gründen der schlechten synthetischen Zugänglichkeit nicht ausgewählt wurde.

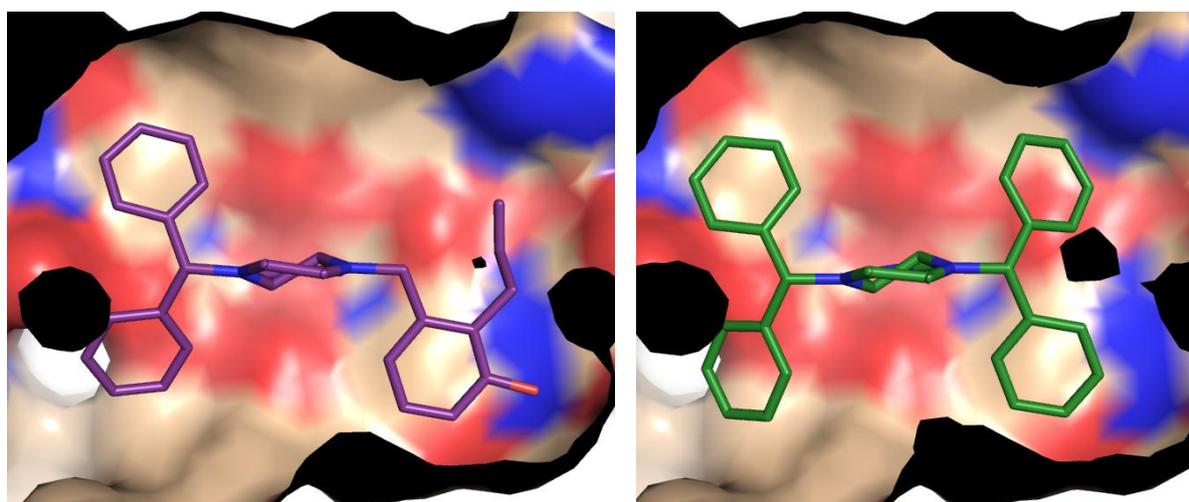
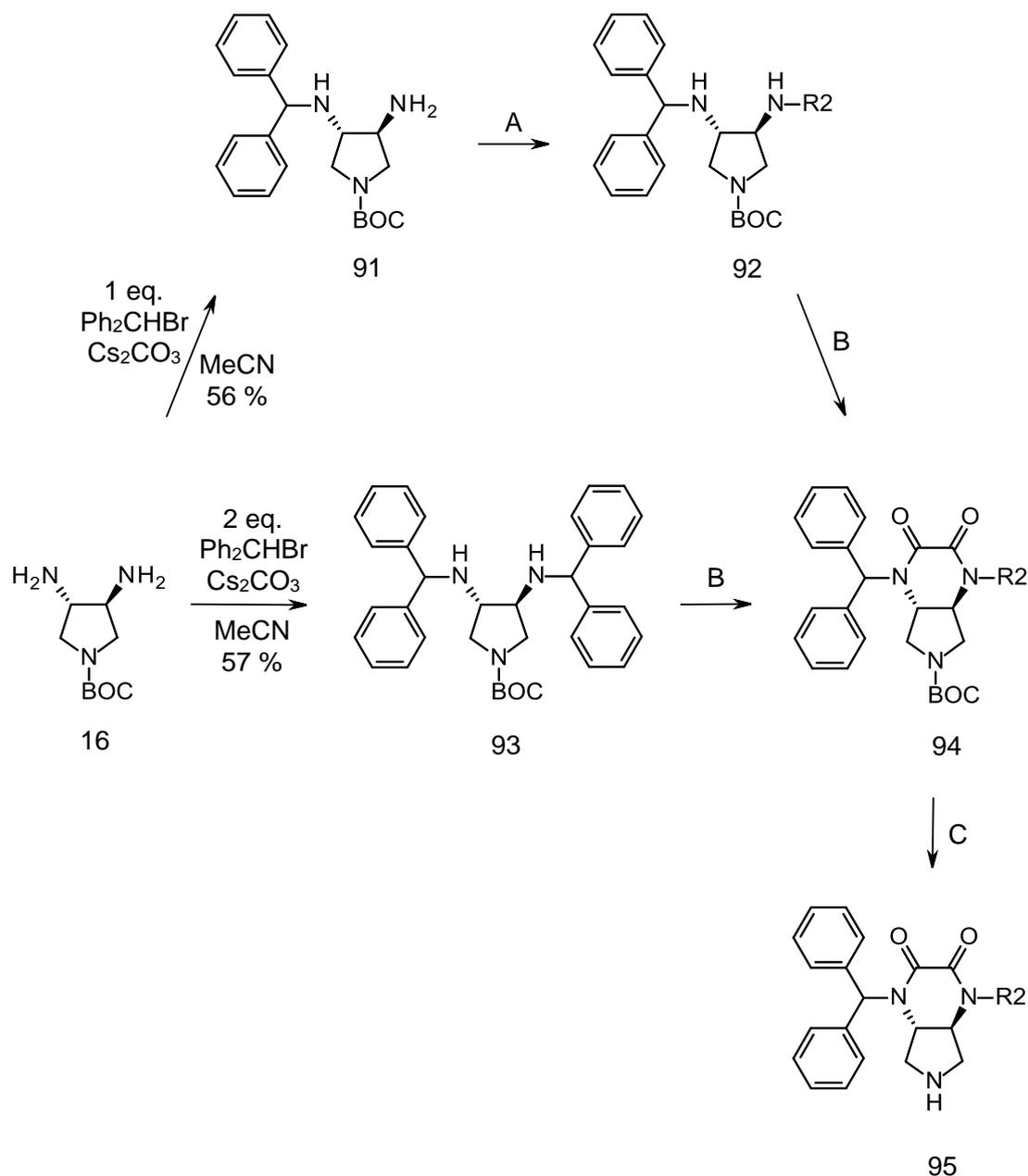


Abbildung 88: Minimiere Dockinglösungen der Verbindung 89 (links) und 90 (rechts) in Komplex mit der HIV-Protease

4.5.2 Synthese

Zur Einführung des Benzhydryl-Substituenten wurde das Amin 16 mit Benzhydrylbromid versetzt. Je nachdem ob beide oder nur einer der exozyklischen Stickstoff-Atome alkyliert

werden sollten, wurden 1,0 oder 2,0 Äquivalente des Bromids eingesetzt. Die Ausbeuten waren mit 56 und 57 % zufriedenstellend, wenn man berücksichtigt, dass drei und vierfach Alkylierungen als Nebenreaktionen auftreten könnten. Für die unsymmetrischen Inhibitoren wurde nun der zweite Substituent mittels reduktiver Aminierung eingeführt. Im Anschluss wurden alle vier Verbindungen wie bisher zyklisiert und entschützt. Die gesamte Reaktionssequenz ist in Schema 16 gezeigt.



Schema 16: Syntheseroute zur Darstellung symmetrischer und unsymmetrischer Benzhydryl-substituierter Bicyklen

Tabelle 25 zeigt die verwendeten Reagenzien und Ausbeuten.

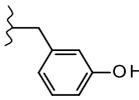
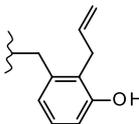
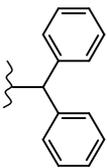
	R2	Schritt A		Schritt B		Schritt C	
		Reagenzien	Ausbeute	Reagenzien	Ausbeute	Reagenzien	Ausbeute
87		Benzaldehyd, Molsieb 4Å, NaBH ₄ , MeOH	83 %	Oxalylchlorid, DIPEA, DCM	36 %	HCl in Et ₂ O, DCM	28 %
88		3-[<i>tert</i> -Butyl- (dimethyl)- silyl]oxybenz- aldehyd, Molsieb 4Å, NaBH ₄ , MeOH	72 %	Oxalylchlorid, DIPEA, DCM	9 %	HCl in Et ₂ O, DCM	63 %
89		2-Allyl-3- [<i>tert</i> -Butyl- (dimethyl)silyl]oxybenz- aldehyd, Molsieb 4Å, NaBH ₄ , MeOH	88 %	Oxalylchlorid, DIPEA, DCM	18 %	HCl in Et ₂ O, DCM	60 %
90		-	-	Oxalylchlorid, DIPEA, DCM	41 %	HCl in Et ₂ O, DCM	52 %

Tabelle 25: Reagenzien und Ausbeuten der letzten drei Stufen zur Darstellung Benzhydryl-substituierter Bicyklen

4.5.3 Testung der Enzymhemmung

Die Verbindungen wurden wie bisher in einem kompetitiven Fluoreszenz-basierten Enzymassay vermessen (Tabelle 26).

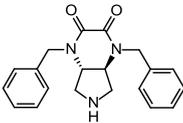
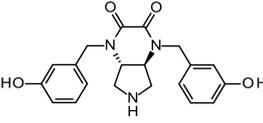
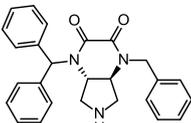
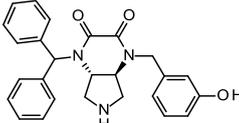
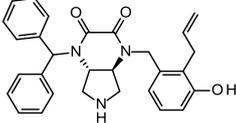
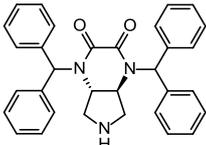
Verbindung	Formel	K_i (μM)	MW (g/mol)	LE (kcal/mol)
Ausgangsverbindungen				
73		35	335	-0,24
78		6,4	367	-0,26
Bicyklische Inhibitoren der zweiten Serie				
87		0,90	412	-0,27
88		0,21	428	-0,29
89		0,024	468	-0,30
90		0,007	488	-0,30

Tabelle 26: Ergebnisse der Affinitätsbestimmung für die Verbindungen 87 bis 90

Die Ergebnisse zeigen, dass mit dem neu entworfenen bicyklischen Grundgerüst und den im zweiten Designzyklus optimierten Substituenten, das Ziel eine Ligandeneffizienz von -0,29 kcal/mol zu erhalten, erreicht (Verbindung 88) oder sogar übertroffen werden konnte (89 und 90).

Die beiden besten Inhibitoren Verbindung 89 und 90 sind ein- und zweistellig nanomolar und haben ein Molekulargewicht von unter 500 g/mol. Damit erfüllen sie die Kriterien für Affinität und Molekulargewicht eines Arzneistoffs. Da sie einen protonierbaren Stickstoff

besitzen, stellte die Löslichkeit der Verbindungen im leicht sauren pH-Bereich unter den Enzymassay-Bedingungen ebenfalls kein Problem dar. Wegen dieser Eigenschaften wurden die Verbindungen 89 und 90 für die Aktivitätsbestimmung in einem Zellassay ausgewählt (siehe Kapitel 4.7).

4.5.4 Kristallstrukturanalyse

Martin Stieler gelang es, von dem aktivsten der Inhibitoren der 2. Serie, Verbindung 90, eine Kristallstruktur zu lösen. [71] Betrachtet man die Anordnung des Grundgerüsts des vierarmigen bicyklischen Inhibitors im Vergleich zu der eines zweiarmigen Inhibitors ergeben sich interessante Unterschiede (Abbildung 89). Da die sowohl die Raumgruppen als auch die Packungen bei beiden Strukturen identisch sind, kann ausgeschlossen werden, dass diese Unterschiede durch die Kristallgeometrie erzwungen werden.

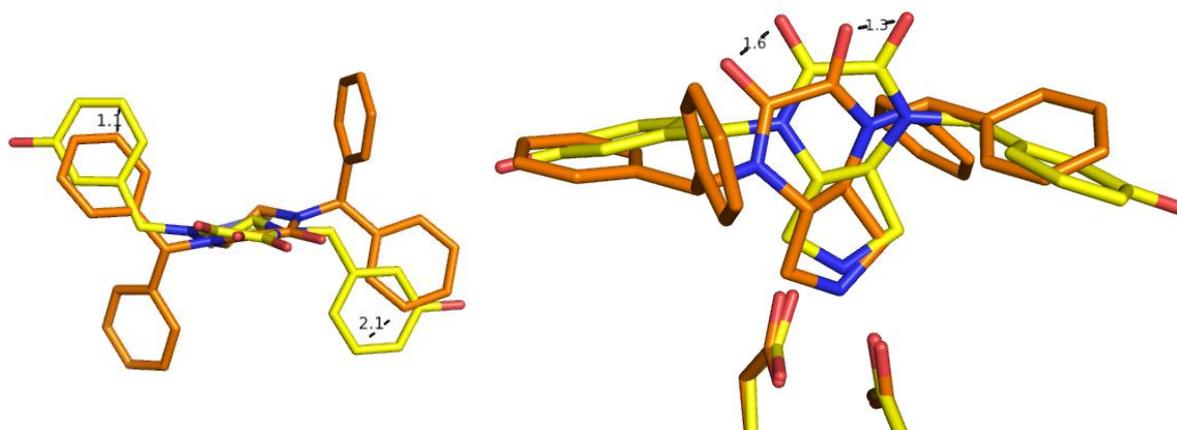


Abbildung 89: In Komplex mit der HIV-Protease beobachteter Bindungsmodus des vierarmigen bicyklischen Inhibitors 90 in Orange, überlagert mit dem eines zweiarmigen bicyklischen Inhibitors 78 in Gelb (PDB-Code 3QN8). Links: Aufsicht. Rechts: Seitenansicht

In der Aufsicht erkennt man, dass der vierarmige Inhibitor um ein bis zwei Å in seiner Position verschoben ist. Gründe dafür werden auf Seite 128 diskutiert. In der Seitenansicht erkennt man, dass das sekundäre Amin sich etwas näher an den katalytischen Aspartaten befindet, vor allem aber sind die Carbonyl-Gruppen um 1,3 bis 1,6 Å verschoben. Auch in der *Flap*-Region zeigen sich interessante Veränderungen. (Abbildung 90).

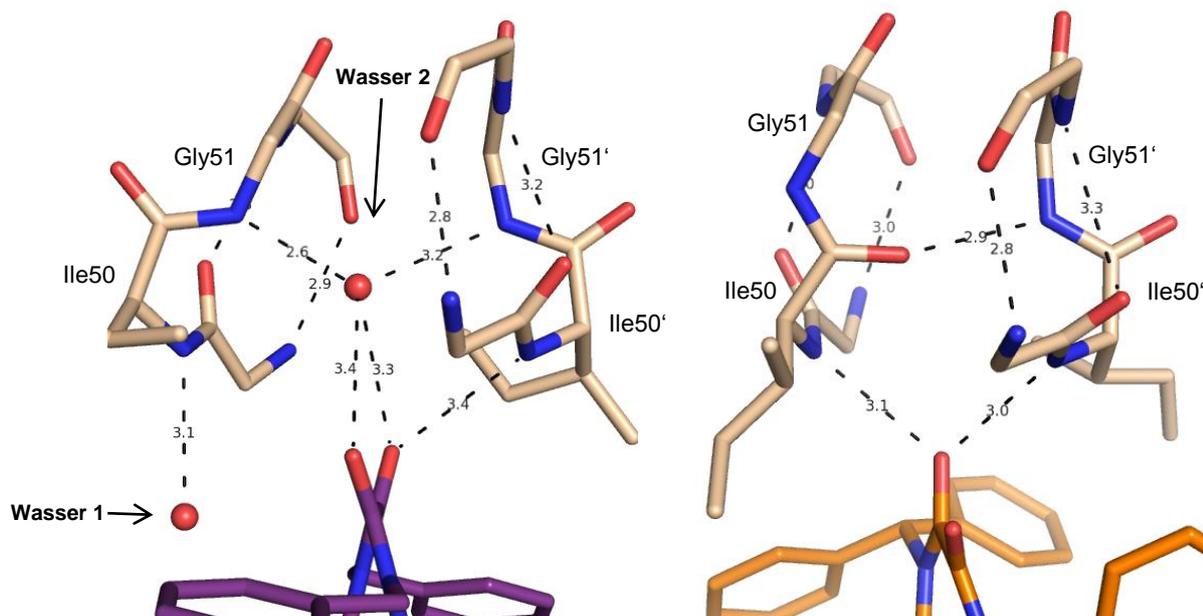


Abbildung 90: Durch Kristallstrukturanalyse beobachtete Flap-Anordnung bei Verbindung 90 (rechts) im Vergleich zu Verbindung 78 (links, PDB-Code 3QN8)

Der vierarmige Inhibitor führt also dazu, dass die HIV-Protease die bei diesem Enzym am häufigsten beobachtete Flap-Konformation einnimmt. Dabei interagieren beide Isoleucine 50 und 50' direkt mit dem Inhibitor ohne dass es zu einer Komplexierung eines Wassermoleküls durch die Glycine 50 und 50' und dem Inhibitor kommt. Der vierarmige Inhibitor verdrängt das Wassermolekül 1 (Abbildung 90, links) und das Isoleucin 50' richtet sich zum Inhibitor hin aus, welcher sich dadurch ebenfalls etwas anders positioniert. Die so veränderte Flap- und Inhibitor-Anordnung führt dazu, dass die Glycine 50 und 50' und der Inhibitor das Wassermolekül 2 nicht mehr komplexieren können. Insgesamt werden somit zwei Wassermoleküle gegenüber der Struktur von Verbindung 78 frei gesetzt, was für diesen Bindungsmodus einen günstigen Beitrag bedeuten könnte. Hinsichtlich der direkten Wechselwirkungen müsste allerdings der Bindungsmodus von Verbindung 78 begünstigt sein, da insgesamt mehr Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet werden und beide Carbonyl-Sauerstoffe des Inhibitors einen Interaktionspartner besitzen. Bei Verbindung 90 bleibt der eine Carbonyl-Sauerstoff des Inhibitors hingegen ohne typische Wasserstoffbrücken-Partner. Er befindet sich jedoch in einem Abstand von 2,3 Å zu dem α -Kohlenstoff-Atom des Glycins 49 (Abbildung 91).

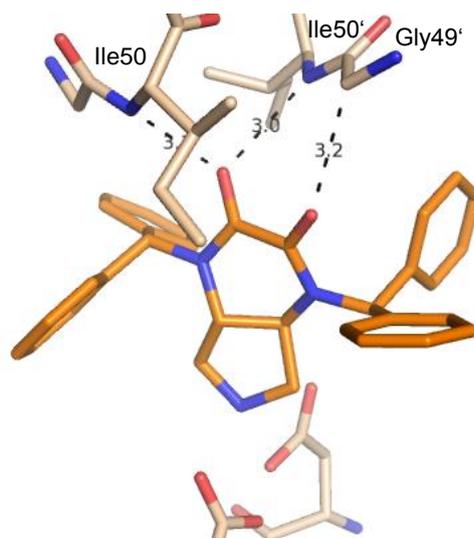


Abbildung 91: Nicht-klassische Wasserstoffbrückenbindung der Verbindung 90 zum α -Kohlenstoff des Glycins 49'

Diese Interaktion stellt eine nicht-klassische Wasserstoffbrückenbindung dar und sollte im Vergleich zu einer konventionellen Wasserstoffbrücke nur einen verhältnismäßig kleinen Beitrag zu Bindungsaffinität leisten. [88]

4.6 Eliminierung einer der beiden Carbonyl-Funktion

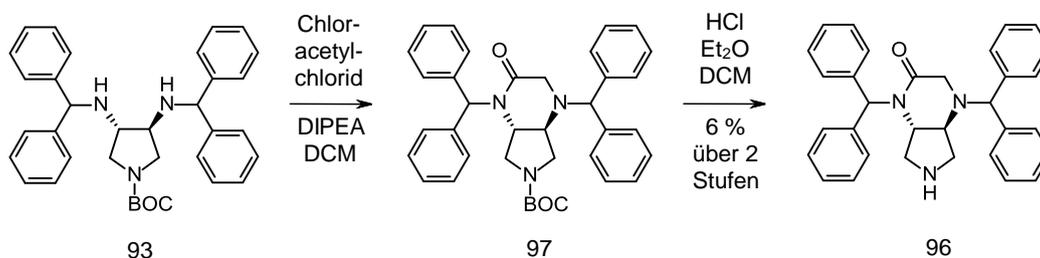
4.6.1 Design

Auf Grund der Beobachtung, dass bei dem aktivsten Inhibitor, Verbindung 90, der Bindungsmodus gegenüber den Vorgängern (Verbindung 77 und 78) verändert ist und eine der beiden Carbonyl-Gruppen dadurch keine starke Wechselwirkung zur *Flap* mehr eingeht, erschien es aussichtsreich, diese Gruppe zu entfernen. Da frühere Versuche anstelle des Oxalsäureamids ein Harnstoff-Derivat darzustellen erfolglos geblieben waren (vergleiche Kapitel 4.2), sollte nun versucht werden, ein Glycin-Derivat zu synthetisieren, in dem der Carbonyl-Sauerstoff, welcher keine klassische Wasserstoffbrücke zum Protein eingeht, nicht mehr vorhanden ist. Dadurch wird aus einem der, bei den Oxalsäureamid-Bizyklen vorhandenen, Amid-Stickstoffen ein tertiäres Amin, welches protonierbar ist. Dies hat zwar den Nachteil einer erhöhten Desolvationsenergie, führt dafür aber zu einem geringeren Molekulargewicht. Letztendlich war es beim Entwurf des Glycin-verbrückten Bizyklus das Ziel, die Affinität beizubehalten und gleichzeitig das Molekulargewicht zu verringern, um eine weitere Verbesserung der Ligandeneffizienz zu erreichen.

Beim Docking der Verbindung 96 in die Röntgenstruktur von Verbindung 90 verbessert sich der Score gegenüber Verbindung 90 nicht, vermutlich, da beide Verbindungen die Gleiche

4.6.2 Synthese

Die Synthese wurde analog der Synthese von Verbindung 90 (Abschnitt 4.5.2) durchgeführt. Anstelle von Oxalylchlorid wurde allerdings Chloracetylchlorid verwendet. Die Ausbeuten der letzten beiden Stufen der insgesamt neun-stufigen Route wurden nicht optimiert.



Schema 17: Syntheseroute zur Darstellung der Verbindung 96

4.6.3 Testung der Enzymhemmung

Die Ergebnisse der Affinitätsbestimmung gegenüber der HIV-Protease sind in Tabelle 28 gezeigt.

Name	Formel	K_i (μM)	MW (g/mol)	LE (kcal/mol)
Ausgangsverbindung				
90		0,007	488	-0,30
Eliminierung des Carbonyl-Sauerstoffs				
96		0,16	474	-0,26

Tabelle 28: Ergebnisse der Affinitätsbestimmung für die Verbindung 96

Leider führte die Eliminierung des einen Carbonyl-Sauerstoffs, trotz nur schwacher Interaktion dieser Gruppe mit dem Enzym, zu einer starken Verschlechterung des Hemmwerts um den Faktor 23. Die Hauptursachen liegen vermutlich in der bereits angesprochenen erhöhten Desolvatationsenergie durch den zweiten basischen Stickstoff und dem Wegfall der nicht-klassischen Wasserstoffbrückenbindung. Ein zusätzlicher Faktor, der zu der Abnahme an Affinität beitragen könnte, ist die veränderte Hybridisierung des modifizierten Kohlenstoff-

Atoms und damit eine veränderte Geometrie des Glycin-verbrückten Bicyklus. Das könnte zu einer verschlechterten Passform des Inhibitors führen. Eine Röntgenstruktur sollte helfen diese Frage zu klären.

4.6.4 Kristallstrukturanalyse

Dr. Holger Steuber gelang es durch Austauschsoaking mit Co-Kristallen eines schwach affinen Peptids und der HIV-Protease eine Kristallstruktur der Verbindung 96 zu lösen. Auch hier befinden sich beide Monomere in der assymetrischen Einheit. Wie man in der Überlagerung mit der Struktur von Verbindung 90 erkennt, bleibt der Bindungsmodus erhalten, sodass eine verschlechterte Passform nicht die Ursache für den Affinitätsverlust darstellt. Auch das Protein zeigt keine Veränderung in der *Flap*-Region gegenüber der Struktur von Verbindung 90.

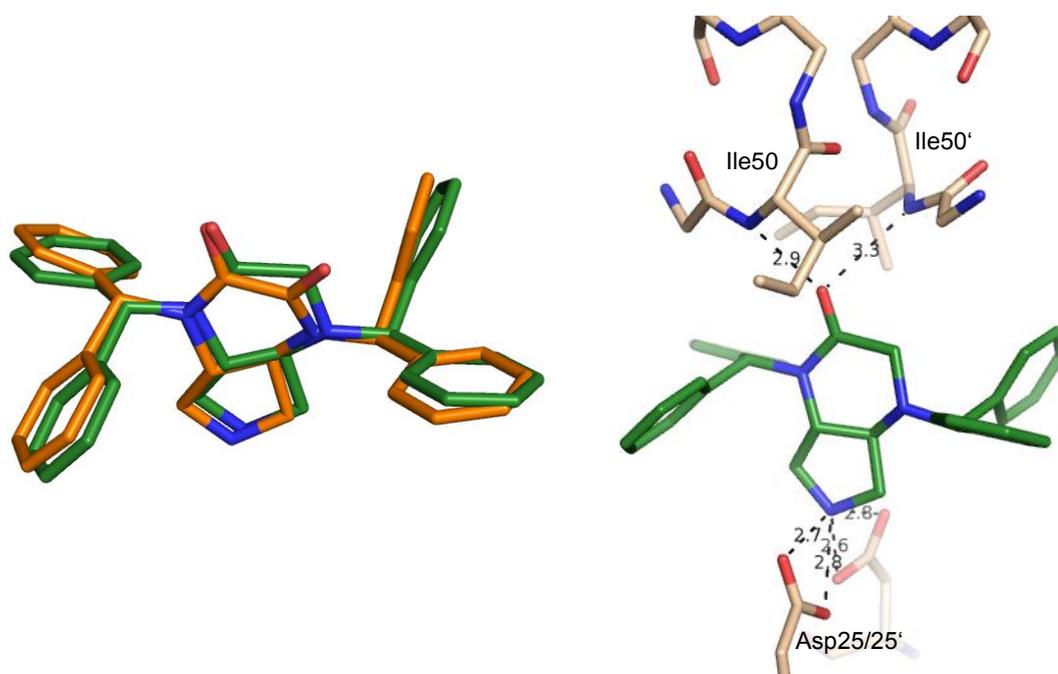


Abbildung 93: In Komplex mit der HIV-Protease beobachteter Bindungsmodus des Glycin-verbrückten Bicyklus 96 in Grün. Links: Überlagert mit Verbindung 90 in Orange. Rechts: Wechselwirkungen mit der katalytischen Diade und der Flap.

Es ist bemerkenswert, dass der starke Affinitätsverlust um einen Faktor von 23 allein durch den Unterschied der Desolvationsenthalpie eines tertiären Amins zu dem Amid und der vergleichsweise schwachen, nicht-konventionellen $C_{\alpha}H^{\cdots}O=C$ Bindung verursacht zu werden scheint. Unabhängig von den Einzelbeiträgen zur Bindungsenergie, kann aus den Ergebnissen geschlossen werden, dass obwohl nur eine der beiden Carbonyl-Gruppen in directionale Wasserstoffbrückenbindungen involviert ist, beide Carbonyl-Gruppen der Oxalsäureamid-Bicyklen für die Bindungsaffinität nicht abträglich sind.

4.7 Zellassay

4.7.1 Bestimmung der Zellaktivität

Analog zu den dreiarmigen Verbindungen wurden die interessantesten Bicyklen zur Zellaktivitätsmessung ausgewählt und von Abbas Raza untersucht. Die Ergebnisse finden sich in Tabelle 29.

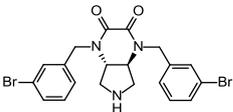
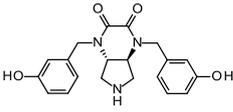
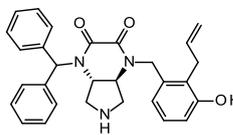
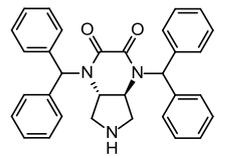
Name	Formel	K_i [μM] HIV-Protease (Enzymaffinität)	% Inhibition von HIV bei 10 μM (Zellaktivität)	% überlebende Zellen bei 10 μM (Toxizität)
77		7,3	2	100
78		6,4	2	98
89		0,024	0	92
90		0,007	0	66

Tabelle 29: Ergebnisse des HIV-Zellassays für die Verbindungen 77, 78, 89 und 90

Leider zeigen alle getesteten Bicyklen, trotz ihrer zum Teil hohen Affinität zur HIV-Protease, praktisch keine Zellaktivität. Das könnte an einer mangelnden Membrangängigkeit liegen. Um den bicyklischen Inhibitoren eine Membranpassage zu ermöglichen, sollte in einem Prodrug-Ansatz der positiv geladene Pyrrolidin-Stickstoff maskiert werden.

4.7.2 Carbamat-Prodrugs

Um ein ungeladenes Molekül zu generieren, aber auch die Spaltung zum aktiven Inhibitor innerhalb der Zelle zu ermöglichen, wurde das sekundäre Amin in ein Methyl- und ein Ethylcarbamat überführt. Die Carbamate könnten durch zelleigene Esterasen gespalten werden, wodurch das freie Amin im Zellinneren freigesetzt würde. Ein Beispiel für einen Stoff der zur Zellpenetration verestert wurde und innerhalb der Zelle durch Esterasen zum freien Alkohol wird, ist DAF-2 DA, ein Fluoreszenz-Marker für Stickstoffmonoxid. [89] In unserem Fall sollte durch Esterasen zunächst die Carbaminsäure entstehen, welche dann spontan zum freien Amin zerfallen sollte. Im Organismus würde diese Reaktion mit der Spaltung durch Plasma-Esterasen konkurrieren. Abbildung 94 zeigt die zwei genannten Möglichkeiten zur Freisetzung der freien Base 90 aus dem Prodrug.

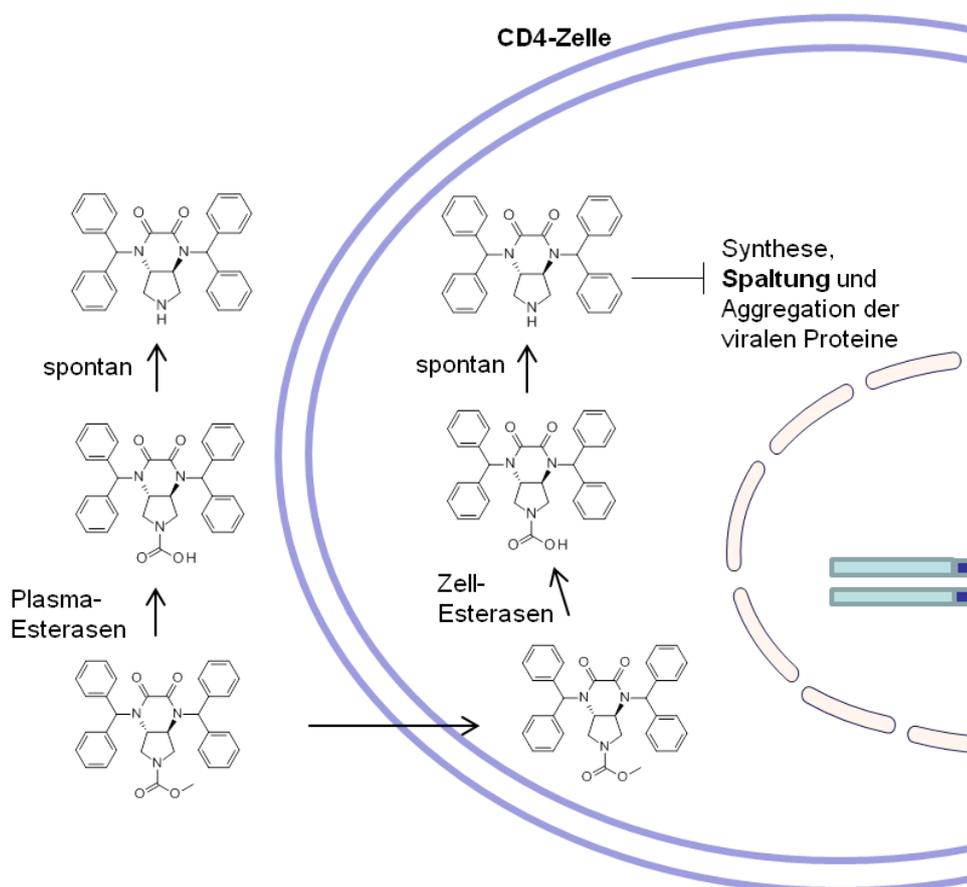
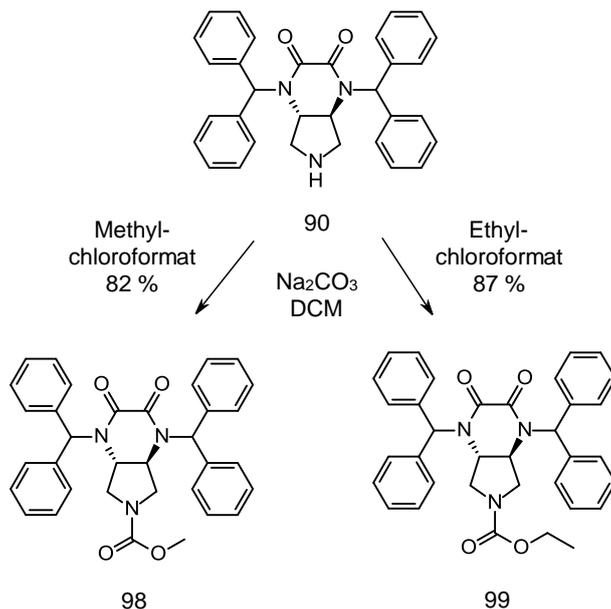


Abbildung 94: Möglichkeiten zur Freisetzung der freien Base 90 aus einem Carbamat-Prodrug

4.7.2.1 Synthese

Für die Synthese der Prodrugs war lediglich ein Schritt ausgehend von Verbindung 90 notwendig. Diese wurde mit Chlorameisensäuremethylester sowie dem entsprechenden

Ethylester in DCM mit Natriumcarbonat als Base umgesetzt und die Carbamate in guten Ausbeuten von 82 und 87 % erhalten (Schema 18).



Schema 18: Syntheseroute zur Darstellung von Verbindung 98 und 99

4.7.2.2 Bestimmung der Zellaktivität der Carbamat-Prodrugs

Die Ergebnisse der Zellaktivitätsbestimmung durch Abbas Raza sowie die Enzymaktivität der Prodrugs sind in folgender Tabelle gezeigt.

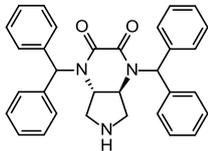
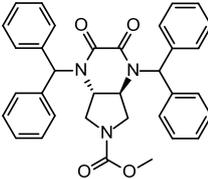
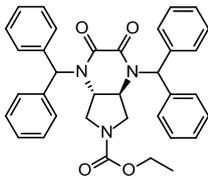
Name	Formel	K _i [μM] HIV-Protease (Enzymaffinität)	% Inhibition von HIV bei 10 μM (Zellaktivität)	% überlebende Zellen bei 10 μM (Toxizität)
Ausgangsverbindung				
90		0,007	0	66
Prodrugs				
98		Keine Affinität	42	98
99		Keine Affinität	35	94

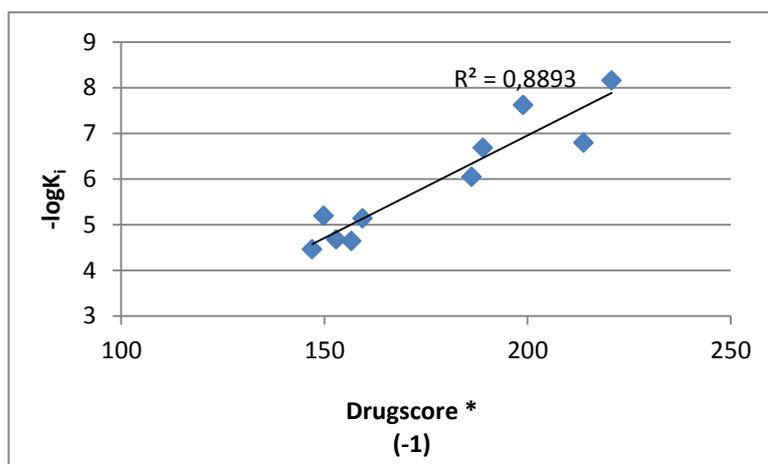
Tabelle 30: Ergebnisse des Enzymassays und des HIV-Zellassays für die Verbindungen 98 und 99

Sowohl für das Methyl- als auch für das Ethyl-Derivat ergibt sich eine bessere Zellaktivität als für das analoge freie Amin. Das Prodrug 98 stellt die Verbindung dieser Arbeit dar, welche im Zellassay die besten Ergebnisse zeigte. Im Vergleich mit der Enzymaffinität der freien Base (Verbindung 90) ist die Zellaktivität der Verbindung 98 jedoch relativ gering. Das könnte daran liegen, dass die Prodrugs durch den Verlust des protonierbaren Stickstoffs eine schlechtere Wasserlöslichkeit besitzen. Ein weiterer Grund könnte sein, dass nur ein Teil des Prodrugs zum aktiven Inhibitor gespalten wird. Letzteres passt zu der Beobachtung, dass das leichter zu spaltende Methylcarbamat-Prodrug eine bessere Zellaktivität aufweist als das Ethylcarbamate-Prodrug. Außerdem können natürlich auch die Prodrugs noch eine eingeschränkte Membran-Gängigkeit besitzen.

4.8 Zusammenfassung und Ausblick: Bizyklische Inhibitoren der HIV-Protease

In dieser Arbeit wurde ein Pyrrolidin-basierter Oxalsäureamid-Bizyklus als neuartiges und sehr effizientes Grundgerüst für HIV-Protease-Inhibitoren entworfen. Passende Substituenten für dieses Grundgerüst wurden durch Docking-Experimente ausgewählt, die resultierenden bizyklischen Inhibitoren dargestellt und auf ihre Enzymaffinität hin untersucht. Dabei wurden vier Verbindungen (88, 89, 90 und 96) im unteren nanomolaren Bereich und einem Molekulargewicht zwischen 428 und 488 g/mol identifiziert. Die Verbindungen 88 bis 90 erreichen oder übertreffen dabei den Zielwert der Ligandeneffizienz von -0,29 kcal/mol.

Für die bizyklischen Inhibitoren erwiesen sich die Ergebnisse aus Docking, Minimierung und Scoring als sehr zuverlässig, obwohl die Flexibilität der *Flap*-Region nicht berücksichtigt werden konnte. Folgende Grafik zeigt die Zuverlässigkeit der Methode anhand der Drug-score-Ergebnisse nach Docking mit FlexX in die Struktur von Verbindung 90 und Minimierung mit MiniMuDS aufgetragen gegen den negativen dekadischen Logarithmus der K_i -Werte. Das Quadrat des Korrelations-Koeffizienten beträgt hier 0,89, was für die Bewertung von Dockinglösungen ein gutes Ergebnis darstellt.



Grafik 3: Der Drugscore (*-1) der minimierten Dockinglösungen, aufgetragen gegen $-\log K_i$ der bizyklischen Inhibitoren

Leider erwiesen sich die im Zellassay untersuchten bizyklischen Inhibitoren als nicht protektiv, vermutlich, da sie die Zellmembran nicht passieren können. Deshalb wurde ein Prodrug-Ansatz verfolgt, in dem ein Methyl- und ein Ethyl-Carbamat der Verbindung 90 dargestellt wurde. Wie erhofft verbesserte sich die Zellaktivität auf eine Prozent-Inhibition von 42 % bei 10 μ M für das Methylcarbamat-Derivat. Dieses Ergebnis zeigt, dass es grundsätzlich möglich ist, zellgängige bizyklische Pyrrolidine darzustellen und lässt hoffen, dass durch

weitere Optimierung auch eine Zellaktivität im unteren nanomolaren Bereich zu erreichen ist. Genau hier ergeben sich auch Ansätze für weitere Forschungsarbeiten.

Es bleibt aufzuklären, warum die Carbamat-Prodrugs eine im Vergleich zur Enzymaffinität schwache Zellprotektion zeigen. Hierfür sollte in Zukunft die Löslichkeit der Verbindungen, ihre Membran-Gängigkeit und die Geschwindigkeit der Freisetzung der freien Base innerhalb der Zelle ermittelt werden. Je nachdem, welche Ergebnisse sich hier ergeben, resultieren verschiedene Vorgehensweisen für die chemische Modifikation der Inhibitoren.

Bevor die Verbindungen in die Zelle eindringen können, müssen sie gelöst vorliegen, was vor allem für die ungeladenen Carbamat-Prodrugs eine Herausforderung darstellt. Zur Verbesserung der Löslichkeit können polare Gruppen eingeführt werden. Es bietet sich zum Erhalt der Enzymaffinität an, eine der Benzhydryl-Gruppen beizubehalten und auf der anderen Seite polare Gruppen einzuführen, welche Wasserstoffbrückenbindungen in der S2-Tasche des Enzyms ausbilden. Unter Berücksichtigung der Löslichkeit der entsprechenden Carbamat-Prodrugs, welche zum Beispiel mit MOE berechnet werden könnte und der Enzymaffinität der freien Base, welche durch *Docking* und *Scoring* abgeschätzt werden könnte, sollten in Zukunft neue Substituenten ausgewählt werden. Die dargestellten Inhibitoren und deren Prodrugs müssten anschließend auf ihre Löslichkeit hin untersucht werden.

Für eine gute Zellaktivität müssen die gelösten Verbindungen nun die Zellmembran möglichst vollständig passieren. Es ist aktuell unklar, welcher Mechanismus der Membranpassage für die Carbamat-Prodrugs vorherrscht. Auf der einen Seite lässt der Erfolg des Prodrug-Ansatzes, bei dem aus einem geladenen Molekül eine ungeladene und lipophilere Verbindung entsteht, auf einen passiven Membrantransport schließen. In der Vergangenheit konnte zum Beispiel für die Flourchinolone ein solcher, vorwiegend passiver, Membrantransport nachgewiesen werden. [90]

Auf der anderen Seite ist die Bedeutung dieses Transportwegs für die Mehrheit der Arzneistoffe umstritten. So erläutern Kell et al. in einem Übersichtartikel, warum der passive, nicht Transporter vermittelte Weg in die Zelle vermutlich nur eine untergeordnete Rolle bei der Aufnahme von Arzneistoffen spielt und die meisten Verbindungen über noch unbekannte Transporter in die Zelle gelangen. [91] Auch die in dieser Arbeit gemachte Beobachtung, dass die wesentlich polarereren dreiarmigen Inhibitoren eine Zellaktivität zeigen, nicht aber die unpolarereren und im Enzymassay potentereren freien Bicyklen, könnte zumindest bei den dreiarmigen Pyrrolidinen, für eine Transporter-vermittelte Membranpassage sprechen.

Aus diesem Grund sollten für die Verbesserung der Membrangängigkeit parallel verschiedene Ansätze verfolgt werden. Eine gezielte Optimierung der physikochemischen Eigenschaften, wie eine Erhöhung des logP, würde bei einem passiven Transport die Aufnahme in die Zelle

steigern, wobei die Löslichkeit der Verbindungen ebenfalls beachtet werden muss. Falls unbekannte Transporter die Hauptrolle bei der Aufnahme der Pyrrolidine spielen, ist eine gezielte Optimierung auf Grund der unbekanntenen Struktur der Transporter nicht möglich und es müssten durch die Testung der Membrangängigkeit von möglichst diversen Abwandlungen der Inhibitoren, bevorzugt transportierte Strukturelement ermittelt werden. In jedem Fall wäre es notwendig, für alle potenten Inhibitoren sowie für die entsprechenden Prodrugs, die Membranpermeabilität zu untersuchen.

Sollten sich die Carbamat-Prodrugs als zu stabil erweisen, können andere Prodrug-Ansätze verfolgt werden. Ein Beispiel für labilere Prodrugs wären gemischte Carboxylat-Carbamat-Anhydride. Diese können metallkatalysiert unter Verwendung von Kohlendioxid und dem entsprechenden Säurechlorid dargestellt werden. [92] Allerdings besteht hier die Gefahr einer zu geringen Plasmastabilität, weshalb diese ebenfalls bestimmt und die Stabilität der Anhydride durch Veränderung des eingesetzten Säurechlorids gesteuert werden sollte. Als Beispiel ist das Carboxylat-Carbamat-Anhydrid der Verbindung 90 in Abbildung 95 gezeigt. Als Rest sollten zunächst kurze Aliphaten verwendet werden und die Stabilität der Verbindung untersucht werden.

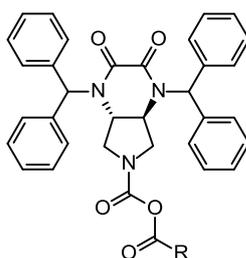


Abbildung 95: Carboxylat-Carbamat-Anhydrid der Verbindung 90

Durch möglichst diverse Modifikation der Substituenten im Hinblick auf die Löslichkeit und die Membrangängigkeit, unter Beibehaltung der nanomolaren Enzymaffinität, oder durch weitere Prodrug-Ansätze könnte also die Zellaktivität der bityklischen Inhibitoren in Zukunft weiter verbessert werden.

Ein weiterer wichtiger Aspekt für zukünftige Arbeiten an den hier entwickelten bityklischen Inhibitoren ist die Bestimmung der Affinität gegenüber resistenten Mutanten der HIV-Protease. Wie in Abbildung 18 gezeigt, gibt es eine enorme Vielfalt an Mutationen in der HIV-Protease, welche zu Resistenzen gegen die zugelassenen Arzneistoffe führen. Für eine Weiterentwicklung der Pyrrolidin-basierten Bityklen wäre ein Screening gegen verschiedene Mutanten der HIV-Protease deshalb von höchstem Interesse. Die Pyrrolidin-basierten Bityklen könnten insbesondere gegen die innerhalb der *Flap* mutierten HIV-Protease-Varianten eine

gute Affinität beibehalten, da in den hier beschriebenen Kristallstrukturen bereits drei unterschiedliche Modi, mit der *Flap* zu interagieren beobachtet wurden (Abbildung 103). Das könnte auf eine gute Adaptivität der Inhibitoren für diesen Bereich hindeuten. Im Bereich der *Flap* häufig auftretende und zu Resistenzen gegen die zugelassenen Arzneistoffe führende Mutationen sind: M46L, I47V, I54M, I54V, I50V und G48V. Abbildung 96 zeigt am Beispiel der Mutation I54M, die bei der Resistenz gegen Amprenavir, Darunavir und Saquinavir eine wichtige Rolle spielt, [93, 94] wie die Adaptivität der Bicyklen einen Vorteil für den Affinitätsverlust gegen diese Mutante darstellen könnte. Gezeigt ist links der Bindungsmodus der Verbindung 78 in Komplex mit der HIV-Protease (PDB-Code: 3QN8) überlagert mit der mutierten Aminosäure Methionin 54 aus einer Darunavir Struktur (PDB-Code: 2D1Z). Man erkennt, dass dieser Bindungsmodus für die Mutante I54M nicht möglich wäre, da das Methionin 54 dem Isoleucin 50' zu nahe kommt. Rechts ist die Struktur von Verbindung 78 mit einem Fragmenten in der S1-Tasche, welche der Übersichtlichkeit halber in der Abbildung nicht dargestellt sind, gezeigt (PDB-Code: 3QIH). Auf diese Struktur wird im nächsten Kapitel ausführlich eingegangen. Auch hier wurde mit der mutierten Aminosäure Methionin 54 überlagert. Wie der Abstand dieser Seitenkette zu dem Isoleucin 50' zeigt, hätte bei diesem Bindungsmodus die Mutation I54M vermutlich keine Konsequenzen.

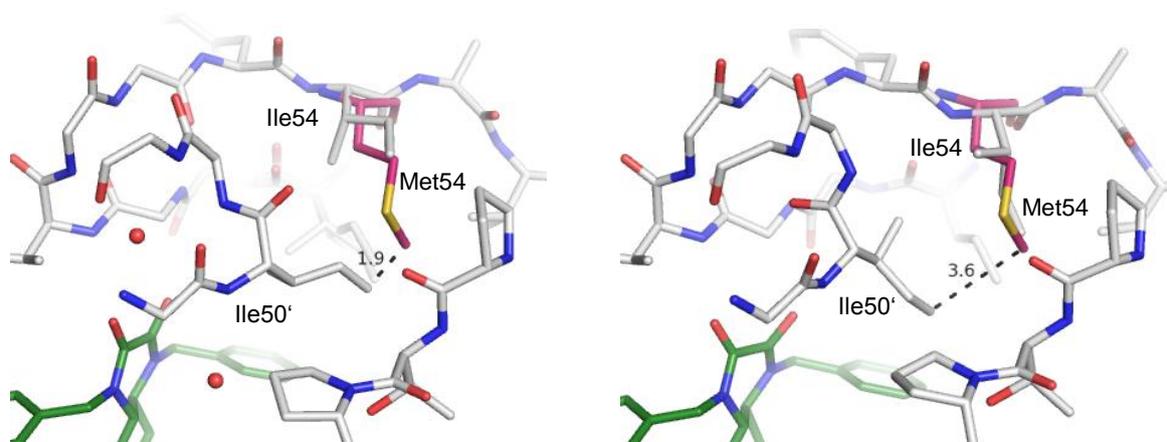


Abbildung 96: Bindungsmodus der Verbindung 78 in Komplex mit der HIV-Protease (PDB-Code: 3QN8, links) und von Verbindung 78 mit den Fragmenten in der S1-Tasche, welche der Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt sind (PDB-Code: 3QIH, rechts), überlagert mit der mutierten Aminosäure Methionin 54 aus einer Darunavir Struktur (PDB-Code: 2D1Z).

Es bleibt offen, wie sich die Änderung im Bindungsmodus, welche den Kristallstrukturen zufolge für Verbindung 78 gut möglich ist, auf die Affinität gegenüber den verschiedenen Mutanten auswirkt und auch, wie sich die unterschiedlichen Substituenten auf die Adaptivität der Bicyklen auswirken. Ob die in dieser Arbeit entwickelten bicyklischen Inhibitoren tatsächlich eine überdurchschnittliche Adaptivität aufweisen und gegen gängige Mutanten der HIV-

Protease aktiv bleiben, kann letztendlich nur durch Experimente mit entsprechend mutierten HIV-Protease-Varianten geklärt werden.

Zusammenfassend lässt sich schließen, dass die Affinitätsbestimmung gegen resistente HIV-Protease-Mutanten und die Verbesserung der Zellaktivität der bicyklischen Inhibitoren die nächsten wichtigen Schritte für weitere Arbeiten an den Pyrrolidin-basierten HIV-Protease-Inhibitoren darstellen.

5 FRAGMENTE IN DER HIV-PROTEASE

5.1 Ausgangspunkt und Idee

Das fragmentbasierte Wirkstoffdesign ist eine zunehmend etablierte Vorgehensweise bei der Suche nach neuen Arzneistoffen. Dabei werden kleine (Molekulargewicht unter 300 g/mol) und in der Regel schwach affine Moleküle zusammen mit ihrem Zielenzym kristallisiert und dann miteinander zu einem hochaffinen Inhibitor verbunden oder sukzessive weiter vergrößert. [95] Dieses Vorgehen würde sich prinzipiell auch für das Design neuer HIV-Protease-Inhibitoren eignen. Leider wurde aber nach unserem Wissen bis heute kein Fragment in der Substrat-Bindetasche der HIV-Protease kristallisiert. Die einzigen bisher kristallisierten Fragmente finden sich in sogenannten Exo-Sites, die außerhalb der Bindetasche liegen und über einen allosterischen Mechanismus für eine Inhibition relevant sein könnten. Bei diesen Fragment-Strukturen findet sich ein bekannter und potenter Inhibitor in der Bindetasche der HIV-Protease. [95, 96]

Das liegt vermutlich daran, dass sich die HIV-Protease, ohne affinen Inhibitor, nicht in der biologisch aktiven Form mit geschlossener *Flap* kristallisieren lässt. Die in dieser Arbeit synthetisierten Inhibitoren lassen eine oder beide der S1-Taschen unbesetzt. Die Idee, diese Gelegenheit für die Kristallisation von Fragmenten in der Bindetasche der HIV-Protease zu nutzen, fußt auf der Beobachtung, dass sich in der Kristallstruktur von Verbindung 1 Dithiandiol (DTD), welches aus den Kristallisationsbedingungen stammt, direkt in der S1'-Tasche findet.

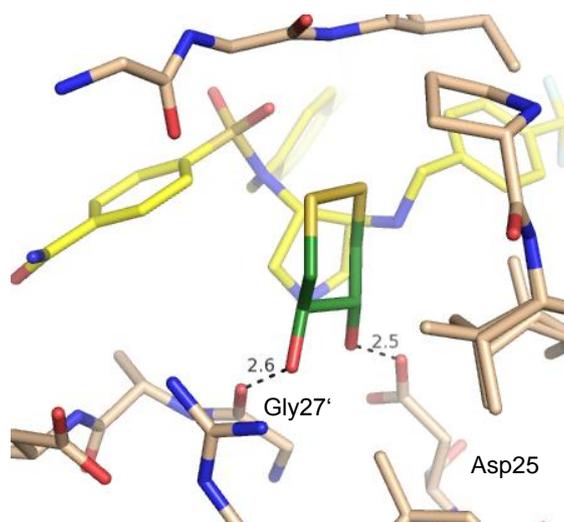


Abbildung 97: Kristallstruktur von Verbindung 1 in Komplex mit der HIV-Protease. DTD (in Grün gezeigt) befindet sich in der S1'-Tasche

Da die zweiarmigen bizyklischen Inhibitoren besonders gut kristallisieren, sollten HIV-Protease-Kristalle mit dem kleinen zweiarmigen Bicyklus, Verbindung 78, mit Fragmenten gesoakt werden. Die Fragmente sollten in den, von dem Inhibitor unbesetzten, S1-Taschen zum Liegen kommen, um dort besonders günstige Interaktionen aufzudecken.

5.2 Dockingexperimente

Zunächst wurden aus einer internen Bibliothek aus 364 Fragmenten, welche von Tobias Craan zusammengestellt wurde [97], die Fragmente ausgewählt, welche ein Molekulargewicht unter 170 g/mol besitzen und somit die Möglichkeit bieten, in die kleine S1-Tasche zu passen. Diese 59 Fragmente wurden dann mit FlexX in die S1-Tasche gedockt, wobei der bizyklische Inhibitor zusammen mit dem Protein als Rezeptor und das Fragment als Ligand behandelt wurde. Es wurde die S1-Tasche ausgewählt, in welcher das Isoleucin 50 keine Wechselwirkung zum Inhibitor sondern lediglich zu einem Wasser eingeht. Für die Wechselwirkung mit diesem Isoleucin wurde ein Pharmakophor gesetzt, da es sinnvoll erschien, dass die Fragmente hier eine Wechselwirkung ausbilden und somit das Wasser verdrängen (siehe Abbildung 98).

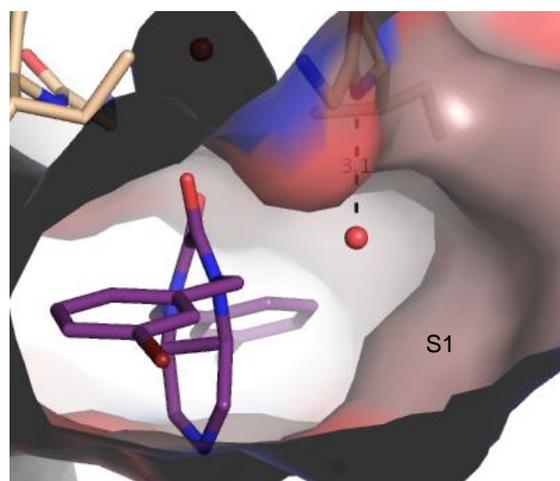


Abbildung 98: Kristallstruktur von Verbindung 78 in Komplex mit der HIV-Protease (PDB-Code 3QN8) mit leerer S1-Tasche und einem zu verdrängenden Wasser-Molekül

Um auch Fragmente zu finden, welche andere gewinnbringende Wechselwirkungen eingehen, wurde das Docking einmal mit und einmal ohne Pharmakophor durchgeführt. Docking-Posen, bei denen das Fragment außerhalb der S1-Tasche zu liegen kam, wurden hingegen nicht berücksichtigt. Die so generierten Dockinglösungen wurden mit MiniMuDS minimiert und mit Drugscore bewertet. Nach visueller Auswertung der minimierten Dockingposen und Berücksichtigung des Drugscores wurden acht vielversprechende Fragmente für die Kristallisation ausgewählt, welche in Abbildung 99 gezeigt sind.

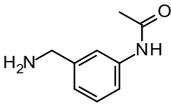
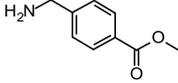
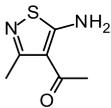
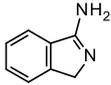
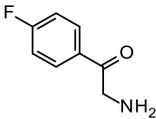
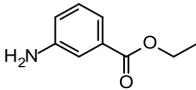
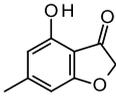
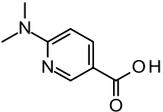
Verbindung		Drugscore
100		-68
101		-59
102		-42
103		-69
104		-63
105		-50
106		-58
107		-55

Abbildung 99: Für Soaking-Experimente ausgewählte Fragmente

Als Beispiel sind in Abbildung 100 die Dockinglösungen der Verbindungen 101, 103 und 105 gezeigt.

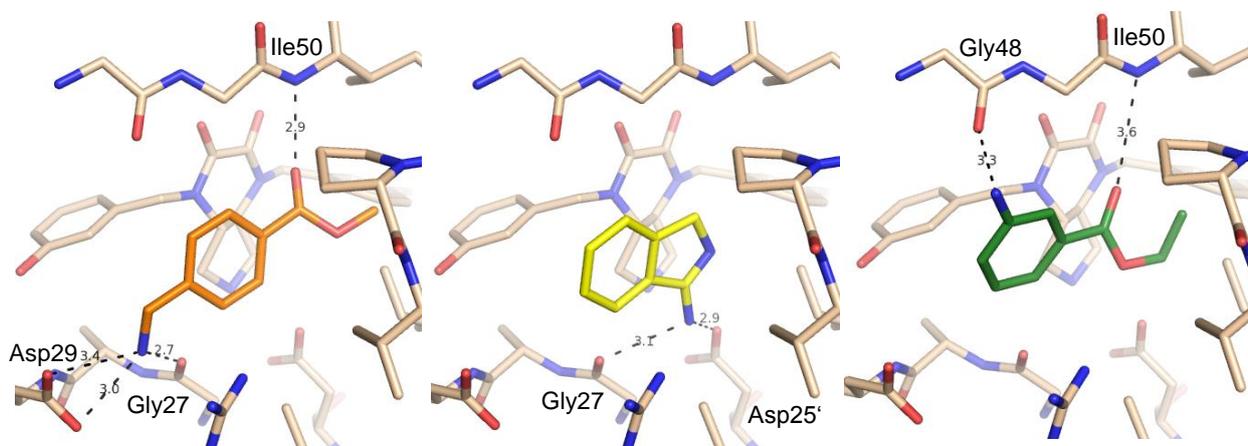
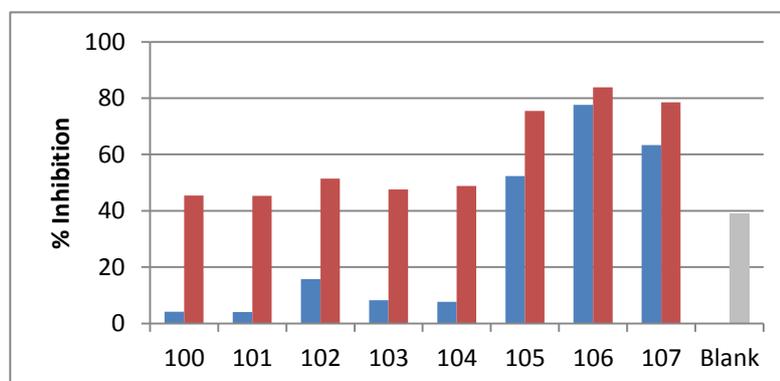


Abbildung 100: Minimierte Dockinglösungen für die Verbindungen 101 (links), 103 (mitte) und 105 (rechts)

Wie die Dockinglösungen zeigen, können die Fragmente, abgesehen von der Wechselwirkung mit dem Rückgrat von Isoleucin 50, noch mit dem Rückgrat von Glycin 27 und 48 sowie mit den Seitenketten der Aspartate 25 und 29 in Interaktion treten.

5.3 Affinitätsbestimmung

Parallel zu den Soaking-Experimenten, welche mit den ausgewählten Fragmenten von Ina Lindemann durchgeführt wurden [70], wurde die Affinität der Fragmente bei 1 mM zur HIV-Protease in einem kompetitiven fluoreszenzbasierten Assay mit und ohne Zusatz von Verbindung 78 gemessen. Verbindung 78 wurde bei einer Konzentration von 10 μM zugesetzt, was in etwa dem IC₅₀ entspricht. Es sollte untersucht werden, ob sich ein mehr als additiver Effekt durch gleichzeitige Bindung der Fragmente und des Inhibitors ergibt.



Grafik 4: %-Inhibition für die Verbindungen 100 bis 107 bei 1 mM in Blau und für die Verbindungen 100 bis 107 bei 1 mM unter Zusatz von Verbindung 78 (10 μM) in Rot

Wie Grafik 4 zeigt, können alle Fragmente für sich die HIV-Protease zumindest schwach bei 1 mM inhibieren. Bei keinem Fragment lässt sich aber ein deutlich mehr als additiver Effekt bei Zusatz von Verbindung 78 erkennen. Die Messwerte könnten entweder bedeuten, dass Fragmente und Inhibitor gleichzeitig an das Enzym binden, der gesamte Enzym-Inhibitor-Komplex dadurch aber nicht mehr als additiv stabilisiert wird, oder dass ein Teil der Protease-Moleküle von Verbindung 78 und eine anderer Teil von dem entsprechenden Fragment inhibiert wird. Für das Platzieren der Fragmente in der S1-Tasche ließen sich hier also keine weiteren Informationen gewinnen. Sehr interessant ist aber die relativ starke Inhibition der HIV-Protease durch das Fragment 106 mit 78 %. Überlegungen und Dockingexperimente zu diesem Fragment sowie Ideen für weitere Arbeiten mit dieser Verbindung finden sich in Abschnitt 5.5.

5.4 Kristallstrukturanalyse

Ina Lindemann gelang es, durch Soaking-Experimente eine Struktur der HIV-Protease im Komplex mit Verbindung 78 und zwei vollständig populierte Molekülen des Fragments, Verbindung 105, zu lösen. [70]

Wie erwartet besetzt das Fragment die S1-Tasche, kommt aber hier anders zum Liegen, als im Docking vorhergesagt wurde. Anstatt mit dem Rückgrat von Isoleucin 50 und dem von Glycin 48 zu interagieren, bilden sich Wasserstoffbrückenbindungen zu der Seitenkette von Aspartat 25', zum Rückgrat von Glycin 27 und zur Seitenkette von Arginin 8 aus, welches in zwei Konformationen mit in etwa gleicher Besetzung vorliegt.

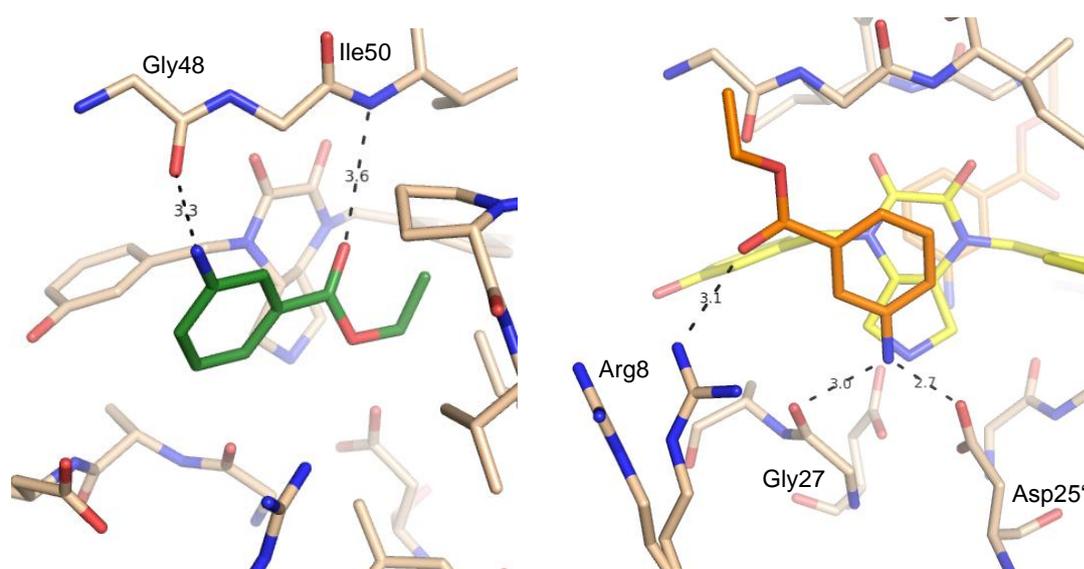


Abbildung 101: Dockinglösung (links) und Kristallstruktur (rechts) des Fragments 105 in Komplex mit Verbindung 78 und der HIV-Protease (PDB-Code: 3QIH)

Die Lage des bicyklischen Inhibitors bleibt durch das Fragment-Soaking praktisch unverändert, wie Abbildung 102 zeigt.

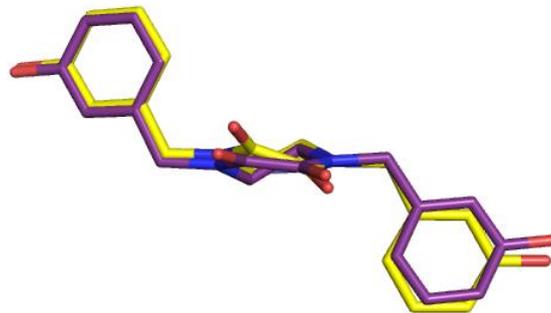


Abbildung 102: Überlagerung der Verbindung 78 aus der Kristallstruktur in Komplex mit der HIV-Protease (PDB-Code: 3QN8, violett) und der Verbindung 78 aus der Kristallstruktur in Komplex mit der HIV-Protease und den Fragmenten (PDB-Code: 3QIH, gelb).

Da nun das Isoleucin 50 nicht mehr mit einem Wasser in Wechselwirkung treten kann und sich auch kein anderer Wechselwirkungspartner an dieser Position findet, verändert sich erneut die Anordnung der *Flap* und eine dritte Möglichkeit, mit der *Flap* zu interagieren, wird sichtbar. Bei dieser Anordnung ist, wie bei den meisten Strukturen der HIV-Protease, das eine Glycin 49 nach innen und das andere nach außen gedreht. Die Isoleuine 50 und 50' drehen sich beide zum Inhibitor hin, wobei jeweils ein Isoleucin 50 mit jeweils einem Carbonyl-Sauerstoff interagiert. Zum Vergleich sind alle drei beobachteten Anordnungen in Abbildung 103 gezeigt. Alle drei dargestellten Strukturen zeigen die gleiche Raumgruppe sowie die gleiche Packung und enthalten das gesamte Dimer in der asymmetrischen Einheit, sodass die Kristallsymmetrie als Ursache für die verschiedenen Anordnungen der *Flap* ausgeschlossen werden kann.

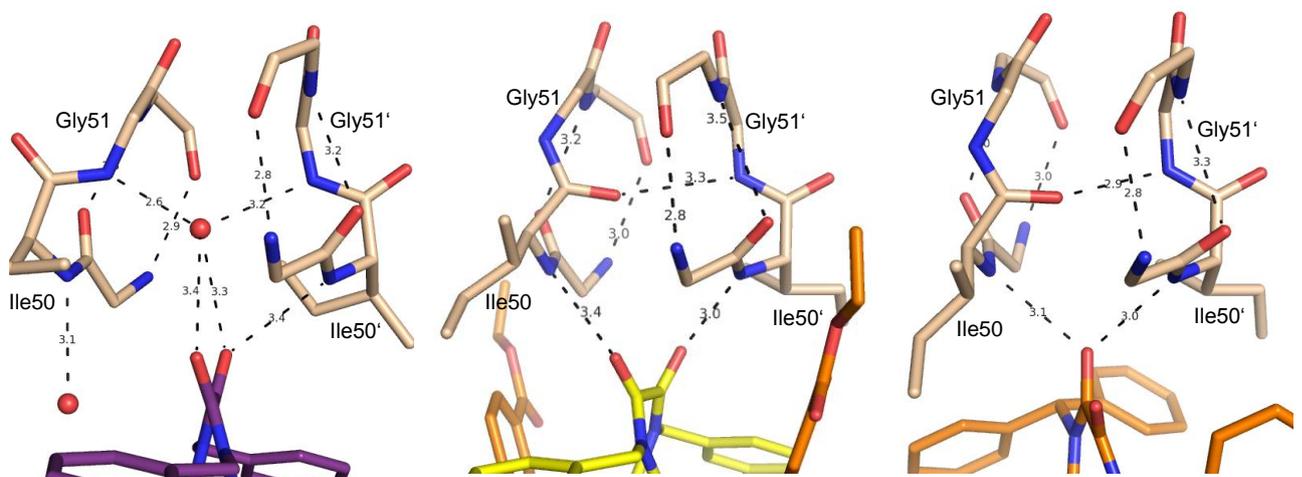


Abbildung 103: Durch Kristallstrukturanalyse beobachtete Flap-Anordnung bei Verbindung 78 (links, PDB-Code: 3QN8), Verbindung 78 mit 105 (mitte, PDB-Code: 3QIH) und Verbindung 90 (rechts)

Das Fragment 105 sowie das DTD kommen in der S1-Tasche etwa an derselben Stelle zum Liegen, in der sich bei Verbindung 90 der zweite Aromat befindet. An dieser Position sind aromatische und lipophile Gruppen vermutlich bevorzugt. Eine Position an der bevorzugt bestimmte Gruppen zum Liegen kommen, nennt man Hotspot (Abbildung 104).

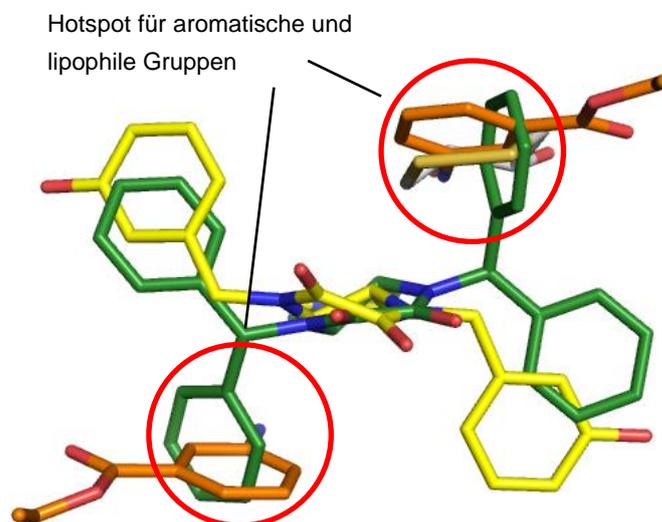


Abbildung 104: Überlagerung der Kristallstrukturen von Verbindung 78 in Gelb) und Verbindung 105 in Orange (PDB-Code: 3QIH), DTD (in Grau, PDB-Code: 3QRO) und Verbindung 90 (in Grün). Der Übersicht halber ist der Inhibitor der DTD-Struktur nicht dargestellt.

Die experimentelle Beobachtung für günstige aromatische und lipophile Wechselwirkungen innerhalb der S1-Tasche wurde durch eine computergestützte Hotspot-Analyse mit dem Programm GRID 1.2.2 [98] bestätigt. Unter Verwendung einer Sonde für aromatische Wechselwirkungen konnte gezeigt werden, dass sich vor allem dort günstige Bereiche für aromatische Interaktionen finden, wo das Fragment zum Liegen kommt. Die hydrophobe Sonde ergibt ein ähnliches Bild. Um diese bevorzugte Position besetzen zu können, muss sich Verbindung 90 gegenüber Verbindung 78 etwas drehen, was den leicht veränderten Bindungsmodus, für den es zunächst keinen ersichtlichen Grund zu geben schien, plausibel erklärt.

In Abbildung 105 sind die ermittelten aromatischen Hotspots als blaue Konturkarten gezeigt.

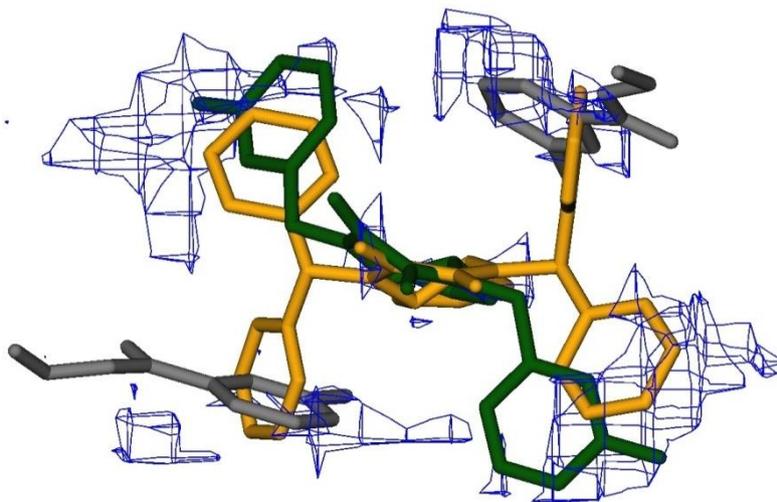


Abbildung 105: Hotspotanalyse für Aromaten mit dem Programm GRID 1.2.2 generiert. Hotspots sind als blaue Konturkarten gezeigt und mit den Kristallstrukturen von Verbindung 78, 105 (in Grün und Grau, PDB-Code: 3QIH) und Verbindung 90 (in Orange) überlagert.

5.5 Fragment 106

Zwar gelang es nicht das Fragment 106, welches im Docking durch eine gute Passform für die S1-Tasche auffiel, in diese Tasche zu soaken, jedoch zeigte das Fragment eine vergleichsweise hohe Prozent-Inhibition von 78 % bei 1 mM im Enzymassay. Da die Struktur dem Grundgerüst von Tipranavir ähnelt, erschien es wahrscheinlich, dass dieses Fragment nicht nur sinnvolle Wechselwirkungen in der S1-Tasche, sondern auch mit der katalytischen Diade ausbilden kann.

Besonders deutlich wird diese Ähnlichkeit, betrachtet man den exakt gleichen Abstand zwischen dem Akzeptor-Sauerstoff und der Hydroxy-Gruppe der beiden Verbindungen.

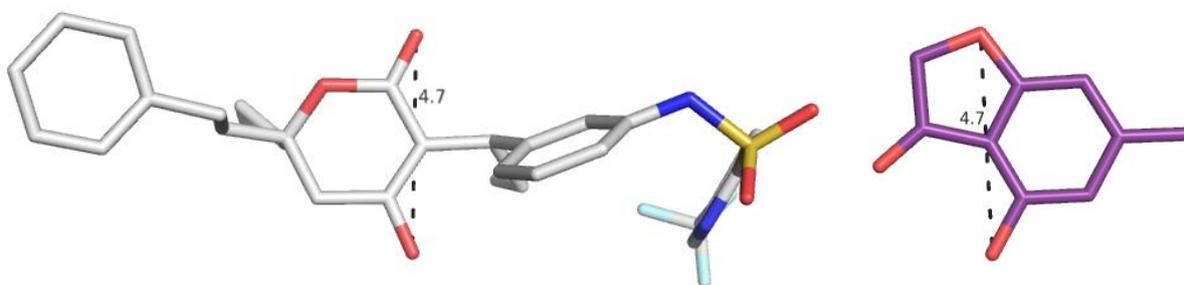


Abbildung 106: Vergleich des Abstands zwischen dem Akzeptor-Sauerstoff und der Hydroxy-Gruppe von Tipranavir (links, PDB-Code: 1D4Y) und Verbindung 106 (rechts)

Um diese Vermutung zu prüfen, wurde die Verbindung 106 in die leere HIV-Protease-Bindetasche der Tipranavir Struktur ohne Verwendung eines Pharmakophors gedockt. Die

Ergebnisse zeigen, dass eine sinnvolle Wechselwirkung sowohl mit den katalytischen Asparataten als auch mit der *Flap* möglich ist. In Abbildung 111 ist die am besten bewertete Lösung gezeigt. Es sei erwähnt, dass sich unter den besten 10 Lösungen auch solche finden, bei denen das Ringsystem um 180° gedreht vorliegt. Zusätzlich unterliegt die Carbonyl-Gruppe am Furan einer Keto-Enol-Tautomerie. Die Dockinglösungen der Enol-Form werden jedoch leicht schlechter bewertet und ähneln jenen der Keto-Form, weshalb sie hier nicht extra gezeigt sind.

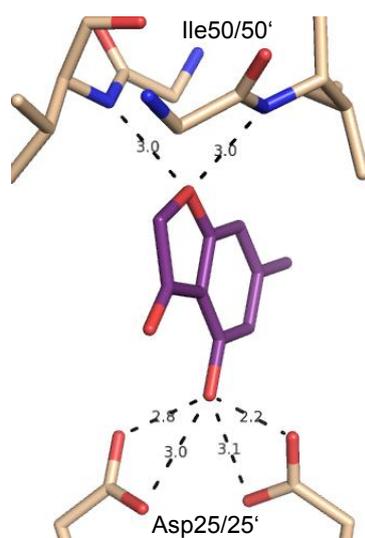


Abbildung 107: FlexX Dockinglösung für die Verbindung 106

Leider konnte bisher keine Struktur dieses Fragments mit der HIV-Protease Co-kristallisiert werden. Sollte dies noch gelingen, könnte erstmals mittels Fragment-basierten Wirkstoffdesigns, Inhibitoren mit Verbindung 106 als neuem Grundgerüst für HIV-Protease entwickelt werden.

5.6 Zusammenfassung und Ausblick: Fragmente in der HIV-Protease

In diesem Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, Fragmente in die Bindetasche der HIV-Protease zu Soaken, wenn zuvor Co-Kristalle mit einem potenten Inhibitor, welcher einen Teil der Bindetasche unbesetzt lässt, generiert wurden. Beobachtet wurde dies zuerst zufällig durch die Anwesenheit von DTD in der S1-Bindetasche eines dreiarmligen Inhibitors und konnte dann durch gezielte Soaking-Experimente mit dem Fragment 105 in die S1-Bindetaschen eines zweiarmligen bicyklischen Inhibitors erfolgreich übertragen werden. Somit ist es nach unserem Wissen erstmalig gelungen, ein Fragment in die Substrat-Bindetasche der HIV-Protease zu soaken. Das Fragment 105 mit dem in dieser Arbeit dargestellten bicyklischen Grundgerüst zu verbinden, um zu höchstwahrscheinlich affineren Inhibitoren zu gelangen, ist synthetisch sehr schwierig. Fragment-Verknüpfung (Englisch *fragment linking*)

ist im Allgemeinen eine große Herausforderung, da beim Verbinden die räumliche Lage der Fragmente nicht verändert werden darf.

Wie Abbildung 106 zeigt, kann der planare Aromat des Fragments in der S1-Tasche nicht über den bereits verwendeten Anknüpfungspunkt 1 (Abbildung 101) mit dem zweiarmigen Bicyklus in der S2-Tasche verbunden werden, da die Verknüpfungslinie (rot) fast orthogonal zum Aromaten des Fragments steht. Die notwendige Drehung des Aromaten um etwa 90° bei einer solchen Verknüpfung, würde einen Verlust der in Abbildung 101 gezeigten Wechselwirkungen mit sich bringen.

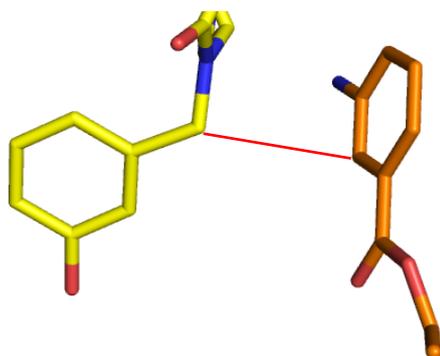


Abbildung 108: Das Fragment kann nicht auf diese Art mit dem bicyclischen Inhibitor verknüpft werden.

Eine chemisch sinnvolle Verknüpfung ergibt sich von dem Aromaten des Bicyklus in der S2-Tasche aus zu dem Fragment in der S1'-Tasche (Abbildung 107). Sowohl der mit einem Fragment verknüpfte Bicyklus als auch der mit beiden Fragmenten verbundene Bicyklus wurde mit dem Programm FlexX in die HIV-Protease eingepasst, mit MiniMuDS minimiert und mit Drugscore bewertet.

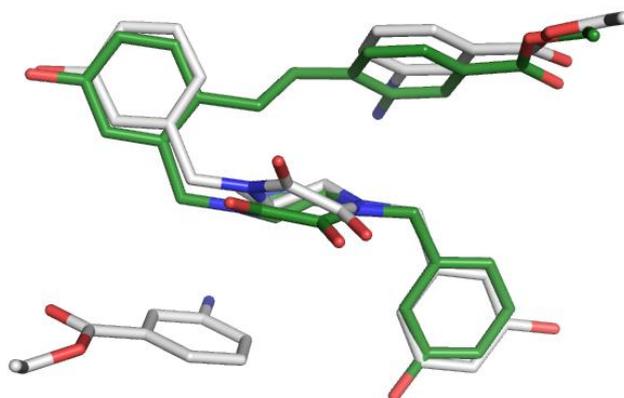


Abbildung 109: Minimierter Dockinglösung für den mit einem Fragment verknüpften bicyclischen Inhibitor in Grün. Die Kristallstruktur ist in Grau überlagert (PDB-Code: 3QIH).

Drugscore bewertet den mit einem Fragment verknüpften Bicyklus mit einem Score von -212,4 sehr gut, obwohl der Linker dem bicyklischen Grundgerüst recht nahe kommt und der Ligand zusätzliche freidrehbare Bindungen aufweist. Beide Fragmente können den Dockingexperimenten zufolge nicht gewinnbringend mit dem Bicyklus verknüpft werden. Die Darstellung des für die Synthese benötigten, nicht kommerziell erhältlichen Aldehyds (Abbildung 108) erfordert eine mehrstufige Syntheseroute.

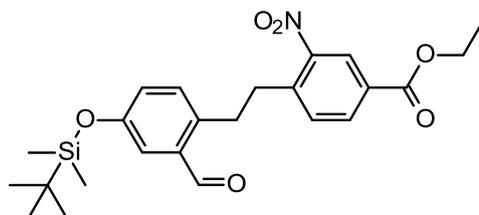


Abbildung 110: Benötigtes Synthese-Edukt zur Darstellung des Fragment-verknüpften bicyklischen Inhibitors.

Die Besetzung der Spezifitätstaschen erfolgt hier, ähnlich wie bei den drei- und vierarmigen Pyrrolidinen, von der S2- zu S1'-Tasche und nicht, wie bei den Benzhydryl-Derivaten von der S2 zu S1-Tasche. Durch diese Anordnung kommt, wie in Abbildung 109 gezeigt, der Ethyl-Linker dem Isoleucin 84 sehr nahe. Bei den 4-armigen Pyrrolidin-basierten Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass die beobachtete H-förmige Anordnung (Vergleiche Abbildung 32) durch die Nähe zu Isoleucin 84 dazu führt, dass diese Inhibitoren, im Gegensatz zu vielen zugelassenen Inhibitoren, besonders gegen die häufig auftretende Mutation I84V aktiv sind. [54] Dieser vorteilhafte Effekt wäre hier ebenfalls zu erwarten. Wegen der aufwendigen Synthese der Seitenkette, empfiehlt es sich, zu Beginn die in Abbildung 109 gezeigt, einfacher darzustellende Verbindung zu synthetisieren, auf ihre Affinität gegenüber dem Wildtyp und der I84V-Mutante hin zu untersuchen und die Röntgenstruktur zu lösen.

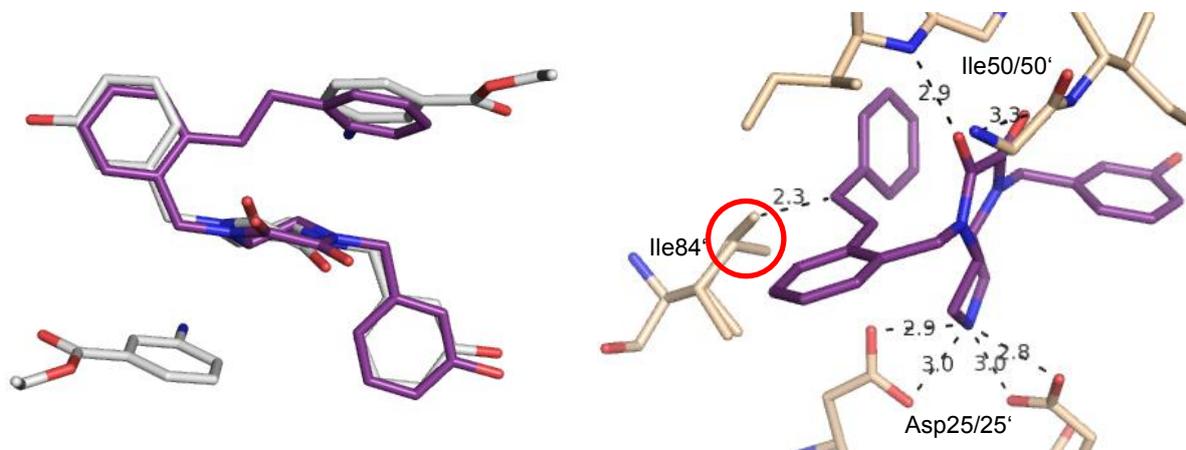


Abbildung 111: Minimiere Dockinglösung für eine einfacher darzustellende Verbindung in Violett, überlagert mit der Fragmentstruktur in Grau (PDB-Code 3QIH). Das bei resistenten Stämmen häufig zu einem Valin mutierte Isoleucin ist mit einem roten Kreis gekennzeichnet.

Um durch das fragmentbasierte Wirkstoffdesign noch weitere Ideen für neue Inhibitoren zu erlangen, müssten noch mehr Fragmente in die S1-Tasche gesoakt werden. Vor allem müsste die Methode auf andere Inhibitoren, welche die S2-Tasche nicht besetzen, wie zum Beispiel die kleineren Vertreter der Hydroxycoumarin-Derivate übertragen werden. [99] Die gefundenen Fragmente könnten dann nicht nur mit dem bityklischen Grundgerüst, sondern auch miteinander und mit verschiedenen funktionellen Gruppen zur Adressierung der katalytischen Diade verknüpft werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ausgehend von dem sehr potenten aber relativ großen Inhibitor AB111 kleinere Inhibitoren der HIV-Protease mit einer verbesserten Ligandeneffizienz zu entwerfen, darzustellen und auf ihre Enzymaffinität hin zu untersuchen.

Der erste Ansatz bestand in der Synthese von dreiarmigen Pyrrolidin-basierten-Inhibitoren, welche mit zwei protonierbaren Stickstoffen die katalytische Diade adressieren. Die Ligandeneffizienz konnten gegenüber der Ausgangsverbindung zwar verbessert werden, allerdings ist der K_i der besten Verbindung mit $0,9 \mu\text{M}$ nur moderat. Als nicht additiv und auch mit Dockingexperimenten schwer vorhersagbar erwies sich die SAR dieser Verbindungsklasse, weshalb ITC Experimente nötig sind um hier weiter rational optimieren zu können.

Im zweiten Ansatz wurde mit den bizyklischen Inhibitoren ein effizienteres Grundgerüst entwickelt. Bereits die zweiarmigen Bizyklen erwiesen sich mit einer Ligandeneffizienz der besten Verbindung von $-0,27 \text{ kcal/mol}$ als ausgesprochen vielversprechend. In einem weiteren Optimierungszyklus wurden drei- und vierarmige bizyklische Inhibitoren synthetisiert, von denen drei Verbindungen den Zielwert für die Ligandeneffizienz erreichen oder sogar übertreffen. Mit einem K_i von 7 nM liegt die beste der dargestellten Verbindungen zudem in einem sehr guten Affinitätsbereich für einen potentiellen Arzneistoff.

Im Zellaassay zeigten die bizyklischen Inhibitoren allerdings keine Aktivität, weshalb hier ein Prodrug-Ansatz verfolgt wurde. Die im Zellaassay aktivste Verbindung dieser Arbeit stellt ein Methylcarbamat-Prodrug eines vierarmigen bizyklischen Inhibitors dar, welcher eine Zellaktivität von 42% bei $10 \mu\text{M}$ aufweist. Abbildung 112 veranschaulicht nochmal die wichtigsten Eckpunkte der vorliegenden Arbeit.

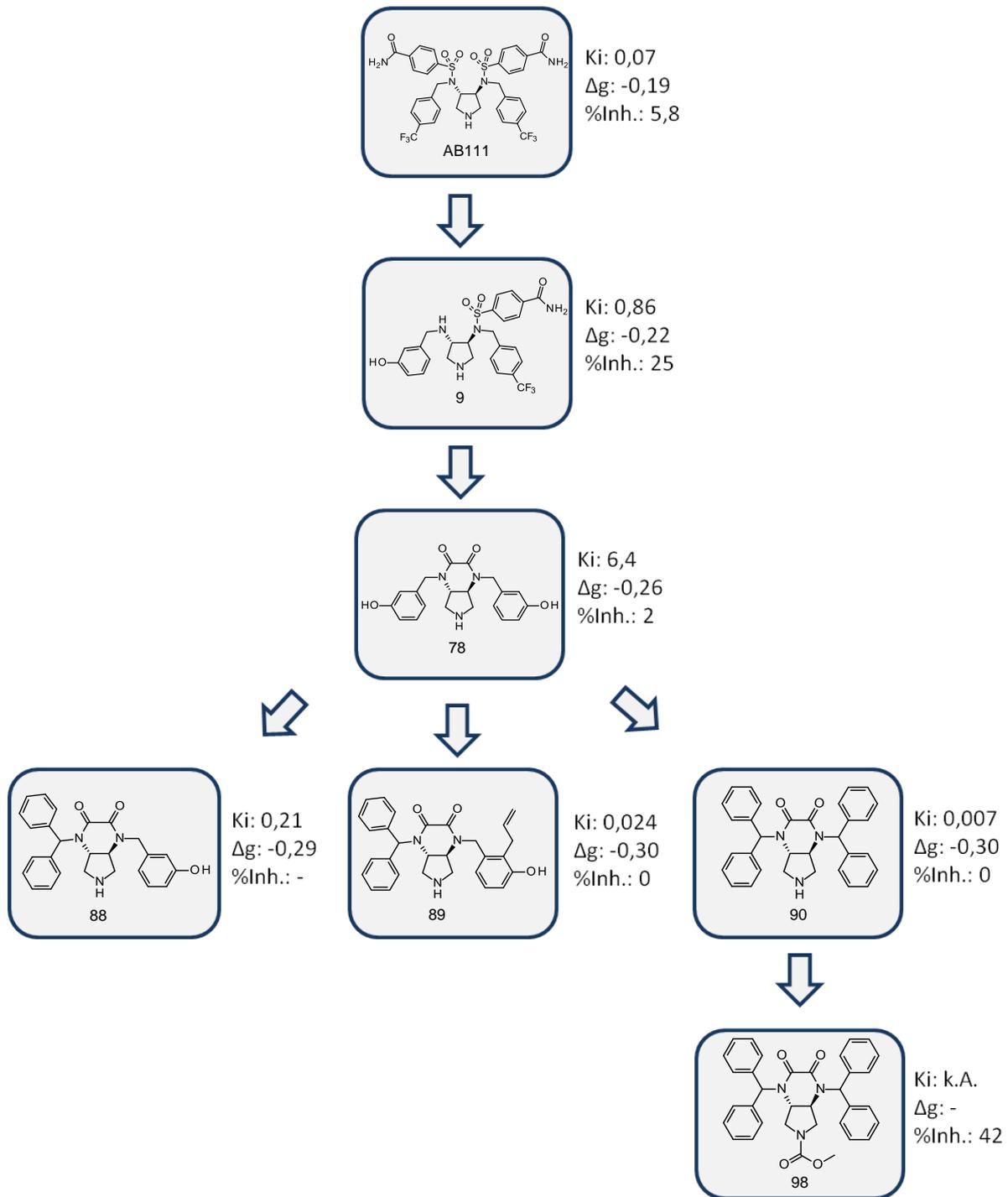


Abbildung 112: Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit (Der K_i bezieht sich auf den Enzymassay und ist in μM angegeben, Δg ist in kcal/mol angegeben. %Inh. bezieht sich auf den Zellassay bei einer Inhibitor-konzentration von $10 \mu\text{M}$)

7 EXPERIMENTAL TEIL

7.1 Allgemeine Anmerkungen

In Abschnitt 7 wird, wie in der Analytik üblich, der Punkt als Dezimaltrennzeichen verwendet.

NMR-Spektroskopie

Die Verbindungen wurden gelöst in kommerziell erhältlichen deuterierten Lösungsmitteln, an einem supraleitenden Multiresonanzspektrometer der Firma *Jeol Inc.* USA vom Typ ECX (1H: 400 MHz, 13C: 100 MHz) in der NMR-Abteilung des Fachbereichs Pharmazie der Philipps-Universität Marburg vermessen. Die entsprechenden Kopplungskonstanten J werden in Hz angegeben. Die 13C-Spektren wurden je nach Substanz entweder als COM- (engl. Single Pulse Complete Decoupling Experiment) oder als APT-Spektrum (engl. Attached Proton Test) aufgenommen. Die Spektren-Bearbeitung erfolgte mit Hilfe der Software Delta 5.0.0 der Firma *Jeol Inc.* USA. Die Interpretation wurde durch die Programme NMRShiftDB [100]1.4.1 und nmrdB [101] zur Berechnung von Verschiebungen unterstützt.

Für die Auswertung der Spektren wurde die chemischen Verschiebungen in ppm angegeben und das eingesetzte Lösungsmittel als interner Standard verwendet (CDCl₃ 1H: $\delta = 7.26$ ppm, 13C: $\delta = 77.2$ ppm; DMSO-d₆: $\delta = 2.50$ ppm, 13C: $\delta = 39.5$ ppm).

Die Signamultiplizitäten der Spektren wurden folgendermaßen abgekürzt:

s Singulett

d Dublett

t Triplett

q Quartett

qn Quintett

m Multipllett

s symmetrisches Signal

d doppeltes Signal

br breites Signal

ps pseudo Signal

Massenspektrometrie

Zur Bestimmung der Masse wurden die Verbindungen in Methanol gelöst und in der Abteilung für Massenspektrometrie am Fachbereich Pharmazie der Phillips-Universität Marburg vermessen. Die Ionisierung erfolgte entweder über Elektronenstoß-Methode (EI) wofür ein doppelfokussierendes Sektorfeld-Spektrometer vom Typ VG 7070 der Firma *Generators* verwendet wurde, oder über ES⁺ (zu Englisch: Electron spray ionisation) wobei ein doppelfokussierendem Sektorfeld-Spektrometer mit EBE-Geometrie vom Typ VG-Autospec der Firma *Micromass* zum Einsatz kam.

Elementaranalyse

Die Elementaranalyse wurde in der entsprechenden Abteilung am Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg unter Verwendung eines Micro Cube der Firma *Elementar Analysen GmbH* bestimmt.

Schmelzpunkt

Die Schmelzpunkte wurden an einem Schmelzpunktgerät des Typs KSP1N der Firma *A.Krüß Optronic GmbH* bestimmt und sind unkorrigiert.

MPLC

Die säulenchromatografische Aufreinigung mittels MPLC erfolgte an einem Sepacore-MPLC der Firma *Büchi* mit kommerziell erhältlichen Kartuschen (puriFlash 15 oder 30 µm) der Firma *Interchim*.

Reaktionsführung

Die eingesetzten Lösungsmittel besitzen p.a.-Qualität und wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet. Falls erforderlich wurden diese über Molsieb nach einer Vorschrift von Williams et al. getrocknet. [102]

Alle feuchtigkeitsempfindlichen Reaktionen wurden in ausgeheizten Glasgeräten unter Argon-Atmosphäre und in wasserfreien Lösungsmitteln durchgeführt.

Fluoreszenz-basierter Enzymassay der HIV-Protease

4 µl des in DMSO gelösten Inhibitors in unterschiedlichen Konzentrationen, 4 µl einer 20 µM Substratlösung und 172 µl Assaypuffer (100 mM MES, 300 mM KCl, 5 mM EDTA, 1 mg/ml BSA, pH 5,5) wurden mit in Assaypuffer verdünnter HIV-Protease (20 µl) versetzt. Als Substrat wurde das fluorogene Anthranilyl-HIV-Protease-Substrat (Abz-Thr-Ile-Nle-(p-NO₂-Phe)-Gln-Arg-NH₂) verwendet, das bei *Bachem* kommerziell erhältlich ist. Die Spaltung des Substrats durch die HIV-Protease wurde durch einen Anstieg der Fluoreszenzintensität (Anregungswellenlänge: 337 nm; Emissionsbereich: 410 nm) über einen Zeitraum von

mindestens 10 min mit dem Fluoreszenz-Plattenleser der Marke Safire II (Tecan) bestimmt. [103] Aus dem Fluoreszenzanstieg bei verschiedene Inhibitorkonzentrationen wurde mit Hilfe des Programms Grafit 4.09 der Firma *Erithacus Software Limited* der IC50 ermittelt. Dieser konnte unter Einbeziehung des Km-Werts und der Substratkonzentration mit Hilfe der Cheng-Prusoff Gleichung in den K_i umgerechnet werden. [104]

Der Km wurde für dieses System nach Lineweaver Burk mit 21,4 μM bestimmt. [105]

7.2 Arbeitsvorschriften und Charakterisierung der synthetisierten Verbindungen

AAV1: BOC-Entschützung

Das BOC-geschützte Pyrrolidin wurde in DCM gelöst und anschließend unter Rühren 2M HCl in Et₂O hinzu getropft. Nach 48 h wurde die überstehende Lösung abpipettiert, eingeeengt und anschließend mittels MPLC (DCM/MeOH/NH₃) als aufgereinigt.

AAV2: BOC-Entschützung

Das BOC-geschützte Pyrrolidin wurde in DCM und/oder EtOAc gelöst und anschließend unter Rühren 2M HCl in Et₂O hinzu getropft. Nach 48 h wurde die überstehende Lösung abpipettiert, mit wenig DCM gewaschen und das Hydrochlorid im Vakuum getrocknet.

AAV3: Reduktive Aminierung

Das Amin wurde in trockenem MeOH gelöst, mit pulverisiertem Molsieb (4 Å) versetzt, unter Rühren der Aldehyd zugegeben und 1.5 h bis 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion auf 0 °C gekühlt, NaBH₄ portionsweise zugegeben und weitere 1 h bis 2 h bei 0 °C gerührt. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur, wurde der Ansatz mit NaHCO₃ versetzt, anschließend mit EtOAc extrahiert, mit MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt. Aufreinigung mittels MPLC führte zu dem gewünschten Produkt.

AAV4: Ringschluss mit Oxalylchlorid

Das Amin wurde in trockenem DCM gelöst, mit DIPEA versetzt, auf -10 °C gekühlt, tropfenweise Oxalylchlorid zugegeben und die Reaktion innerhalb von 2 h auf Raumtemperatur erwärmt. Der Vorgang wurde noch zwei Mal mit jeweils der halben Menge DIPEA und Oxalylchlorid wiederholt. Dabei wurde jede Stunde überprüft, ob sich der pH-Wert im basischen Bereich befindet. Anschließend wurde der Ansatz mit einer eiskalten wässrigen Lösung von NaHCO₃ versetzt, dreimal mit EtOAc extrahiert, mit MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt. Aufreinigung mittels MPLC (Cyclohexan/EtOAc) führte zu dem gewünschten Produkt.

AAV5: Kondensation zu Sulfonamiden

Das Amin wurde in DCM gelöst, mit DIPEA versetzt und auf 0 °C gekühlt. Unter Rühren wurde das Sulfonylchlorid portionsweise zugegeben, die Suspension auf Raumtemperatur erwärmt und 2 h bis 6 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend

wurde das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt. Aufreinigung mittels MPLC führte zu dem gewünschten Produkt.

AAV6: N-Alkylierung von Sulfonamiden

Das Sulfonamid wurde in trockenem Acetonitril oder Aceton gelöst und mit Cs_2CO_3 und in einigen Fällen zusätzlich mit KI versetzt. Bei 0 °C wurde das Bromid zugegeben und die Mischung 10 min lang gerührt. Im Anschluss wurde 1 h bis 24 h unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde am Rotavapor entfernt und der Ansatz mit H_2O versetzt (50 ml), mit EtOAc extrahiert (3 x 50 ml), mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen (1 x 50 ml), über MgSO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt. Aufreinigung mittels MPLC führte zu dem gewünschten Produkt.

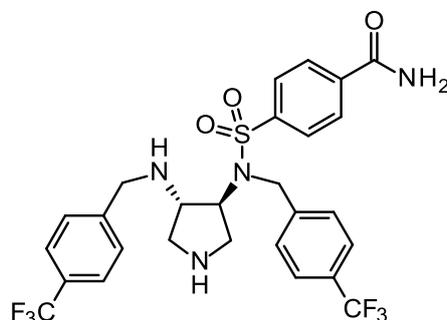
AAV7: Hydrolyse von Nitrilen zu Amiden

Das Nitril wurde in DMSO gelöst und bei 0 °C mit K_2CO_3 und 30% aq. H_2O_2 versetzt. Die Reaktion wurde auf Raumtemperatur erwärmt und 0.5 bis 6 h gerührt. Anschließend wurde das Produkt mit dem zehnfachen Volumen an H_2O bei 0 °C gefällt und filtriert. Der Filtrerrückstand wurde in 50 ml EtOAc gelöst und mit H_2O (3 x 50 ml) und gesättigter Kochsalzlösung (1 x 50 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt.

AAV8: N-Alkylierung von primären Aminen

Das Amin wurde in trockenem DMF gelöst und mit K_2CO_3 versetzt. Bei 0 °C wurde das Bromid portionsweise zugegeben und die Mischung auf Raumtemperatur erwärmt. Im Anschluss wurde 12-36 h gerührt. H_2O wurde zugegeben (50 ml), mit EtOAc extrahiert (3 x 50 ml), die vereinigten organischen Phasen mit Wasser (3 x 50 ml) und gesättigter Kochsalzlösung (1 x 50 ml) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt. Aufreinigung mittels MPLC führte zu dem gewünschten Produkt.

4-[[4-(Trifluoromethyl)phenyl]methyl-[(3S,4S)-4-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]-methylamino]pyrrolidin-3-yl]sulfonyl]benzamid (1)



Unter Verwendung der AAV1 mit 250 mg *tert*-Butyl-(3S,4S)-3-[(4-carbamoyl-phenyl)-sulfonyl]-[[4-(trifluoromethyl)-phenyl]methyl]-amino]-4-[[4-(trifluoromethyl)-phenyl]-methylamino]pyrrolidin-1-carboxylat **127** (0.36 mmol) in 2 ml DCM, 2 ml EtOAc und 2 ml 2M HCl in Et₂O wurden 0.19 g (88%) von **1** in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

Ausbeute: 0.19 g (88%) (farbloser Feststoff)

Smp.: 166 °C (DCM/MeOH/NH₃(MeOH))

EA: C₂₇H₂₆F₆N₄O₃S*1H₂O (618.59 g/mol)

Ber.: C:52.42 H:4.56 N:9.06

Gef.: C:52.02 H:4.94 N:8.92

MS (ES+):

m/z (%) = 601 (100, [M+H]⁺)

HRMS (ES+):

m/z berechnet für C₂₇H₂₇F₆N₄O₃S : 601.170807

gefunden : 601.173976

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 399.79 MHz):

δ_H (ppm) = 8.22 *brs*, 1H, CONH₂

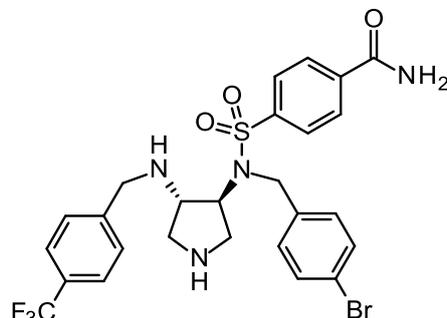
8.09 *d*, 2H, ³J=8.7 Hz, SO₂-C-CH-CH₂-C-C-NH₂

7.99	<i>d</i> , 2H, $^3J=8.7$ Hz, SO ₂ -C- <u>CH</u> -CH-C-C-NH ₂
7.65	<i>brs</i> , 1H, CONH <u>2</u>
7.63	<i>d</i> , 2H, $^3J=8.0$ Hz CH ₂ -C-CH- <u>CH</u> -C-CF ₃
7.60	<i>d</i> , 2H, $^3J=9.2$ Hz, CH ₂ -C-CH- <u>CH</u> -C-CF ₃
7.57	<i>d</i> , 2H, $^3J=8.9$ Hz, CH ₂ -C- <u>CH</u> -CH-C-CF ₃
7.37	<i>d</i> , 2H, $^3J=8.0$ Hz, CH ₂ -C- <u>CH</u> -CH-C-CF ₃
4.65	<i>d</i> , 1H, $^2J=17.4$ Hz, S-N- <u>CH</u> ₂ -Ar
4.51	<i>d</i> , 1H, $^2J=17.4$ Hz, S-N- <u>CH</u> ₂ -Ar
4.37	<i>ddd</i> , 1H, $^3J=8.2$ Hz, $^3J=7.3$ Hz, <u>CH</u> (Pyrrolidin)
3.65	<i>d</i> , 1H, $^2J=14.4$ Hz, NH- <u>CH</u> ₂ -Ar
3.49	<i>d</i> , 1H, $^2J=14.2$ Hz, NH- <u>CH</u> ₂ -Ar
3.08	<i>dd</i> , 1H, $^2J=10.9$ Hz, $^3J=6.8$ Hz, <u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)
3.02-2.90	<i>m</i> , 2H, <u>CH</u> (Pyrrolidin), <u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)
2.61	<i>dd</i> , 1H, $^2J=10.5$ Hz, $^3J=7.8$ Hz, <u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)
2.52-2.44	1H, <u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin) (overlaid with DMSO- <i>d</i> ₆)

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 21.2 °C, 100.53 MHz):

δ_C (ppm) = 166.5	<u>C</u> ONH ₂
145.3	CH ₂ - <u>C</u> -CH-CH-C-CF ₃
143.6	CH ₂ - <u>C</u> -CH-CH-C-CF ₃
141.3	SO ₂ - <u>C</u> -CH-CH-C-C-NH ₂
138.3	SO ₂ -C-CH-CH- <u>C</u> -C-NH ₂
128.6	SO ₂ -C-CH- <u>CH</u> -C-C-NH ₂
128.4	CH ₂ -C- <u>CH</u> -CH-C-CF ₃
127.8, 127.6	<i>q</i> , $^2J_{C,F}=31.3$ Hz, CH ₂ -C-CH-CH- <u>C</u> -CF ₃
127.8	CH ₂ -C- <u>CH</u> -CH-C-CF ₃
127.3	SO ₂ -C- <u>CH</u> -CH-C-C-NH ₂
124.9	<i>q</i> , $^3J_{C,F}=3.9$ Hz, CH ₂ -C-CH- <u>CH</u> -C-CF ₃
124.4, 124.3	<i>q</i> , $^1J_{C,F}=272.1$ Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C- <u>C</u> F ₃
62.5	<u>CH</u> (Pyrrolidin)
59.2	<u>CH</u> (Pyrrolidin)
50.2	NH- <u>CH</u> ₂ -Ar
48.8	<u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)
46.9	S-N- <u>CH</u> ₂ -Ar
45.3	<u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)

4-[(4-Bromophenyl)methyl-[(3S,4S)-4-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]-methylamino]pyrrolidin-3-yl]sulfonyl]benzamid (2)



Unter Verwendung der AAV7 wurden 0.31 g *tert*-Butyl-(3S,4S)-3-[*tert*-butoxycarbonyl-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]amino]-4-[(4-carbamoylphenyl)sulfonyl]-[(3-cyanophenyl)methyl]amino]pyrrolidine-1-carboxylat **108** (0.39 mmol) in 25 ml DMSO mit 27 mg K₂CO₃ (0.20 mmol) und 2 ml 30% aq. H₂O₂ 1 h gerührt. Nach der gemäß AAV7 durchgeführten Aufreinigung wurde ein weißer Feststoff erhalten, welcher direkt nach der AAV1 unter Verwendung von 2 ml EtOAc und 2 ml 2M HCl in Et₂O weiter umgesetzt wurde. Die Ausbeute von **2** über beide Stufen betrug 0.14 g (59%).

Ausbeute: 0.14 g (59%) (farbloser Feststoff)

Smp.: 87 °C (DCM/MeOH/NH₃(MeOH))

EA: C₂₆H₂₆BrF₃N₄O₃S*2H₂O (647.51 g/mol)

Ber.: C:48.23 H:4.67 N:8.65

Gef: C:48.59 H:4.65 N:8.79

MS (ES+):

m/z (%) = 611 (88, [M^{79Br}+H]⁺), 613 (100, [M^{81Br}+H]⁺)

HRMS (ES+):

m/z berechnet für C₂₆H₂₇BrF₃N₄O₃S: 611.093934

gefunden : 611.092739

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 399.79 MHz):

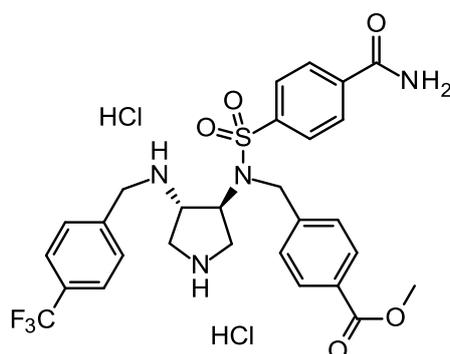
δ_{H} (ppm) = 8.21	<i>brs</i> , 1H, <u>CONH</u> ₂
8.07	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> =8.5 Hz, SO ₂ -C-CH- <u>CH</u> -C-C-NH ₂
7.97	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> =8.5 Hz, SO ₂ -C- <u>CH</u> -CH-C-C-NH ₂
7.64	<i>d</i> , 3H, ³ <i>J</i> =8.0 Hz, CH ₂ -C-CH- <u>CH</u> -C-CF ₃ , <u>CONH</u> ₂
7.45	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> =8.5 Hz, CH ₂ -C- <u>CH</u> -CH-C-CF ₃
7.37	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> =7.8 Hz, CH ₂ -C-CH- <u>CH</u> -C-Br
7.31	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> =8.5 Hz, CH ₂ -C- <u>CH</u> -CH-C-Br
4.50	<i>d</i> , 1H, ² <i>J</i> =17.2 Hz, S-N- <u>CH</u> ₂ -Ar
4.35	<i>d</i> , 1H, ² <i>J</i> =17.2 Hz, S-N- <u>CH</u> ₂ -Ar
4.26	<i>ddd</i> , 1H, ³ <i>J</i> =7.1 Hz, S-N- <u>CH</u> _(Pyrrolidin)
3.63	<i>d</i> , 1H, ² <i>J</i> =13.7 Hz, NH- <u>CH</u> ₂ -Ar
3.53	<i>d</i> , 1H, ² <i>J</i> =14.0 Hz, NH- <u>CH</u> ₂ -Ar
3.03-2.90	<i>m</i> , 2H, <u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin), NH- <u>CH</u> _(Pyrrolidin)
2.85	<i>dd</i> , 1H, ² <i>J</i> =11.7 Hz, ³ <i>J</i> =8.7 Hz, <u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)
2.64-2.51	1H, <u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin) (überlagert mit DMSO- <i>d</i> ₆)
2.38	<i>dd</i> , 1H, ² <i>J</i> =11.5 Hz, ³ <i>J</i> =6.6 Hz, <u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 22.7 °C, 100.53 MHz):

δ_{C} (ppm) = 166.7	<u>C</u> ONH ₂
145.4	CH ₂ - <u>C</u> -CH-CH-C-CF ₃
141.6	SO ₂ - <u>C</u> -CH-CH-C-C-NH ₂
138.3	CH ₂ - <u>C</u> -CH-CH-C-Br, SO ₂ -C-CH-CH- <u>C</u> -C-NH ₂
131.1	CH ₂ -C-CH- <u>CH</u> -C-Br
129.4	CH ₂ -C- <u>CH</u> -CH-C-Br
128.7	SO ₂ -C-CH- <u>CH</u> -C-C-NH ₂
128.5	CH ₂ -C- <u>CH</u> -CH-C-CF ₃
127.5	<i>q</i> , ² <i>J</i> _{C,F} =32.6 Hz, CH ₂ -C-CH-CH- <u>C</u> -CF ₃
127.3	SO ₂ -C- <u>CH</u> -CH-C-C-NH ₂
125.0	<i>q</i> , ³ <i>J</i> _{C,F} =2.9 Hz, CH ₂ -C-CH- <u>CH</u> -C-CF ₃
124.5	<i>q</i> , ¹ <i>J</i> _{C,F} =273.6 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C- <u>C</u> F ₃
120.2	CH ₂ -C-CH-CH- <u>C</u> -Br
63.3	S-N- <u>CH</u> _(Pyrrolidin)
59.6	NH- <u>CH</u> _(Pyrrolidin)
50.4	<u>CH</u> ₂ -Ar
49.7	<u>CH</u> ₂ -Ar

46.9 $\underline{\text{C}}\text{H}_2(\text{Pyrrolidin})$ 46.3 $\underline{\text{C}}\text{H}_2(\text{Pyrrolidin})$

**Methyl-4-[[[4-carbamoylphenyl)sulfonyl-[(3S,4S)-4-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methylamino]pyrrolidin-3-yl]amino]methyl]benzoat
Dihydrochlorid (3)**



Unter Verwendung der AAV2 mit 100 mg *tert*-Butyl-(3S,4S)-3-[*tert*-butoxycarbonyl-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]amino]-4-[[4-(4-carbamoylphenyl)sulfonyl-[(4-methoxycarbonylphenyl)methyl]amino]pyrrolidin-1-carboxylat **110** (0.13 mmol), 1 ml EtOAc und 1 ml 2M HCl in Et₂O wurden 81 mg (94%) von **3** in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

Ausbeute: 81 mg (94%) (farbloser Feststoff)

Smp.: 187 °C (DCM/EtOAc/Et₂O)

EA: C₂₈H₂₉F₃N₄O₅S*2HCl (663.54 g/mol)

Ber.: C:50.68 H:4.71 N:8.44

Gef.: C:50.44 H:4.86 N:8.41

MS (ES+):

m/z (%) = 591 (100, [M+H]⁺)

HRMS (ES+):

m/z	berechnet für C ₂₈ H ₃₀ F ₃ N ₄ O ₅ S	:	591.188902
	gefunden	:	591.190964

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

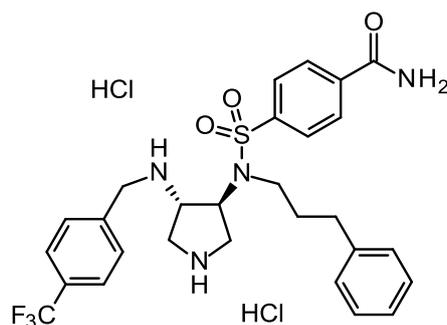
δ _H (ppm) =	10.53	<i>brs</i> , 2H, <u>NH₂</u> ⁺
	10.22	<i>brs</i> , 1H, <u>NH₂</u> ⁺
	9.56	<i>brs</i> , 1H, <u>NH₂</u> ⁺
	8.28	<i>brs</i> , 1H, <u>CONH₂</u>
	8.14	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> =8.3 Hz, SO ₂ -C-CH- <u>CH</u> -C-C-NH ₂
	8.05	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> =8.3 Hz, SO ₂ -C- <u>CH</u> -CH-C-C-NH ₂
	7.93	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> =8.3 Hz, CH ₂ -C-CH- <u>CH</u> -C-C-O-CH ₃
	7.76	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> =8.0 Hz, CH ₂ -C-CH- <u>CH</u> -C-CF ₃
	7.68	<i>brs</i> , 3H, <u>CONH₂</u> , CH ₂ -C- <u>CH</u> -CH-C-C-O-CH ₃
	7.60	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> =8.0 Hz, CH ₂ -C- <u>CH</u> -CH-C-CF ₃
	5.31	<i>brs</i> , 1H, NH ₂ ⁺ - <u>CH</u> _(Pyrrolidin)
	4.71	<i>s</i> , 2H, S-N- <u>CH₂</u> -Ar
	4.13	<i>brs</i> , 1H, S-N- <u>CH</u> _(Pyrrolidin)
	4.09	<i>brs</i> , 1H, NH ₂ ⁺ - <u>CH₂</u> -Ar
	3.86	<i>s</i> , 3H, CH ₂ -C-CH-CH-C-C-O- <u>CH₃</u>
	3.73	<i>brs</i> , 1H, NH ₂ ⁺ - <u>CH₂</u> -Ar
	3.58	<i>brs</i> , 1H, <u>CH₂</u> _(Pyrrolidin)
	3.46	<i>brs</i> , 1H, <u>CH₂</u> _(Pyrrolidin)
	3.17	<i>dd</i> , 1H, ² <i>J</i> =11.9 Hz, ³ <i>J</i> =9.7 Hz, <u>CH₂</u> _(Pyrrolidin)
	2.88	<i>dd</i> , 1H, ² <i>J</i> =11.6 Hz, ³ <i>J</i> =6.6 Hz, <u>CH₂</u> _(Pyrrolidin)

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

δ _C (ppm) =	166.2	<u>C</u> ONH ₂
	165.9	CH ₂ -C-CH-CH-C- <u>C</u> -O-CH ₃
	142.9	CH ₂ - <u>C</u> -CH-CH-C-CF ₃ , SO ₂ - <u>C</u> -CH-CH-C-C-NH ₂
	140.0	CH ₂ - <u>C</u> -CH-CH-C-C-O-CH ₃
	138.8	SO ₂ -C-CH-CH- <u>C</u> -C-NH ₂
	130.5	CH ₂ -C-CH- <u>CH</u> -C-C-O-CH ₃
	129.2	SO ₂ -C-CH- <u>CH</u> -C-C-NH ₂
	128.9	CH ₂ -C- <u>CH</u> -CH-C-C-O-CH ₃
	128.7	CH ₂ -C-CH-CH- <u>C</u> -CF ₃ , CH ₂ -C-CH-CH- <u>C</u> -C-O-CH ₃
	127.9	CH ₂ -C- <u>CH</u> -CH-C-CF ₃

127.4	SO ₂ -C- <u>CH</u> -CH-C-C-NH ₂
125.3	<i>q</i> , ³ J _{C,F} =3.6 Hz, CH ₂ -C-CH- <u>CH</u> -C-CF ₃
124.0	<i>q</i> , ¹ J _{C,F} =273.5 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C- <u>CF</u> ₃
58.9	NH ₂ ⁺ - <u>CH</u>
57.4	S-N- <u>CH</u>
52.0	O- <u>CH</u> ₃
48.3	<u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)
47.8	<u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)
45.3	S-N- <u>CH</u> ₂
44.3	NH ₂ ⁺ - <u>CH</u> ₂

4-[3-Phenylpropyl-[(3S,4S)-4-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methylamino]-pyrrolidin-3-yl]sulfamoyl]benzamid Dihydrochlorid (4)



Unter Verwendung der AAV2 mit 450 mg *tert*-Butyl-(3S,4S)-3-[*tert*-butoxycarbonyl-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]amino]-4-[(4-carbamoylphenyl)sulfonyl-[(3-methoxyphenyl)methyl]amino]pyrrolidin-1-carboxylat **115** (0.59 mmol), 2 ml EtOAc und 2 ml 2M HCl in Et₂O wurden 360 mg (96%) von **4** in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

Ausbeute: 360 mg (96%) (farbloser Feststoff)

Smp.: 153 °C (DCM/EtOAc/Et₂O)

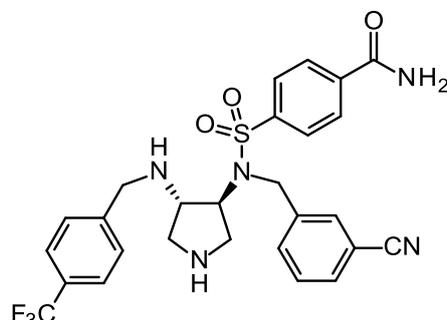
EA: C₂₈H₃₁F₃N₄O₃S*2HCl*1H₂O (651.57 g/mol)

Ber.: C:51.61 H:5.41 N:8.60

Gef.: C:51.75 H:5.34 N:8.48

130.8	SO ₂ -C-CH- <u>C</u> H-C-C-NH ₂
129.4	<i>q</i> , ² J _{C,F} =32.4 Hz, CH ₂ -C-CH-CH- <u>C</u> -CF ₃
128.8	CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -C-CH- <u>C</u> H-CH
128.25	CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -C- <u>C</u> H-CH-CH
128.19	CH ₂ -C- <u>C</u> H-CH-C-CF ₃
127.1	SO ₂ -C- <u>C</u> H-CH-C-C-NH ₂
125.8	CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -C-CH-CH- <u>C</u> H
125.5	<i>q</i> , ³ J _{C,F} =2.4 Hz, CH ₂ -C-CH- <u>C</u> H-C-CF ₃
124.0	<i>q</i> , ¹ J _{C,F} =272.3 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C- <u>C</u> F ₃
58.2	NH ₂ ⁺ - <u>C</u> H _(Pyrrolidin)
57.2	S-N- <u>C</u> H _(Pyrrolidin)
48.0	<u>C</u> H ₂ (Pyrrolidin)
44.9, 44.8	<u>C</u> H ₂ -CH ₂ -CH ₂ -C-CH-CH-CH
44.1	NH ₂ ⁺ - <u>C</u> H ₂ -Ar
32.1	CH ₂ -CH ₂ - <u>C</u> H ₂ -C-CH-CH-CH
32.0	CH ₂ - <u>C</u> H ₂ -CH ₂ -C-CH-CH-CH

4-[(3-Cyanophenyl)methyl-[(3S,4S)-4-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methylamino]pyrrolidin-3-yl]sulfonyl]benzamid (5)



Unter Verwendung der AAV1 mit 180 mg *tert*-Butyl-(3S,4S)-3-[*tert*-butoxycarbonyl-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]amino]-4-[(4-carbamoylphenyl)sulfonyl-[(3-cyanophenyl)methyl]amino]pyrrolidin-1-carboxylat **113** (0.24 mmol), 2 ml EtOAc und 2 ml 2M HCl in Et₂O wurden 73 mg (55%) von **5** in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

Ausbeute: 73 mg (55%) (farbloser Feststoff)

Smp.: 86 °C (DCM/MeOH/NH₃(MeOH))

EA: C₂₇H₂₆F₃N₅O₃S*1.5H₂O (584.61 g/mol)

Ber.: C:55.47 H:5.00 N:11.98

Gef.: C:55.35 H:5.11 N:11.69

MS (ES+):

m/z (%) = 558 (100, [M+H]⁺)

HRMS (ES+):

m/z berechnet für C₂₇H₂₇F₃N₅O₃S : 558.178672

gefunden : 558.176182

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 399.79 MHz):

δ_H (ppm) = 8.20 *brs*, 1H, CONH₂

8.07 *d*, 2H, ³J=8.5 Hz, SO₂-C-CH-CH₂-C-C-NH₂

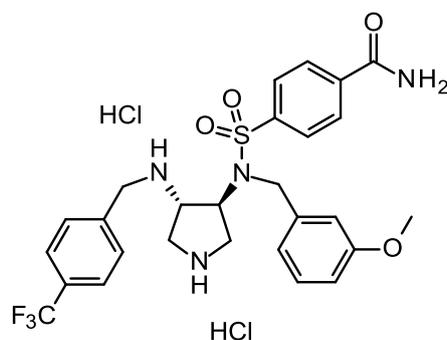
7.97	<i>d</i> , 2H, $^3J=8.5$ Hz, SO ₂ -C- <u>CH</u> -CH-C-C-NH ₂
7.80	<i>s</i> , 1H, NC-C-CH-CH-CH-C- <u>CH</u>
7.70	<i>d</i> , 2H, NC-C- <u>CH</u> -CH- <u>CH</u> -C-CH
7.63	<i>brs</i> , 1H, CON <u>H</u> ₂
7.62	<i>d</i> , 2H, $^3J=8.2$ Hz, CH ₂ -C-CH- <u>CH</u> -C-CF ₃
7.48	<i>dd</i> , 1H, $^3J=7.7$ Hz, NC-C-CH- <u>CH</u> -CH-C-CH
7.40	<i>d</i> , 2H, $^3J=8.0$ Hz, CH ₂ -C- <u>CH</u> -CH-C-CF ₃
4.58	<i>d</i> , 1H, $^2J=17.6$ Hz, S-N- <u>CH</u> ₂ -Ar
4.42	<i>d</i> , 1H, $^2J=17.2$ Hz, S-N- <u>CH</u> ₂ -Ar
4.26	<i>ddd</i> , 1H, $^3J=8.0$ Hz, $^3J=6.6$ Hz, S-N- <u>CH</u> (Pyrrolidin)
3.63	<i>d</i> , 1H, $^2J=14.0$ Hz, NH- <u>CH</u> ₂ -Ar
3.54	<i>d</i> , 1H, $^2J=14.0$ Hz, NH- <u>CH</u> ₂ -Ar
2.95	<i>dd</i> , 1H, $^2J=10.3$ Hz, $^3J=6.9$ Hz, <u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)
2.87	<i>sm</i> , 1H, NH- <u>CH</u> (Pyrrolidin)
2.81	<i>dd</i> , 1H, $^2J=11.5$ Hz, $^3J=8.7$ Hz, <u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)
2.46	<i>dd</i> , 1H, $^2J=10.4$ Hz, $^3J=7.3$ Hz, <u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)
2.31	<i>dd</i> , 1H, $^2J=11.6$ Hz, $^3J=6.4$ Hz, <u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 100.53 MHz):

δ _C (ppm) = 166.4	<u>C</u> ONH ₂
145.3	CH ₂ - <u>C</u> -CH-CH-C-CF ₃
141.3	SO ₂ - <u>C</u> -CH-CH-C-C-NH ₂
140.6	CH ₂ - <u>C</u> -CH-C-CN
138.2	SO ₂ -C-CH-CH- <u>C</u> -C-NH ₂
131.9	NC-C- <u>CH</u> -CH-CH-C-CH
130.7	NC-C-CH-CH-CH-C- <u>CH</u>
130.5	NC-C-CH-CH- <u>CH</u> -C-CH
129.3	NC-C-CH- <u>CH</u> -CH-C-CH
128.5	SO ₂ -C-CH- <u>CH</u> -C-C-NH ₂
128.3	CH ₂ -C- <u>CH</u> -CH-C-CF ₃
127.3	<i>q</i> , $^2J_{C,F}=30.8$ Hz, CH ₂ -C-CH-CH- <u>C</u> -CF ₃
127.2	SO ₂ -C- <u>CH</u> -CH-C-C-NH ₂
124.9	<i>q</i> , $^3J_{C,F}=3.9$ Hz, CH ₂ -C-CH- <u>CH</u> -C-CF ₃
124.3	<i>q</i> , $^1J_{C,F}=271.6$ Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C- <u>CF</u> ₃
118.7	NC- <u>C</u> -CH-CH-CH-C-CH
111.1	NC- <u>C</u> -CH-CH-CH-C-CH

63.8	S-N- <u>C</u> H ₂ -Ar
60.3	NH- <u>C</u> H ₂ -Ar
50.5	<u>C</u> H(Pyrrolidin)
50.1	<u>C</u> H(Pyrrolidin)
46.7	<u>C</u> H ₂ (Pyrrolidin)
46.6	<u>C</u> H ₂ (Pyrrolidin)

**4-[(3-Methoxyphenyl)methyl]-[(3S,4S)-4-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methylamino]pyrrolidin-3-yl]sulfonyl]benzamid
Dihydrochlorid (6)**



Unter Verwendung der AAV2 mit 330 mg *tert*-Butyl-(3S,4S)-3-[*tert*-butoxycarbonyl-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]amino]-4-[[4-carbamoylphenyl]sulfonyl]-[(3-methoxyphenyl)methyl]amino]pyrrolidin-1-carboxylat **112** (0.43 mmol), 2 ml EtOAc und 2 ml 2M HCl in Et₂O wurden 260 mg (95%) von **6** in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

Ausbeute: 260 mg (95%) (farbloser Feststoff)

Smp.: 165 °C (DCM/EtOAc/Et₂O)

EA: C₂₇H₂₉F₃N₄O₄S*2HCl (635.52 g/mol)

Ber.: C:51.03 H:4.92 N:8.82

Gef.: C:50.81 H:4.96 N:8.63

MS (ES+):

m/z (%) = 563 (100, $[M+H]^+$)

HRMS (ES+):

m/z berechnet für $C_{27}H_{30}F_3N_4O_4S$: 563.193987
 gefunden : 563.190821

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

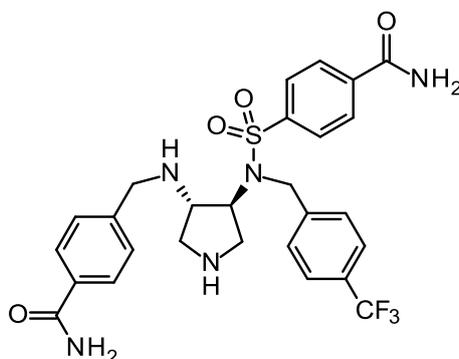
δ_H (ppm) = 10.53	<i>brs</i> , 2H, NH_2^+
10.34	<i>brs</i> , 1H, NH_2^+
9.54	<i>brs</i> , 1H, NH_2^+
8.28	<i>brs</i> , 1H, $CONH_2$
8.13	<i>d</i> , 2H, $^3J=8.3$ Hz, $SO_2-C-CH-CH-C-C-NH_2$
8.06	<i>d</i> , 2H, $^3J=8.3$ Hz, $SO_2-C-CH-CH-C-C-NH_2$
7.78	<i>d</i> , 2H, $^3J=8.0$ Hz, $CH_2-C-CH-CH-C-CF_3$
7.67	<i>brs</i> , 1H, $CONH_2$
7.64	<i>d</i> , 2H, $^3J=6.9$ Hz, $CH_2-C-CH-CH-C-CF_3$
7.28	<i>t</i> , 1H, $^3J=8.0$ Hz, $CH_3-O-C-CH-CH-CH-C-CH$
7.07	<i>d</i> , 2H, $^3J=7.5$ Hz, $CH_3-O-C-CH-CH-CH-C-CH$
6.89-6.85	<i>m</i> , 1H, $CH_3-O-C-CH-CH-CH-C-CH$
5.24	<i>brs</i> , 1H, $NH_2^+-CH_{(Pyrrolidin)}$
4.68	<i>d</i> , 1H, $^2J=16.6$ Hz, $S-N-CH_2-Ar$
4.56	<i>d</i> , 1H, $^2J=16.6$ Hz, $S-N-CH_2-Ar$
4.03	<i>brs</i> , 1H, $S-N-CH_{(Pyrrolidin)}$
3.89	<i>d</i> , 2H, $^2J=11.7$ Hz, $NH_2^+-CH_2-Ar$
3.73	<i>s</i> , 3H, $O-CH_3$
3.62-3.40	<i>m</i> , 2H, $CH_2_{(Pyrrolidin)}$
3.20	<i>dd</i> , 1H, $^2J=11.6$ Hz, $^3J=9.7$ Hz, $CH_2_{(Pyrrolidin)}$
2.93	<i>dd</i> , 1H, $^2J=11.2$ Hz, $^3J=7.5$ Hz, $CH_2_{(Pyrrolidin)}$

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

δ_C (ppm) = 166.2	$\underline{C}ONH_2$
159.3	$CH_3-O-\underline{C}-CH-CH-CH-C-CH$
140.6	$SO_2-\underline{C}-CH-CH-C-C-NH_2$, $CH_2-\underline{C}-CH-CH-C-CF_3$
138.7	$CH_3-O-C-CH-CH-CH-\underline{C}-CH$
138.6	$SO_2-C-CH-CH-\underline{C}-C-NH_2$
130.5	$CH_3-O-C-CH-\underline{C}-CH-CH-C-CH$

129.7	SO ₂ -C-CH- <u>C</u> H-C-C-NH ₂
129.3	<i>q</i> , ² J _{C,F} =32.4 Hz, CH ₂ -C-CH-CH- <u>C</u> -CF ₃
128.8	CH ₂ -C- <u>C</u> H-CH-C-CF ₃
127.4	SO ₂ -C- <u>C</u> H-CH-C-C-NH ₂
125.4	<i>q</i> , ³ J _{C,F} =3.6 Hz, CH ₂ -C-CH- <u>C</u> H-C-CF ₃
124.0	<i>q</i> , ¹ J _{C,F} =272.3 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C- <u>C</u> F ₃
120.2	CH ₃ -O-C-CH-CH- <u>C</u> H-C-CH
113.7	CH ₃ -O-C- <u>C</u> H-CH-CH-C-CH
113.3	CH ₃ -O-C-CH-CH-CH-C- <u>C</u> H
58.7	NH ₂ ⁺ - <u>C</u> H _(Pyrrolidin)
57.3	S-N- <u>C</u> H _(Pyrrolidin)
55.0	O- <u>C</u> H ₃
48.2	<u>C</u> H ₂ (Pyrrolidin)
45.3	S-N-CH ₂ -Ar
44.5	NH ₂ ⁺ -CH ₂ -Ar

4-[[[(3S,4S)-4-[(4-Carbamoylphenyl)methylamino]pyrrolidin-3-yl]-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]sulfonyl]benzamid (7)



Unter Verwendung der AAV7 wurden 0.60 g *tert*-Butyl-(3S,4S)-3-[(4-carbamoylphenyl)sulfonyl]-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]-amino]-4-[(4-cyanophenyl)methylamino]pyrrolidin-1-carboxylat **128** (0.90 mmol) in 15 ml DMSO mit 0.10 g K₂CO₃ (0.70 mmol) und 5 ml 30% aq. H₂O₂ 2 h gerührt. Nach der gemäß AAV7 durchgeführten Aufreinigung wurde ein weißer Feststoff erhalten, welcher direkt nach der AAV1 weiter umgesetzt wurde. Hierfür wurden 6 ml EtOAc und 4 ml 2M HCl in Et₂O verwendet. Die Ausbeute von **7** über beide Stufen betrug 0.12 g (24%).

Ausbeute: 0.12 g (24%) (farbloser Feststoff)

Smp.: 113 °C (DCM/MeOH/NH₃(MeOH))

EA: C₂₇H₂₈F₃N₅O₄S*0.5H₂O (584.61 g/mol)

Ber.: C:55.47 H:5.00 N:11.98

Gef.: C:55.12 H:5.43 N:11.79

MS (ES+):

m/z (%) = 576 (100, [M+H]⁺), 598 (34, [M+Na]⁺), 614 (27, [M+K]⁺)

HRMS (ES+):

m/z berechnet für C₂₇H₂₉F₃N₅O₄S : 576.189236

gefunden : 576.192503

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 399.79 MHz):

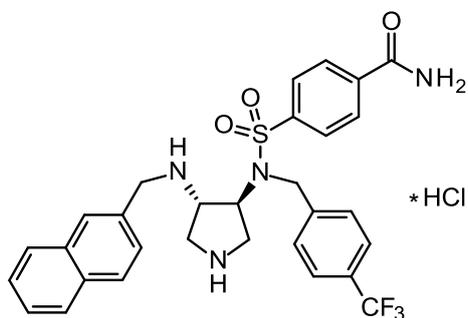
δ _H (ppm) = 8.21	<i>brs</i> , 1H, CONH ₂
8.07	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> =8.7 Hz, SO ₂ -C-CH-CH-C-C-NH ₂
7.98	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> =8.5 Hz, SO ₂ -C-CH-CH-C-C-NH ₂
7.88	<i>brs</i> , 1H, CONH ₂
7.81	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> =8.5 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C-C-NH ₂
7.61	<i>d</i> , 3H, ³ <i>J</i> =8.5 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃ , CONH ₂
7.53	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> =8.0 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
7.28	<i>d</i> , 3H, ³ <i>J</i> =8.0 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C-CONH ₂
4.59	<i>d</i> , 1H, ² <i>J</i> =17.6 Hz, S-N-CH ₂ -Ar
4.43	<i>d</i> , 1H, ² <i>J</i> =17.4 Hz, S-N-CH ₂ -Ar
4.19	<i>ddd</i> , 1H, ³ <i>J</i> =7.6 Hz, ³ <i>J</i> =5.72 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin)
3.60	<i>d</i> , 1H, ² <i>J</i> =14.0 Hz, NH-CH ₂ -Ar
3.54	<i>d</i> , 1H, ² <i>J</i> =14.0 Hz, NH-CH ₂ -Ar
2.87-2.75	<i>m</i> , 2H, CH ₂ (Pyrrolidin), CH ₂ (Pyrrolidin)
2.69	<i>dd</i> , 1H, ² <i>J</i> =11.5 Hz, ³ <i>J</i> =8.2 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin)
2.38-2.29	<i>sm</i> , 1H, CH ₂ (Pyrrolidin)
2.18	<i>dd</i> , 1H, ² <i>J</i> =11.5 Hz, ³ <i>J</i> =5.5 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin)

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 100.53 MHz):

δ_C (ppm) = 167.8 CONH₂

166.6	$\underline{\text{C}}\text{ONH}_2$
144.0	$\text{CH}_2\text{-}\underline{\text{C}}\text{-CH-CH-C-CF}_3$
141.5	$\text{SO}_2\text{-}\underline{\text{C}}\text{-CH-CH-C-C-NH}_2$
138.2	$\text{CH}_2\text{-}\underline{\text{C}}\text{-CH-CH-C-C-NH}_2, \text{SO}_2\text{-C-CH-CH-}\underline{\text{C}}\text{-C-NH}_2$
132.7	$\text{CH}_2\text{-C-CH-CH-}\underline{\text{C}}\text{-C-NH}_2$
128.5	$\text{SO}_2\text{-C-CH-}\underline{\text{C}}\text{H-C-C-NH}_2$
127.6	$\text{CH}_2\text{-C-}\underline{\text{C}}\text{H-CH-C-CF}_3$
127.6	$q, {}^2J_{\text{C,F}}=31.8\text{Hz}, \text{CH}_2\text{-C-CH-CH-}\underline{\text{C}}\text{-CF}_3$
127.5	$\text{CH}_2\text{-C-CH-}\underline{\text{C}}\text{H-C-C-NH}_2$
127.4	$\text{CH}_2\text{-C-}\underline{\text{C}}\text{H-CH-C-C-NH}_2$
127.2	$\text{SO}_2\text{-C-}\underline{\text{C}}\text{H-CH-C-C-NH}_2$
124.9	$q, {}^3J_{\text{C,F}}=2.9\text{ Hz}, \text{CH}_2\text{-C-CH-}\underline{\text{C}}\text{H-C-CF}_3$
124.3	$q, {}^1J_{\text{C,F}}=272.6\text{ Hz}, \text{CH}_2\text{-C-CH-CH-C-}\underline{\text{C}}\text{F}_3$
65.0	$\underline{\text{C}}\text{H}(\text{Pyrrolidin})$
61.4	$\underline{\text{C}}\text{H}(\text{Pyrrolidin})$
51.7	$\underline{\text{C}}\text{H}_2$
50.8	$\underline{\text{C}}\text{H}_2$
48.1	$\underline{\text{C}}\text{H}_2$
47.2	$\underline{\text{C}}\text{H}_2$

4-[[[(3S,4S)-4-(2-Naphthylmethylamino)pyrrolidin-3-yl]-[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]sulfonyl]benzamidhydrochlorid (8)



Unter Verwendung der AAV1 mit 230 mg *tert*-Butyl-(3S,4S)-3-[[4-carbamoylphenyl]-sulfonyl]-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]-amino]-4-(2-naphthylmethylamino)-

pyrrolidin-1-carboxylat **129** (0.30 mmol) in 3 ml DCM, 6 ml EtOAc und 4 ml 2M HCl in Et₂O wurden 0.14 g (75%) von **8** in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

Ausbeute: 0.14 g (75%) (farbloser Feststoff)

Smp.: 229 °C (Zersetzung) (DCM/MeOH/NH₃(MeOH))

MS (ES+):

m/z (%) = 583 (100, [M+H]⁺), 605 (13, [M+Na]⁺)

HRMS (ES+):

m/z berechnet für C₃₀H₃₀F₃N₄O₃S : 583.199073

gefunden : 583.196942

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 399.79 MHz):

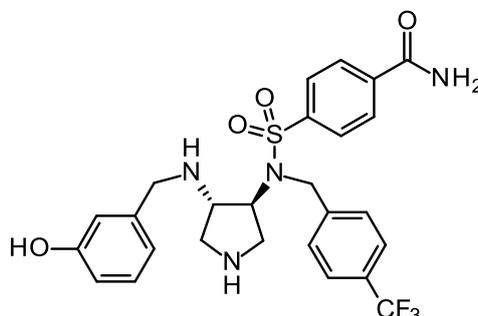
δ _H (ppm) = 9.21	<i>brs</i> , 2H, NH ₂ ⁺
8.24	<i>brs</i> , 1H, CONH ₂
8.10	<i>d</i> , 2H, ³ J=8.7 Hz, SO ₂ -C-CH-CH-C-C-NH ₂
8.02	<i>d</i> , 2H, ³ J=8.7 Hz, SO ₂ -C-CH-CH-C-C-NH ₂
7.91-7.80	<i>m</i> , 3H, CONH ₂ , CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
7.70-7.53	<i>m</i> , 6H, ³ J=10.1 Hz, CH ₂ -C-CH-C-CH-CH-CH-CH-C-CH-CH
7.54-7.46	<i>sm</i> , 2H, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
7.32	<i>dd</i> , 1H, ³ J=8.5 Hz, ⁴ J=1.3 Hz, CH ₂ -C-CH-C-CH-CH-CH-CH-C-CH-CH
4.68	<i>d</i> , 1H, ² J=17.4 Hz, S-N-CH ₂ -Ar
4.57	<i>d</i> , 1H, ² J=17.6 Hz, S-N-CH ₂ -Ar
4.53	<i>ddd</i> , 1H, ³ J=8.2 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin)
3.68-3.45	<i>m</i> , 2H, CH ₂ -Ar
3.25-3.06	<i>m</i> , 3H, CH ₂ (Pyrrolidin), CH ₂ (Pyrrolidin)
2.81	<i>dd</i> , 1H, ² J=10.7 Hz, ³ J=8.1 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin)
2.73-2.64	<i>m</i> , 1H, CH ₂ (Pyrrolidin)
2.53	<i>brs</i> , 1H, NH (überlagert mit DMSO- <i>d</i> ₆)

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 100.53 MHz):

δ_C (ppm) = 166.4 CONH₂

143.3	CH ₂ - <u>C</u> -CH-CH-C-CF ₃
141.2	SO ₂ - <u>C</u> -CH-CH-C-C-NH ₂
138.4	SO ₂ -C-CH-CH- <u>C</u> -C-NH ₂
137.6	CH ₂ - <u>C</u> -CH-C-CH-CH-CH-CH-C-CH-CH
132.8	CH ₂ -C-CH-C-CH-CH-CH-CH- <u>C</u> -CH-CH
132.2	CH ₂ -C-CH- <u>C</u> -CH-CH-CH-CH-C-CH-CH
128.7	SO ₂ -C-CH- <u>CH</u> -C-C-NH ₂
127.9	CH ₂ -C- <u>CH</u> -CH-C-CF ₃
127.7	<i>q</i> , ² J _{C,F} =31.8Hz, CH ₂ -C-CH-CH- <u>C</u> -CF ₃
127.7	CH ₂ -C-CH-C- <u>CH</u> -CH-CH-CH-C-CH-CH
127.5	CH ₂ -C-CH-C-CH-CH-CH-CH-C-CH- <u>CH</u>
127.4	CH ₂ -C-CH-C-CH-CH-CH- <u>CH</u> -C-CH-CH
127.2	SO ₂ -C- <u>CH</u> -CH-C-C-NH ₂
126.5	CH ₂ -C- <u>CH</u> -C-CH-CH-CH-CH-C-CH-CH
126.1	CH ₂ -C-CH-C-CH-CH- <u>CH</u> -CH-C-CH-CH
126.0	CH ₂ -C-CH-C-CH-CH-CH-CH-C- <u>CH</u> -CH
125.6	CH ₂ -C-CH-C-CH- <u>CH</u> -CH-CH-C-CH-CH
124.9	<i>q</i> , ³ J _{C,F} =2.9 Hz, CH ₂ -C-CH- <u>CH</u> -C-CF ₃
124.2	<i>q</i> , ¹ J _{C,F} =271.7 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C- <u>C</u> F ₃
60.8	<u>CH</u> (Pyrrolidin)
58.0	<u>CH</u> (Pyrrolidin)
51.1	NH- <u>CH</u> ₂ -Ar
47.0	<u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)
46.9	S-N- <u>CH</u> ₂ -Ar
43.2	<u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)

4-[[[(3S,4S)-4-[(3-Hydroxyphenyl)methylamino]pyrrolidin-3-yl]-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]sulfonyl]benzamid (9)



Unter Verwendung der AAV1 mit 220 mg *tert*-Butyl-(3S,4S)-3-[[4-carbamoylphenyl]-sulfonyl]-[[4-(trifluoromethyl)-phenyl]methyl]amino]-4-[(3-hydroxyphenyl)methylamino]-pyrrolidin-1-carboxylat **130** (0.34 mmol) in 2 ml DCM, 2 ml EtOAc und 2 ml 2M HCl in Et₂O wurden 0.11 g (59%) von **9** in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

Ausbeute: 0.11 g (59%) (farbloser Feststoff)

Smp.: 133 °C (DCM/MeOH/NH₃(MeOH))

EA: C₂₆H₂₇F₃N₄O₄S*0.5H₂O (557.59 g/mol)

Ber.: C:56.01 H:5.06 N:10.05

Gef.: C:55.80 H:5.48 N:9.64

MS (ES+):

m/z (%) = 549 (100, [M+H]⁺), 1097 (14, [2M+H]⁺)

HRMS (ES+):

m/z berechnet für C₂₆H₂₈F₃N₄O₄S : 549.178337
 gefunden : 549.183294

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 399.79 MHz):

δ_H (ppm) = 9.25 s, 1H, OH-C-CH-CH-CH-C-CH
 8.20 brs, 1H, CONH₂

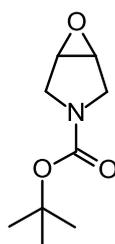
8.07	<i>d</i> , 2H, $^3J=8.5$ Hz, SO ₂ -C-CH-CH-C-C-NH ₂
7.98	<i>d</i> , 2H, $^3J=8.5$ Hz, SO ₂ -C-CH-CH-C-C-NH ₂
7.64	<i>d</i> , 3H, $^3J=8.2$ Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃ , CONH ₂
7.56	<i>d</i> , 2H, $^3J=8.2$ Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
7.05	<i>t</i> , 1H, $^3J=7.8$ Hz, OH-C-CH-CH-CH-C-CH
6.70	<i>t</i> , 1H, $^4J=1.8$ Hz, OH-C-CH-CH-CH-C-CH
6.64-6.59	<i>m</i> , 2H, OH-C-CH-CH-CH-C-CH
4.59	<i>d</i> , 1H, $^2J=17.4$ Hz, S-N-CH ₂ -Ar
4.42	<i>d</i> , 1H, $^2J=17.4$ Hz, S-N-CH ₂ -Ar
4.17	<i>ddd</i> , 1H, $^3J=7.8$ Hz, $^3J=5.3$ Hz, CH _(Pyrrolidin)
3.46	<i>d</i> , 1H, $^2J=13.3$ Hz, NH-CH ₂ -Ar
3.41	<i>d</i> , 1H, $^2J=13.5$ Hz, NH-CH ₂ -Ar
2.86-2.77	<i>m</i> , 2H, CH _(Pyrrolidin) , CH _{2(Pyrrolidin)}
2.72-2.65	<i>m</i> , 1H, CH _{2(Pyrrolidin)}
2.37-2.29	<i>m</i> , 1H, CH _{2(Pyrrolidin)}
2.18	<i>dd</i> , 1H, $^2J=11.3$ Hz, $^3J=5.4$ Hz, CH _{2(Pyrrolidin)}

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 100.53 MHz):

δ _C (ppm) = 166.4	<u>C</u> ONH ₂
157.4	OH- <u>C</u> -CH-CH-CH-C-CH
143.4	CH ₂ - <u>C</u> -CH-CH-C-CF ₃
141.0	SO ₂ - <u>C</u> -CH-CH-C-C-NH ₂
138.5	SO ₂ -C-CH-CH- <u>C</u> -C-NH ₂ , OH-C-CH-CH-CH- <u>C</u> -CH
129.0	OH-C-CH- <u>CH</u> -CH-C-CH
128.7	SO ₂ -C-CH- <u>CH</u> -C-C-NH ₂
127.9	CH ₂ -C- <u>CH</u> -CH-C-CF ₃
127.7	<i>q</i> , $^2J_{C,F}=32.8$ Hz, CH ₂ -C-CH-CH- <u>C</u> -CF ₃
127.2	SO ₂ -C- <u>CH</u> -CH-C-C-NH ₂
125.0	<i>q</i> , $^3J_{C,F}=2.9$ Hz, CH ₂ -C-CH- <u>CH</u> -C-CF ₃
124.3	<i>q</i> , $^1J_{C,F}=271.7$ Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C- <u>CF</u> ₃
118.4	OH-C-CH-CH- <u>CH</u> -C-CH
114.9	OH-C- <u>CH</u> -CH-CH-C-CH
113.9	OH-C-CH-CH-CH-C- <u>CH</u>
60.7	<u>CH</u> _(Pyrrolidin)
58.1	<u>CH</u> _(Pyrrolidin)
51.0	<u>CH</u> ₂

46.8	<u>C</u> H ₂
46.7	<u>C</u> H ₂
42.8	<u>C</u> H ₂

***tert*-Butyl-6-oxa-3-azabicyclo[3.1.0]hexan-3-carboxylat (**24**)**



0.61 g TPP (2.32 mmol) und 0.45 ml DIAD (2.32 mmol) wurden in 20 ml THF 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend auf 0 °C gekühlt. Zu dieser Lösung wurden 0.39 g *tert*-Butyl-(3*R*,4*R*)-3,4-dihydroxypyrrolidin-1-carboxylat **13** [52] (1.94 mmol) hinzu gegeben, langsam auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Im Anschluss wurde die Reaktion mit Wasser (20 ml) gestoppt, das THF am Rotavapor entfernt, mit EtOAc extrahiert (3 x 20 ml), mit gesättigter Kochsalzlösung (1 x 20 ml) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt. Aufreinigung mittels MPLC (Cyclohexan/EtOAc 1:1) ergab 0.21 g (59 %) von **24** in Form eines farblosen Öls.

Ausbeute: 0.21 g (59 %)

(farbloses Öl)

MS (ES+):

m/z (%) = 371 (30, [2*M*+*H*]⁺), 388 (46, [2*M*+*NH*₄]⁺), 393 (100, [2*M*+*Na*]⁺)

HRMS (EI+):

m/z	berechnet für C ₉ H ₁₅ N ₁ O ₃	:	185.1052
	gefunden	:	185.1050

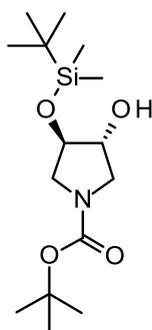
¹H-NMR (DCCl₃, 21.0 °C, 399.79 MHz):

δ_{H} (ppm) = 3.81	<i>d</i> , 1H, $^2J=12.8$ Hz, CH_2 (Pyrrolidin)
3.73	<i>d</i> , 1H, $^2J=12.8$ Hz, CH_2 (Pyrrolidin)
3.68-3.64	<i>sm</i> , 2H, CH (Pyrrolidin)
3.30	<i>ddd</i> , 2H, $^2J=12.8$ Hz, $^3J=5.8$ Hz, $^4J=0.9$ Hz, CH_2 (Pyrrolidin)
1.43	<i>s</i> , 9H, O-C-(CH_3) ₃

$^{13}\text{C-NMR}$ (DCCl_3 , 22.9 °C, 100.53 MHz, Rotamere):

δ_{C} (ppm) = 154.9	N- $\text{C}\text{OO-C}$
79.8	O- $\text{C}-(\text{CH}_3)_3$
55.7, 55.1	CH (Pyrrolidin)
47.4, 47.0	CH_2 (Pyrrolidin)
28.5	O-C-(CH_3) ₃

***tert*-Butyl-(3*R*,4*R*)-3-[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy-4-hydroxy-pyrrolidin-1-carboxylat (28)**



Zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung von 0.45 g *tert*-Butyl-(3*R*,4*R*)-3,4-dihydroxy-pyrrolidin-1-carboxylat **13** [52] (2.20 mmol) in 20 ml DCM wurden 0.22 g Imidazol (3.30 mmol) gegeben und anschließend eine Lösung von 0.33 g TBDMSCl (2.20 mmol) in 10 ml DCM über den Zeitraum von 20 Minuten hinzugegossen, weitere vier Stunden bei 0 °C und dann über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde eine gesättigte Lösung von NaHCO_3 zugegeben (50 ml) und mit DCM extrahiert (3 x 50 ml). Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NH_4Cl -Lösung (3 x 50 ml) und gesättigter Kochsalzlösung (1 x 50 ml) gewaschen,

über MgSO_4 getrocknet, filtriert und im Vakuum eingeeengt. Aufreinigung mittels MPLC (Cyclohexan/TBME 6:4) ergab 0.31 g (44 %) von **28** in Form eines farblosen Feststoffs.

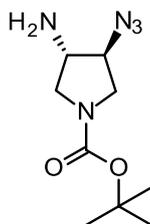
Ausbeute: 0.31 g (44 %)

(farbloses Pulver)

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DCCl}_3\text{-}d_6$, 30.0 °C, 399.79 MHz, Rotamere):

δ_{H} (ppm) = 4.11-4.02	<i>m</i> , 2H, $\text{CH}_{(\text{Pyrrolidin})}$
3.64-3.50	<i>sm</i> , 2H, $\text{CH}_2(\text{Pyrrolidin})$
3.38-3.17	<i>sm</i> , 2H, $\text{CH}_2(\text{Pyrrolidin})$
2.18	<i>psdd</i> , 1H, OH
1.45	<i>s</i> , 9H, $\text{O-C-(CH}_3)_3$
0.86	<i>s</i> , 9H, $\text{Si-C-(CH}_3)_3$
0.07	<i>psd</i> , 6H, $\text{Si-(CH}_3)_2$

***tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-amino-4-azido-pyrrolidin-1-carboxylat (**32**)**



Zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung von *tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3,4-diazidopyrrolidin-1-carboxylat **15** [52] (4.66 g, 18.4 mmol) in DCM (50 ml) unter Argon wurde TPP (4.35 g, 16.6 mmol) in DCM (75 ml) über die Zeit von 1 h hinzu getropft und die Reaktion 3.5 h bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde auf Raumtemperatur erwärmt, nochmals 1 h lang gerührt, das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt und danach 25 ml THF sowie 25 ml 28% NH_3 in H_2O zugegeben. Die Emulsion wurde 24 h bei Raumtemperatur intensiv gerührt. Im Anschluss wurden 5 ml Toluol zugesetzt und das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt. Aufreinigung mittels MPLC

(DCM/MeOH/NH₃(MeOH) 93:7:0.1) ergab 3.11 g (82%) von **32** in Form eines farblosen Feststoffs.

Ausbeute: 3.11 g (82%) (weißer Feststoff)

Smp.: 35 °C (DCM/MeOH/NH₃)

EA: C₉H₁₇N₅O₂ (227.26 g/mol)

Ber.: C: 47.56 H: 7.54 N: 30.82

Gef.: C: 47.82 H: 7.57 N: 30.91

MS (ES+):

m/z (%) = 250 (90, [M+Na]⁺), 282 (100), 477 (71, [2M+Na]⁺), 682 (84, [3M+H]⁺), 909 (31, [4M+H]⁺)

HRMS (ES+):

m/z berechnet für C₉H₁₇N₅O₂Na₁ : 250.127995

gefunden : 250.123978

IR (KBr):

ν (cm⁻¹) = 3372m, 2928s, 2108s (Azid), 1688s

¹H-NMR (DMSO-d₆, 30.0 °C, 500.16 MHz):

δ_{H} (ppm) = 3.83	<i>sm</i> , 1H, CH ₂ -CH-N ₃
3.59	<i>pstd</i> , 1H, ² J=11.5 Hz, ³ J=5.7 Hz, CH ₂ -CH-N ₃
3.39	<i>pstd</i> , 1H, ² J=10.4 Hz, ³ J=6.0 Hz, CH ₂ -CH-NH ₂
3.30	<i>sm</i> , 1H, CH ₂ -CH-NH ₂
3.13	<i>psdt</i> , 1H, ² J=10.6 Hz, ³ J=5.2 Hz, CH ₂ -CH-N ₃
2.97	<i>psdt</i> , 1H, ² J=10.9 Hz, ³ J=3.4 Hz, CH ₂ -CH-NH ₂
1.86	<i>s</i> , 2H, CH-NH ₂
1.39	<i>s</i> , 9H, O-C-(CH ₃) ₃

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 30.0 °C, 100.53 MHz, Rotamere):

δ_{C} (ppm) = 153.4	N-COO-C
78.5	O-C-(CH ₃) ₃
65.8, 65.0	CH ₂ -CH-N ₃
56.0, 55.1	CH ₂ -CH-NH ₂
52.0, 51.6	CH ₂ -CH-NH ₂

48.5, 48.2	$\underline{C}H_2-CH-N_3$
28.1	O-C-($\underline{C}H_3$) ₃

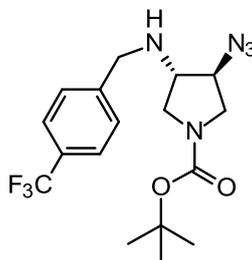
H,H-COSY (500.16 MHz : 500.16 MHz):

δ_H (ppm)	δ_H (ppm)
3.83	: 3.83, 3.59, 3.30, 3.13
3.59	: 3.83, 3.59, 3.13
3.39	: 3.39, 3.30, 2.97
3.30	: 3.83, 3.39, 3.30, 2.97
3.13	: 3.83, 3.59, 3.13
2.97	: 3.39, 3.30, 2.97

C,H-COSY (125.77 MHz : 500.16 MHz):

δ_C (ppm)	δ_H (ppm)
65.8, 65.0	: 3.83
56.0, 55.1	: 3.30
52.0, 51.6	: 3.39, 2.97
48.5, 48.2	: 3.59, 3.13
28.1	: 1.39

***tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-azido-4-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methylamino]pyrrolidin-1-carboxylat (33)**



Unter Verwendung der AAV8 wurden 2.00 g *tert*-Butyl (3*S*,4*S*)-3-amino-4-azido-pyrrolidin-1-carboxylat **32** (8.80 mmol) in 20 ml DMF mit 1.21 g K₂CO₃ (8.80 mmol) und 2.10 g 4-(Trifluoromethyl)benzylbromid (8.80 mmol) über Nacht gerührt. Auf-

reinigung mittels MPLC (DCM/EtOAc 9:1) ergab 2.72 g (80%) von **33** in Form eines blassgelben Öls.

Ausbeute: 2.72 g (80%) (blassgelbes Öl)

EA: C₁₇H₂₂F₃N₅O₂ (385.38 g/mol)

Ber.: C:52.98 H:5.75 N:18.17

Gef: C:53.06 H:5.85 N:17.96

MS (ES+):

m/z (%) = 231 (100), 386 (60, [M+H]⁺), 408 (18, [M+Na]⁺)

HRMS (ES+):

m/z berechnet für C₁₇H₂₃F₃N₅O₂ : 386.180385

gefunden : 386.179616

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 399.79 MHz, Rotamere):

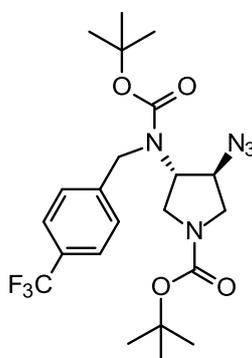
δ _H (ppm) = 7.67	<i>d</i> , 2H, ³ J=8.0 Hz, CF ₃ -C-CH-CH
7.57	<i>d</i> , 2H, ³ J=8.0 Hz, CF ₃ -C-CH-CH
4.09	<i>brs</i> , 1H, N ₃ -CH ₂ (Pyrrolidin)
3.84	<i>s</i> , 2H, CH ₂ -Ar
3.64-3.55	<i>sm</i> , 1H, CH ₂ (Pyrrolidin)
3.46-3.36	<i>sm</i> , 1H, CH ₂ (Pyrrolidin)
3.21-3.06	<i>m</i> , 3H, CH ₂ (Pyrrolidin), CH(Pyrrolidin)
2.78	<i>brs</i> , 1H, NH
1.39, 1.38	<i>psd</i> , 9H, O-C-(CH ₃) ₃

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 100.53 MHz, Rotamere):

δ _C (ppm) = 153.4	N-COO-C
145.64, 145.56	CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
128.5	CH ₂ -C-C-CH-CH-C-CF ₃
127.4	<i>q</i> , ² J _{C,F} =31.8 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
124.9	<i>q</i> , ³ J _{C,F} =2.9 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
124.4	<i>q</i> , ¹ J _{C,F} =273.6 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
78.6	O-C-(CH ₃) ₃

63.2, 62.5	$\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{(Pyrrolidin)}}$
61.6, 60.6	$\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{(Pyrrolidin)}}$
50.1	$\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-C-CH-CH-C-CF}_3$
49.9, 49.6	$\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{(Pyrrolidin)}$
48.7, 48.4	$\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{(Pyrrolidin)}$
28.0	$\text{O-C-(}\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$

***tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-azido-4-[[*tert*-butoxycarbonyl-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]amino]pyrrolidin-1-carboxylat (**34**)**



Tert-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-azido-4-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methylamino]pyrrolidin-1-carboxylat **33** (2.65 g, 6.88 mmol), Bocanhydrid (1.80 g, 8.26 mmol) und Iod (0.18 g, 0.69 mmol) wurden ohne Verwendung eines Lösungsmittels zusammen gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. 1 ml MeOH wurde zugegeben und nochmals 24 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde eine gesättigte Lösung von NaHS zugegeben (50 ml) und mit EtOAc extrahiert (3 x 50 ml), mit gesättigter Kochsalzlösung (1 x 50 ml) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt. Aufreinigung mittels MPLC (Cyclohexan/EtOAc 7:1) ergab 2.93 g (88%) von **34** in Form eines blassgelben Öls.

Ausbeute: 2.93 g (88%)

(blassgelbes Öl)

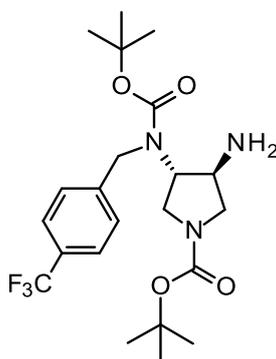
MS (ES⁺):

m/z (%) = 486 (100, [M+H]⁺), 503 (82, [M+NH₄]⁺), 508 (55, [M+Na]⁺)

HRMS (ES⁺):

m/z	berechnet für C ₂₂ H ₃₀ F ₃ N ₅ O ₄ Na :	508.214759
	gefunden :	508.218423

***tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-amino-4-[*tert*-butoxycarbonyl-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]amino]pyrrolidin-1-carboxylat (**35**)**



Tert-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-azido-4-[*tert*-butoxycarbonyl-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]-amino]pyrrolidin-1-carboxylat **34** (2.00 g, 4.12 mmol) wurde in 15 ml MeOH gelöst und mit 320 mg Pd/C versetzt. Unter H₂-Atmosphäre wurde der Ansatz 5 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Der Katalysator wurde durch Filtration über Celit abgetrennt, der Filterkuchen mit MeOH gewaschen (100 ml) und das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt. Nach Trocknung wurden so 1.72 g (91%) von **35** in Form eines farblosen Öls erhalten.

Ausbeute: 1.72 g (91%) (farbloses Öl)

EA: C₂₂H₃₂F₃N₃O₄ (459.50 g/mol)
 Ber.: C:57.50 H:7.02 N:9.14
 Gef: C:57.51 H:7.15 N:8.82

MS (ES⁺):

m/z (%) = 460 (100, [M+H]⁺)

HRMS (ES+):

m/z	berechnet für C ₂₂ H ₃₃ F ₃ N ₃ O ₄	:	460.242317
	gefunden	:	460.239094

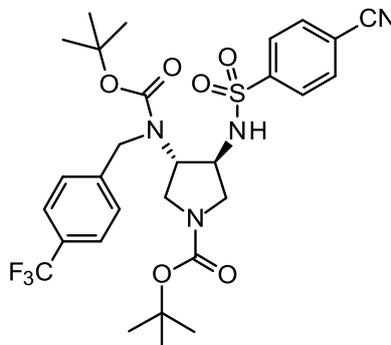
¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 399.79 MHz, Rotamere):

δ _H (ppm) =	7.70	<i>d</i> , 2H, ³ J=8.0 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
	7.48	<i>pst</i> , 2H, ³ J=7.7 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
	4.49	<i>s</i> , 2H, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
	4.12	<i>brs</i> , 1H, CH _(Pyrrolidin)
	3.51-3.31	<i>m</i> , 3H, CH ₂ (Pyrrolidin), CH _(Pyrrolidin)
	3.05	<i>psq</i> , 1H, J=10.3 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin)
	2.86-2.74	<i>sm</i> , 1H, CH ₂ (Pyrrolidin)
	1.57	<i>brs</i> , 2H, NH ₂
	1.36	<i>s</i> , 9H, O-C-(CH ₃) ₃
	1.34	<i>s</i> , 9H, O-C-(CH ₃) ₃

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 100.53 MHz, Rotamere):

δ _C (ppm) =	155.1	N-COO-C
	153.3	N-COO-C
	144.9	CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
	127.3	<i>q</i> , ² J _{C,F} =31.3 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
	127.2, 127.1	CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
	125.1	<i>q</i> , ³ J _{C,F} =2.9 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
	124.3	<i>q</i> , ¹ J _{C,F} =271.7 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
	79.5	O-C-(CH ₃) ₃
	78.3	O-C-(CH ₃) ₃
	63.3-60.6	CH _(Pyrrolidin)
	53.4-51.5	CH _(Pyrrolidin)
	51.9, 51.5	CH ₂ (Pyrrolidin)
	47.1	CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
	46.6-45.7	CH ₂ (Pyrrolidin)
	28.1	O-C-(CH ₃) ₃
	27.9	O-C-(CH ₃) ₃

***tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-[*tert*-butoxycarbonyl-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]amino]-4-[(4-cyanophenyl)-sulfonylamino]pyrrolidin-1-carboxylat (**36**)**



Unter Verwendung der AAV5 wurden 1.61 g *tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-amino-4-[*tert*-butoxycarbonyl-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]amino]pyrrolidin-1-carboxylat **35** (3.50 mmol) und 1.47 ml DIPEA (8.40 mmol) in 40 ml DCM mit 0.85 g 4-Cyanobenzoesulfonylchlorid (4.20 mmol) 2.5 h gerührt. Aufreinigung mittels MPLC nach Aufziehen auf Kieselgel (DCM/MeOH 98.5:1.5) ergab 2.08 g (95%) von **36** in Form eines farblosen Feststoffs.

Ausbeute: 2.08 g (95%) (farbloser Feststoff)

Smp.: 107 °C (DCM/MeOH)

EA: C₂₉H₃₅F₃N₄O₆S (624.67 g/mol)

Ber.: C:55.76 H:5.65 N:8.97

Gef.: C:55.79 H:5.84 N:8.99

MS (ES⁺):

m/z (%) = 231 (100), 642 (56, [M+NH₄]⁺), 647 (25, [M+Na]⁺)

HRMS (ES⁺):

m/z berechnet für C₂₉H₃₅F₃N₄O₆SNa : 647.212712
 gefunden : 647.215685

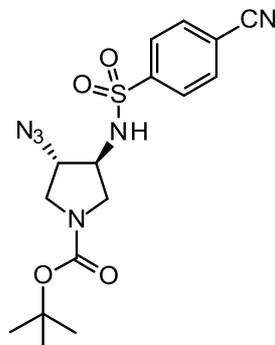
¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 399.79 MHz, Rotamere):

δ_{H} (ppm) = 8.44	<i>brs</i> , 1H, S-NH-CH
8.09	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> =8.0 Hz, SO ₂ -C-CH-CH-C-CN
7.95	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> =8.5 Hz, SO ₂ -C-CH-CH-C-CN
7.66	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> =8.2 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
7.33	<i>pst</i> , 2H, ³ <i>J</i> =8.8 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
4.40	<i>d</i> , 1H, ² <i>J</i> =16.7 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
4.33-3.99	<i>m</i> , 3H, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃ , CH(Pyrrolidin)
3.25-3.12	<i>m</i> , 2H, CH ₂ (Pyrrolidin)
3.07-2.91	<i>m</i> , 1H, CH ₂ (Pyrrolidin)
2.71	<i>pst</i> , 1H, <i>J</i> =9.2 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin)
1.27	<i>s</i> , 9H, O-C-(CH ₃) ₃
1.20	<i>brs</i> , 9H, O-C-(CH ₃) ₃

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 35.0 °C, 125.77 MHz, Rotamere):

δ_{C} (ppm) = 154.2	N-COO-C
153.0	N-COO-C
145.3	SO ₂ -C-CH-CH-C-CN
144.2	CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
133.4	SO ₂ -C-CH-CH-C-CN
127.5	<i>q</i> , ² <i>J</i> _{C,F} =31.2 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
127.1	CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃ , SO ₂ -C-CH-CH-C-CN
125.1	CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
124.2	<i>q</i> , ¹ <i>J</i> _{C,F} =272.3 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
117.5	SO ₂ -C-CH-CH-C-CN
114.9	SO ₂ -C-CH-CH-C-CN
80.0	O-C-(CH ₃) ₃
78.8	O-C-(CH ₃) ₃
48.7-47.5	CH ₂
27.9	O-C-(CH ₃) ₃
27.7	O-C-(CH ₃) ₃

(3*S*,4*S*)-*tert*-Butyl-3-azido-4-(4-cyanophenylsulfonamido)pyrrolidin-1-carboxylat
(39)



Unter Verwendung der AAV5 wurden 2.70 g *tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-amino-4-azido-pyrrolidin-1-carboxylat **32** (11.88 mmol) und 2.40 ml DIPEA (14.11 mmol) in 100 ml DCM mit 2.64 g 4-Cyanobenzenesulfonylchlorid (13.09 mmol) 4 h gerührt. Aufreinigung mittels MPLC (Cyclohexan/EtOAc 6:4 - 4:6) ergab 3.54 g (76%) von **39** in Form eines farblosen Feststoffs.

Ausbeute: 3.54 g (76%) (farbloser Feststoff)

Smp.: 66 °C (Cyclohexan/EtOAc)

EA: C₁₆H₂₀N₆O₄S (392.43 g/mol)

Ber.: C: 48.97 H: 5.14 N: 21.41

Gef.: C: 48.99 H: 5.29 N: 21.27

MS (ES+):

m/z (%) = 415 (90, [M+Na]⁺), 807 (100, [2M+Na]⁺), 1199 (61, [3M+Na]⁺)

HRMS (ES+):

m/z berechnet für C₁₆H₂₀N₆O₄SNa : 415.116445

gefunden : 415.115799

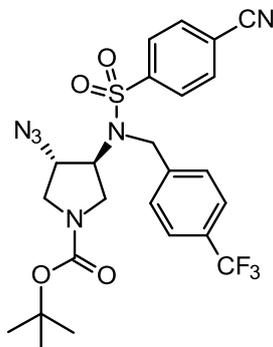
¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 399.79 MHz, Rotamere):

δ_{H} (ppm) = 8.64	s, 1H, S-N <u>H</u> -CH
8.12	d, 2H, $^3J=8.2$ Hz, SO ₂ -C-CH-CH <u>C</u> -CN
8.01	d, 2H, $^3J=8.5$ Hz, SO ₂ -C-CH-CH <u>C</u> -CN
4.02	ddd, 1H, $^3J=6.0$ Hz, N ₃ -CH <u>H</u> (Pyrrolidin)
3.70	dd, 1H, $^2J=12.4$ Hz, $^3J=6.0$ Hz, CH <u>2</u> (Pyrrolidin)
3.58	dd, 1H, $^2J=10.4$ Hz, $^3J=7.0$ Hz, CH <u>2</u> (Pyrrolidin)
3.30	dd, 1H, $^2J=10.5$ Hz, $^3J=7.6$ Hz, CH <u>2</u> (Pyrrolidin) (überlagert mit Wasser)
3.12-3.01	m, 1H, NH-CH <u>H</u> (Pyrrolidin)
2.92	dd, 1H, $^2J=11.2$ Hz, $^3J=5.5$ Hz, CH <u>2</u> (Pyrrolidin)
1.36, 1.35	psd, 9H, O-C-(CH <u>3</u>) ₃

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 100.53 MHz, Rotamere):

δ_{C} (ppm) = 153.0	N- <u>C</u> OO-C
144.9	SO ₂ - <u>C</u> -CH-CH-C-CN
133.5	SO ₂ -C-CH- <u>C</u> H-C-CN
127.2	SO ₂ -C- <u>C</u> H-CH-C-CN
117.6	SO ₂ -C-CH-CH-C- <u>C</u> N
115.1	SO ₂ -C-CH-CH- <u>C</u> -CN
79.0	O- <u>C</u> -(CH ₃) ₃
63.1, 62.5	N ₃ - <u>C</u> H(Pyrrolidin)
56.6, 55.9	NH- <u>C</u> H(Pyrrolidin)
48.9, 48.5	<u>C</u> H ₂ (Pyrrolidin)
48.0, 47.6	<u>C</u> H ₂ (Pyrrolidin)
28.0	O-C-(<u>C</u> H ₃) ₃

***tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-azido-4-[(4-cyanophenyl)-sulfonyl]-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]amino]-pyrrolidin-1-carboxylat (**40**)**



Unter Verwendung der AAV6 wurden 1.53 g (3*S*,4*S*)-*tert*-Butyl-3-azido-4-(4-cyanophenylsulfonylamido)pyrrolidin-1-carboxylat **39** (3.90 mmol), 1.91 g Cs₂CO₃ (5.86 mmol), eine katalytische Menge KI und 1.11 g 4-(Trifluoromethyl)benzylbromid (4.64 mmol) in 20 ml Aceton 2 h erhitzt. Aufreinigung mittels MPLC (Cyclohexan/EtOAc 6:4) ergab 1.98 g (91%) von **40** in Form eines farblosen Feststoffs.

Ausbeute: 1.98 g (91%) (farbloser Feststoff)

Smp.: 71 °C (Cyclohexan/EtOAc)

EA: C₂₄H₂₅F₃N₆O₄S (550.56 g/mol)

Ber.: C:52.36 H:4.58 N:15.26

Gef.: C:52.64 H:4.82 N:15.17

MS (ES+):

m/z (%) = 573 (100, [M+Na]⁺), 1123 (28, [2M+Na]⁺)

HRMS (ES+):

m/z berechnet für C₂₄H₂₅F₃N₆O₄SNa : 573.150780

gefunden : 573.147660

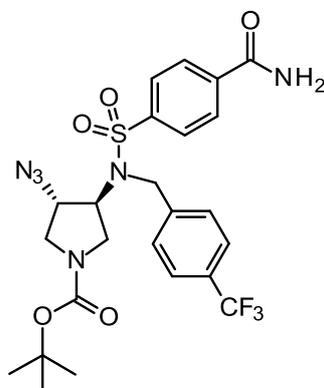
¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 399.79 MHz, Rotamere):

δ_{H} (ppm) = 8.14	<i>s</i> , 4H, SO ₂ -C- <u>CH</u> - <u>CH</u> -C-CN
7.74	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> =8.2 Hz, CH ₂ -C-CH- <u>CH</u> -C-CF ₃
7.64	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> =8.0 Hz, CH ₂ -C- <u>CH</u> -CH-C-CF ₃
4.80-4.57	<i>m</i> , 2H, <u>CH</u> ₂ -Ar
4.46	<i>ddd</i> , 1H, N ₃ - <u>CH</u> (Pyrrolidin)
4.05	<i>pstd</i> , 1H, <i>J</i> =15.9 Hz, <i>J</i> =7.6 Hz, <u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)
3.59	<i>dd</i> , 1H, ² <i>J</i> =10.4 Hz, ³ <i>J</i> =8.1 Hz, <u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)
3.20-3.00	<i>sm</i> , 1H, S-N- <u>CH</u> (Pyrrolidin)
3.00-2.77	<i>m</i> , 2H, <u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)
1.34, 1.30	<i>psd</i> , 9H, O-C-(<u>CH</u> ₃) ₃

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 100.53 MHz, Rotamere):

δ_{C} (ppm) = 152.9	N- <u>C</u> OO-C
143.3	SO ₂ - <u>C</u> -CH-CH-C-CN
142.8	CH ₂ - <u>C</u> -CH-CH-C-CF ₃
133.5	SO ₂ -C-CH- <u>CH</u> -C-CN
128.0	<i>q</i> , ² <i>J</i> _{C,F} =32.3 Hz, CH ₂ -C-CH-CH- <u>C</u> -CF ₃
127.9	CH ₂ -C- <u>CH</u> -CH-C-CF ₃
127.8	SO ₂ -C- <u>CH</u> -CH-C-CN
125.2	<i>q</i> , ³ <i>J</i> _{C,F} =3.9 Hz, CH ₂ -C-CH- <u>CH</u> -C-CF ₃
124.2	<i>q</i> , ¹ <i>J</i> _{C,F} =272.0 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C- <u>C</u> F ₃
117.4	SO ₂ -C-CH-CH-C- <u>C</u> N
115.7	SO ₂ -C-CH-CH- <u>C</u> -CN
79.0, 78.9	O- <u>C</u> -(CH ₃) ₃
60.4, 59.9	N ₃ - <u>CH</u> (Pyrrolidin)
59.2, 58.5	S-N- <u>CH</u> (Pyrrolidin)
47.4, 47.1	<u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)
46.7	<u>CH</u> ₂ -Ar
44.5, 43.9	<u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)
27.9, 27.8	O-C-(<u>CH</u> ₃) ₃

***tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-azido-4-[(4-carbamoylphenyl)-sulfonyl]-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]amino]-pyrrolidin-1-carboxylat (**41**)**



Unter Verwendung der AAV7 wurden 1.82 g *tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-azido-4-[(4-cyano-phenyl)-sulfonyl]-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]-methyl]amino]-pyrrolidin-1-carboxylat **40** (3.30 mmol), 0.24 g K₂CO₃ (1.70 mmol) und 8 ml 30% aq. H₂O₂ in 15 ml DMSO 0.5 h gerührt. Fällung mit 200 ml H₂O und weitere Aufarbeitung nach der AAV7 ergab 1.62 g (86%) von **41** in Form eines farblosen Feststoffs.

Ausbeute: 1.62 g (86%) (farbloser Feststoff)

Smp.: 104 °C (EtOAc)

EA: C₂₄H₂₇F₃N₆O₅S (568.57 g/mol)

Ber.: C:50.70 H:4.79 N:14.78

Gef: C:50.83 H:5.11 N:14.75

MS (ES+):

m/z (%) = 591 (100, [M+Na]⁺), 1159 (16, [2M+Na]⁺)

HRMS (ES+):

m/z berechnet für C₂₄H₂₇F₃N₆O₅SNa : 591.161345

gefunden : 591.160655

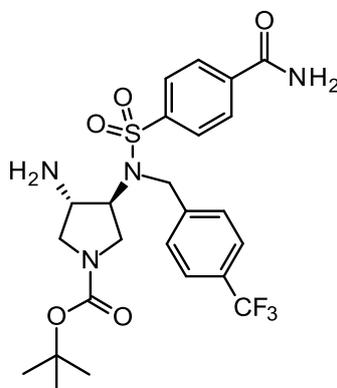
¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 399.79 MHz, Rotamere):

δ_{H} (ppm) = 8.22	<i>brs</i> , 1H, CON <u>H</u> ₂
8.10	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> =8.2 Hz, SO ₂ -C-CH-CH <u>C</u> -C-NH ₂
8.04	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> =8.2 Hz, SO ₂ -C-CH <u>C</u> -CH-C-C-NH ₂
7.75	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> =8.2 Hz, CH ₂ -C-CH-CH <u>C</u> -C-CF ₃
7.68	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> =8.2 Hz, CH ₂ -C-CH <u>C</u> -CH-C-CF ₃
7.64	<i>brs</i> , 1H, CON <u>H</u> ₂
4.74	<i>d</i> , 1H, ² <i>J</i> =17.4 Hz, CH <u>2</u> -Ar
4.65-4.53	<i>m</i> , 1H, CH <u>2</u> -Ar
4.50-4.33	<i>sm</i> , 1H, N ₃ -CH <u>C</u> (Pyrrolidin)
4.08-3.92	<i>sm</i> , 1H, CH <u>2</u> (Pyrrolidin)
3.58	<i>dd</i> , 1H, ³ <i>J</i> =10.4 Hz, ² <i>J</i> =8.2 Hz, CH <u>2</u> (Pyrrolidin)
3.16-2.98	<i>sm</i> , 1H, S-N-CH <u>C</u> (Pyrrolidin)
2.98-2.76	<i>m</i> , 2H, CH <u>2</u> (Pyrrolidin)
1.34, 1.28	<i>psd</i> , 9H, O-C-(CH <u>3</u>) ₃

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 100.53 MHz, Rotamere):

δ_{C} (ppm) = 166.4, 166.2	<u>C</u> ONH ₂
152.9	N- <u>C</u> OO-C
143.1	CH ₂ - <u>C</u> -CH-CH-C-CF ₃
141.4	SO ₂ - <u>C</u> -CH-CH-C-C-NH ₂
138.4	SO ₂ -C-CH-CH- <u>C</u> -C-NH ₂
128.5	SO ₂ -C-CH-CH- <u>C</u> -C-NH ₂
128.0	<i>q</i> , ² <i>J</i> _{C,F} =31.8 Hz, CH ₂ -C-CH-CH- <u>C</u> -CF ₃
127.9, 127.8	CH ₂ -C- <u>C</u> -CH-CH-C-CF ₃
127.2	SO ₂ -C- <u>C</u> -CH-CH-C-C-NH ₂
125.2	<i>q</i> , ³ <i>J</i> _{C,F} =2.9 Hz, CH ₂ -C-CH- <u>C</u> -C-CF ₃
124.2	<i>q</i> , ¹ <i>J</i> _{C,F} =272.0 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C- <u>C</u> F ₃
79.1, 78.9	O- <u>C</u> -(CH ₃) ₃
60.5, 59.9	N ₃ - <u>C</u> H(Pyrrolidin)
59.4, 58.7	S-N- <u>C</u> H(Pyrrolidin)
47.5, 47.1	<u>C</u> H ₂ (Pyrrolidin)
46.6	<u>C</u> H ₂ -Ar
44.3, 43.7	<u>C</u> H ₂ (Pyrrolidin)
27.9, 27.8	O-C-(<u>C</u> H ₃) ₃

***tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-amino-4-[(4-carbamoylphenyl)sulfonyl]-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]amino]pyrrolidine-1-carboxylat (**42**)**



Tert-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-amino-4-[(4-carbamoylphenyl)-sulfonyl]-[[4-(trifluoromethyl)-phenyl]-methyl]amino]-pyrrolidin-1-carboxylat **41** (3.35 g, 5.89 mmol) wurde unter Argon in DCM (60 ml) gelöst und auf 0 °C gekühlt. TPP (1.90 g, 7.25 mmol) wurde portionsweise hinzugegeben und die Reaktion 0.5 h bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde auf Raumtemperatur erwärmt und nochmal 5 h lang gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotavapor entfernt und danach 30 ml THF sowie 30 ml 28% NH₃ in H₂O zugegeben. Die Emulsion wurde 24 h bei 50 °C intensiv gerührt. Im Anschluss wurden 5 ml Toluol zugesetzt und das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt. Aufreinigung mittels MPLC (Hexan/DCM/MeOH 5:4.5:0.5 - 4:4.5:1.5) ergab 2.87 g (90%) von **42** in Form eines farblosen Feststoffs.

Ausbeute: 2.87 g (90%) (farbloser Feststoff)

Smp.: 233 °C (Hexan/DCM/MeOH)

EA: C₂₄H₂₉F₃N₄O₅S (542.57 g/mol)

Ber.: C:53.13 H:5.39 N:10.33

Gef: C:53.25 H:5.50 N:10.22

MS (ES+):

m/z (%) = 543 (100, [M+H]⁺)

HRMS (ES+):

m/z	berechnet für C ₂₄ H ₃₀ F ₃ N ₄ O ₅ S	:	543.188902
	gefunden	:	543.184971

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 399.79 MHz, Rotamere):

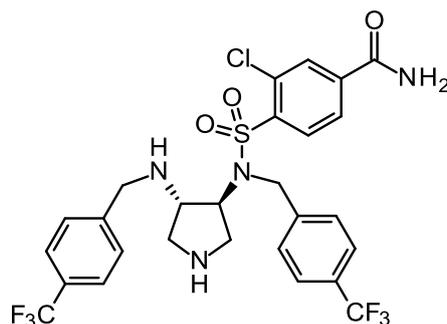
δ _H (ppm) =	8.21, 8.20	<i>brpsd</i> , 1H, CONH ₂
	8.07	<i>d</i> , 2H, ³ J=8.5 Hz, SO ₂ -C-CH-CH-C-C-NH ₂
	8.01	<i>d</i> , 2H, ³ J=8.0 Hz, SO ₂ -C-CH-CH-C-C-NH ₂
	7.72	<i>d</i> , 2H, ³ J=8.7 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
	7.69	<i>d</i> , 2H, ³ J=8.9 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
	7.62	<i>brs</i> , 1H, CONH ₂
	4.71-4.48	<i>sm</i> , 2H, CH ₂ -Ar
	4.17-4.01	<i>sm</i> , 1H, CH _(Pyrrolidin)
	3.40-3.30	<i>m</i> , 1H, CH _(Pyrrolidin)
	3.21-3.00	<i>m</i> , 2H, CH ₂ (Pyrrolidin)
	2.84-2.68	<i>sm</i> , 2H, CH ₂ (Pyrrolidin)
	1.61	<i>brs</i> , 2H, NH ₂
	1.33, 1.27	<i>psd</i> , 9H, O-C-(CH ₃) ₃

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 100.53 MHz, Rotamere):

δ _C (ppm) =	166.5, 166.4	<u>C</u> ONH ₂
	153.1, 153.0	N- <u>C</u> OO-C
	143.7	CH ₂ - <u>C</u> -CH-CH-C-CF ₃
	141.8	SO ₂ - <u>C</u> -CH-CH-C-C-NH ₂
	138.2	SO ₂ -C-CH-CH- <u>C</u> -C-NH ₂
	128.4	SO ₂ -C-CH- <u>CH</u> -C-C-NH ₂
	128.0, 127.9	CH ₂ -C- <u>CH</u> -CH-C-CF ₃
	127.8	<i>q</i> , ² J _{C,F} =31.8Hz, CH ₂ -C-CH-CH- <u>C</u> -CF ₃
	127.0	SO ₂ -C- <u>CH</u> -CH-C-C-NH ₂
	125.1	<i>q</i> , ³ J _{C,F} =3.9 Hz, CH ₂ -C-CH- <u>CH</u> -C-CF ₃
	124.3	<i>q</i> , ¹ J _{C,F} =272.0 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C- <u>CF</u> ₃
	78.5, 78.4	O- <u>C</u> -(CH ₃) ₃
	63.2, 62.6	<u>CH</u> (Pyrrolidin)
	52.3, 51.6	<u>CH</u> (Pyrrolidin)
	51.0, 50.6	<u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)
	46.6	CH ₂ -Ar

45.9, 45.2	$\underline{\text{C}}\text{H}_2(\text{Pyrrolidin})$
28.0, 27.9	$\text{O}-\text{C}-\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$

3-Chloro-4-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl-[(3S,4S)-4-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methylamino]pyrrolidin-3-yl]sulfamoyl]benzamid (45)



Unter Verwendung der AAV7 wurden 0.40 g *tert*-Butyl-(3S,4S)-3-[*tert*-butoxycarbonyl-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]amino]-4-[(2-chloro-4-cyano-phenyl)-sulfonyl-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]amino]pyrrolidin-1-carboxylat **47** (0.49 mmol) in 30 ml DMSO mit 34 mg K_2CO_3 (0.22 mmol) und 3 ml 30% aq. H_2O_2 1 h gerührt. Nach der gemäß AAV7 durchgeführten Aufreinigung wurde ein weißer Feststoff erhalten, welcher direkt nach der AAV1 unter Verwendung von 2 ml EtOAc und 2 ml 2M HCl in Et_2O weiter umgesetzt wurde. Die Ausbeute von **45** über beide Stufen betrug 57 mg (18%).

Ausbeute: 57 mg (18%) (farbloser Feststoff)

Smp.: 87 °C (DCM/MeOH/ $\text{NH}_3(\text{MeOH})$)

EA: $\text{C}_{27}\text{H}_{25}\text{ClF}_6\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$ (635.02 g/mol)

Ber.: C:51.07 H:3.97 N:8.82

Gef.: C:50.68 H:4.27 N:8.69

MS (ES+):

m/z (%) = 635 (88, $[M+H]^+$)

HRMS (ES+):

m/z	berechnet für C ₂₇ H ₂₆ ClF ₆ N ₄ O ₃ S:	635.131835
	gefunden	: 635.132999

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 399.79 MHz):

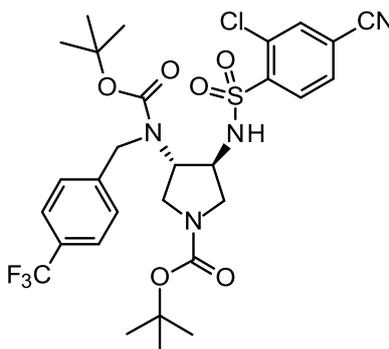
δ _H (ppm) =	8.25	<i>brs</i> , 1H, CONH ₂
	8.14	<i>d</i> , 1H, ³ <i>J</i> =8.3 Hz, SO ₂ -C-CH-CH-C-CH-C-Cl
	8.12	<i>d</i> , 1H, ⁴ <i>J</i> =1.6 Hz, SO ₂ -C-CH-CH-C-CH-C-Cl
	7.95	<i>dd</i> , 1H, ³ <i>J</i> =8.2 Hz, ⁴ <i>J</i> =1.6 Hz, SO ₂ -C-CH-CH-C-CH-C-Cl
	7.74	<i>brs</i> , 1H, CONH ₂
	7.63	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> =8.0 Hz, NH-CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
	7.57	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> =8.5 Hz, S-N-CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
	7.53	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> =8.5 Hz, NH-CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
	7.41	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> =8.0 Hz, S-N-CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
	4.84	<i>d</i> , 1H, ² <i>J</i> =17.4 Hz, S-N-CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
	4.68	<i>d</i> , 1H, ² <i>J</i> =17.6 Hz, S-N-CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
	4.01	<i>ddd</i> , 1H, ³ <i>J</i> =7.6 Hz, ³ <i>J</i> =6.0 Hz, S-N-CH ₂ (Pyrrolidin)
	3.66	<i>d</i> , 1H, ² <i>J</i> =14.4 Hz, NH-CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
	3.53	<i>d</i> , 1H, ² <i>J</i> =14.4 Hz, NH-CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
	2.89	<i>ddd</i> , 1H, ³ <i>J</i> =5.7 Hz, NH-CH ₂ (Pyrrolidin)
	2.80	<i>dd</i> , 1H, ² <i>J</i> =10.5 Hz, ³ <i>J</i> =6.6 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin)
	2.70	<i>dd</i> , 1H, ² <i>J</i> =11.5 Hz, ³ <i>J</i> =8.2 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin)
	2.59-2.49	1H, NH ₂ (Pyrrolidin) (überlagert mit DMSO- <i>d</i> ₆)
	2.55-2.46	1H, CH ₂ (Pyrrolidin) (überlagert mit DMSO- <i>d</i> ₆)
	2.38	<i>dd</i> , 1H, ² <i>J</i> =10.7 Hz, ³ <i>J</i> =5.8 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin)
	2.24	<i>brs</i> , 1H, NH-CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 22.8 °C, 100.53 MHz):

δ _C (ppm) =	165.2	C=O
	145.5	S-N-CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
	143.8	NH-CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
	139.5	SO ₂ -C-CH-CH-C-CH-C-Cl
	139.2	SO ₂ -C-CH-CH-C-CH-C-Cl
	132.2	SO ₂ -C-CH-CH-C-CH-C-Cl
	130.8	SO ₂ -C-CH-CH-C-CH-C-Cl
	128.4	SO ₂ -C-CH-CH-C-CH-C-Cl

127.7	$q, {}^2J_{C,F}=32.8$ Hz, CH ₂ -C-CH-CH- <u>C</u> -CF ₃
127.6	CH ₂ -C- <u>C</u> H-CH-C-CF ₃
127.0	$q, {}^2J_{C,F}=31.8$ Hz, CH ₂ -C-CH-CH- <u>C</u> -CF ₃
126.8	CH ₂ -C- <u>C</u> H-CH-C-CF ₃
125.0	$q, {}^3J_{C,F}=2.9$ Hz, CH ₂ -C-CH- <u>C</u> H-C-CF ₃
124.9	$q, {}^3J_{C,F}=3.9$ Hz, CH ₂ -C-CH- <u>C</u> H-C-CF ₃
124.4	$q, {}^1J_{C,F}=271.7$ Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C- <u>C</u> F ₃
124.2	$q, {}^1J_{C,F}=271.7$ Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C- <u>C</u> F ₃
64.7	S-N- <u>CH</u> (Pyrrolidin)
60.7	NH- <u>CH</u> (Pyrrolidin)
51.7	S-N- <u>CH</u> ₂ -Ar
50.3	NH- <u>CH</u> ₂ -Ar
48.5	<u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)
48.1	<u>C</u> H ₂ (Pyrrolidin)

***tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-[*tert*-butoxycarbonyl-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]amino]-4-[(2-chloro-4-cyano-phenyl)-sulfonylamino]pyrrolidin-1-carboxylat (46)**



Unter Verwendung der AAV5 wurden 0.60 g *tert*-butyl-(3*S*,4*S*)-3-amino-4-[*tert*-butoxycarbonyl-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]amino]pyrrolidin-1-carboxylat **35** (1.30 mmol) und 0.32 ml DIPEA (1.82 mmol) in 20 ml DCM mit 0.37 g 4-(2-chloro-4-cyano-benzenesulfonyl)chlorid (1.57 mmol) 2.5 h gerührt. Aufreinigung mittels MPLC

nach Aufziehen auf Kieselgel (DCM/MeOH 100:0 - 97:3) ergab 0.64 g (75%) von **46** in Form eines farblosen Feststoffs.

Ausbeute: 0.64 g (75%) (farbloser Feststoff)

Smp.: 118 °C (DCM/MeOH)

EA: C₂₉H₃₄ClF₃N₄O₆S (659.12 g/mol)

Ber.: C:52.85 H:5.20 N:8.50

Gef.: C:52.84 H:5.36 N:8.30

MS (ES+):

m/z (%) = 676 (100, [M^{35Cl}+NH₄]⁺), 681 (21, [M+Na]⁺)

HRMS (EI+):

m/z berechnet für C₂₅H₂₅ClF₃N₄O₆S [M-C₄H₉]⁺ : 601.113544

gefunden : 601.110268

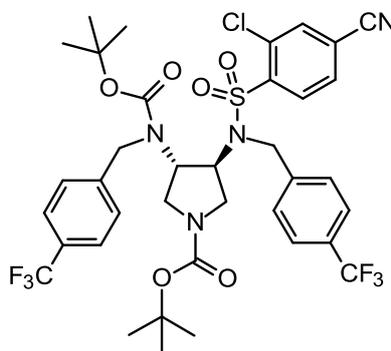
¹H-NMR (DMSO-d₆, 30.0 °C, 399.79 MHz, Rotamere):

δ _H (ppm) = 8.72	<i>brs</i> , 1H, S-NH-CH
8.36	<i>s</i> , 1H, SO ₂ -C-CH-CH-C-CH-C-Cl
8.16	<i>d</i> , 1H, ³ J=8.0 Hz, SO ₂ -C-CH-CH-CH-C-CH-C-Cl
8.08	<i>d</i> , 1H, ³ J=8.2 Hz, SO ₂ -C-CH-CH-CH-C-CH-C-Cl
7.69	<i>d</i> , 2H, ³ J=8.2 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
7.33	<i>brs</i> , 2H, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
4.42	<i>brs</i> , 1H, CH ₂ (Pyrrolidin)
4.28	<i>brs</i> , 2H, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
4.19	<i>ddd</i> , 1H, ³ J=7.8 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin)
3.35	<i>psq</i> , 1H, J=10.1 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin)
3.22	<i>brs</i> , 1H, CH ₂ (Pyrrolidin)
3.04	<i>psd</i> , 1H, J=9.2 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin)
2.92	<i>psd</i> , 1H, J=8.7 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin)
1.33, 1.30	<i>psd</i> , 9H, O-C-(CH ₃) ₃
1.23	<i>brs</i> , 9H, O-C-(CH ₃) ₃

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 30.0 °C, 100.53 MHz, Rotamere):

δ_C (ppm) =	154.1	N-COO-C
	153.0	N-COO-C
	142.3	CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃ , SO ₂ -C-CH-CH-C-CH-C-Cl
	135.2	SO ₂ -C-CH-CH-C-CH-C-Cl
	131.8	SO ₂ -C-CH-CH-C-CH-C-Cl
	131.6	SO ₂ -C-CH-CH-C-CH-C-Cl
	131.1	SO ₂ -C-CH-CH-C-CH-C-Cl
	127.8-126.7	CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
	125.2	CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
	124.2	q , $^1J_{C,F}=271.7$ Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
	116.45	NC-C
	116.39	NC-C
	79.9	O-C-(CH ₃) ₃
	78.9	O-C-(CH ₃) ₃
	49.7-47.1	CH ₂
	27.9	O-C-(CH ₃) ₃
	27.7	O-C-(CH ₃) ₃

***tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-[*tert*-butoxycarbonyl-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]-methyl]amino]-4-[(2-chloro-4-cyano-phenyl)sulfonyl]-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]amino]pyrrolidin-1-carboxylat (**47**)**



Unter Verwendung der AAV6 wurden 0.50 g *tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-[*tert*-butoxycarbonyl-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]amino]-4-[(2-chloro-4-cyano-phenyl)sulfonylamino]-pyrrolidin-1-carboxylat **46** (0.76 mmol), 0.37 g Cs₂CO₃ (1.14 mmol)

und 217 mg 1-Bromo-1-(bromomethyl)-4-(trifluoromethyl)benzen (0.91 mmol) in 10 ml MeCN 2 h erhitzt. Aufreinigung mittels MPLC (Cyclohexan/EtOAc 100:0 - 70:30) ergab 0.53 g (85%) von **47** in Form eines farblosen Feststoffs.

Ausbeute: 0.53 g (85%) (farbloser Feststoff)

Smp.: 116 °C (Cyclohexan/EtOAc)

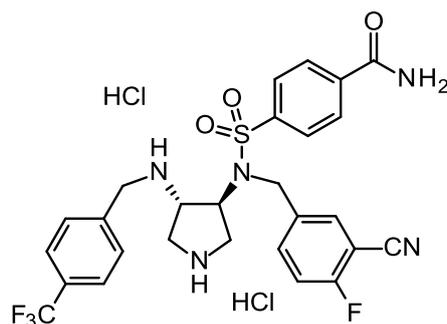
MS (ES+):

m/z (%) = 817 (22, $[M^{35Cl}+H]^+$), 834 (100, $[M^{35Cl}+NH_4]^+$), 839 (45, $[M^{35Cl}+Na]^+$)

HRMS (ES+):

m/z berechnet für $C_{37}H_{39}ClF_6N_4O_6SNa$: 839.208074
 gefunden : 839.201462

**4-[(3-Cyano-4-fluoro-phenyl)methyl]-[(3S,4S)-4-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methylamino]pyrrolidin-3-yl]sulfamoyl]benzamid
 Dihydrochlorid (**48**)**



Unter Verwendung der AAV2 mit 240 mg *tert*-Butyl-(3S,4S)-3-[*tert*-butoxycarbonyl-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]amino]-4-[(4-carbamoylphenyl)sulfonyl]-[(3-cyano-4-fluoro-phenyl)methyl]amino]pyrrolidin-1-carboxylat **50** (0.31 mmol), 2 ml DCM und 2 ml 2M HCl in Et₂O wurden 159 mg (79%) von **48** in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

Ausbeute: 159 mg (79%) (farbloser Feststoff)

Smp.: 181 °C (DCM/EtOAc/Et₂O)

EA: C₂₇H₂₅F₄N₅O₃S*2HCl*1H₂O (666.51 g/mol)

Ber.: C:48.65 H:4.39 N:10.51

Gef.: C:48.95 H:4.58 N:10.29

MS (ES+):

m/z (%) = 576 (100, [M+H]⁺)

HRMS (ES+):

m/z berechnet für C₂₇H₂₆F₄N₅O₃S : 576.169250

gefunden : 576.167374

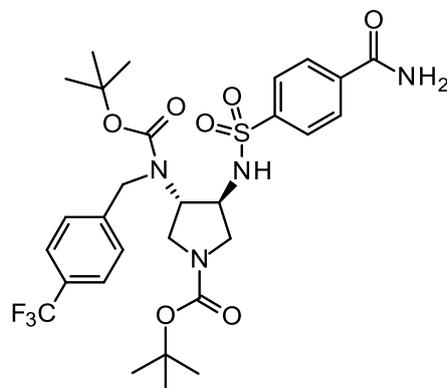
¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 500.16 MHz):

δ _H (ppm) = 10.73	<i>brs</i> , 2H, NH ₂ ⁺
10.31	<i>brs</i> , 1H, NH ₂ ⁺
9.59	<i>brs</i> , 1H, NH ₂ ⁺
8.28	<i>brs</i> , 1H, CONH ₂
8.14	<i>d</i> , 2H, ³ J=8.3 Hz, SO ₂ -C-CH-CH-C-C-NH ₂
8.03	<i>d</i> , 2H, ³ J=8.3 Hz, SO ₂ -C-CH-CH-C-C-NH ₂
8.02	<i>brs</i> , 1H, F-C-CH-CH-C-CH-C-CN
7.89-7.83	<i>m</i> , 1H, F-C-CH-CH-C-CH-C-CN
7.74	<i>d</i> , 2H, ³ J=7.7 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
7.68	<i>brs</i> , 3H, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃ , CONH ₂
7.47	<i>dd</i> , 1H, ³ J _{H,H} =8.9 Hz, ³ J _{H,F} =8.9 Hz, F-C-CH-CH-C-CH-C-C-N
5.33	<i>brs</i> , 1H, NH ₂ ⁺ -CH ₂ (Pyrrolidin)
4.68	<i>d</i> , 1H, ² J=17.2 Hz, S-N-CH ₂ -Ar
4.61	<i>d</i> , 1H, ² J=17.2 Hz, S-N-CH ₂ -Ar
4.14	<i>brs</i> , 2H, S-N-CH ₂ (Pyrrolidin), NH ₂ ⁺ -CH ₂ -Ar
3.63	<i>brs</i> , 2H, NH ₂ ⁺ -CH ₂ -Ar, CH ₂ (Pyrrolidin)
3.45	<i>brs</i> , 1H, CH ₂ (Pyrrolidin)
3.17	<i>dd</i> , 1H, ² J=11.6 Hz, ³ J=10.3 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin)
2.81	<i>dd</i> , 1H, ² J=11.6 Hz, ³ J=6.7 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin)

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

δ_{C} (ppm) = 166.2	$\underline{\text{C}}\text{NH}_2$
161.6	$d, {}^1J_{\text{C,F}}=255.5$ Hz, F- $\underline{\text{C}}$ -CH-CH-C-CH-C-CN
139.7	CH ₂ - $\underline{\text{C}}$ -CH-CH-C-CF ₃ , SO ₂ - $\underline{\text{C}}$ -CH-CH-C-C-NH ₂
138.9	SO ₂ -C-CH-CH- $\underline{\text{C}}$ -C-NH ₂
135.31	$d, {}^3J_{\text{C,F}}=8.4$ Hz, F-C-CH- $\underline{\text{C}}$ H-C-CH-C-CN
135.1	F-C-CH-CH- $\underline{\text{C}}$ -CH-C-CN
132.8	F-C-CH-CH-C- $\underline{\text{C}}$ H-C-CN
130.7	SO ₂ -C-CH- $\underline{\text{C}}$ H-C-C-NH ₂
128.9	CH ₂ -C- $\underline{\text{C}}$ H-CH- $\underline{\text{C}}$ -CF ₃
127.5	SO ₂ -C- $\underline{\text{C}}$ H-CH-C-C-NH ₂
125.3	$q, {}^3J_{\text{C,F}}=3.6$ Hz, CH ₂ -C-CH- $\underline{\text{C}}$ H-C-CF ₃
123.9	$q, {}^1J_{\text{C,F}}=272.3$ Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C- $\underline{\text{C}}$ F ₃
116.4	$d, {}^2J_{\text{C,F}}=19.2$ Hz, F-C- $\underline{\text{C}}$ H-CH-C-CH-C-CN
113.9	F-C-CH-CH-C-CH-C- $\underline{\text{C}}$ N
99.9	$d, {}^2J_{\text{C,F}}=15.6$ Hz, F-C-CH-CH-C-CH- $\underline{\text{C}}$ -CN
58.9	NH ₂ ⁺ - $\underline{\text{C}}$ H _(Pyrrolidin)
56.8	S-N- $\underline{\text{C}}$ H _(Pyrrolidin)
48.4	$\underline{\text{C}}$ H _{2(Pyrrolidin)}
46.4	$\underline{\text{C}}$ H _{2(Pyrrolidin)}
44.8	NH ₂ ⁺ -CH ₂ -Ar
43.9	S-N- $\underline{\text{C}}$ H ₂ -Ar

***tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-[*tert*-butoxycarbonyl-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]amino]-4-[(4-carbamoylphenyl)sulfonylamino]pyrrolidin-1-carboxylat (**49**)**



Unter Verwendung der AAV7 wurden 0.50 g *tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-[*tert*-butoxycarbonyl-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]amino]-4-[(4-cyanophenyl)sulfonylamino]pyrrolidin-1-carboxylat **35** (0.80 mmol), 55 mg K₂CO₃ (0.40 mmol) und 4 ml 30% aq. H₂O₂ in 16 ml DMSO 2 h gerührt. Aufarbeitung nach AAV7 ergab 0.51 g (94%) von **49** in Form eines farblosen Feststoffs.

Ausbeute: 0.51 g (94%) (farbloser Feststoff)

Smp.: 125 °C (EtOAc)

EA: C₂₉H₃₇F₃N₄O₇S (642.69 g/mol)

Ber.: C:54.20 H:5.80 N:8.72

Gef.: C:53.99 H:6.02 N:8.69

MS (ES+):

m/z (%) = 543 (100, [*M*-*boc*+*H*]⁺), 643 (21, [*M*+*H*]⁺), 660 (29, [*M*+*NH*₄]⁺), 665 (35, [*M*+*Na*]⁺)

HRMS (ES+):

m/z berechnet für C₂₉H₃₇F₃N₄O₇SNa : 665.223276

gefunden : 665.220674

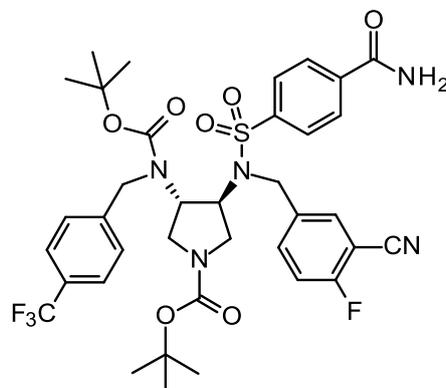
¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 500.16 MHz, Rotamere):

δ _H (ppm) = 8.24	<i>brs</i> , 1H, S-N <u>H</u> -CH
8.16	<i>brs</i> , 1H, CON <u>H</u> ₂
8.08	<i>pst</i> , 2H, ³ <i>J</i> =6.0 Hz, SO ₂ -C-CH- <u>CH</u> -C-C-NH ₂
7.88	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> =8.6 Hz, SO ₂ -C- <u>CH</u> -CH-C-C-NH ₂
7.68	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> =8.3 Hz, CH ₂ -C-CH- <u>CH</u> -C-CF ₃
7.58	<i>brs</i> , 1H, CON <u>H</u> ₂
7.38	<i>d</i> , 1H, ³ <i>J</i> =7.5 Hz, CH ₂ -C- <u>CH</u> -CH-C-CF ₃
7.34	<i>d</i> , 1H, ³ <i>J</i> =7.5 Hz, CH ₂ -C- <u>CH</u> -CH-C-CF ₃
4.54-4.01	<i>m</i> , 2H + 2H, <u>CH</u> ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃ , Pyrrolidin- <u>H</u>
3.28-2.97	<i>m</i> , 3H, Pyrrolidin- <u>H</u>
2.73	<i>sm</i> , 1H, <u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)
1.29	<i>s</i> , 9H, O-C-(<u>CH</u> ₃) ₃
1.23	<i>brs</i> , 9H, O-C-(<u>CH</u> ₃) ₃

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

δ _C (ppm) = 166.5, 166.3	<u>C</u> ONH ₂
154.3	N- <u>C</u> OO-C
153.0	N- <u>C</u> OO-C
143.4	CH ₂ - <u>C</u> -CH-CH-C-CF ₃ , SO ₂ - <u>C</u> -CH-CH-C-C-NH ₂
137.7	SO ₂ -C-CH-CH- <u>C</u> -C-NH ₂
128.4	SO ₂ -C-CH- <u>CH</u> -C-C-NH ₂
127.4	<i>q</i> , ² <i>J</i> _{C,F} =32.4Hz, CH ₂ -C-CH-CH- <u>C</u> -CF ₃
127.1	CH ₂ -C- <u>CH</u> -CH-C-CF ₃
126.3	SO ₂ -C- <u>CH</u> -CH-C-C-NH ₂
125.1	CH ₂ -C-CH- <u>CH</u> -C-CF ₃
124.3	<i>q</i> , ¹ <i>J</i> _{C,F} =273.5 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C- <u>C</u> F ₃
78.8	O- <u>C</u> -(CH ₃) ₃
48.5	<u>CH</u> ₂
48.2	<u>CH</u> ₂
47.6	<u>CH</u> ₂
27.9	O-C-(<u>CH</u> ₃) ₃
27.7	O-C-(<u>CH</u> ₃) ₃

***tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-[*tert*-butoxycarbonyl-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]amino]-4-[(4-carbamoylphenyl)sulfonyl-[(3-cyano-4-fluoro-phenyl)methyl]amino]pyrrolidin-1-carboxylat (**50**)**



Unter Verwendung der AAV6 wurden 0.40 g *tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-[*tert*-butoxycarbonyl-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]amino]-4-[(4-carbamoylphenyl)sulfonyl-amino]-pyrrolidin-1-carboxylat **49** (0.62 mmol), 0.30 g Cs₂CO₃ (0.93 mmol) und 0.16 g 5-(Bromomethyl)-2-fluoro-benzonitril (0.74 mmol) in 10 ml MeCN 2.5 h erhitzt. Aufreinigung mittels MPLC (DCM/MeOH 98:2 - 96:4) ergab 0.35 g (73%) von **50** in Form eines farblosen Feststoffs.

Ausbeute: 0.35 g (73%) (farbloser Feststoff)

Smp.: 125 °C (DCM/MeOH)

EA: C₃₇H₄₁F₄N₅O₇S (775.81 g/mol)

Ber.: C:57.28 H:5.33 N:9.03

Gef.: C:57.14 H:5.38 N:9.00

MS (ES⁺):

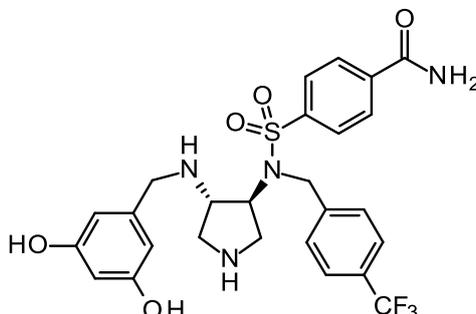
m/z (%) = 776 (5, [M+H]⁺), 793 (100, [M+NH₄]⁺), 798 (65, [M+Na]⁺)

HRMS (ES⁺):

m/z berechnet für C₃₇H₄₁F₄N₅O₇SNa : 798.256054

gefunden : 798.253588

4-[[[(3S,4S)-4-[(3,5-Dihydroxyphenyl)methylamino]pyrrolidin-3-yl]-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]sulfamoyl]benzamid (51)



Unter Verwendung der AAV3 wurden 0.40 g (0.74mmol) *tert*-Butyl-(3S,4S)-3-amino-4-[(4-carbamoylphenyl)sulfonyl]-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]-methyl]amino]pyrrolidin-1-carboxylat **42** in 10 ml MeOH mit 0.19 g Molsieb und 0.43 g 3,5-Dihydroxybenzaldehyd (3.10 mmol) 2 h und anschließend mit 0.17 g NaBH₄ (4.50 mmol) 1 h gerührt. Aufreinigung mittels MPLC (DCM/MeOH 95:5 - 90:10) ergab 0.26 g eines farblosen Feststoffs, der direkt weiter umgesetzt wurde.

Unter Verwendung der AAV1 wurde dieser Feststoff in 6 ml EtOAc und 4 ml 2M HCl in Et₂O umgesetzt und so über zwei Stufen 0.11 g (26%) von **51** in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

Ausbeute: 0.11 g (26%) (farbloser Feststoff)

Smp.: 155 °C (DCM/MeOH/NH₃(MeOH))

EA: C₂₆H₂₇F₃N₄O₅S*0.5H₂O (573.59 g/mol)

Ber.: C:54.44 H:4.92 N:9.77

Gef: C:54.44 H:5.00 N:9.72

MS (ES+):

m/z (%) = 565 (100, [M+H]⁺), 587 (15, [M+Na]⁺)

HRMS (ES+):

m/z	berechnet für C ₂₆ H ₂₈ F ₃ N ₄ O ₅ S	:	565.173252
	gefunden	:	565.176138

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 399.79 MHz):

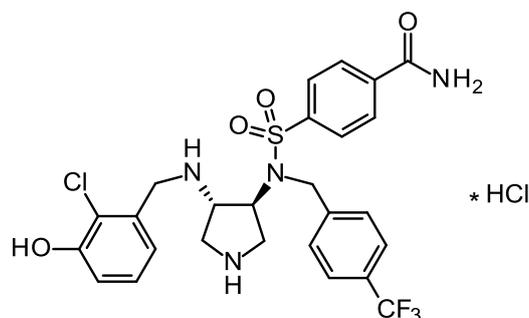
δ _H (ppm) =	9.07	<i>brs</i> , 2H, OH
	8.19	<i>brs</i> , 1H, CONH ₂
	8.07	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> =8.5 Hz, SO ₂ -C-CH-CH-C-C-NH ₂
	7.98	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> =8.7 Hz, SO ₂ -C-CH-CH-C-C-NH ₂
	7.66	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> =8.2 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
	7.63	<i>brs</i> , 1H, CONH ₂
	7.56	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> =8.2 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
	6.16	<i>d</i> , 2H, ⁴ <i>J</i> =2.3 Hz, HO-C-CH-C-CH-C-OH
	6.09	<i>t</i> , 1H, ⁴ <i>J</i> =2.2 Hz, HO-C-CH-C-OH
	4.57	<i>d</i> , 1H, ² <i>J</i> =17.6 Hz, S-N-CH ₂ -Ar
	4.41	<i>d</i> , 1H, ² <i>J</i> =17.6 Hz, S-N-CH ₂ -Ar
	4.16	<i>ddd</i> , 1H, ³ <i>J</i> =8.2 Hz, ³ <i>J</i> =5.3 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin)
	3.36	<i>s</i> , 2H, NH-CH ₂ -Ar
	2.80	<i>psdd</i> , 2H, <i>J</i> =13.2 Hz, <i>J</i> =6.8 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin), CH ₂ (Pyrrolidin)
	2.67	<i>dd</i> , 1H, ³ <i>J</i> =11.6 Hz, ³ <i>J</i> =8.4 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin)
	2.31	<i>dd</i> , 1H, ² <i>J</i> =13.1 Hz, ³ <i>J</i> =9.4 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin)
	2.16	<i>dd</i> , 1H, ² <i>J</i> =11.7 Hz, ³ <i>J</i> =5.5 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin)

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 100.53 MHz):

δ _C (ppm) =	166.6	<u>C</u> ONH ₂
	158.2	HO- <u>C</u> -CH-C-CH- <u>C</u> -OH
	144.1	CH ₂ - <u>C</u> -CH-CH-C-CF ₃
	142.6	HO-C-CH- <u>C</u> -CH-C-OH
	141.3	SO ₂ - <u>C</u> -CH-CH-C-C-NH ₂
	138.2	SO ₂ -C-CH-CH- <u>C</u> -C-NH ₂
	128.5	SO ₂ -C-CH- <u>CH</u> -C-C-NH ₂
	127.5	CH ₂ -C- <u>CH</u> -CH-C-CF ₃
	127.5	<i>q</i> , ² <i>J</i> _{C,F} =31.8 Hz, CH ₂ -C-CH-CH- <u>C</u> -CF ₃
	127.2	SO ₂ -C- <u>CH</u> -CH-C-C-NH ₂
	125.0	<i>q</i> , ³ <i>J</i> _{C,F} =2.9 Hz, CH ₂ -C-CH- <u>CH</u> -C-CF ₃
	124.3	<i>q</i> , ¹ <i>J</i> _{C,F} =271.6 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C- <u>C</u> F ₃
	105.9	HO-C- <u>CH</u> -C- <u>CH</u> -C-OH

100.9	HO-C- <u>CH</u> -C-OH
65.0	<u>CH</u> (Pyrrolidin)
61.2	<u>CH</u> (Pyrrolidin)
51.6	<u>CH</u> ₂
51.3	<u>CH</u> ₂
47.9	<u>CH</u> ₂
47.2	<u>CH</u> ₂

4-[[[(3S,4S)-4-[(2-Chloro-3-hydroxy-phenyl)methylamino]pyrrolidin-3-yl]-[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]sulfonyl]benzamidhydrochlorid (52)



Unter Verwendung der AAV1 mit 120 mg *tert*-Butyl-(3S,4S)-3-[(4-carbamoylphenyl)-sulfonyl]-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]amino]-4-[(2-chloro-3-hydroxy-phenyl)-methylamino]pyrrolidin-1-carboxylat **131** (0.18 mmol) in 5 ml DCM und 2 ml 2M HCl in Et₂O wurden 73 mg (67%) von **52** in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

Ausbeute: 73 mg (67%) (farbloser Feststoff)

Smp.: 230 °C (DCM/MeOH/NH₃(MeOH))

MS (ES+):

m/z (%) = 583 (100, [M+H]⁺)

HRMS (EI+):

m/z berechnet für C₂₆H₂₆ClF₃N₄O₄S: 582.131540

gefunden : 582.129974

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

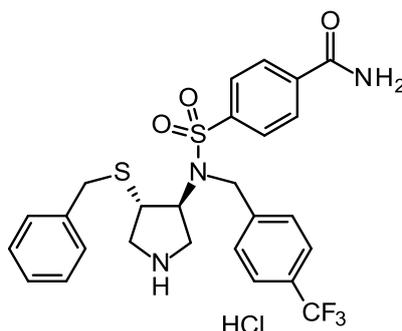
δ_{H} (ppm) =	9.99	<i>brs</i> , 2H, NH_2^+
	8.52	<i>brs</i> , 1H, $\text{OH-C-CH-CH-CH-C-C-Cl}$
	8.23	<i>s</i> , 1H, CONH_2
	8.09	<i>d</i> , 2H, $^3J=8.3$ Hz, $\text{SO}_2\text{-C-CH-CH-C-C-NH}_2$
	7.99	<i>d</i> , 2H, $^3J=8.3$ Hz, $\text{SO}_2\text{-C-CH-CH-C-C-NH}_2$
	7.63	<i>brs</i> , 5H, $\text{CH}_2\text{-C-CH-CH-C-CF}_3$, CONH_2
	7.04	<i>t</i> , 1H, $^3J=7.7$ Hz, $\text{OH-C-CH-CH-CH-C-C-Cl}$
	6.88	<i>d</i> , 1H, $^3J=8.0$ Hz, $\text{OH-C-CH-CH-CH-C-C-Cl}$
	6.69	<i>d</i> , 1H, $^3J=7.5$ Hz, $\text{OH-C-CH-CH-CH-C-C-Cl}$
	4.68	<i>d</i> , 1H, $^2J=17.5$ Hz, $\text{S-N-CH}_2\text{-Ar}$
	4.58	<i>d</i> , 1H, $^2J=17.5$ Hz, $\text{S-N-CH}_2\text{-Ar}$
	4.43	<i>m</i> , 1H, $\text{CH}_{(\text{Pyrrolidin})}$
	3.51	<i>d</i> , 1H, $^2J=14.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Ar}$
	3.41	<i>d</i> , 1H, $^2J=14.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Ar}$
	3.19-3.11	<i>m</i> , 1H, $\text{CH}_{(\text{Pyrrolidin})}$
	3.11-3.04	<i>m</i> , 1H, $\text{CH}_2(\text{Pyrrolidin})$
	3.04-2.96	<i>m</i> , 1H, $\text{CH}_2(\text{Pyrrolidin})$
	2.75-2.48	<i>m</i> , 2H, $\text{CH}_2(\text{Pyrrolidin})$, (überlagert mit DMSO)
	2.28	<i>brs</i> , 1H, NH

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

δ_{C} (ppm) =	166.3	$\underline{\text{C}}\text{ONH}_2$
	153.1	$\text{OH-}\underline{\text{C}}\text{-CH-CH-CH-C-C-Cl}$
	143.4	$\text{CH}_2\text{-}\underline{\text{C}}\text{-CH-CH-C-CF}_3$
	141.2	$\text{SO}_2\text{-}\underline{\text{C}}\text{-CH-CH-C-C-NH}_2$
	138.7	$\text{OH-C-CH-CH-CH-}\underline{\text{C}}\text{-C-Cl}$
	138.3	$\text{SO}_2\text{-C-CH-CH-}\underline{\text{C}}\text{-C-NH}_2$
	128.6	$\text{OH-C-CH-}\underline{\text{CH}}\text{-CH-C-C-Cl}$
	127.8	$\text{SO}_2\text{-C-CH-}\underline{\text{CH}}\text{-C-C-NH}_2$
	127.5	<i>q</i> , $^2J_{\text{C,F}}=32.4$ Hz, $\text{CH}_2\text{-C-CH-CH-}\underline{\text{C}}\text{-CF}_3$
	127.2	$\text{CH}_2\text{-C-}\underline{\text{CH}}\text{-CH-C-CF}_3$
	125.3	$\text{SO}_2\text{-C-}\underline{\text{CH}}\text{-CH-C-C-NH}_2$
	125.0	<i>q</i> , $^3J_{\text{C,F}}=3.6$ Hz, $\text{CH}_2\text{-C-CH-}\underline{\text{CH}}\text{-C-CF}_3$

124.2	q , $^1J_{C,F}=275.9$ Hz, $CH_2-C-CH-CH-C-CF_3$
119.4	$OH-C-CH-CH-CH-C-C-Cl$
119.0	$OH-C-CH-CH-CH-C-C-Cl$
114.9	$OH-C-CH-CH-CH-C-C-Cl$
61.8	$CH_{(Pyrrolidin)}$
58.6	$CH_{(Pyrrolidin)}$
48.6	CH_2
48.0	CH_2
46.9	CH_2
44.3	CH_2

4-[[[(3S,4S)-4-Benzylsulfanylpyrrolidin-3-yl]-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]sulfamoyl]benzamidehydrochlorid (53)



Unter Verwendung der AAV2 mit 25 mg des Produkts aus der Vorschrift **135** in 4 ml Et₂O und 1 ml 2M HCl in Et₂O wurden 20 mg (14%) von **53** in Form eines farblosen Feststoffs über zwei Stufen erhalten. Reinheit >80% nach ¹H-NMR.

Ausbeute: 20 mg (14%), über zwei Stufen

(farbloser Feststoff)

MS (ES+):

m/z (%) = 550 (100, $[M+H]^+$)

HRMS (ES+):

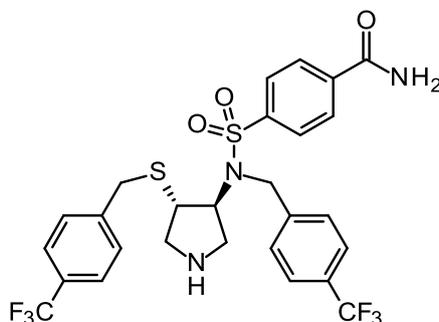
m/z berechnet für C₂₆H₂₇F₃N₃O₃S₂ : 550.144595

gefunden : 550.145120

¹H-NMR (DMSO-d₆, 30.0 °C, 399.796 MHz):

δ _H (ppm) = 9.47	<i>brs</i> , 2H, <u>NH₂</u> ⁺
8.25	<i>brs</i> , 1H, <u>CONH₂</u>
8.09	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> =8.5 Hz, SO ₂ -C-CH- <u>CH</u> -C-C-NH ₂
7.99	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> =8.5 Hz, SO ₂ -C- <u>CH</u> -CH-C-C-NH ₂
7.68	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> =8.0 Hz CH ₂ -C-CH- <u>CH</u> -C-CF ₃
7.67	<i>brs</i> , 1H, <u>CONH₂</u>
7.55	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> =8.0 Hz, CH ₂ -C- <u>CH</u> -CH-C-CF ₃
7.33-7.23	<i>m</i> , 3H, CH ₂ -C-CH- <u>CH</u> - <u>CH</u>
7.18	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> =6.9 Hz, CH ₂ -C- <u>CH</u> -CH-CH
4.87	<i>ddd</i> , 1H, ³ <i>J</i> =8.2 Hz, <u>CH</u> _(Pyrrolidin)
4.68	<i>d</i> , 1H, ² <i>J</i> =18.1 Hz, S-N- <u>CH₂</u> -Ar
4.63	<i>d</i> , 1H, ² <i>J</i> =18.3 Hz, S-N- <u>CH₂</u> -Ar
3.69	<i>d</i> , 1H, ² <i>J</i> =12.8 Hz, S- <u>CH₂</u> -Ar
3.58	<i>d</i> , 1H, ² <i>J</i> =12.8 Hz, S- <u>CH₂</u> -Ar
3.52	<i>ddd</i> , 1H, ³ <i>J</i> =6.2 Hz, <u>CH</u> _(Pyrrolidin)
3.46-3.36	<i>m</i> , 2H, <u>CH₂</u> _(Pyrrolidin)
3.12	<i>dd</i> , 1H, ² <i>J</i> =12.1 Hz, ³ <i>J</i> =5.5 Hz, <u>CH₂</u> _(Pyrrolidin)
2.94	<i>pst</i> , 1H, <i>J</i> =10.2 Hz, <u>CH₂</u> _(Pyrrolidin)

4-[[4-(Trifluoromethyl)phenyl]methyl-[(3*S*,4*S*)-4-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methylsulfanyl]pyrrolidin-3-yl]sulfamoyl]benzamid (54)



Unter Verwendung der AAV1 mit 150 mg des Produkts aus der Vorschrift **136** in 2 ml EtOAc und 2 ml 2M HCl in Et₂O und nach abweichend von der AAV1 dreimaliger Aufreinigung mittels MPLC (DCM/MeOH 100:0 - 95:5) wurden 15 mg (5%) von **54** in Form eines farblosen Feststoffs über zwei Stufen erhalten. Reinheit >80% nach ¹H-NMR.

Ausbeute: 15 mg (5%), über zwei Stufen (farbloser Feststoff)

MS (ES+):

m/z (%) = 618 (100, [M+H]⁺)

HRMS (ES+):

m/z	berechnet für C ₂₇ H ₂₆ F ₆ N ₃ O ₃ S ₂ :	618.131980
	gefunden :	618.130357

¹H-NMR (DMSO-d₆, 30.0 °C, 399.79 MHz):

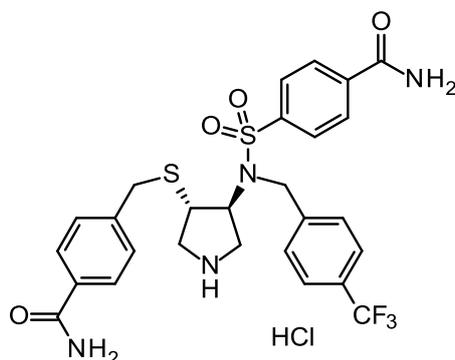
δ _H (ppm) = 8.21	<i>brs</i> , 1H, <u>CONH</u> ₂
8.05	<i>d</i> , 2H, ³ J=8.5 Hz, SO ₂ -C-CH-CH <u>C</u> -C-C-NH ₂
7.91	<i>d</i> , 2H, ³ J=8.2 Hz, SO ₂ -C-CH <u>C</u> -CH-C-C-NH ₂
7.75-7.59	<i>m</i> , 5H, CH ₂ -C-CH-CH <u>C</u> -C-CF ₃ , <u>CONH</u> ₂
7.53	<i>d</i> , 2H, ³ J=8.0 Hz, CH ₂ -C-CH <u>C</u> -CH-C-CF ₃
7.40	<i>d</i> , 2H, ³ J=7.8 Hz, CH ₂ -C-CH <u>C</u> -CH-C-CF ₃
4.72	<i>d</i> , 1H, ² J=17.6 Hz, S-N-CH <u>2</u> -Ar
4.64	<i>ddd</i> , 1H, ³ J=7.3 Hz, CH <u>(Pyrrolidin)</u>
4.53	<i>d</i> , 1H, ² J=17.6 Hz, S-N-CH <u>2</u> -Ar
3.72	<i>d</i> , 1H, ² J=12.8 Hz, S-CH <u>2</u> -Ar
3.62	<i>d</i> , 1H, ² J=13.1 Hz, S-CH <u>2</u> -Ar
3.16	<i>ddd</i> , 1H, ³ J=7.3 Hz, CH <u>(Pyrrolidin)</u>
3.06	<i>dd</i> , 1H, ² J=11.3 Hz, ³ J=7.3 Hz, CH <u>2</u> (Pyrrolidin)
2.94	<i>dd</i> , 1H, ² J=11.5 Hz, ³ J=7.6 Hz, CH <u>2</u> (Pyrrolidin)
2.69	<i>brs</i> , 1H, <u>NH</u> (Pyrrolidin)
2.56-2.41	2H, CH <u>2</u> (Pyrrolidin) (overlaid with DMSO-d ₆)

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 35.0 °C, 125.77 MHz):

δ_C (ppm) = 167.1 CONH₂

143.9	CH ₂ - <u>C</u> -CH-CH-C-CF ₃
143.7	CH ₂ - <u>C</u> -CH-CH-C-CF ₃
142.4	SO ₂ - <u>C</u> -CH-CH-C-C-NH ₂
138.6	SO ₂ -C-CH-CH- <u>C</u> -C-NH ₂
130.1	CH ₂ -C- <u>CH</u> -CH-C-CF ₃
128.9	SO ₂ -C-CH- <u>CH</u> -C-C-NH ₂
128.5	CH ₂ -C- <u>CH</u> -CH-C-CF ₃
128.1	<i>q</i> , ² J _{C,F} =31.2 Hz, CH ₂ -C-CH-CH- <u>C</u> -CF ₃
127.8	SO ₂ -C- <u>CH</u> -CH-C-C-NH ₂
125.7	<i>q</i> , ³ J _{C,F} =3.6 Hz, CH ₂ -C-CH- <u>CH</u> -C-CF ₃
125.3	<i>q</i> , ³ J _{C,F} =3.6 Hz, CH ₂ -C-CH- <u>CH</u> -C-CF ₃
124.8	<i>q</i> , ¹ J _{C,F} =272.3 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C- <u>CF</u> ₃
61.4	<u>CH</u> (Pyrrolidin)
53.8	<u>CH</u> ₂
50.4	<u>CH</u> ₂
49.5	CH ₂
47.5	<u>CH</u> (Pyrrolidin)
35.5	<u>CH</u> ₂

4-[[[(3S,4S)-4-[(4-Carbamoylphenyl)sulfonyl]-[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]-amino]pyrrolidin-3-yl]sulfanylmethyl]benzamidhydrochlorid (55)



Unter Verwendung der AAV1 mit 40 mg des Produkts aus der Vorschrift **137** in 2 ml DCM, 2 ml Et₂O und 1 ml 2M HCl in Et₂O wurde die freie Base von **55** erhalten. Diese wurde in 1 ml DCM gelöst und mit 0.5 ml 2M HCl in Et₂O als Hydrochlorid

gefällt. Durch abpipettieren des Lösungsmittels und Trocknung wurden 17 mg (17%) von **55** in Form eines farblosen Feststoffs über zwei Stufen erhalten. Reinheit >80% nach $^1\text{H-NMR}$.

Ausbeute: 17 mg (17%), über zwei Stufen (farbloser Feststoff)

MS (ES+):

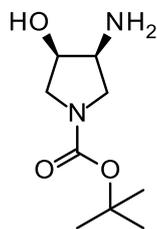
m/z (%) = 593 (100, $[M+H]^+$), 625 (76, $[M+Na]^+$)

HRMS (ES+):

m/z	berechnet für $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_4\text{S}_2$:	593.150409
	gefunden	:	593.150005

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 30.0 °C, 399.79 MHz):

δ_{H} (ppm) =	9.54	<i>brs</i> , 2H, NH_2^+
	8.25	<i>brs</i> , 1H, CONH_2
	8.09	<i>d</i> , 2H, $^3J=8.5$ Hz, $\text{SO}_2\text{-C-CH-CH-C-C-NH}_2$
	7.99	<i>d</i> , 2H, $^3J=8.5$ Hz, $\text{SO}_2\text{-C-CH-CH-C-C-NH}_2$
	7.94	<i>brs</i> , 1H, CONH_2
	7.82	<i>d</i> , 2H, $^3J=8.2$ Hz $\text{CH}_2\text{-C-CH-CH-C-C-NH}_2$
	7.69	<i>brs</i> , 1H, CONH_2
	7.68	<i>d</i> , 2H, $^3J=8.5$ Hz, $\text{CH}_2\text{-C-CH-CH-C-CF}_3$
	7.55	<i>d</i> , 2H, $^3J=8.2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-C-CH-CH-C-CF}_3$
	7.34	<i>brs</i> , 1H, CONH_2
	7.27	<i>d</i> , 2H, $^3J=8.2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-C-CH-CH-C-C-NH}_2$
	4.86	<i>ddd</i> , 1H, $^3J=7.8$ Hz, $\text{CH}_{(\text{Pyrrolidin})}$
	4.64	<i>s</i> , 2H, $\text{CH}_2\text{-Ar}$
	3.74	<i>d</i> , 1H, $^2J=12.8$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Ar}$
	3.64	<i>d</i> , 1H, $^2J=13.1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Ar}$
	3.52	<i>ddd</i> , 1H, $^3J=6.4$ Hz, $\text{CH}_{(\text{Pyrrolidin})}$
	3.46-3.39	2H, $\text{CH}_2(\text{Pyrrolidin})$ (überlagert mit H_2O)
	3.15-3.03	<i>m</i> , 1H, $\text{CH}_2(\text{Pyrrolidin})$
	2.99-2.87	<i>m</i> , 1H, $\text{CH}_2(\text{Pyrrolidin})$

***tert*-Butyl-(3*S*,4*R*)-3-amino-4-hydroxy-pyrrolidin-1-carboxylat (58)**

Eine Lösung von TPP (11.63 g, 44.40 mmol) in 100 ml trockenem THF wurde auf -15 °C gekühlt. 3.48 ml DEAD (22.20 mmol) wurde langsam hinzugegeben, während die Lösung permanent unter -10 °C gehalten wurde. Nach 30 min rühren bei -10 °C wurde eine Lösung von *tert*-Butyl-(3*R*,4*R*)-3,4-dihydroxypyrrolidin-1-carboxylat [52] (3.00 g, 14.70 mmol) in 50 ml THF langsam zugefügt und nochmals 30 min bei -10°C gerührt. Anschließend wurden 4.80 ml DPPA (22.20 mmol) langsam zugetropft und die Mischung 5 h bei -10 °C und dann 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurden 70 ml einer wässrigen Ammoniumhydroxid Lösung (25 %) zugegeben und bei 50 °C zwei Tage lang gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotavapor entfernt und der Rückstand mittels MPLC (DCM/MeOH 99:10 - 85:15) aufgereinigt. Das Produkt wurde in 60 ml EtOAc gelöst und filtriert. Das Lösungsmittel des Filtrats wurde am Rotavapor entfernt was zu 1.83 g (62%) von **58** in Form eines farblosen Feststoffs führte.

Ausbeute: 1.83 g (62%) (farbloser Feststoff)

Smp.: 120 °C (EtOAc)

EA: C₉H₁₈N₂O₃ (202.25 g/mol)

Ber.: C:53.45 H:8.97 N:13.85

Gef.: C:53.18 H:8.82 N:13.85

MS (ES⁺):

m/z (%) = 203 (100, [M+H]⁺), 225 (7, [M+Na]⁺), 405 (54, [2M+H]⁺), 427 (8, [2M+Na]⁺), 607 (78, [3M+H]⁺), 639 (34, [3M+Na]⁺), 809 (11, [4M+H]⁺)

HRMS (EI+):

m/z	berechnet für C ₉ H ₁₈ N ₂ O ₃	:	202.131743
	gefunden	:	202.132908

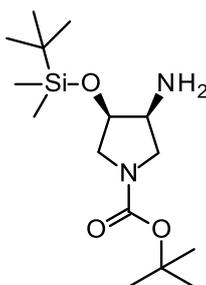
¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 399.79 MHz):

δ _H (ppm) =	4.96	<i>brs</i> , 1H, <u>OH</u>
	3.76-3.70	<i>sm</i> , 1H, <u>OH-CH</u> _(Pyrrolidin)
	3.49-3.31	<i>m</i> , 2H, <u>CH</u> _{2(Pyrrolidin)}
	3.14-3.08	<i>sm</i> , 1H, <u>NH₂-CH</u> _(Pyrrolidin)
	3.04	<i>dd</i> , 1H, ² <i>J</i> =11.2 Hz, ³ <i>J</i> =2.5 Hz, <u>CH</u> _{2(Pyrrolidin)}
	2.94	<i>dd</i> , 1H, ² <i>J</i> =10.7 Hz, ³ <i>J</i> =2.9 Hz, <u>CH</u> _{2(Pyrrolidin)}
	1.61	<i>brs</i> , 1H, <u>NH</u> ₂
	1.39	<i>s</i> , 9H, O-C-(<u>CH</u> ₃) ₃
	1.37	<i>brs</i> , 1H, <u>NH</u> ₂

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 21.7 °C, 100.53 MHz):

δ _C (ppm) =	153.9	N- <u>COO</u> -C
	78.0	O- <u>C</u> -(CH ₃) ₃
	75.6, 74.8	OH- <u>CH</u> _(Pyrrolidin)
	57.4, 56.5	NH ₂ - <u>CH</u> _(Pyrrolidin)
	52.0, 51.6	<u>CH</u> _{2(Pyrrolidin)}
	28.2	O-C-(<u>C</u> H ₃) ₃

***tert*-Butyl-(3*S*,4*R*)-3-amino-4-[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy-pyrrolidin-1-carboxylat (59)**



Zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung von *tert*-Butyl-(3*S*,4*R*)-3-amino-4-hydroxypyrrolidin-1-carboxylat (0.80 g, 3.96 mmol) in DCM (40 ml) wurden Imidazol (0.82 g, 12.06 mmol), eine katalytische Menge DMAP und TBDMSCI (0.90 g, 6.00 mmol) nacheinander hinzugegeben und die Reaktion über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zusatz einer gesättigten Lösung von NaHCO₃ (50 ml) wurde mit EtOAc (3 x 50 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Kochsalzlösung (1 x 50 ml) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt. Der Rückstand wurde mittels MPLC (DCM/MeOH 97:3 - 95:5) aufgereinigt, was zu 0.82 g (65%) von **59** in Form eines farblosen Öls führte.

Ausbeute: 0.82 g (65%) (farbloses Öl)

EA: C₁₅H₃₂N₂O₃Si (316.51 g/mol)
 Ber.: C:56.92 H:10.19 N:8.85
 Gef.: C:56.56 H:10.01 N:8.91

MS (ES+):

m/z (%) = 317 (100, [M+H]⁺), 633 (22, [2M+H]⁺)

HRMS (EI+):

m/z	berechnet für C ₁₁ H ₂₃ N ₂ O ₃ Si [<i>M-t-Butyl</i>] ⁺	: 259.147796
	gefunden	: 259.146951

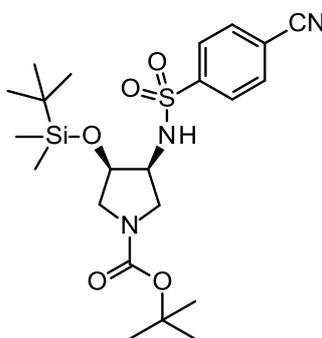
¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 399.79 MHz, Rotamere):

δ _H (ppm) =	3.94-3.88	<i>sm</i> , 1H, O-CH ₂ (Pyrrolidin)
	3.55-3.47	<i>sm</i> , 1H, CH ₂ (Pyrrolidin)
	3.41-3.33	<i>sm</i> , 1H, CH ₂ (Pyrrolidin)
	3.15-3.09	<i>sm</i> , 1H, NH ₂ -CH ₂ (Pyrrolidin)
	3.09-3.02	<i>sm</i> , 1H, CH ₂ (Pyrrolidin)
	3.01-2.94	<i>sm</i> , 1H, CH ₂ (Pyrrolidin)
	1.63	<i>brs</i> , 2H, NH ₂
	1.41	<i>s</i> , 9H, O-C-(CH ₃) ₃
	0.87	<i>s</i> , 9H, Si-C-(CH ₃) ₃
	0.084, 0.077	<i>psd</i> , 6H, Si-(CH ₃) ₂

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

δ_{C} (ppm) = 153.8	N-COO-C
78.0	O-C-(CH ₃) ₃
77.0, 76.3	O-CH ₂ (Pyrrolidin)
57.7, 56.9	NH ₂ -CH ₂ (Pyrrolidin)
52.1, 51.8	CH ₂ (Pyrrolidin)
51.4	CH ₂ (Pyrrolidin)
28.1	O-C-(CH ₃) ₃
25.6	Si-(CH ₃) ₂
17.6	Si-C-(CH ₃) ₃
-4.8, -5.0	Si-C-(CH ₃) ₃

***tert*-Butyl-(3*R*,4*S*)-3-[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy-4-[(4-cyanophenyl)sulfonylamino]pyrrolidin-1-carboxylat (**60**)**



Unter Verwendung der AAV5 wurden 1.20 g *tert*-Butyl-(3*S*,4*R*)-3-amino-4-[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy-pyrrolidin-1-carboxylat **59** (3.79 mmol) und 1.5 ml DIPEA (8.82 mmol) in 60 ml DCM mit 0.92 g 4-Cyanobenzoesulfonylchlorid (4.56 mmol) 2 h gerührt. Abweichend von der AAV5 wurde vor der MPLC eine Extraktion durchgeführt: Gesättigte Kochsalzlösung wurde zugegeben (50 ml), mit DCM extrahiert (3 x 50 ml), mit gesättigter Kochsalzlösung (1 x 50 ml) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt. Aufreinigung mittels MPLC (Cyclohexan/EtOAc 8:2) ergab 1.58 g (87%) von **60** in Form eines farblosen Feststoffs.

Ausbeute: 1.58 g (87%) (farbloser Feststoff)

Smp.: 74 °C (Cyclohexan/EtOAc)

EA: C₂₂H₃₅N₃O₅SSi (481.68 g/mol)

Ber.: C:54.86 H:7.32 N:8.72

Gef.: C:54.81 H:7.42 N:8.63

MS (ES+):

m/z (%) = 499 (100, [M+NH₄]⁺), 504 (18, [M+Na]⁺)

HRMS (ES+):

m/z berechnet für C₂₂H₃₅N₃O₅SSiNa : 504.196442

gefunden : 504.200879

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

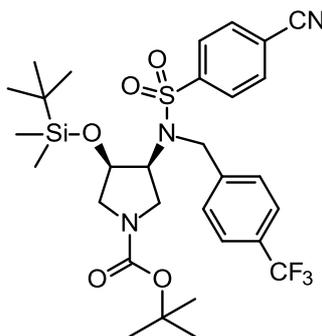
δ _H (ppm) = 8.39	<i>brs</i> , 1H, S-NH-CH
8.11	<i>d</i> , 2H, ³ J=8.5 Hz, SO ₂ -C-CH-CH-C-CN
7.98	<i>d</i> , 2H, ³ J=8.7 Hz, SO ₂ -C-CH-CH-C-CN
4.07	<i>brs</i> , 1H, CH _(Pyrrolidin)
3.45	<i>dd</i> , 1H, ² J=11.5 Hz, ³ J=4.8 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin)
3.37	<i>brs</i> , 1H, CH _(Pyrrolidin)
3.28	<i>m</i> , 1H, CH ₂ (Pyrrolidin) (überlagert mit H ₂ O)
3.07-2.96	<i>m</i> , 2H, CH ₂ (Pyrrolidin)
1.37, 1.36	<i>psd</i> , 9H, O-C-(CH ₃) ₃
0.782, 0.775	<i>psd</i> , 9H, Si-C-(CH ₃) ₃
-0.01, -0.02,	
-0.03	<i>psm</i> , 6H, Si-(CH ₃) ₂

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 35.0 °C, 125.77 MHz, Rotamere):

δ _C (ppm) = 153.4	N-COO-C
145.0	SO ₂ -C-CH-CH-C-CN
133.4	SO ₂ -C-CH-CH-C-CN
127.2	SO ₂ -C-CH-CH-C-CN
117.5	SO ₂ -C-CH-CH-C-CN
115.0	SO ₂ -C-CH-CH-C-CN

78.5	O-C-(CH ₃) ₃
74.5, 73.6	O-CH(Pyrrolidin)
58.9, 58.1	NH-CH(Pyrrolidin)
51.5, 51.2	CH ₂ (Pyrrolidin)
48.9, 48.5	CH ₂ (Pyrrolidin)
28.0	O-C-(CH ₃) ₃
25.4	Si-(CH ₃) ₂
17.5	Si-C-(CH ₃) ₃
-5.1	Si-C-(CH ₃) ₃

***tert*-Butyl-(3*R*,4*S*)-3-[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy-4-[(4-cyanophenyl)sulfonyl-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]amino]pyrrolidin-1-carboxylat (**61**)**



Unter Verwendung der AAV6 wurden 0.80 g *tert*-Butyl-(3*R*,4*S*)-3-[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy-4-[(4-cyanophenyl)sulfonylamino]pyrrolidin-1-carboxylat **60** (1.66 mmol), 0.82 g Cs₂CO₃ (2.52 mmol) und 0.47 g 4-(Trifluoromethyl)benzylbromid (1.97 mmol) in 20 ml MeCN und 10 ml Aceton 1 h erhitzt. Aufreinigung mittels MPLC (Cyclohexan/EtOAc 88:12) ergab 0.82 g (77%) von **61** in Form eines farblosen Feststoffs.

Ausbeute: 0.82 g (77%) (farbloser Feststoff)

Smp.: 138 °C (Cyclohexan/EtOAc)

EA: C₃₀H₄₀F₃N₃O₅SSi (639.80 g/mol)
 Ber.: C:56.32 H:6.30 N:6.57
 Gef: C:56.34 H:6.38 N:6.50

MS (ES+):

m/z (%) = 640 (10, [M+H]⁺), 657 (100, [M+NH₄]⁺), 662 (21, [M+Na]⁺)

HRMS (EI+):

m/z berechnet für C₂₆H₃₁F₃N₃O₅SSi [M-t-Butyl]⁺ : 582.170581
 gefunden : 582.170958

¹H-NMR (DMSO-d₆, 30.0 °C, 399.79 MHz, Rotamere):

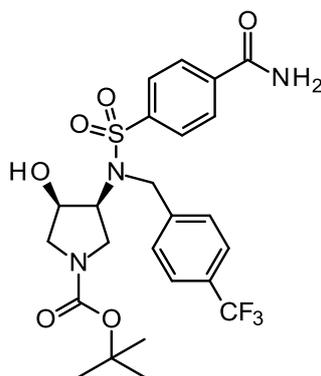
δ_H (ppm) = 8.04 *brs*, 4H, SO₂-C-CH-CH-C-CN
 7.67 *d*, 2H, ³J=7.8 Hz, CH₂-C-CH-CH-C-CF₃
 7.53 *brs*, 2H, CH₂-C-CH-CH-C-CF₃
 4.68-4.46 *m*, 2H, CH₂-Ar
 4.30-4.14 *m*, 2H, CH_(Pyrrolidin)
 3.50-3.15 *m*, 2H, CH_{2(Pyrrolidin)} (überlagert mit H₂O)
 2.93-2.70 *m*, 2H, CH_{2(Pyrrolidin)}
 1.30, 1.28 *psd*, 9H, O-C-(CH₃)₃
 0.71, 0.69 *psd*, 9H, Si-C-(CH₃)₃
 -0.10, -0.17,
 -0.20 *psm*, 6H, Si-(CH₃)₂

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 30.0 °C, 125.77 MHz, Rotamere):

δ_C (ppm) = 153.0 N-COO-C
 143.4 SO₂-C-CH-CH-C-CN
 142.6 CH₂-C-CH-CH-C-CF₃
 133.5 SO₂-C-CH-CH-C-CN
 128.0 *q*, ²J_{C,F}=31.8 Hz, CH₂-C-CH-CH-C-CF₃
 128.0 CH₂-C-CH-CH-C-CF₃
 127.8 SO₂-C-CH-CH-C-CN
 125.1 *q*, ³J_{C,F}=2.9 Hz, CH₂-C-CH-CH-C-CF₃
 124.1 *q*, ¹J_{C,F}=273.1 Hz, CH₂-C-CH-CH-C-CF₃
 117.4 SO₂-C-CH-CH-C-CN
 115.5 SO₂-C-CH-CH-C-CN

78.8	O-C-(CH ₃) ₃
71.2, 70.2	O-CH _(Pyrrolidin)
63.3, 62.9	NH ₂ -CH _(Pyrrolidin)
50.7, 50.1	CH ₂ (Pyrrolidin)
47.1	CH ₂ -Ar
45.2, 44.7	CH ₂ (Pyrrolidin)
27.9	O-C-(CH ₃) ₃
25.4	Si-(CH ₃) ₂
17.3	Si-C-(CH ₃) ₃
-5.5	Si-C-(CH ₃) ₃

***tert*-Butyl-(3*S*,4*R*)-3-[(4-carbamoylphenyl)sulfonyl]-[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]amino]-4-hydroxy-pyrrolidin-1-carboxylat (**62**)**



Tert-Butyl-(3*R*,4*S*)-3-[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy-4-[(4-cyanophenyl)sulfonyl]-[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]amino]pyrrolidin-1-carboxylat **61** (1.70 g, 2.66 mmol) wurde in THF (25 ml) gelöst und auf 0 °C gekühlt. 3.15 ml TBAF 1M in THF (3.15 mmol) wurden hinzugegeben und die Reaktion bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Gesättigte Kochsalzlösung (50 ml) wurde hinzugegeben und mit EtOAc (3 x 50 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Kochsalzlösung (1 x 50 ml) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt (1.52 g) wurde ohne weitere Aufreinigung nach der AAV7 mit 0.20 g K₂CO₃ (1.43 mmol), 15 ml 30% aq. H₂O₂ und 30 ml DMSO 1h lang weiter umgesetzt. Fällung mit 450 ml H₂O und

weitere Aufarbeitung nach der AAV7 ergab 1.13 g (78%) von **62** in Form eines farblosen Feststoffs über zwei Stufen.

Ausbeute: 1.13 g (78%) (farbloser Feststoff)

Smp.: 214 °C (EtOAc)

EA: C₂₄H₂₈F₃N₃O₆S (543.56 g/mol)

Ber.: C:53.03 H:5.19 N:7.73

Gef.: C:53.33 H:5.49 N:7.74

MS (ES+):

m/z (%) = 561 (100, [M+NH₄]⁺), 566 (31, [M+Na]⁺)

HRMS (EI+):

m/z berechnet für C₂₀H₁₉F₃N₃O₅S [M-t-BuO]⁺ : 470.099753

gefunden : 470.098521

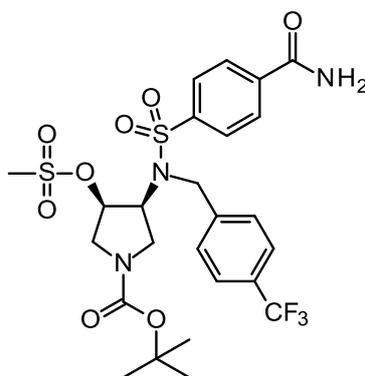
¹H-NMR (DMSO-d₆, 30.0 °C, 399.79 MHz, Rotamere):

δ _H (ppm) = 8.20	<i>brs</i> , 1H, CONH ₂
8.06	<i>d</i> , 2H, ³ J=8.7 Hz, SO ₂ -C-CH-CH-C-C-NH ₂
7.98	<i>d</i> , 2H, ³ J=8.7 Hz, SO ₂ -C-CH-CH-C-C-NH ₂
7.70	<i>d</i> , 2H, ³ J=8.2 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
7.63	<i>d</i> , 2H, ³ J=8.2 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
7.62	<i>brs</i> , 1H, CONH ₂
5.33	<i>d</i> , 1H, ³ J=5.3 Hz, CH-OH
4.60	<i>d</i> , 1H, ² J=15.3 Hz, CH ₂ -Ar
4.54	<i>d</i> , 1H, ² J=16.5 Hz, CH ₂ -Ar
4.24	<i>psqn</i> , 1H, ³ J=7.6 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin)
4.02	<i>psqn</i> , 1H, ³ J=7.1 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin)
3.44-3.32	<i>sm</i> , 1H, CH ₂ (Pyrrolidin)
3.27-3.14	<i>sm</i> , 1H, CH ₂ (Pyrrolidin)
2.91-2.72	<i>m</i> , 2H, CH ₂ (Pyrrolidin)
1.33, 1.27	<i>psd</i> , 9H, O-C-(CH ₃) ₃

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 30.0 °C, 100.53 MHz, Rotamere):

δ_C (ppm) =	166.44, 166.37	$\underline{C}ONH_2$
	153.1, 153.0	N- $\underline{C}OO-C$
	143.56, 143.52	$CH_2-\underline{C}-CH-CH-C-CF_3$
	141.54, 141.51	$SO_2-\underline{C}-CH-CH-C-C-NH_2$
	138.2	$SO_2-C-CH-CH-\underline{C}-C-NH_2$
	128.4	$SO_2-C-CH-\underline{C}H-C-C-NH_2$
	127.8, 127.6	$CH_2-C-\underline{C}H-CH-C-CF_3$
	127.6	$q, {}^2J_{C,F}=32.8\text{Hz}, CH_2-C-CH-CH-\underline{C}-CF_3$
	127.1	$SO_2-C-\underline{C}H-CH-C-C-NH_2$
	125.0	$q, {}^3J_{C,F}=2.9\text{Hz}, CH_2-C-CH-\underline{C}H-C-CF_3$
	124.3	$q, {}^1J_{C,F}=271.7\text{Hz}, CH_2-C-CH-CH-C-\underline{C}F_3$
	78.6, 78.5	O- $\underline{C}-(CH_3)_3$
	69.6, 68.9	$\underline{C}H(\text{Pyrrolidin})$
	62.8, 62.2	$\underline{C}H(\text{Pyrrolidin})$
	50.4, 50.1	$\underline{C}H_2(\text{Pyrrolidin})$
	46.90, 46.85	$\underline{C}H_2\text{-Ar}$
	45.7, 44.9	$\underline{C}H_2(\text{Pyrrolidin})$
	28.0, 27.9	O-C-($\underline{C}H_3$) ₃

***tert*-Butyl-(3*S*,4*R*)-3-[(4-carbamoylphenyl)sulfonyl]-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]amino]-4-methylsulfonyloxy-pyrrolidin-1-carboxylat (63)**



Zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung von *tert*-Butyl-(3*S*,4*R*)-3-[(4-carbamoylphenyl)sulfonyl]-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]amino]-4-hydroxy-pyrrolidin-1-carboxylat

62 (0.40 g, 0.74 mmol), 0.22 ml TEA (1.55 mmol) und 9 mg DMAP (0.07 mmol) in DCM (10 ml) wurden 0.11 ml Mesylchlorid (1.40 mmol) hinzuge tropft und die Reaktion bei 0 °C 2 h gerührt. Anschließend wurde eine gesättigte Lösung von NaHCO₃ (50 ml) hinzugegeben und mit DCM (3 x 50 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden nacheinander mit gesättigter NaHCO₃ Lösung (3 x 50 ml), gesättigter NH₄Cl Lösung (3 x 50 ml) sowie mit gesättigter Kochsalzlösung (1 x 50 ml) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt. Aufreinigung mittels MPLC (Cyclohexan/EtOAc 4:6 - 1:9) ergab 0.35 g (77%) von **63** in Form eines farblosen Feststoffs.

Ausbeute: 0.35 g (77%) (farbloser Feststoff)

Smp.: 147 °C (Cyclohexan/EtOAc)

EA: C₂₅H₃₀F₃N₃O₈S₂ (621.65 g/mol)

Ber.: C:48.30 H:4.86 N:6.76

Gef.: C:47.93 H:5.34 N:6.63

MS (ES+):

m/z (%) = 644 (100, [M+Na]⁺)

HRMS (ES+):

m/z berechnet für C₂₅H₃₀F₃N₃O₈S₂Na : 644.132413

gefunden : 644.132073

¹H-NMR (DMSO-d₆, 30.0 °C, 399.79 MHz, Rotamere):

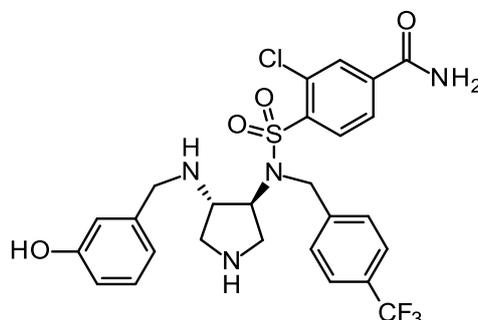
δ _H (ppm) = 8.20	<i>brs</i> , 1H, CONH ₂
8.07	<i>d</i> , 2H, ³ J=8.5 Hz, SO ₂ -C-CH-CH-C-C-NH ₂
8.00	<i>d</i> , 2H, ³ J=8.5 Hz, SO ₂ -C-CH-CH-C-C-NH ₂
7.71	<i>d</i> , 2H, ³ J=8.2 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
7.63	<i>brs</i> , 1H, CONH ₂
7.59	<i>d</i> , 2H, ³ J=8.0 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
5.05	<i>psd</i> , 1H, ³ J=6.4 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin)
4.79-4.57	<i>m</i> , 3H, CH ₂ -Ar, CH ₂ (Pyrrolidin)
3.73-3.56	<i>m</i> , 1H, CH ₂ (Pyrrolidin)

3.28-3.14	<i>m</i> , 2H, $\underline{\text{CH}}_2(\text{Pyrrolidin})$
2.99	<i>s</i> , 3H, S- $\underline{\text{CH}}_3$
2.97-2.81	<i>m</i> , 1H, $\underline{\text{CH}}_2(\text{Pyrrolidin})$
1.34, 1.29	<i>psd</i> , 9H, O-C-($\underline{\text{CH}}_3$) ₃

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 35.0 °C, 125.77 MHz, Rotamere):

δ_{C} (ppm) = 166.3	$\underline{\text{C}}\text{ONH}_2$
152.8	N- $\underline{\text{C}}\text{OO-C}$
142.7	$\text{CH}_2\text{-}\underline{\text{C}}\text{-CH-CH-C-CF}_3$
141.2	$\text{SO}_2\text{-}\underline{\text{C}}\text{-CH-CH-C-C-NH}_2$
138.4	$\text{SO}_2\text{-C-CH-CH-}\underline{\text{C}}\text{-C-NH}_2$
128.5	$\text{SO}_2\text{-C-CH-}\underline{\text{CH}}\text{-C-C-NH}_2$
127.9	<i>q</i> , ² $J_{\text{C,F}}=31.2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-C-CH-CH-}\underline{\text{C}}\text{-CF}_3$
127.8	$\text{CH}_2\text{-C-}\underline{\text{CH}}\text{-CH-C-CF}_3$
127.2	$\text{SO}_2\text{-C-}\underline{\text{CH}}\text{-CH-C-C-NH}_2$
125.1	<i>q</i> , ³ $J_{\text{C,F}}=3.6$ Hz, $\text{CH}_2\text{-C-CH-}\underline{\text{CH}}\text{-C-CF}_3$
124.2	<i>q</i> , ¹ $J_{\text{C,F}}=272.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-C-CH-CH-C-}\underline{\text{C}}\text{F}_3$
79.2	O- $\underline{\text{C}}\text{-(CH}_3\text{)}_3$
76.9, 76.3	$\underline{\text{CH}}(\text{Pyrrolidin})$
60.5, 59.9	$\underline{\text{CH}}(\text{Pyrrolidin})$
48.1, 47.9	$\underline{\text{CH}}_2(\text{Pyrrolidin})$
47.1	$\underline{\text{CH}}_2\text{-Ar}$
44.2, 43.6	$\underline{\text{CH}}_2(\text{Pyrrolidin})$
37.4	S- $\underline{\text{CH}}_3$
27.8	O-C-($\underline{\text{C}}\text{H}_3$) ₃

4-[(3-Cyanophenyl)methyl-[(3S,4S)-4-[(3-hydroxyphenyl)methylamino]pyrrolidin-3-yl]sulfonyl]benzamid (64)



Unter Verwendung der AAV1 mit 200 mg *tert*-Butyl-(3S,4S)-3-[(4-carbamoyl-2-chlorophenyl)sulfonyl-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]amino]-4-[(3-hydroxyphenyl)methylamino]pyrrolidin-1-carboxylat **132** (0.29 mmol), 3 ml DCM und 1 ml 2M HCl in Et₂O wurden 54 mg (32%) von **64** in Form eines farblosen Feststoffs erhalten. Abweichend von der AAV1 musste die MPLC dreimal durchgeführt werden, um die gewünschte Reinheit zu erreichen.

Ausbeute: 54 mg (32%) (farbloser Feststoff)

Smp.: 229 °C (DCM/MeOH/NH₃(MeOH))

MS (ES+):

m/z (%) = 583 (100, [M+H]⁺)

HRMS (ES+):

m/z	berechnet für C ₂₆ H ₂₇ ClF ₃ N ₄ O ₄ S:	583.139365
	gefunden	: 583.140456

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 399.79 MHz):

δ _H (ppm) =	9.33	<i>brs</i> , 1H, OH-C-CH-CH-CH-C-CH
	8.27	<i>brs</i> , 1H, CONH ₂
	8.14	<i>d</i> , 1H, ⁴ J=1.6 Hz, SO ₂ -C-CH-CH-C-CH ₂ -C-Cl
	8.10	<i>d</i> , 1H, ³ J=8.2 Hz, SO ₂ -C-CH ₂ -CH-C-CH-C-Cl
	7.95	<i>dd</i> , 1H, ³ J=8.2 Hz, ⁴ J=1.6 Hz, SO ₂ -C-CH-CH ₂ -C-CH-C-Cl

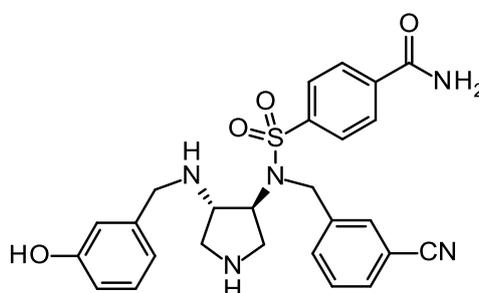
7.75	<i>brs</i> , 1H, CONH_2
7.64	<i>d</i> , 2H, $^3J=8.5$ Hz, $\text{CH}_2\text{-C-CH-CH-C-CF}_3$
7.60	<i>d</i> , 2H, $^3J=8.2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-C-CH-CH-C-CF}_3$
7.08	<i>t</i> , 1H, $^3J=7.8$ Hz, $\text{OH-C-CH-CH-CH-C-CH}$
6.71-6.66	<i>m</i> , 1H, $\text{OH-C-CH-CH-CH-C-CH}$
6.66-6.63	<i>m</i> , 1H, $\text{OH-C-CH-CH-CH-C-CH}$
6.60	<i>d</i> , 1H, $^3J=7.6$ Hz, $\text{OH-C-CH-CH-CH-C-CH}$
4.87	<i>d</i> , 1H, $^2J=17.4$ Hz, S-N-CH_2
4.78	<i>d</i> , 1H, $^2J=17.4$ Hz, S-N-CH_2
4.31	<i>ddd</i> , 1H, $^3J=8.2$ Hz, $\text{CH}_{(\text{Pyrrolidin})}$
3.36	<i>d</i> , 1H, $^2J=13.3$ Hz, $\text{NH-CH}_2\text{-Ar}$
3.28	<i>d</i> , 1H, $^2J=13.1$ Hz, $\text{NH-CH}_2\text{-Ar}$
3.20-3.11	<i>m</i> , 2H, $\text{CH}_{(\text{Pyrrolidin})}$, $\text{CH}_2(\text{Pyrrolidin})$
3.03	<i>dd</i> , 1H, $^2J=11.9$ Hz, $^3J=8.9$ Hz, $\text{CH}_2(\text{Pyrrolidin})$
2.87	<i>dd</i> , 1H, $^2J=11.9$ Hz, $^3J=8.2$ Hz, $\text{CH}_2(\text{Pyrrolidin})$
2.76-2.66	<i>m</i> , 1H, $\text{CH}_2(\text{Pyrrolidin})$

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 30.0 °C, 100.53 MHz):

δ_{C} (ppm) = 165.0	$\underline{\text{C}}\text{ONH}_2$
157.3	$\text{OH-}\underline{\text{C}}\text{-CH-CH-CH-C-CH}$
142.9	$\text{CH}_2\text{-}\underline{\text{C}}\text{-CH-CH-C-CF}_3$
141.5	$\text{SO}_2\text{-C-CH-CH-}\underline{\text{C}}\text{-CH-C-Cl}$
139.6	$\text{SO}_2\text{-}\underline{\text{C}}\text{-CH-CH-C-CH-C-Cl}$
138.8	$\text{OH-C-CH-CH-CH-}\underline{\text{C}}\text{-CH}$
131.9	$\text{SO}_2\text{-C-CH-CH-C-}\underline{\text{C}}\text{H-C-Cl}$
130.8	$\text{OH-C-CH-}\underline{\text{C}}\text{H-CH-C-CH}$
130.7	$\text{SO}_2\text{-C-CH-CH-C-CH-}\underline{\text{C}}\text{-Cl}$
129.0	$\text{SO}_2\text{-C-CH-}\underline{\text{C}}\text{H-C-CH-C-Cl}$
127.9	$\text{SO}_2\text{-C-}\underline{\text{C}}\text{H-CH-C-CH-C-Cl}$
127.9	<i>q</i> , $^2J_{\text{C,F}}=31.8$ Hz, $\text{CH}_2\text{-C-CH-CH-}\underline{\text{C}}\text{-CF}_3$
126.8	$\text{CH}_2\text{-C-}\underline{\text{C}}\text{H-CH-C-CF}_3$
125.1	<i>q</i> , $^3J_{\text{C,F}}=3.9$ Hz, $\text{CH}_2\text{-C-CH-}\underline{\text{C}}\text{H-C-CF}_3$
122.8	<i>q</i> , $^1J_{\text{C,F}}=271.7$ Hz, $\text{CH}_2\text{-C-CH-CH-C-}\underline{\text{C}}\text{F}_3$
118.4	$\text{OH-C-CH-CH-}\underline{\text{C}}\text{H-C-CH}$
114.8	$\text{OH-C-}\underline{\text{C}}\text{H-CH-CH-C-CH}$
113.8	$\text{OH-C-CH-CH-CH-C-}\underline{\text{C}}\text{H}$

61.0	$\underline{\text{C}}\text{H}_{(\text{Pyrrolidin})}$
57.9	$\underline{\text{C}}\text{H}_{(\text{Pyrrolidin})}$
51.1	$\underline{\text{C}}\text{H}_2$
47.9	$\underline{\text{C}}\text{H}_2$
47.8	$\underline{\text{C}}\text{H}_2$
44.4	$\underline{\text{C}}\text{H}_2(\text{Pyrrolidin})$

4-[(3-Cyanophenyl)methyl-[(3S,4S)-4-[(3-hydroxyphenyl)methylamino]pyrrolidin-3-yl]sulfamoyl]benzamid (65)



Unter Verwendung der AAV1 mit 430 mg *tert*-Butyl-(3S,4S)-3-[(4-carbamoylphenyl)sulfonyl-[(3-cyanophenyl)methyl]amino]-4-[(3-hydroxyphenyl)-methylamino]pyrrolidin-1-carboxylat **133** (0.71 mmol), 3 ml DCM und 3 ml 2M HCl in Et₂O wurden 42 mg (12%) von **65** in Form eines farblosen Feststoffs erhalten. Abweichend von der AAV1 musste die MPLC dreimal durchgeführt werden, um die gewünschte Reinheit zu erreichen.

Ausbeute: 42 mg (12%) (farbloser Feststoff)

Smp.: 138 °C (DCM/MeOH/NH₃(MeOH))

MS (ES+):

m/z (%) = 506 (100, [M+H]⁺)

HRMS (ES+):

m/z berechnet für C₂₆H₂₈N₅O₄S : 506.186202

gefunden : 506.183771

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 399.79 MHz):

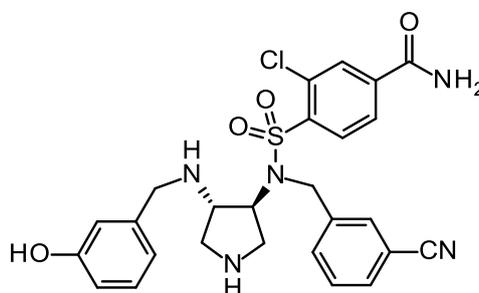
δ_{H} (ppm) = 9.32	<i>brs</i> , 1H, OH-C-CH-CH-CH-C-CH
8.23	<i>brs</i> , 1H, CONH ₂
8.09	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> =8.5 Hz, SO ₂ -C-CH-CH-C-C-NH ₂
8.00	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> =8.5 Hz, SO ₂ -C-CH-CH-C-C-NH ₂
7.86	<i>s</i> , 1H, NC-C-CH-CH-CH-C-CH
7.81	<i>d</i> , 1H, ³ <i>J</i> =8.0 Hz, NC-C-CH-CH-CH-C-CH
7.76	<i>d</i> , 1H, ³ <i>J</i> =7.8 Hz, NC-C-CH-CH-CH-C-CH
7.65	<i>brs</i> , 1H, CONH ₂
7.54	<i>t</i> , 1H, ³ <i>J</i> =7.8 Hz, NC-C-CH-CH-CH-C-CH
7.10-7.04	<i>sm</i> , 1H, OH-C-CH-CH-CH-C-CH
6.66-6.61	<i>m</i> , 2H, OH-C-CH-CH-CH-C-CH
6.57	<i>d</i> , 1H, ³ <i>J</i> =7.8 Hz, OH-C-CH-CH-CH-C-CH
4.66	<i>d</i> , 1H, ² <i>J</i> =17.6 Hz, S-N-CH ₂
4.55	<i>d</i> , 1H, ² <i>J</i> =17.6 Hz, S-N-CH ₂
4.48	<i>ddd</i> , 1H, ³ <i>J</i> =8.5 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin)
3.32-3.20	2H, NH-CH ₂ -Ar (überlagert mit H ₂ O)
3.15	<i>dd</i> , 1H, ² <i>J</i> =10.8 Hz, ³ <i>J</i> =6.9 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin)
3.11-3.01	<i>m</i> , 2H, CH ₂ (Pyrrolidin), CH ₂ (Pyrrolidin)
2.71	<i>dd</i> , 1H, ² <i>J</i> =10.5 Hz, ³ <i>J</i> =8.7 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin)
2.62	<i>dd</i> , 1H, ² <i>J</i> =12.0 Hz, ³ <i>J</i> =7.8 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin)

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 100.53 MHz):

δ_{C} (ppm) = 166.4	C=O
157.3	OH-C-CH-CH-CH-C-CH
141.4	SO ₂ -C-CH-CH-C-C-NH ₂
141.0	NC-C-CH-CH-CH-C-CH
140.2	OH-C-CH-CH-CH-C-CH
138.4	SO ₂ -C-CH-CH-C-C-NH ₂
132.1	NC-C-CH-CH-CH-C-CH
131.0	NC-C-CH-CH-CH-C-CH
130.7	NC-C-CH-CH-CH-C-CH
129.5	NC-C-CH-CH-CH-C-CH
129.1	OH-C-CH-CH-CH-C-CH

128.6	SO ₂ -C- <u>C</u> H-CH-C-C-NH ₂
127.2	SO ₂ -C-CH- <u>C</u> H-C-C-NH ₂
118.7	NC- <u>C</u> -CH-CH-CH-C-CH
118.4	OH-C-CH-CH- <u>C</u> H-C-CH
114.8	OH-C- <u>C</u> H-CH-CH-C-CH
113.8	OH-C-CH-CH-CH-C- <u>C</u> H
111.2	NC- <u>C</u> -CH-CH-CH-C-CH
60.8	<u>C</u> H _(Pyrrolidin)
57.9	<u>C</u> H _(Pyrrolidin)
51.2	<u>C</u> H ₂
47.2	<u>C</u> H ₂
46.5	<u>C</u> H ₂
43.3	<u>C</u> H ₂ (Pyrrolidin)

4-[(3-Cyanophenyl)methyl-[(3S,4S)-4-[(3-hydroxyphenyl)methylamino]pyrrolidin-3-yl]sulfonyl]benzamid (66)



Unter Verwendung der AAV1 mit 256 mg *tert*-Butyl-(3S,4S)-3-[(4-carbamoyl-2-chlorophenyl)sulfonyl-[(3-cyanophenyl)methyl]amino]-4-[(3-hydroxyphenyl)methylamino]-pyrrolidin-1-carboxylat **134** (0.40 mmol), 2 ml DCM und 2 ml 2M HCl in Et₂O wurden 31 mg (14%) von **66** in Form eines farblosen Feststoffs erhalten. Abweichend von der AAV1 musste die MPLC dreimal durchgeführt werden, um die gewünschte Reinheit zu erreichen.

Ausbeute: 31 mg (14%)

(farbloser Feststoff)

Smp.: 151 °C (DCM/MeOH/NH₃(MeOH))

MS (ES+):

m/z (%) = 540 (100, [M+H]⁺)

HRMS (ES+):

m/z berechnet für C₂₆H₂₇ClN₅O₄S : 540.147229
 gefunden : 540.151832

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 399.79 MHz):

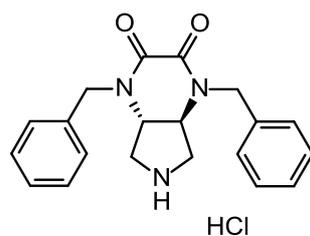
δ _H (ppm) = 9.33	<i>brs</i> , 1H, OH-C-CH-CH-CH-C-CH
8.28	<i>brs</i> , 1H, CONH ₂
8.15	<i>d</i> , 1H, ⁴ J=1.6 Hz, SO ₂ -C-CH-CH-C-CH-C-Cl
8.09	<i>d</i> , 1H, ³ J=8.2 Hz, SO ₂ -C-CH-CH-C-CH-C-Cl
7.95	<i>dd</i> , 1H, ³ J=8.2 Hz, ⁴ J=1.6 Hz, SO ₂ -C-CH-CH-C-CH-C-Cl
7.77	<i>s</i> , 1H, NC-C-CH-CH-CH-C-CH
7.76	<i>d</i> , 2H, ³ J=8.0 Hz, NC-C-CH-CH-CH-C-CH, CONH ₂
7.73	<i>dt</i> , 1H, ³ J=7.6 Hz, ⁴ J=1.3 Hz, NC-C-CH-CH-CH-C-CH
7.52	<i>t</i> , 1H, ³ J=7.8 Hz, NC-C-CH-CH-CH-C-CH
7.09	<i>dt</i> , 1H, ³ J=7.6 Hz, ⁵ J=0.9 Hz, OH-C-CH-CH-CH-C-CH
6.68-6.61	<i>m</i> , 3H, ³ J=7.3 Hz, OH-C-CH-CH-CH-C-CH
4.84	<i>d</i> , 1H, ² J=17.4 Hz, S-N-CH ₂
4.76	<i>d</i> , 1H, ² J=17.4 Hz, S-N-CH ₂
4.37	<i>ddd</i> , 1H, ³ J=8.5 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin)
3.37-3.30	2H, NH-CH ₂ -Ar (überlagert mit H ₂ O)
3.20	<i>ddd</i> , 2H, J=6.6 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin), CH ₂ (Pyrrolidin)
3.10	<i>dd</i> , 1H, ² J=11.9 Hz, ³ J=9.2 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin)
2.93	<i>dd</i> , 1H, ² J=11.9 Hz, ³ J=8.7 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin)
2.77	<i>pst</i> , 1H, J=12.3 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin)
2.27	<i>brs</i> , 1H, NH

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 100.53 MHz):

δ _C (ppm) = 164.9	CONH ₂
157.3	OH-C-CH-CH-CH-C-CH
141.5	NC-C-CH-CH-CH-C-CH
139.6	SO ₂ -C-CH-CH-C-CH-C-Cl

138.7	SO ₂ - <u>C</u> -CH-CH-C-CH-C-Cl, OH-C-CH-CH-CH- <u>C</u> -CH
132.1	SO ₂ -C-CH-CH-C-CH- <u>C</u> -Cl
131.9	NC-C-CH-CH-CH-C- <u>CH</u>
131.2	NC-C- <u>CH</u> -CH-CH-C-CH
130.80	SO ₂ -C-CH-CH-C- <u>CH</u> -C-Cl
130.76	SO ₂ -C-CH- <u>CH</u> -C-CH-C-Cl
130.6	NC-C-CH-CH- <u>CH</u> -C-CH
129.6	NC-C-CH- <u>CH</u> -CH-C-CH
129.1	OH-C-CH- <u>CH</u> -CH-C-CH
126.8	SO ₂ -C- <u>CH</u> -CH-C-CH-C-Cl
118.5	NC- <u>C</u> -CH-CH-CH-C-CH
118.4	OH-C-CH-CH- <u>CH</u> -C-CH
114.9	OH-C- <u>CH</u> -CH-CH-C-CH
113.9	OH-C-CH-CH-CH-C- <u>CH</u>
111.3	NC- <u>C</u> -CH-CH-CH-C-CH
60.3	<u>CH</u> (Pyrrolidin)
57.3	<u>CH</u> (Pyrrolidin)
51.1	<u>CH</u> ₂
47.4	<u>CH</u> ₂
47.1	<u>CH</u> ₂
43.5	<u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)

(4a*S*,7a*S*)-1,4-Dibenzyl-5,6,7,7a-tetrahydro-4a*H*-pyrrolo[3,4-*b*]pyrazin-2,3-dionhydrochlorid (73)



Unter Verwendung der AAV2 mit 55 mg (0.13 mmol) *tert*-Butyl-(4a*S*,7a*S*)-1,4-dibenzyl-2,3-dioxo-4a,5,7,7a-tetrahydropyrrolo[3,4-*b*]pyrazin-6-carboxylat **145** in 1 ml DCM und 1 ml 2 M HCl in Et₂O wurden 43 mg (91 %) von **73** in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

Ausbeute: 43 mg (91%) (farbloser Feststoff)

Smp.: 237 °C (DCM/Et₂O)

EA: C₂₀H₂₁N₃O₂*HCl*H₂O (389.88 g/mol)

Ber.: C: 61.61 H: 6.20 N: 10.78

Gef: C: 61.68 H: 6.23 N: 10.55

MS (ES+):

m/z (%) = 336 (100, [M+H]⁺), 358 (48, [M+Na]⁺)

HRMS (EI+):

m/z berechnet für C₂₀H₂₁N₃O₂ : 335.163377

gefunden : 335.164173

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

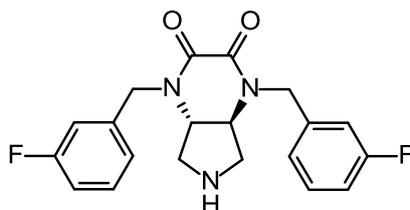
δ _H (ppm) = 9.77	s, 2H, <u>NH</u> ₂ ⁺ (Pyrrolidin)
7.39-7.27	<i>m</i> , 10H, Ar- <u>H</u>
4.71	<i>d</i> , 2H, ² <i>J</i> =15.8 Hz, Ar- <u>CH</u> ₂
4.54	<i>d</i> , 2H, ² <i>J</i> =15.8 Hz, Ar- <u>CH</u> ₂
4.24-4.12	<i>sm</i> , 2H, <u>CH</u> (Pyrrolidin)
3.50	<i>dd</i> , 2H, ² <i>J</i> =10.5 Hz, ³ <i>J</i> =6.5 Hz, <u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)
3.12-3.00	<i>sm</i> , 2H, <u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)

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

δ _C (ppm) = 157.7	O= <u>C</u> - <u>C</u> =O
136.6	CH ₂ - <u>C</u> -CH-CH-CH
128.6	CH ₂ -C-CH- <u>C</u> H-CH
127.44	CH ₂ -C-CH-CH- <u>C</u> H
127.38	CH ₂ -C- <u>C</u> H-CH-CH

56.2	$\underline{\text{C}}\text{H}_{(\text{Pyrrolidin})}$
48.0	$\underline{\text{C}}\text{H}_2(\text{Pyrrolidin})$
43.8	$\text{Ar}-\underline{\text{C}}\text{H}_2$

(4a*S*,7a*S*)-1,4-Bis[(3-fluorophenyl)methyl]-5,6,7,7a-tetrahydro-4a*H*-pyrrolo[3,4-b]pyrazin-2,3-dion (75)



Unter Verwendung der AAV1 mit 75 mg (0.16 mmol) *tert*-Butyl-(4a*S*,7a*S*)-1,4-bis[(3-fluorophenyl)methyl]-2,3-dioxo-4a,5,7,7a-tetrahydropyrrolo[3,4-b]pyrazin-6-carboxylat **146** in 2 ml EtOAc und 4 ml 2M HCl in Et₂O wurden 40 mg (68 %) von **75** in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

Ausbeute: 40 mg (68%) (farbloser Feststoff)

Smp.: 239 °C (DCM/MeOH/NH₃)

EA: C₂₀H₁₉N₃O₂F₂ (371.38 g/mol)

Ber.: C: 64.68 H: 5.16 N: 11.31

Gef.: C: 64.85 H: 5.40 N: 11.13

MS (ES+):

m/z (%) = 372 (30, [M+H]⁺), 394 (20, [M+Na]⁺), 765 (100, [2M+Na]⁺), 1114 (79, [3M+H]⁺)

HRMS (ES+):

m/z berechnet für C₂₀H₂₀N₃O₂F₂ : 372.152359

gefunden : 372.154556

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 399.79 MHz):

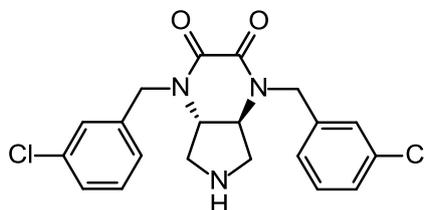
δ_{H} (ppm) = 7.38 dt, 2H, ³J=8.1 Hz, ⁴J_{H,F}=6.2 Hz, F-C-CH-CH-CH-C

7.20-7.06	<i>m</i> , 6H, Ar- <u>H</u>
4.63	<i>d</i> , 2H, $^2J=15.6$ Hz, Ar- <u>CH₂</u>
4.50	<i>d</i> , 2H, $^2J=15.8$ Hz, Ar- <u>CH₂</u>
4.02-3.92	<i>sm</i> , 2H, <u>CH</u> _(Pyrrolidin)
3.07-2.96	<i>sm</i> , 2H, <u>CH₂</u> _(Pyrrolidin)
2.86	<i>brs</i> , 1H, <u>NH</u> _(Pyrrolidin)
2.75-2.64	<i>sm</i> , 2H, <u>CH₂</u> _(Pyrrolidin)

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 100.53 MHz):

δ_{C} (ppm) = 162.3	<i>d</i> , $^1J_{\text{C,F}}=241.79$ Hz, F- <u>C</u> -CH-CH-CH-C-CH
158.4	O= <u>C</u> - <u>C</u> =O
140.3	<i>d</i> , $^3J_{\text{C,F}}=7.71$ Hz, F-C-CH-CH-CH- <u>C</u> -CH
130.5	<i>d</i> , $^3J_{\text{C,F}}=8.67$ Hz, F-C-CH- <u>CH</u> -CH-C-CH
123.3	<i>d</i> , $^4J_{\text{C,F}}=2.9$ Hz, F-C-CH-CH- <u>CH</u> -C-CH
114.13	<i>d</i> , $^2J_{\text{C,F}}=21.2$ Hz, F-C-CH-CH-CH-C- <u>CH</u>
114.07	<i>d</i> , $^2J_{\text{C,F}}=21.2$ Hz, F-C- <u>CH</u> -CH-CH-C-CH
59.0	<u>CH</u> _(Pyrrolidin)
47.5	<u>CH₂</u> _(Pyrrolidin)
45.7	Ar- <u>CH₂</u>

(4a*S*,7a*S*)-1,4-Bis[(3-chlorophenyl)methyl]-5,6,7,7a-tetrahydro-4a*H*-pyrrolo[3,4-b]pyrazin-2,3-dion (76)



Unter Verwendung der AAV1 mit 628 mg (1.25 mmol) *tert*-Butyl-(4a*S*,7a*S*)-1,4-bis[(3-chlorophenyl)methyl]-2,3-dioxo-4a,5,7,7a-tetrahydropyrrolo[3,4-b]pyrazin-6-carboxylat **147** in 5 ml DCM und 5 ml 2M HCl in Et₂O wurden 139 mg (28 %) von **76** in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

Ausbeute: 139 mg (28 %) (farbloser Feststoff)

Smp.: 241 °C (DCM/MeOH/NH₃)

EA: C₂₀H₁₉N₃O₂Cl₂ (404.29 g/mol)

Ber.: C: 59.42 H: 4.74 N: 10.39

Gef.: C: 59.53 H: 4.90 N: 10.49

MS (ES+):

m/z (%) = 404 (100, [M^{35Cl}+H]⁺), 406 (57, [M^{35Cl,37Cl}+H]⁺), 809 (25, [2M^{35Cl,37Cl}+H]⁺)

HRMS (EI+):

m/z berechnet für C₂₀H₁₉N₃O₂Cl₂ : 403.085433

gefunden : 403.083713

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

δ _H (ppm) = 7.39	<i>t</i> , 2H, ⁴ J=1.7 Hz, Cl-C-CH-CH-CH-C- <u>CH</u>
7.39-7.35	<i>m</i> , 2H, ³ J=7.5 Hz, Cl-C-CH- <u>CH</u> -CH-C-CH
7.33	<i>dt</i> , 2H, ³ J=8.3 Hz, ⁴ J=1.7 Hz, Cl-C- <u>CH</u> -CH-CH-C-CH
7.28	<i>dt</i> , 2H, ³ J=7.5 Hz, ⁴ J=1.4 Hz, Cl-C-CH-CH- <u>CH</u> -C-CH
4.62	<i>d</i> , 2H, ² J=15.5 Hz, Ar- <u>CH</u> ₂
4.49	<i>d</i> , 2H, ² J=15.8 Hz, Ar- <u>CH</u> ₂
4.01-3.92	<i>sm</i> , 2H, <u>CH</u> _(Pyrrolidin)
3.07-3.00	<i>sm</i> , 2H, <u>CH</u> _{2(Pyrrolidin)}
2.74-2.66	<i>sm</i> , 2H, <u>CH</u> _{2(Pyrrolidin)}

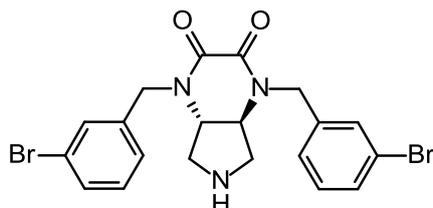
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 125.77 MHz):

δ _C (ppm) = 158.4	O= <u>C</u> - <u>C</u> =O
139.9	Cl-C-CH-CH-CH- <u>C</u> -CH
133.1	Cl- <u>C</u> -CH-CH-CH-C-CH
130.3	Cl-C-CH- <u>CH</u> -CH-C-CH
127.2	Cl-C-CH-CH- <u>CH</u> -C-CH
127.1	Cl-C-CH-CH-CH-C- <u>CH</u>
126.0	Cl-C- <u>CH</u> -CH-CH-C-CH
58.9	<u>CH</u> _(Pyrrolidin)
47.4	<u>CH</u> _{2(Pyrrolidin)}

45.7

Ar-CH₂

(4a*S*,7a*S*)-1,4-Bis[(3-bromophenyl)methyl]-5,6,7,7a-tetrahydro-4a*H*-pyrrolo[3,4-b]pyrazin-2,3-dion (77**)**



Unter Verwendung der AAV1 mit 241 mg (0.41 mmol) *tert*-Butyl-(4a*S*,7a*S*)-1,4-bis[(3-bromophenyl)methyl]-2,3-dioxo-4a,5,7,7a-tetrahydropyrrolo[3,4-b]pyrazin-6-carboxylat **148** in 2 ml DCM und 2 ml 2M HCl in Et₂O wurden 50 mg (25 %) von **77** in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

Ausbeute: 50 mg (25%) (farbloser Feststoff)

Smp.: 232 °C (DCM/MeOH/NH₃)

EA: C₂₀H₁₉N₃O₂Br₂ (493.19 g/mol)

Ber.: C: 48.71 H: 3.88 N: 8.52

Gef.: C: 48.78 H: 4.02 N: 8.66

MS (ES+):

m/z (%) = 494 (7, [M^{79Br,81Br}+H]⁺), 516 (9, [M^{79Br,81Br}+Na]⁺), 1009 (100, [2M^{79Br,81Br}+Na]⁺), 1480 (51, [3M^{79Br,81Br}+H]⁺)

HRMS (ES+):

m/z berechnet für C₂₀H₂₀N₃O₂Br₁81Br₁ : 493.990178

gefunden : 493.991783

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 399.79 MHz):

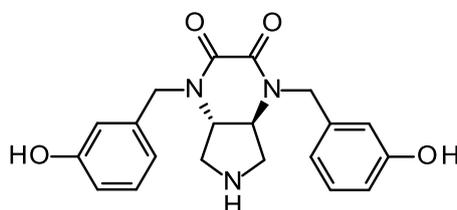
δ_H (ppm) = 7.53 brs, 2H, Br-C-CH-CH-CH-C-CH

7.49-7.45	<i>m</i> , 2H, Br-C-CH ₂ -CH-CH-C-CH
7.34-7.27	<i>m</i> , 4H, Br-C-CH-CH-CH-C-CH
4.61	<i>d</i> , 2H, ² <i>J</i> =15.8 Hz, Ar-CH ₂
4.48	<i>d</i> , 2H, ² <i>J</i> =15.8 Hz, Ar-CH ₂
4.02-3.90	<i>sm</i> , 2H, CH ₂ (Pyrrolidin)
3.02	<i>dd</i> , 2H, ² <i>J</i> =8.9 Hz, ³ <i>J</i> =6.4 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin)
2.81	<i>brs</i> , 1H, NH(Pyrrolidin)
2.73-2.64	<i>sm</i> , 2H, CH ₂ (Pyrrolidin)

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 100.53 MHz):

δ _C (ppm) = 158.4	O=C-C=O
140.1	Br-C-CH-CH-CH-C-CH
130.6	Br-C-CH-CH-CH-C-CH
130.1	Br-C-CH-CH-CH-C-CH
129.9	Br-C-CH-CH-CH-C-CH
126.4	Br-C-CH-CH-CH-C-CH
121.8	Br-C-CH-CH-CH-C-CH
58.9	CH(Pyrrolidin)
47.4	CH ₂ (Pyrrolidin)
45.7	Ar-CH ₂

**(4*aS*,7*aS*)-1,4-Bis[(3-hydroxyphenyl)methyl]-5,6,7,7*a*-tetrahydro-4*aH*-pyrrolo
[3,4-*b*]pyrazin-2,3-dion (78)**



Unter Verwendung der AAV1 mit 220 mg (0.32 mmol) *tert*-Butyl-(4*aS*,7*aS*)-1,4-bis[[3-*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxyphenyl]methyl]-2,3-dioxo-4*a*,5,7,7*a*-tetrahydropyrrolo[3,4-

b]pyrazin-6-carboxylat **149** in 2 ml DCM und 2 ml 2M HCl in Et₂O wurden 42 mg (36 %) von **78** in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

Ausbeute: 42 mg (36%) (farbloser Feststoff)

Smp.: 254 °C (DCM/MeOH/NH₃)

EA: C₂₀H₂₁N₃O₄ (367.40g/mol)

Ber.: C: 65.38 H: 5.76 N: 11.44

Gef.: C: 65.08 H: 5.84 N: 11.36

MS (ES+):

m/z (%) = 368 (100, [M+H]⁺), 390 (42, [M+Na]⁺)

HRMS (EI+):

m/z berechnet für C₂₀H₂₁N₃O₄ : 367.153206

gefunden : 367.151040

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

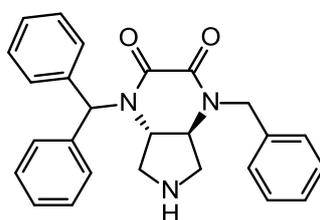
δ _H (ppm) = 9.39	s, 2H, Ar-O <u>H</u>
7.15-7.10	m, 2H, HO-C-CH-CH <u>H</u> -CH
6.67	pst, 6H, ³ J=8.02 Hz, Ar- <u>H</u>
4.71	d, 2H, ² J=15.2 Hz, Ar-CH <u>2</u>
4.25	d, 2H, ² J=15.2 Hz, Ar-CH <u>2</u>
3.86-3.76	sm, 2H, CH(Pyrrolidin)
3.06-2.98	sm, 2H, CH ₂ (Pyrrolidin)
2.89	brs, 1H, NH(Pyrrolidin)
2.81-2.73	sm, 2H, CH ₂ (Pyrrolidin)

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

δ _C (ppm) = 158.1	HO- <u>C</u> -CH-CH-CH-C-CH
157.5	O= <u>C</u> - <u>C</u> =O
138.2	HO-C-CH-CH-CH- <u>C</u> -CH
129.5	HO-C-CH- <u>CH</u> -CH-C-CH
117.9	HO-C-CH-CH- <u>CH</u> -C-CH
114.3	HO-C- <u>CH</u> -CH-CH-C-CH

114.0	HO-C-CH-CH-CH-C- <u>CH</u>
58.6	<u>CH</u> (Pyrrolidin)
47.6	Ar- <u>CH</u> ₂
45.6	<u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)

(4a*S*,7a*S*)-4-Benzhydryl-1-benzyl-5,6,7,7a-tetrahydro-4a*H*-pyrrolo[3,4-*b*]pyrazin-2,3-dion (87)



Unter Verwendung der AAV1 mit 130 mg (0.25 mmol) *tert*-Butyl-(4a*S*,7a*S*)-4-benzhydryl-1-benzyl-2,3-dioxo-4a,5,7,7a-tetrahydropyrrolo[3,4-*b*]pyrazine-6-carboxylat **154** in 1 ml DCM und 1 ml 2M HCl in Et₂O wurden 29 mg (28 %) von **87** in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

Ausbeute: 29 mg (28 %) (farbloser Feststoff)

Smp.: 188 °C (DCM/MeOH/NH₃)

EA: C₂₆H₂₅N₃O₂ * 0.25 H₂O (416.00 g/mol)

Ber.: C: 75.07 H: 6.18 N: 10.10

Gef.: C: 75.07 H: 6.26 N: 10.29

MS (ES+):

m/z (%) = 167 (100), 412 (5, [M+H]⁺), 434 (2, [M+Na]⁺)

HRMS (EI+):

m/z berechnet für C₂₆H₂₅N₃O₂ : 411.194677

gefunden : 411.194142

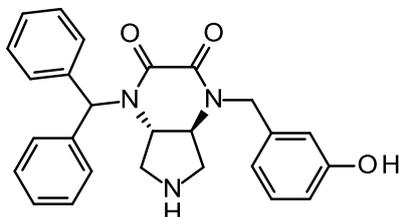
¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 500.16 MHz):

δ_{H} (ppm) = 7.41-7.20	<i>m</i> , 15H, Ar- <u>H</u>
6.36	<i>s</i> , 1H, Ar- <u>CH</u> -N
4.67	<i>d</i> , 1H, ² <i>J</i> =15.5 Hz, Ar- <u>CH</u> ₂
4.45	<i>d</i> , 1H, ² <i>J</i> =15.5 Hz, Ar- <u>CH</u> ₂
4.08	<i>ddd</i> , 1H, ³ <i>J</i> =10.6 Hz, ³ <i>J</i> =6.9 Hz, <u>CH</u> _(Pyrrolidin)
3.95	<i>ddd</i> , 1H, ³ <i>J</i> =10.6 Hz, ³ <i>J</i> =7.2 Hz, <u>CH</u> _(Pyrrolidin)
2.99	<i>dd</i> , 1H, ² <i>J</i> =9.5 Hz, ³ <i>J</i> =6.9 Hz, <u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)
2.77	<i>brs</i> , 1H, NH _(Pyrrolidin)
2.67	<i>pst</i> , 1H, <i>J</i> =10.0 Hz, <u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)
2.59	<i>pst</i> , 1H, <i>J</i> =10.0 Hz, <u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)
2.36	<i>dd</i> , 1H, ² <i>J</i> =9.7 Hz, ³ <i>J</i> =7.5 Hz, <u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)

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

δ_{C} (ppm) = 158.4	O= <u>C</u> - <u>C</u> =O
158.2	O= <u>C</u> - <u>C</u> =O
138.9	N- <u>CH</u> ₂ - <u>C</u> _{Ar}
138.3, 137.2	N- <u>CH</u> - <u>C</u> _{Ar}
129.0	<u>CH</u> _{Ar}
128.5	<u>CH</u> _{Ar}
128.3	<u>CH</u> _{Ar}
128.14	<u>CH</u> _{Ar}
128.06	<u>CH</u> _{Ar}
127.6	<u>CH</u> _{Ar}
127.3	<u>CH</u> _{Ar}
127.2	<u>CH</u> _{Ar}
63.4	N- <u>CH</u> - <u>C</u> _{Ar}
59.9	<u>CH</u> _(Pyrrolidin)
59.2	<u>CH</u> _(Pyrrolidin)
47.8	<u>CH</u> ₂
46.5	<u>CH</u> ₂
45.3	<u>CH</u> ₂

(4a*S*,7a*S*)-4-Benzhydryl-1-[(3-hydroxyphenyl)methyl]-5,6,7,7a-tetrahydro-4a*H*-pyrrolo[3,4-*b*]pyrazin-2,3-dion (88**)**



Unter Verwendung der AAV1 mit 20 mg (0.03 mmol) *tert*-Butyl-(4a*S*,7a*S*)-4-benzhydryl-1-[[3-[[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxyphenyl]methyl]-2,3-dioxo-4a,5,7,7a-tetrahydropyrrolo[3,4-*b*]pyrazin-6-carboxylat **155** in 1 ml DCM und 1 ml 2M HCl in Et₂O wurden 8 mg (63 %) von **88** in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

Ausbeute: 8 mg (63 %) (farbloser Feststoff)

Smp.: 192 °C (DCM/MeOH/NH₃)

MS (ES+):

m/z (%) = 167 (100), 428 (37, [M+H]⁺), 450 (15, [M+Na]⁺)

HRMS (EI+):

m/z	berechnet für C ₂₆ H ₂₅ N ₃ O ₃	:	427.189592
	gefunden	:	427.187240

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

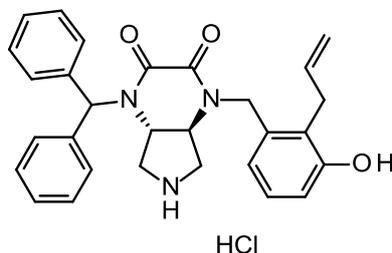
δ _H (ppm) =	9.40	s, 1H, Ar-OH
	7.41-7.20	m, 10H, Ar-H
	7.13	t, 1H, ³ J=7.73 Hz, O-C-CH-CH-CH-C
	6.73-6.64	m, 3H, Ar-H
	6.36	s, 1H, Ar-CH-N
	4.65	d, 1H, ² J=15.18 Hz, Ar-CH ₂
	4.32	d, 1H, ² J=15.46 Hz, Ar-CH ₂
	4.05	ddd, 1H, ³ J=10.60 Hz, ³ J=6.87 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin)
	3.94	ddd, 1H, ³ J=10.60 Hz, ³ J=7.45 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin)

3.01	<i>dd</i> , 1H, $^2J=9.45$ Hz, $^3J=6.87$ Hz, $\underline{\text{CH}}_2(\text{Pyrrolidin})$
2.73	<i>pst</i> , 1H, $J=10.2$ Hz, $\underline{\text{CH}}_2(\text{Pyrrolidin})$
2.62	<i>pst</i> , 1H, $J=10.2$ Hz, $\underline{\text{CH}}_2(\text{Pyrrolidin})$
2.41	<i>dd</i> , 1H, $^2J=9.74$ Hz, $^3J=7.16$ Hz, $\underline{\text{CH}}_2(\text{Pyrrolidin})$

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 125.77 MHz, Rotamere):

δ_{C} (ppm) = 158.2	$\text{O}=\underline{\text{C}}-\underline{\text{C}}=\text{O}$
158.1	$\text{O}=\underline{\text{C}}-\underline{\text{C}}=\text{O}$
157.5	$\text{O}-\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}$
138.8	$\text{N}-\underline{\text{CH}}_2-\underline{\text{C}}$
138.4, 138.3	$\text{N}-\underline{\text{CH}}-\underline{\text{C}}$
129.5	$\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{Ar}}$
129.0	$\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{Ar}}$
128.3	$\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{Ar}}$
128.2	$\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{Ar}}$
128.0	$\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{Ar}}$
127.6	$\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{Ar}}$
127.2	$\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{Ar}}$
117.9	$\text{O}-\text{C}-\text{CH}-\text{CH}-\underline{\text{C}}\text{H}-\text{C}-\text{CH}$
114.3, 114.0	$\text{O}-\text{C}-\text{CH}-\text{CH}-\text{CH}-\text{C}-\underline{\text{C}}\text{H}$
63.5	$\text{N}-\underline{\text{C}}\text{H}-\text{C}_{\text{Ar}}$
59.8	$\underline{\text{C}}\text{H}_{(\text{Pyrrolidin})}$
59.0	$\underline{\text{C}}\text{H}_{(\text{Pyrrolidin})}$
47.6	$\underline{\text{C}}\text{H}_2$
46.4	$\underline{\text{C}}\text{H}_2$
45.2	$\underline{\text{C}}\text{H}_2$

(4a*S*,7a*S*)-1-[(2-Allyl-3-hydroxy-phenyl)methyl]-4-benzhydryl-5,6,7,7a-tetrahydro-4a*H*-pyrrolo[3,4-*b*]pyrazin-2,3-dionhydrochlorid (89**)**



Unter Verwendung der AAV1 mit 49 mg (0.07 mmol) *tert*-Butyl-(4a*S*,7a*S*)-1-[[2-allyl-3-[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy-phenyl]methyl]-4-benzhydryl-2,3-dioxo-4a,5,7,7a-tetrahydro-pyrrolo[3,4-*b*]pyrazin-6-carboxylat **156** in 1 ml DCM und 1 ml 2M HCl in Et₂O wurden 20 mg (61 %) der freien Base von **89** erhalten. Im Anschluss wurde die freie Base mit 1 ml DCM und 1 ml 2M HCl in Et₂O in ihr Hydrochlorid überführt und das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt. So konnten 21 mg (60 %) von **89** in Form eines farblosen Feststoff erhalten werden.

Ausbeute: 21 mg (60 %) (farbloser Feststoff)

Smp.: 211 °C (DCM/Et₂O)

EA: C₂₉H₂₉N₃O₃ *HCl *H₂O (522.04 g/mol)

Ber.: C: 66.72 H: 6.18 N: 8.05

Gef.: C: 66.36 H: 6.26 N: 7.76

MS (ES+):

m/z (%) = 468 (100, [M+H]⁺), 485 (7, [M+NH₄]⁺), 490 (10, [M+Na]⁺)

HRMS (EI+):

m/z berechnet für C₂₉H₂₉N₃O₃ : 467.220892

gefunden : 467.218036

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 399.79 MHz):

δ_H (ppm) = 9.47 s, 1H, Ar-OH

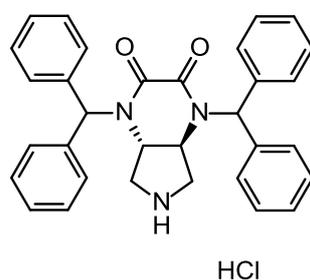
9.24	<i>brs</i> , 2H, NH_2^+ (Pyrrolidin)
7.45-7.24	<i>m</i> , 10H, Ar- <u>H</u>
7.04	<i>t</i> , 1H, $^3J=7.8$ Hz, O-C-CH- <u>CH</u> -CH-C
6.80	<i>d</i> , 1H, $^3J=8.0$ Hz, Ar- <u>H</u>
6.77	<i>d</i> , 1H, $^3J=7.6$ Hz, Ar- <u>H</u>
6.48	<i>s</i> , 1H, Ar- <u>CH</u> -N
5.88-5.75	<i>sm</i> , 1H, C-CH ₂ - <u>CH</u> =CH ₂
4.93-4.83	<i>sm</i> , 2H, C-CH ₂ -CH= <u>CH</u> ₂
4.60	<i>s</i> , 2H, Ar- <u>CH</u> ₂
4.38	<i>ddd</i> , 1H, $^3J=11.2$ Hz, $^3J=6.9$ Hz, <u>CH</u> (Pyrrolidin)
4.27	<i>ddd</i> , 1H, $^3J=11.0$ Hz, $^3J=7.6$ Hz, <u>CH</u> (Pyrrolidin)
3.41-3.21	<i>m</i> , 3H, C- <u>CH</u> ₂ -CH-CH ₂ , <u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin) (überlagert mit H ₂ O)
2.94	<i>pst</i> , 1H, $J=11.2$ Hz, <u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)
2.88	<i>pst</i> , 1H, $J=11.2$ Hz, <u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)
2.65	<i>dd</i> , 1H, $^2J=11.0$ Hz, $^3J=7.3$ Hz, <u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 100.53 MHz, Rotamere):

δ_{C} (ppm) =	157.73	O= <u>C</u> - <u>C</u> =O
	157.68	O= <u>C</u> - <u>C</u> =O
	155.4	O- <u>C</u> _{Ar}
	138.5	N-CH ₂ - <u>C</u>
	137.7	N-CH- <u>C</u>
	136.1	C-CH ₂ - <u>CH</u> -CH ₂
	135.5	<u>C</u> -CH ₂ -CH-CH ₂
	129.1	<u>CH</u> _{Ar}
	128.6	<u>CH</u> _{Ar}
	128.3	<u>CH</u> _{Ar}
	128.1	<u>CH</u> _{Ar}
	128.0	<u>CH</u> _{Ar}
	127.5	<u>CH</u> _{Ar}
	127.0	<u>CH</u> _{Ar}
	123.3	O-C-CH-CH- <u>CH</u> -C-C
	117.9	O-C- <u>CH</u> -CH-CH-C-C
	114.5, 114.3	C-CH ₂ -CH= <u>CH</u> ₂
	63.3	N- <u>CH</u> -C
	56.7	<u>CH</u> (Pyrrolidin)

46.2	<u>C</u> H ₂
44.3	<u>C</u> H ₂
43.2	<u>C</u> H ₂
29.1	C- <u>C</u> H ₂ -CH=CH ₂

(4a*S*,7a*S*)-1,4-Dibenzhydryl-5,6,7,7a-tetrahydro-4a*H*-pyrrolo[3,4-*b*]pyrazin-2,3-dionhydrochlorid (90)



Unter Verwendung der AAV2 mit 80 mg (0.41 mmol) *tert*-Butyl-(4a*S*,7a*S*)-1,4-dibenzhydryl-2,3-dioxo-4a,5,7,7a-tetrahydropyrrolo[3,4-*b*]pyrazin-6-carboxylat **150** in 1 ml DCM und 1 ml 2M HCl in Et₂O wurden nach 3 d rühren 34 mg (52 %) von **90** in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

Ausbeute: 34 mg (52 %) (farbloser Feststoff)

Smp.: 211 °C (DCM/Et₂O)

EA: C₃₂H₂₉N₃O₂ *HCl *H₂O (542.07 g/mol)

Ber.: C: 70.90 H: 5.95 N: 7.75

Gef.: C: 70.67 H: 6.26 N: 8.16

MS (ES+):

m/z (%) = 488 (100, [M+H]⁺)

HRMS (EI+):

m/z	berechnet für C ₃₂ H ₂₉ N ₃ O ₂	:	487.225977
	gefunden	:	487.226765

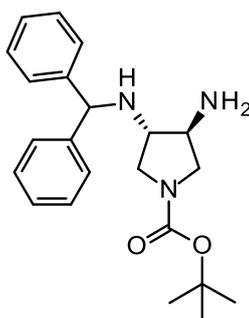
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 30.0 °C, 399.79 MHz):

δ_{H} (ppm) = 9.26	<i>brs</i> , 2H, NH_2^+ (Pyrrolidin)
7.47-7.22	<i>m</i> , 20H, Ar- <u>H</u>
6.41	<i>s</i> , 2H, Ar- <u>CH</u> -N
4.53-4.42	<i>sm</i> , 2H, <u>CH</u> (Pyrrolidin)
2.94-2.71	<i>m</i> , 4H, <u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 30.0 °C, 100.53 MHz, Rotamere):

δ_{C} (ppm) = 157.7	O= <u>C</u> - <u>C</u> =O
138.6, 137.8	N-CH- <u>C</u> -CH-CH-CH
129.1, 128.5	N-CH-C-CH- <u>CH</u> -CH
128.3, 128.1	N-CH-C- <u>CH</u> -CH-CH
127.9, 127.4	N-CH-C-CH-CH- <u>CH</u>
63.6	N- <u>CH</u> -C-CH-CH-CH
57.4	<u>CH</u> (Pyrrolidin)
43.7	<u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)

***tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-amino-4-(benzhydrylamino)pyrrolidin-1-carboxylat (91)**



0.60 g (2.98 mmol) *tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3,4-diaminopyrrolidin-1-carboxylat **16** [52] wurden in 20 ml Acetonitril gelöst, mit 0.97 g Cs₂CO₃ (2.98 mmol) versetzt und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde [Bromo(phenyl)methyl]benzen (0.74 g, 2.98 mmol) portionsweise hinzugegeben, die Reaktion innerhalb von 1 h auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Gesättigte Kochsalzlösung (50 ml) wurde hinzugefügt, mit EtOAc extrahiert (3 x 50 ml), mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen

(1 x 50 ml), über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt. Aufreinigung mittels MPLC (DCM/MeOH/NH₃ 100:0:0.1 - 95:5:0.1) ergab 0.61 g (56 %) von **91** in Form eines farblosen Feststoffs.

Ausbeute: 0.61 g (56 %) (farbloser Feststoff)

Smp.: 111 °C (DCM/MeOH/NH₃)

MS (ES+):

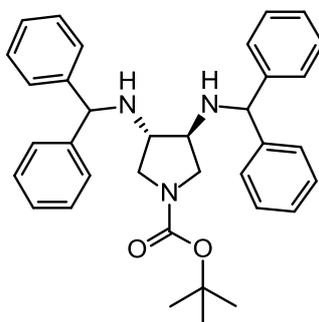
m/z (%) = 368 (100, [M+H]⁺), 735 (14, [2M+H]⁺)

HRMS (EI+):

m/z	berechnet für C ₂₂ H ₂₉ N ₃ O ₂	:	367.225977
	gefunden	:	367.226860

¹H-NMR (DMSO-d₆, 30.0 °C, 399.79 MHz):

δ _H (ppm) =	7.45-7.39	<i>m</i> , 4H, C-CH-CH-CH
	7.32-7.25	<i>m</i> , 4H, C-CH-CH-CH
	7.21-7.15	<i>m</i> , 2H, C-CH-CH-CH
	4.88	<i>s</i> , 1H, Ar-CH-NH
	3.48-3.39	<i>m</i> , 1H, CH ₂ (Pyrrolidin)
	3.37-3.29	<i>m</i> , 1H, CH ₂ (Pyrrolidin) (überlagert mit H ₂ O)
	3.14	<i>dd</i> , 1H, ² J=12.7 Hz, ³ J=6.3 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin)
	2.93	<i>pstd</i> , 1H, J=11.0 Hz, J=6.6 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin)
	2.80	<i>ddd</i> , 1H, ³ J=10.1 Hz, ³ J=6.6 Hz, CH(Pyrrolidin)
	2.75	<i>brs</i> , 1H, Ar-CH-NH
	2.70-2.59	<i>m</i> , 1H, CH(Pyrrolidin)
	1.74	<i>brs</i> , 2H, NH ₂
	1.36	<i>s</i> , 9H, O-C-(CH ₃) ₃

***tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3,4-bis(benzhydrylamino)pyrrolidin-1-carboxylat (**93**)**

0.30 g (1.49 mmol) *tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3,4-diaminopyrrolidin-1-carboxylat **16** [52] wurden in 8 ml Acetonitril gelöst, mit 0.97 g Cs₂CO₃ (2.98 mmol) versetzt und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde [Bromo(phenyl)methyl]benzen (0.74 g, 2.98 mmol) portionsweise hinzugegeben, die Reaktion innerhalb von 1 h auf Raumtemperatur erwärmt und 5 d gerührt. Gesättigte Kochsalzlösung (50 ml) wurde hinzugefügt, mit EtOAc extrahiert (3 x 50 ml), mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen (1 x 50 ml), über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt. Aufreinigung mittels MPLC (Cyclohexan/EtOAc 100:0 - 90:10) ergab 0.45 g (57 %) von **93** in Form eines farblosen Feststoffs.

Ausbeute: 0.45 g (57 %) (farbloser Feststoff)

Smp.: 69 °C (Cyclohexan/EtOAc)

EA: C₃₅H₃₉N₃O₂ (533.70 g/mol)

Ber.: C: 78.77 H: 7.37 N: 7.87

Gef: C: 78.40 H: 7.54 N: 7.93

MS (ES+):

m/z (%) = 534 (100, [M+H]⁺)

HRMS (EI+):

m/z berechnet für C₃₅H₃₉N₃O₂ : 533.304228

gefunden : 533.306153

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 399.79 MHz):

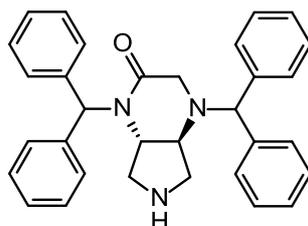
δ _H (ppm) = 7.39	<i>t</i> , 8H, ³ <i>J</i> =6.8 Hz, C-CH-CH ₂ -CH
7.29	<i>dt</i> , 8H, ³ <i>J</i> =7.3 Hz, ⁴ <i>J</i> =6.0 Hz, C-CH ₂ -CH-CH
7.19	<i>pstq</i> , 4H, ³ <i>J</i> =7.3 Hz, <i>J</i> =1.5 Hz, C-CH-CH-CH ₂
4.87	<i>psd</i> , 2H, ³ <i>J</i> =8.7 Hz, Ar-CH ₂ -NH
3.40-3.28	<i>m</i> , 2H, CH ₂ (Pyrrolidin)
3.04-2.92	<i>m</i> , 4H, CH ₂ (Pyrrolidin), CH(Pyrrolidin)
2.70	<i>brs</i> , 2H, Ar-CH-NH
1.34	<i>s</i> , 9H, O-C-(CH ₃) ₃

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 22.1 °C, 100.53 MHz, Rotamere):

δ _C (ppm) = 153.6	N-COO-C
144.8, 144.6	NH-CH-C-CH-CH-CH
128.3	NH-CH-C-CH-CH-CH
126.7	NH-CH-C-CH-CH-CH
78.1	O-C-(CH ₃) ₃
64.7, 64.6	NH-CH-C-CH-CH-CH
60.1, 59.5	CH(Pyrrolidin)
50.2, 50.0	CH ₂ (Pyrrolidin)
28.2	O-C-(CH ₃) ₃

(4a*S*,7a*S*)-1,4-Dibenzhydryl-2,4a,5,6,7,7a-hexahydropyrrolo[3,4-*b*]pyrazin-3-on

(96)



Unter Verwendung der AAV1 mit 180 mg von **97** in 2 ml DCM und 2 ml 2M HCl in Et₂O wurden 21 mg (6 % über zwei Stufen) von **96** in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

Ausbeute: 21 mg (6 % über zwei Stufen) (farbloser Feststoff)

Smp.: 120 °C (DCM/MeOH/NH₃)

EA: C₃₂H₃₁N₃O₁ *0.5 H₂O (482.62 g/mol)

Ber.: C: 79.64 H: 6.68 N: 8.71

Gef.: C: 79.89 H: 6.64 N: 8.87

MS (ES+):

m/z (%) = 167 (75), 474 (100, [M+H]⁺), 496 (7, [M+Na]⁺), 947 (7, [2M+H]⁺)

HRMS (EI+):

m/z berechnet für C₃₂H₃₁N₃O₁ : 473.246713

gefunden : 473.245622

¹H-NMR (DMSO-d₆, 30.0 °C, 500.16 MHz, Rotamere):

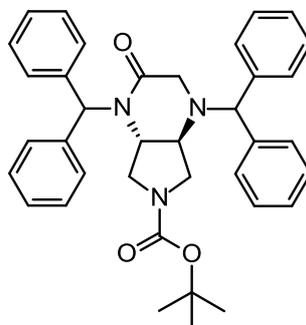
δ _H (ppm) = 7.47-7.17	<i>m</i> , 20H, Ar-H
6.31	<i>s</i> , 1H, Ar- <u>CH</u> -N-C-O
4.64	<i>s</i> , 1H, Ar- <u>CH</u> -N-CH ₂
3.62	<i>ddd</i> , 1H, ³ <i>J</i> =9.9 Hz, ³ <i>J</i> =7.2 Hz, <u>CH</u> (Pyrrolidin)
3.26	<i>d</i> , 1H, ² <i>J</i> =16.9 Hz, O-C- <u>CH</u> ₂
2.96-2.89	<i>m</i> , 1H, <u>CH</u> (Pyrrolidin)
2.91	<i>d</i> , 1H, ² <i>J</i> =16.9 Hz, O-C- <u>CH</u> ₂
2.72	<i>brs</i> , 1H, <u>NH</u> (Pyrrolidin)
2.56	<i>dd</i> , 1H, ² <i>J</i> =9.6 Hz, ³ <i>J</i> =7.0 Hz, <u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)
2.47	<i>pst</i> , 1H, <i>J</i> =10.2 Hz, <u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)
2.38	<i>dd</i> , 1H, ² <i>J</i> =10.0 Hz, ³ <i>J</i> =6.3 Hz, <u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)
2.17	<i>pst</i> , 1H, <i>J</i> =10.2 Hz, <u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 30.0 °C, 125.77 MHz, Rotamere):

δ_C (ppm) = 167.8 N-C-O

142.8	$\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}$
140.4	$\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}$
139.3	$\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}$
138.6	$\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}$
128.9	$\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{Ar}}$
128.5	$\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{Ar}}$
128.4	$\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{Ar}}$
128.2	$\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{Ar}}$
128.1	$\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{Ar}}$
128.0	$\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{Ar}}$
127.7	$\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{Ar}}$
127.3	$\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{Ar}}$
127.2	$\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{Ar}}$
127.1	$\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{Ar}}$
127.0	$\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{Ar}}$
72.9	$\text{C-N-}\underline{\text{C}}\text{H-C}_{\text{Ar}}$
67.3	$\text{CH}_2\text{-N-}\underline{\text{C}}\text{H-C}_{\text{Ar}}$
62.3	$\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{(Pyrrolidin)}}$
61.9	$\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{(Pyrrolidin)}}$
57.4	$\text{O-C-}\underline{\text{C}}\text{H}_2$
47.5	$\underline{\text{C}}\text{H}_2_{\text{(Pyrrolidin)}}$
46.9	$\underline{\text{C}}\text{H}_2_{\text{(Pyrrolidin)}}$

***tert*-Butyl-(4a*S*,7a*S*)-1,4-dibenzhydryl-3-oxo-4a,5,7,7a-tetrahydro-2H-pyrrolo[3,4-b]pyrazin-6-carboxylat (97)**



0.40 g (0.74 mmol) *tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3,4-bis(benzhydrylamino)pyrrolidine-1-carboxylat **93** wurde in 40 ml DCM gelöst und mit 390 μ l DIPEA (2.22 mmol) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde auf -10 °C gekühlt und bei dieser Temperatur 90 μ l Chloracetylchlorid (1.11 mmol) zugegeben. Es wurde innerhalb von 2 h auf 0 °C erwärmt und anschließend noch 1 h bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt. Aufreinigung mittels MPLC (Cyclohexan/EtOAc 100:0 - 0:100) führte nicht zur gewünschten Reinheit. Die so erhaltenen 180 mg in Form eines braunem Feststoffs wurden ohne weitere Reinigung umgesetzt.

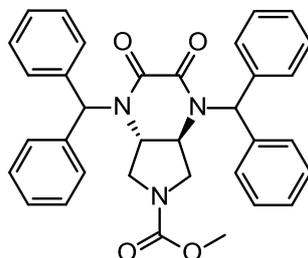
MS (ES+):

m/z (%) = 167 (100), 574 (3, $[M+H]^+$), 596 (14, $[M+Na]^+$)

HRMS (EI+):

m/z	berechnet für C ₃₇ H ₃₉ N ₃ O ₃	:	573.299143
	gefunden	:	573.297116

Methyl-(4a*S*,7a*S*)-1,4-dibenzhydryl-2,3-dioxo-4a,5,7,7a-tetrahydropyrrolo[3,4-b]pyrazin-6-carboxylat (98**)**



60 mg des (4a*S*,7a*S*)-1,4-Dibenzhydryl-5,6,7,7a-tetrahydro-4a*H*-pyrrolo[3,4-b]pyrazin-2,3-dionhydrochlorids **90** (0.11 mmol) wurden in 4 ml DCM gelöst, mit 36 mg Na₂CO₃ (0.34 mmol) versetzt und auf 0 °C gekühlt. Nach 10 minütigen Rühren wurden 18 µl Methylchloroformat (0.23 mmol) zugegeben. Die Reaktion wurde auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Anschließend wurden 10 ml H₂O hinzugegeben, mit DCM extrahiert (3 x 10 ml), die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen (1 x 10 ml), über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt. So konnten 49 mg (82 %) von **98** in Form eines farblosen Feststoffs erhalten werden.

Ausbeute: 49 mg (82 %) (farbloser Feststoff)

Smp.: 281 °C (DCM)

MS (ES+):

m/z (%) = 546 (3, [M+H]⁺), 563 (100, [M+NH₄]⁺), 568 (61, [M+Na]⁺)

HRMS (EI+):

m/z	berechnet C ₃₄ H ₃₁ N ₃ O ₄	:	545.231457
	gefunden	:	545.231597

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 399.79 MHz, Rotamere):

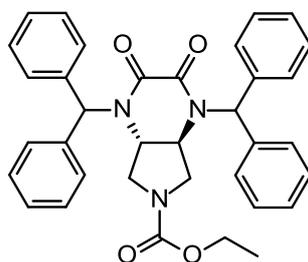
δ_H (ppm) =	7.44-7.22	<i>m</i> , 20H, Ar- <u>H</u>
	6.36	<i>s</i> , 1H, Ar- <u>CH</u> -N
	6.26	<i>s</i> , 1H, Ar- <u>CH</u> -N

4.55-4.35	<i>sm</i> , 2H, $\underline{\text{CH}}$ _(Pyrrolidin)
3.44	<i>s</i> , 3H, $\underline{\text{CH}}_3$
3.16	<i>dd</i> , 1H, $^2J=9.3$ Hz, $^3J=7.0$ Hz, $\underline{\text{CH}}_2$ _(Pyrrolidin)
3.11-2.95	<i>m</i> , 3H, $\underline{\text{CH}}_2$ _(Pyrrolidin)

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 100.53 MHz, Rotamere):

δ_{C} (ppm) = 157.9, 157.8	O= $\underline{\text{C}}$ - $\underline{\text{C}}$ =O
154.0	N- $\underline{\text{C}}$ OO-CH ₃
138.8, 138.1	N-CH- $\underline{\text{C}}$ -CH-CH-CH
128.9, 128.8	N-CH-C-CH- $\underline{\text{C}}$ H-CH
128.4, 128.3	N-CH-C-CH- $\underline{\text{C}}$ H-CH
128.2, 128.1	N-CH-C- $\underline{\text{C}}$ H-CH-CH
127.7, 127.6	N-CH-C- $\underline{\text{C}}$ H-CH-CH
127.3	N-CH-C-CH-CH- $\underline{\text{C}}$ H
63.8, 63.6	N- $\underline{\text{C}}$ H-C-CH-CH-CH
58.1, 57.4	$\underline{\text{C}}$ H _(Pyrrolidin)
52.2	$\underline{\text{C}}$ H ₃
46.4, 46.0	$\underline{\text{C}}$ H ₂ _(Pyrrolidin)

Ethyl-(4a*S*,7a*S*)-1,4-dibenzhydryl-2,3-dioxo-4a,5,7,7a-tetrahydropyrrolo[3,4-b]pyrazin-6-carboxylat (99)



60 mg des (4a*S*,7a*S*)-1,4-Dibenzhydryl-5,6,7,7a-tetrahydro-4a*H*-pyrrolo[3,4-b]pyrazin-2,3-dionhydrochlorids **90** (0.11 mmol) wurden in 4 ml DCM gelöst, mit 36 mg Na₂CO₃ (0.34 mmol) versetzt und auf 0 °C gekühlt. Nach 10 minütigen Rühren wurden 22 μ l Ethylchloroformat (0.23 mmol) zugegeben. Die Reaktion wurde auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Anschließend wurden 10 ml H₂O

hinzugegeben, mit DCM extrahiert (3 x 10 ml), die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen (1 x 10 ml), über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt. So konnten 54 mg (87 %) von **99** in Form eines farblosen Feststoffs erhalten werden.

Ausbeute: 54 mg (87 %) (farbloser Feststoff)

Smp.: 289 °C (DCM)

MS (ES+):

m/z (%) = 577 (100, [M+NH₄]⁺), 582 (73, [M+Na]⁺)

HRMS (EI+):

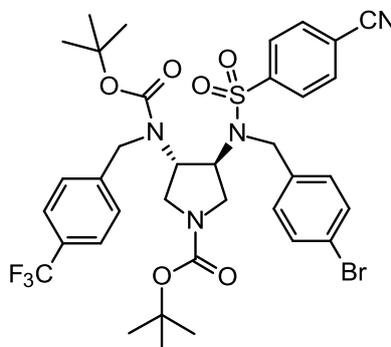
m/z berechnet C₃₅H₃₃N₃O₄ : 559.247107

gefunden : 559.244473

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 399.79 MHz, Rotamere):

δ _H (ppm) = 7.46-7.21	<i>m</i> , 20H, Ar- <u>H</u>
6.35	<i>s</i> , 1H, Ar- <u>CH</u> -N
6.28	<i>s</i> , 1H, Ar- <u>CH</u> -N
4.52-4.38	<i>sm</i> , 2H, <u>CH</u> _(Pyrrolidin)
3.95-3.79	<i>sm</i> , 2H, <u>CH</u> ₂ -CH ₃
3.12-2.92	<i>m</i> , 4H, <u>CH</u> ₂ _(Pyrrolidin)
1.03	<i>t</i> , 3H, ³ <i>J</i> =7.0 Hz, CH ₂ - <u>CH</u> ₃

***tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-[(4-bromophenyl)methyl-(4-cyanophenyl)sulfonyl-amino]-4-[*tert*-butoxycarbonyl-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]amino]pyrrolidin-1-carboxylat (**108**)**



Unter Verwendung der AAV6 wurden 0.50 g *tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-[*tert*-butoxycarbonyl-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]amino]-4-[(4-cyanophenyl)sulfonylamino]-pyrrolidin-1-carboxylat **36** (0.80 mmol), 0.39 g Cs₂CO₃ (1.20 mmol) und 240 mg 1-Bromo-4-(bromomethyl)benzen (0.96 mmol) in 8 ml MeCN 2 h erhitzt. Aufreinigung mittels MPLC (DCM/MeOH 97.5:2.5) ergab 0.48 g (76%) von **108** in Form eines farblosen Feststoffs.

Ausbeute: 0.48 g (76%) (farbloser Feststoff)

Smp.: 98 °C (DCM/MeOH)

EA: C₃₆H₄₀BrF₃N₄O₆S (793.69 g/mol)

Ber.: C:54.48 H:5.08 N:7.06

Gef: C:54.86 H:5.31 N:6.98

MS (ES+):

m/z (%) = 408 (100, [M^{79Br}-C₁₉H₂₃F₃Br+H]⁺), 793 (38, [M^{79Br}+H]⁺), 815 (14, [M^{79Br}+Na]⁺), 817 (51, [M^{81Br}+Na]⁺)

HRMS (ES+):

m/z berechnet für C₃₆H₄₀BrF₃N₄O₆SNa : 815.170173

gefunden : 815.173699

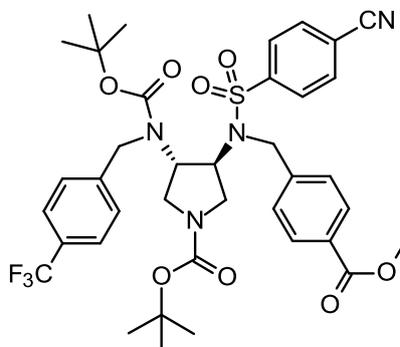
¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 399.79 MHz, Rotamere):

δ_{H} (ppm) = 8.20-7.97	<i>m</i> , 4H, SO ₂ -C-CH-CH-C-CN
7.70	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> =8.2 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
7.56-7.47	<i>m</i> , 2H, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
7.28	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> =6.4 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C-Br
7.25	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> =7.8 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C-Br
4.85	<i>brs</i> , 1H, S-N-CH ₂ -Ar
4.74-4.49	<i>m</i> , 3H, S-N-CH ₂ -Ar, CH _(Pyrrolidin)
4.39	<i>d</i> , 1H, ² <i>J</i> =16.9 Hz, C-N-CH ₂ -Ar
4.05-3.76	<i>m</i> , 1H, CH _(Pyrrolidin)
3.24	<i>brs</i> , 1H, CH ₂ (Pyrrolidin)
3.10	<i>brs</i> , 1H, CH ₂ (Pyrrolidin)
2.93-2.73	<i>m</i> , 2H, CH ₂ (Pyrrolidin)
1.49-1.13	<i>m</i> , 9H, O-C-(CH ₃) ₃
1.28	<i>s</i> , 9H, O-C-(CH ₃) ₃

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 100.53 MHz, Rotamere):

δ_{C} (ppm) = 154.1	N-COO-C
153.0	N-COO-C
143.9	SO ₂ -C-CH-CH-C-CN, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
137.1	CH ₂ -C-CH-CH-C-Br
133.6	SO ₂ -C-CH-CH-C-CN
131.2	CH ₂ -C-CH-CH-C-Br
129.9-129.5	CH ₂ -C-CH-CH-C-Br
127.6	CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
127.1-126.4	SO ₂ -C-CH-CH-C-CN, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
125.2	<i>q</i> , ³ <i>J</i> _{C,F} =2.8 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
124.2	<i>q</i> , ¹ <i>J</i> _{C,F} =272.6 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
120.5	CH ₂ -C-CH-CH-C-Br
117.5	SO ₂ -C-CH-CH-C-CN
115.4	SO ₂ -C-CH-CH-C-CN
78.8	O-C-(CH ₃) ₃
57.2-54.9	CH _(Pyrrolidin)
47.6-44.1	CH ₂
27.9	O-C-(CH ₃) ₃
27.7	O-C-(CH ₃) ₃

***tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-[*tert*-butoxycarbonyl-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]amino]-4-[(4-cyanophenyl)sulfonyl-[(4-methoxycarbonylphenyl)methyl]amino]pyrrolidin-1-carboxylat (109)**



Unter Verwendung der AAV6 wurden 0.30 g *tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-[*tert*-butoxycarbonyl-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]amino]-4-[(2-chloro-4-cyano-phenyl)sulfonylamino]-pyrrolidin-1-carboxylat **36** (0.48 mmol), 0.24 g Cs₂CO₃ (0.72 mmol) und 133 mg Methyl-4-(bromomethyl)benzoat (0.58 mmol) in 5 ml MeCN 2 h erhitzt. Abweichend von der AAV6 wurde nach dem Extrahieren keine MPLC durchgeführt und das Rohprodukt direkt weiter umgesetzt.

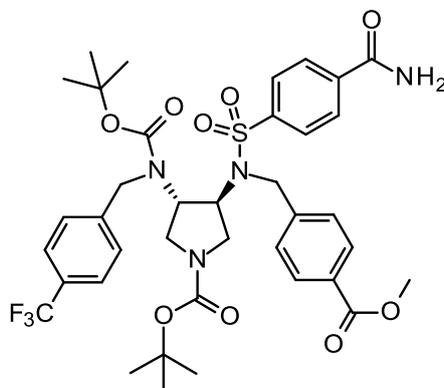
MS (ES+):

m/z (%) = 773 (1, [M+H]⁺), 790 (100, [M+NH₄]⁺), 795 (2, [M+Na]⁺)

HRMS (ES+):

m/z	berechnet für C ₃₈ H ₄₃ F ₃ N ₄ O ₈ SNa	:	795.265141
	gefunden	:	795.267237

***tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-[*tert*-butoxycarbonyl-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]amino]-4-[[4-(4-carbamoylphenyl)sulfonyl-[(4-methoxycarbonylphenyl)methyl]amino]pyrrolidin-1-carboxylat (**110**)**



Unter Verwendung der AAV7 wurden das Rohprodukt **109**, 33 mg K_2CO_3 (0.24 mmol) und 2.5 ml 30% aq. H_2O_2 in 5 ml DMSO 1 h gerührt. Abweichend von der AAV7 wurde nicht mit H_2O gefällt, sondern direkt extrahiert und im Anschluss mittels MPLC (DCM/MeOH 98:2 - 90:10) aufgereinigt. So konnten 0.21 g (55%) von **110** in Form eines farblosen Feststoffs über zwei Stufen erhalten werden.

Ausbeute: 0.21 g (55%) über zwei Stufen (farbloser Feststoff)

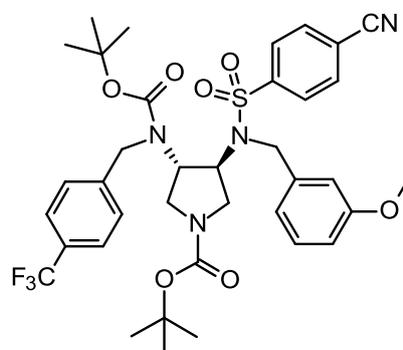
MS (ES+):

m/z (%) = 791 (7, $[M+H]^+$), 808 (100, $[M+NH_4]^+$), 813 (24, $[M+Na]^+$)

HRMS (ES+):

m/z	berechnet für $C_{38}H_{45}F_3N_4O_9SNa$:	813.275706
	gefunden	:	813.280125

***tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-[*tert*-butoxycarbonyl-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]amino]-4-[(4-cyanophenyl)sulfonyl-[(3-methoxyphenyl)methyl]amino]pyrrolidin-1-carboxylat (111)**



Unter Verwendung der AAV6 wurden 0.60 g *tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-[*tert*-butoxycarbonyl-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]amino]-4-[(2-chloro-4-cyano-phenyl)sulfonylamino]-pyrrolidin-1-carboxylat **36** (0.96 mmol), 0.47 g Cs₂CO₃ (1.44 mmol) und 231 mg 1-(Bromomethyl)-3-methoxy-benzen (1.15 mmol) in 10 ml MeCN 2 h erhitzt. Abweichend von der AAV6 wurde nach dem Extrahieren keine MPLC durchgeführt und das Rohprodukt direkt weiter umgesetzt.

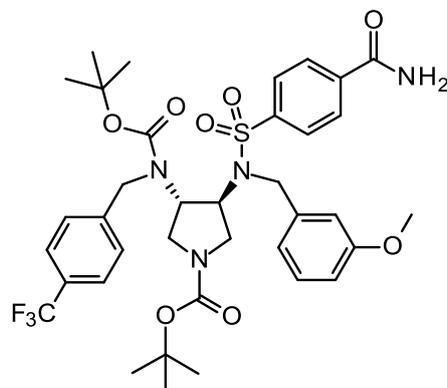
MS (ES+):

m/z (%) = 170 (100), 745 (14, [M+H]⁺), 762 (61, [M+NH₄]⁺), 767 (35, [M+Na]⁺)

HRMS (ES+):

m/z	berechnet für C ₃₇ H ₄₃ F ₃ N ₄ O ₇ SNa	:	767.270226
	gefunden	:	767.268872

***tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-[*tert*-butoxycarbonyl-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]amino]-4-[(4-carbamoylphenyl)sulfonyl-[(3-methoxyphenyl)methyl]amino]pyrrolidin-1-carboxylat (**112**)**



Unter Verwendung der AAV7 wurden das Rohprodukt aus **111**, 66 mg K_2CO_3 (0.48 mmol) und 5 ml 30% aq. H_2O_2 in 10 ml DMSO 1 h gerührt. Aufarbeitung nach AAV7 und anschließende Aufreinigung mittels MPLC (DCM/MeOH 98:2 - 90:10) ergab 0.47 g (65%) von **112** in Form eines farblosen Feststoffs über zwei Stufen.

Ausbeute: 0.47 g (65%) über zwei Stufen (farbloser Feststoff)

Smp.: 107 °C (DCM/MeOH)

EA: $C_{37}H_{45}F_3N_4O_8S$ (762.84 g/mol)

Ber.: C:58.26 H:5.95 N:7.34

Gef: C:58.21 H:5.93 N:7.45

MS (ES+):

m/z (%) = 780 (100, $[M+NH_4]^+$), 785 (3, $[M+Na]^+$)

HRMS (ES+):

m/z berechnet für $C_{37}H_{45}F_3N_4O_8SNa$: 785.280791

gefunden : 785.280998

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

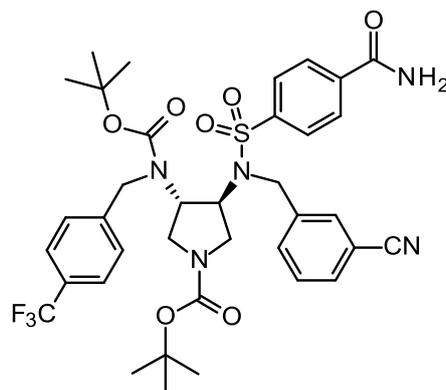
δ_{H} (ppm) = 8.21	<i>brs</i> , 1H, CONH ₂
8.10	<i>brs</i> , 2H, SO ₂ -C-CH-CH-C-C-NH ₂
7.94	<i>brs</i> , 2H, SO ₂ -C-CH-CH-C-C-NH ₂
7.67	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> =8.3 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
7.62	<i>brs</i> , 1H, CONH ₂
7.32-7.15	<i>m</i> , 3H, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃ , CH ₃ -O-C-CH-CH-CH-C-CH
7.00-6.81	<i>m</i> , 3H, CH ₃ -O-C-CH-CH-CH-C-CH
4.83	<i>brs</i> , 1H, S-N-CH ₂
4.64	<i>brs</i> , 1H, S-N-CH ₂
4.55	<i>brs</i> , 2H, C-N-CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
4.29	<i>brs</i> , 1H, C-N-CH ₂ (Pyrrolidin)
3.71	<i>s</i> , 3H, O-CH ₃
3.56	<i>brs</i> , 1H, S-N-CH ₂ (Pyrrolidin)
3.19	<i>brs</i> , 2H, CH ₂ (Pyrrolidin)
2.94-2.74	<i>m</i> , 2H, CH ₂ (Pyrrolidin)
1.50-1.12	<i>brpsd</i> , 9H, O-C-(CH ₃) ₃
1.26	<i>s</i> , 9H, O-C-(CH ₃) ₃

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

δ_{C} (ppm) = 166.3, 166.2	<u>C</u> ONH ₂
159.3	CH ₃ -O- <u>C</u> -CH-CH-CH-C-CH
154.1	N- <u>C</u> OO-C
153.0	N- <u>C</u> OO-C
144.7-143.7	SO ₂ - <u>C</u> -CH-CH-C-C-NH ₂
142.2	CH ₂ - <u>C</u> -CH-CH-C-CF ₃
139.6	CH ₃ -O-C-CH-CH-CH- <u>C</u> -CH
138.0	SO ₂ -C-CH-CH- <u>C</u> -C-NH ₂
129.5	O-C-CH- <u>C</u> H-CH-C-CH
128.5	SO ₂ -C-CH- <u>C</u> H-C-C-NH ₂
127.4	<i>q</i> , ² <i>J</i> _{C,F} =30.0 Hz, CH ₂ -C-CH-CH- <u>C</u> -CF ₃
126.8	SO ₂ -C- <u>C</u> H-CH-C-C-NH ₂ , CH ₂ -C- <u>C</u> H-CH-C-CF ₃
125.1	CH ₂ -C-CH- <u>C</u> H-C-CF ₃
124.2	<i>q</i> , ¹ <i>J</i> _{C,F} =271.1 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C- <u>C</u> F ₃
119.9-119.4	CH ₃ -O-C-CH-CH- <u>C</u> H-C-CH
113.2	CH ₃ -O-C- <u>C</u> H-CH-CH-C-CH

112.8, 112.7	CH ₃ -O-C-CH-CH-CH-C- <u>CH</u>
78.7	CH ₃ -O- <u>C</u> -(CH ₃) ₃
54.9	<u>CH</u> ₃
47.0	<u>CH</u> ₂
27.8	O-C-(<u>CH</u> ₃) ₃
27.7	O-C-(<u>CH</u> ₃) ₃

***tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-[*tert*-butoxycarbonyl-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]amino]-4-[(4-carbamoylphenyl)sulfonyl-[(3-cyanophenyl)methyl]amino]pyrrolidin-1-carboxylat (**113**)**



Unter Verwendung der AAV6 wurden 0.50 g *tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-[*tert*-butoxycarbonyl-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]amino]-4-[(4-carbamoylphenyl)sulfonyl-amino]-pyrrolidin-1-carboxylat **49** (0.78 mmol), 0.38 g Cs₂CO₃ (1.18 mmol) und 0.18 g 3-(Bromomethyl)benzonitril (0.94 mmol) in 8 ml MeCN 24 h erhitzt. Aufreinigung mittels MPLC (DCM/MeOH 97.5:2.5) ergab 0.36 g (60%) von **113** in Form eines farblosen Feststoffs.

Ausbeute: 0.36 g (60%) (farbloser Feststoff)

Smp.: 126 °C (DCM/MeOH)

EA: C₃₇H₄₂F₃N₅O₇S (757.82 g/mol)

Ber.: C:58.64 H:5.59 N:9.24

Gef: C:58.15 H:5.80 N:9.09

MS (ES+):

m/z (%) = 208 (100), 775 (78, $[M+NH_4]^+$), 780 (22, $[M+Na]^+$)

HRMS (ES+):

m/z berechnet für $C_{37}H_{42}F_3N_5O_7SNa$: 780.265475
 gefunden : 780.256644

1H -NMR (DMSO- d_6 , 30.0 °C, 399.79 MHz, Rotamere):

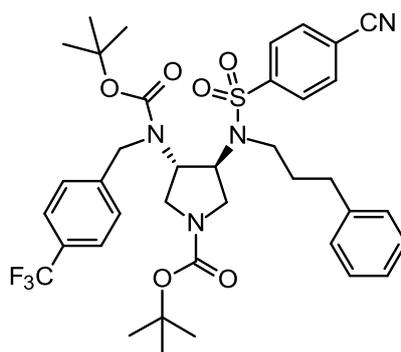
δ_H (ppm) = 8.22	<i>brs</i> , 1H, $CONH_2$
8.10	<i>brs</i> , 2H, $SO_2-C-CH-CH-C-C-NH_2$
7.97	<i>brs</i> , 2H, $SO_2-C-CH-CH-C-C-NH_2$
7.79-7.52	<i>m</i> , 7H, $C_{Ar}-H$, $CONH_2$
7.30	<i>d</i> , 1H, $^3J=7.6$ Hz, $CH_2-C-CH-CH-C-CF_3$
7.26	<i>d</i> , 1H, $^3J=7.3$ Hz, $CH_2-C-CH-CH-C-CF_3$
4.97-4.77	<i>m</i> , 1H, $CH_{(Pyrrolidin)}$
4.75-4.46	<i>m</i> , 3H, CH_2-Ar , $CH_{(Pyrrolidin)}$
4.39	<i>d</i> , 1H, $^2J=16.9$ Hz, CH_2-Ar
3.98, 3.85	<i>psdd</i> , 1H, $^2J=16.9$ Hz, CH_2-Ar
3.26-2.91	<i>m</i> , 2H, $CH_2_{(Pyrrolidin)}$
2.90-2.70	<i>m</i> , 2H, $CH_2_{(Pyrrolidin)}$
1.46-1.10	<i>m</i> , 9H, $O-C-(CH_3)_3$
1.27	<i>s</i> , 9H, $O-C-(CH_3)_3$

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 22.2 °C, 100.53 MHz, Rotamere):

δ_C (ppm) = 166.3, 166.1	$\underline{C}ONH_2$
154.3	N- $\underline{C}OO-C$
153.1	N- $\underline{C}OO-C$
144.5	$SO_2-\underline{C}-CH-CH-C-C-NH_2$
141.6	$CH_2-\underline{C}-CH-CH-C-CF_3$
140.1, 140.0	$CH_2-\underline{C}-CH-C-CN$
138.3	$SO_2-C-CH-CH-\underline{C}-C-NH_2$
132.5-132.3	$NC-C-\underline{C}H-CH-CH-C-CH$
131.1	$NC-C-CH-CH-CH-C-\underline{C}H$
130.9-130.7	$NC-C-CH-CH-\underline{C}H-C-CH$

129.6	NC-C-CH- <u>C</u> H-CH-C-CH
128.6	CH ₂ -C- <u>C</u> H-CH-C-CF ₃ , SO ₂ -C- <u>C</u> H-CH-C-C-NH ₂
127.0-126.5	CH ₂ -C-CH-CH- <u>C</u> -CF ₃
127.2	SO ₂ -C-CH- <u>C</u> H-C-C-NH ₂
125.2	CH ₂ -C-CH- <u>C</u> H-C-CF ₃
124.3	<i>q</i> , ¹ J _{C,F} =271.7 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C- <u>C</u> F ₃
118.7	NC- <u>C</u> -CH-CH-CH-C-CH
111.2	NC- <u>C</u> -CH-CH-CH-C-CH
80.0	O- <u>C</u> -(CH ₃) ₃
78.9, 78.85,	
78.79	O- <u>C</u> -(CH ₃) ₃
57.3-54.0	<u>CH</u> (Pyrrolidin)
47.2-43.7	<u>CH</u> ₂
27.9	O-C-(<u>C</u> H ₃) ₃
27.7	O-C-(<u>C</u> H ₃) ₃

***tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-[*tert*-butoxycarbonyl-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]amino]-4-[[4-(4-cyanophenyl)sulfonyl-(3-phenylpropyl)amino]pyrrolidin-1-carboxylat (114)**



Unter Verwendung der AAV6 wurden 0.60 g *tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-[*tert*-butoxycarbonyl-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]amino]-4-[[2-chloro-4-cyano-phenyl]-sulfonylamino]-pyrrolidin-1-carboxylat **36** (0.96 mmol), 0.47 g Cs₂CO₃ (1.44 mmol) und 229 mg 3-Bromopropylbenzen (1.15 mmol) in 10 ml MeCN 15 h erhitzt.

Abweichend von der AAV6 wurde nach dem Extrahieren keine MPLC durchgeführt und das Rohprodukt direkt weiter umgesetzt.

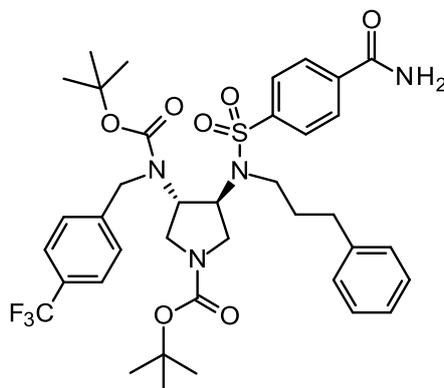
MS (ES+):

m/z (%) = 147 (100), 743 (40, $[M+H]^+$), 760 (37, $[M+NH_4]^+$), 765 (10, $[M+Na]^+$)

HRMS (ES+):

m/z	berechnet für $C_{38}H_{45}F_3N_4O_6SNa$:	765.290962
	gefunden	:	765.286157

***tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-[*tert*-butoxycarbonyl-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]amino]-4-[(4-carbamoylphenyl)sulfonyl-(3-phenylpropyl)amino]pyrrolidin-1-carboxylat (**115**)**



Unter Verwendung der AAV7 wurden das Rohprodukt aus **114**, 66 mg K_2CO_3 (0.48 mmol) und 5 ml 30% aq. H_2O_2 in 20 ml DMSO 2 h gerührt. Aufarbeitung nach AAV7 ergab 0.57 g (78%) von **115** in Form eines farblosen Feststoffs über zwei Stufen.

Ausbeute: 0.57 g (78%) über zwei Stufen (farbloser Feststoff)

Smp.: 97 °C (EtOAc)

EA: $C_{38}H_{47}F_3N_4O_7S$ (760.86 g/mol)

Ber.: C:59.99 H:6.23 N:7.36

Gef: C:59.61 H:6.32 N:7.41

MS (ES+):

m/z (%) = 761 (9, [M+H]⁺), 778 (100, [M+NH₄]⁺), 783 (4, [M+Na]⁺)

HRMS (ES+):

m/z berechnet für C₃₈H₄₇F₃N₄O₇SNa : 783.301527
 gefunden : 783.300021

¹H-NMR (DMSO-d₆, 30.0 °C, 500.16 MHz, Rotamere):

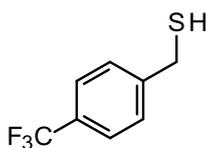
δ _H (ppm) = 8.20	<i>brs</i> , 1H, CONH ₂
8.08	<i>d</i> , 2H, ³ J=6.3 Hz, SO ₂ -C-CH-CH-C-C-NH ₂
7.89	<i>d</i> , 2H, ³ J=6.9 Hz, SO ₂ -C-CH-CH-C-C-NH ₂
7.67	<i>d</i> , 2H, ³ J=8.3 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
7.61	<i>brs</i> , 1H, CONH ₂
7.41-7.28	<i>m</i> , 2H, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
7.27	<i>t</i> , 2H, ³ J=7.5 Hz, CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -C-CH-CH-CH
7.21-7.12	<i>m</i> , 3H, CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -C-CH-CH-CH
4.94-3.93	<i>m</i> , 4H, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃ , CH ₂ (Pyrrolidin)
3.36	<i>brs</i> , 1H, CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -C-CH-CH-CH
3.25	<i>brs</i> , 1H, CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -C-CH-CH-CH
3.17	<i>pst</i> , 2H, J=8.3 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin)
2.99-2.83	<i>m</i> , 2H, CH ₂ (Pyrrolidin)
2.55	<i>brs</i> , 2H, CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -C-CH-CH-CH
1.87	<i>brs</i> , 2H, CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -C-CH-CH-CH
1.50-1.09	<i>m</i> , 18H, O-C-(CH ₃) ₃

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 30.0 °C, 125.77 MHz, Rotamere):

δ _C (ppm) = 166.4, 166.2	C=O
154.5	N-C=O
153.1	N-C=O
144.7	CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
142.1	SO ₂ -C-CH-CH-C-C-NH ₂
141.1	CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -C-CH-CH-CH
138.0	SO ₂ -C-CH-CH-C-C-NH ₂
128.5	SO ₂ -C-CH-CH-C-C-NH ₂

128.2	CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -C-CH- <u>C</u> H-CH
128.1	CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -C- <u>C</u> H-CH-CH
127.3	<i>q</i> , ² J _{C,F} =31.2 Hz, CH ₂ -C-CH-CH- <u>C</u> -CF ₃
126.8	CH ₂ -C- <u>C</u> H-CH-C-CF ₃
126.6	SO ₂ -C- <u>C</u> H-CH-C-C-NH ₂
125.7	CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -C-CH-CH- <u>C</u> H
125.1	CH ₂ -C-CH- <u>C</u> H-C-CF ₃
124.3	<i>q</i> , ¹ J _{C,F} =271.1 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C- <u>C</u> F ₃
80.0	O- <u>C</u> -(CH ₃) ₃
78.8	O- <u>C</u> -(CH ₃) ₃
56.2	<u>C</u> H(Pyrrrolidin)
44.5	Ar-CH ₂
43.9	<u>C</u> H ₂ (Pyrrrolidin)
43.5	<u>C</u> H ₂ -CH ₂ -CH ₂ -C-CH-CH-CH
32.3	CH ₂ -CH ₂ - <u>C</u> H ₂ -C-CH-CH-CH
32.0	CH ₂ - <u>C</u> H ₂ -CH ₂ -C-CH-CH-CH
27.9	O-C-(<u>C</u> H ₃) ₃
27.7	O-C-(<u>C</u> H ₃) ₃

[4-(Trifluoromethyl)phenyl]methanthiol (116)



1-(Bromomethyl)-4-(trifluoromethyl)benzen (2.39 g, 10.00 mmol) und Thioharnstoff (0.77 g, 10.00 mmol) wurden unter Argon in EtOH (5 ml) gelöst und unter Rückfluss 3 h lang erhitzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt und eine Lösung von 1.0 g NaOH in 10 ml H₂O zugegeben. Die Suspension wurde 30 min unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde mit 3 ml H₂SO₄ angesäuert, mit Et₂O extrahiert (3 x 50 ml), mit gesättigter Kochsalzlösung (1 x 50 ml) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am

Rotavapor entfernt. So wurden 1.76 g (92%) von **116** in Form eines farblosen Feststoffs erhalten. [106]

Ausbeute: 1.76 g (92%)

(farbloser Feststoff)

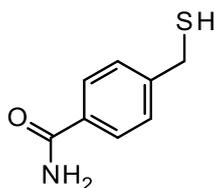
MS (EI+):

m/z (%) = 191 (100, [M-H]⁺)

HRMS (ES+):

m/z	berechnet für C ₈ H ₆ F ₃ S	:	191.014232
	gefunden	:	191.022865

4-(Sulfanylmethyl)benzamid (**117**)



4-(Bromomethyl)benzonnitril (2.45 g, 12.50 mmol) und Thioharnstoff (0.97 g, 12.50 mmol) wurden unter Argon in EtOH (10 ml) gelöst und unter Rückfluss 3 h lang erhitzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt, der Rückstand in 10 ml H₂O gelöst und eine Lösung von 1.0 g NaOH in 10 ml H₂O zugegeben. Die Suspension wurde 24 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde mit HCl (36%) auf pH 4-6 angesäuert, mit DCM extrahiert (3 x 50 ml), mit gesättigter Kochsalzlösung (1 x 50 ml) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt. So wurden 0.85 g (41%) von **117** in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

Ausbeute: 0.85 g (41%)

(farbloser Feststoff)

Smp.: 167 °C

(DCM)

EA: C₈H₉NOS (167.23 g/mol)
 Ber.: C:57.46 H:5.42 N:8.38
 Gef.: C:57.51 H:5.50 N:8.21

MS (ES+):

m/z (%) = 357 (71, [2M+Na]⁺), 524 (100, [3M+Na]⁺)

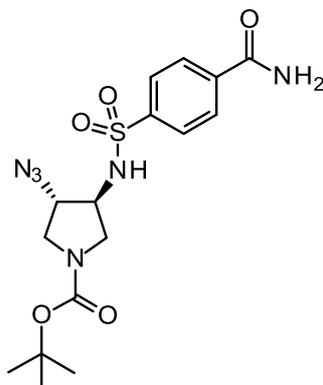
HRMS (ES+):

m/z berechnet für C₂₄H₂₇N₃O₃S₃Na : 524.111227
 gefunden : 524.114209

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 399.79 MHz):

δ _H (ppm) = 7.91	<i>brs</i> , 1H, CONH ₂
7.82	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> =8.5 Hz, SH-CH ₂ -C-CH-CH-C-C-NH ₂
7.40	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> =8.5 Hz, SH-CH ₂ -C-CH-CH-C-C-NH ₂
7.29	<i>brs</i> , 1H, CONH ₂
3.77	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> =4.4 Hz, SH-CH ₂ -C-CH-CH-C-C-NH ₂
2.90	<i>brs</i> , 1H, SH-CH ₂ -C-CH-CH-C-C-NH ₂

***tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-azido-4-[(4-carbamoylphenyl)sulfonylamino]pyrrolidin-1-carboxylat (118)**



Unter Verwendung der AAV7 wurden 1.84 g *tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-azido-4-[(4-cyanophenyl)sulfonylamino]pyrrolidin-1-carboxylat **39** (4.68 mmol), 0.32 g K₂CO₃

(2.34 mmol) und 10 ml 30% aq. H₂O₂ in 40 ml DMSO 2 h gerührt. Aufarbeitung nach der AAV7 ergab 1.83 g (95%) von **118** in Form eines farblosen Feststoffs.

Ausbeute: 1.83 g (95%) (farbloser Feststoff)

Smp.: 170 °C (EtOAc)

EA: C₁₆H₂₂N₆O₅S (410.45 g/mol)

Ber.: C: 46.82 H: 5.40 N: 20.48

Gef.: C: 47.06 H: 5.45 N: 20.19

MS (ES+):

m/z (%) = 311 (88, [M-Boc+H]⁺), 355 (100, [M-t-Butyl+H]⁺), 411 (14, [M+H]⁺), 428 (40, [M+NH₄]⁺), 433 (16, [M+Na]⁺)

HRMS (ES+):

m/z berechnet für C₁₆H₂₂N₆O₅SNa : 433.127010

gefunden : 433.126602

¹H-NMR (DMSO-d₆, 30.0 °C, 500.16 MHz):

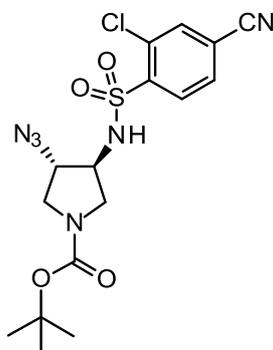
δ _H (ppm) = 8.43	<i>brs</i> , 1H, S-NH-CH
8.16	<i>brs</i> , 1H, CONH ₂
8.07	<i>d</i> , 2H, ³ J=8.3 Hz, SO ₂ -C-CH-CH-C-C-NH ₂
7.91	<i>dt</i> , 2H, ³ J=8.6 Hz, ⁴ J=1.9 Hz, SO ₂ -C-CH-CH-C-C-NH ₂
7.59	<i>brs</i> , 1H, CONH ₂
4.02	<i>ddd</i> , 1H, ³ J=5.7 Hz, N ₃ -CH ₂ (Pyrrolidin)
3.66	<i>dd</i> , 1H, ² J=12.5 Hz, ³ J=5.7 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin)
3.61-3.53	<i>m</i> , 1H, CH ₂ (Pyrrolidin)
3.28	<i>dd</i> , 1H, ² J=11.2 Hz, ³ J=7.2 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin) (überlagert mit H ₂ O)
3.11-3.03	<i>sm</i> , 1H, NH-CH ₂ (Pyrrolidin)
2.94-2.88	<i>sm</i> , 1H, CH ₂ (Pyrrolidin)
1.36, 1.33	<i>psd</i> , 9H, O-C-(CH ₃) ₃

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 30.0 °C, 125.77 MHz, Rotamere):

δ_C (ppm) = 166.6, 166.5 CONH₂

153.0	N-COO-C
143.0	SO ₂ -C-CH-CH-C-C-NH ₂
137.9	SO ₂ -C-CH-CH-C-C-NH ₂
128.4	SO ₂ -C-CH-CH-C-C-NH ₂
126.4	SO ₂ -C-CH-CH-C-C-NH ₂
79.0, 78.9	O-C-(CH ₃) ₃
63.2, 62.5	N ₃ -CH(Pyrrolidin)
56.7, 55.9	NH-CH(Pyrrolidin)
48.9, 48.5	CH ₂ (Pyrrolidin)
47.9, 47.6	CH ₂ (Pyrrolidin)
28.0	O-C-(CH ₃) ₃

***tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-azido-4-[(2-chloro-4-cyano-phenyl)sulfonylamino]pyrrolidin-1-carboxylat (**119**)**



Unter Verwendung der AAV5 wurden 1.70 g *tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-amino-4-azido-pyrrolidin-1-carboxylat **32** (7.49 mmol) und 1.90 ml DIPEA (11.24 mmol) in 30 ml DCM mit 2.12 g 2-Chloro-4-cyano-benzenesulfonylchlorid (8.99 mmol) 4 h gerührt. Aufreinigung mittels MPLC (DCM/MeOH 99:1 - 95:5) ergab 1.94 g (61%) von **119** in Form eines farblosen Feststoffs.

Ausbeute: 1.94 g (61%)

(farbloser Feststoff)

Smp.: 85 °C (DCM/MeOH)

EA: C₁₆H₁₉ClN₆O₄S (426.88 g/mol)

Ber.: C: 45.02 H: 4.49 N: 19.69

Gef.: C: 44.94 H: 4.60 N: 19.61

MS (ES+):

m/z (%) = 371 (100, [M^{35Cl}-*t*-Butyl+H]⁺), 427 (16, [M^{35Cl}+H]⁺), 429 (12, [M^{37Cl}+H]⁺),
444 (45, [M^{35Cl}+NH₄]⁺), 446 (20, [M^{37Cl}+NH₄]⁺), 449 (88, [M^{35Cl}+Na]⁺),
451 (26, [M^{37Cl}+Na]⁺)

HRMS (ES+):

m/z berechnet für C₁₆H₁₉ClN₆O₄SNa : 449.077473

gefunden : 449.068517

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 399.79 MHz):

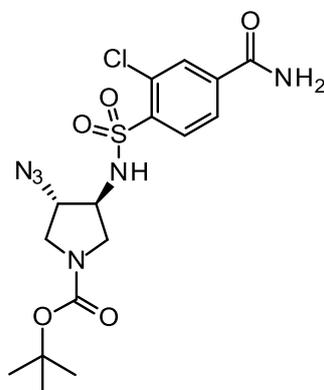
δ _H (ppm) = 8.92	<i>brs</i> , 1H, S-NH-CH
8.34	<i>brs</i> , 1H, SO ₂ -C-CH-CH-C-CH-C-Cl
8.16	<i>d</i> , 1H, ³ J=8.2 Hz, SO ₂ -C-CH-CH-C-CH-C-Cl
8.06	<i>dd</i> , 1H, ³ J=8.1 Hz, ⁴ J=1.5 Hz, SO ₂ -C-CH-CH-C-CH-C-Cl
4.04	<i>ddd</i> , 1H, ³ J=6.4 Hz, N ₃ -CH ₂ (Pyrrolidin)
3.72	<i>dd</i> , 1H, ² J=12.1 Hz, ³ J=6.6 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin)
3.62	<i>dd</i> , 1H, ² J=11.1 Hz, ³ J=6.6 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin)
3.42-3.33	<i>m</i> , 1H, NH-CH ₂ (Pyrrolidin)
3.08-2.99	<i>m</i> , 2H, CH ₂ (Pyrrolidin)
1.36	<i>s</i> , 9H, O-C-(CH ₃) ₃

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

δ _C (ppm) = 153.0	N-COO-C
142.0	SO ₂ -C-CH-CH-C-CH-C-Cl
135.2	SO ₂ -C-CH-CH-C-CH-C-Cl
131.8	SO ₂ -C-CH-CH-C-CH-C-Cl
131.6	SO ₂ -C-CH-CH-C-CH-C-Cl
131.2	SO ₂ -C-CH-CH-C-CH-C-Cl
116.5	NC-C
116.4	NC-C

79.0	O-C-(CH ₃) ₃
62.9, 62.3	N ₃ -CH(Pyrrolidin)
56.5, 55.8	NH-CH(Pyrrolidin)
48.8, 48.3	CH ₂ (Pyrrolidin)
47.9, 47.6	CH ₂ (Pyrrolidin)
28.0	O-C-(CH ₃) ₃

***tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-azido-4-[(4-carbamoyl-2-chloro-phenyl)sulfonylamino]pyrrolidin-1-carboxylat (**120**)**



Unter Verwendung der AAV7 wurden 1.60 g *tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-azido-4-[(2-chloro-4-cyano-phenyl)sulfonylamino]pyrrolidin-1-carboxylat **119** (3.75 mmol), 0.26 g K₂CO₃ (1.85 mmol) und 10 ml 30% aq. H₂O₂ in 40 ml DMSO 2 h gerührt. Aufarbeitung nach der AAV7 ergab 1.44 g (91%) von **120** in Form eines farblosen Feststoffs.

Ausbeute: 1.44 g (91%) (farbloser Feststoff)

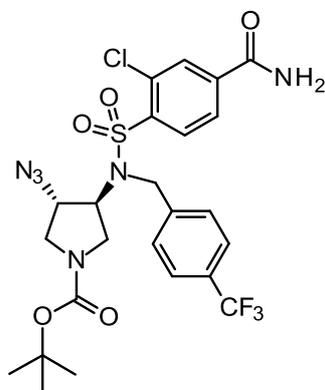
Smp.: 105 °C (EtOAc)

EA: C₁₆H₂₁ClN₆O₅S (444.89 g/mol)

Ber.: C: 43.19 H: 4.76 N: 18.89

Gef.: C: 43.22 H: 4.88 N: 18.51

***tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-azido-4-[(4-carbamoyl-2-chloro-phenyl)sulfonyl]-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]amino]pyrrolidin-1-carboxylat (**121**)**



Unter Verwendung der AAV6 wurden 1.69 g *tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-azido-4-[(4-carbamoyl-2-chloro-phenyl)sulfonylamino]pyrrolidin-1-carboxylat **120** (3.80 mmol), 1.87 g Cs₂CO₃ (5.73 mmol) und 1.09 g 1-(Bromomethyl)-4-(trifluoromethyl)benzen (4.58 mmol) in 40 ml MeCN 10 h erhitzt. Aufreinigung mittels MPLC (DCM/MeOH 99:1 - 90:10) ergab 1.93 g (84%) von **121** in Form eines farblosen Feststoffs.

Ausbeute: 1.93 g (84%) (farbloser Feststoff)

Smp.: 122 °C (DCM/MeOH)

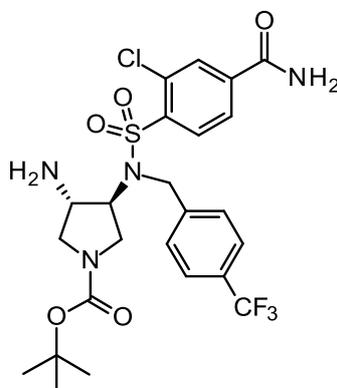
MS (EI+):

m/z (%) = 159 (100), 529 (8, [*M-t-buO*]⁺)

HRMS (EI+):

m/z	berechnet für C ₂₀ H ₁₇ ClF ₃ N ₆ O ₄ S	:	529.067263
	gefunden	:	529.069171

***tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-amino-4-[(4-carbamoyl-2-chloro-phenyl)sulfonyl]-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]amino]pyrrolidin-1-carboxylat (**122**)**



Zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung von *tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-azido-4-[(4-carbamoyl-2-chloro-phenyl)sulfonyl]-[[4-(trifluoro-methyl)phenyl]methyl]amino]pyrrolidin-1-carboxylat **121** (1.81 g, 3.00 mmol) in DCM (12 ml) wurde unter Argonatmosphäre TPP (0.94 g, 3.60 mmol) in 8 ml DCM tropfenweise hinzugegeben, 0.5 h bei 0 °C gerührt und anschließend 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotavapor entfernt und danach 4 ml THF sowie 4 ml wässrige Ammoniak-Lösung (28 %) zugegeben. Die Emulsion wurde 24 h bei 50 °C intensiv gerührt. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt. Aufreinigung mittels MPLC (DCM/MeOH/NH₃(MeOH)) 99:1:0.1 - 90:10:0.1) ergab 1.47 g (85%) von **122** in Form eines farblosen Feststoffs.

Ausbeute: 1.47 g (85%) (farbloser Feststoff)

Smp.: 132 °C (DCM/MeOH/NH₃(MeOH))

EA: C₂₄H₂₈ClF₃N₄O₅S (577.02 g/mol)

Ber.: C:49.96 H:4.89 N:9.71

Gef.: C:49.94 H:4.99 N:9.68

MS (EI+):

m/z (%) = 302 (100, [M^{37Cl}-NH₂-*boc*-BnCF₃]⁺), 503 (9, [M^{35Cl}-*t*-buO]⁺)

HRMS (EI+):

m/z	berechnet für C ₂₀ H ₁₉ ClF ₃ N ₄ O ₄ S:	503.076765
	gefunden	: 503.076445

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

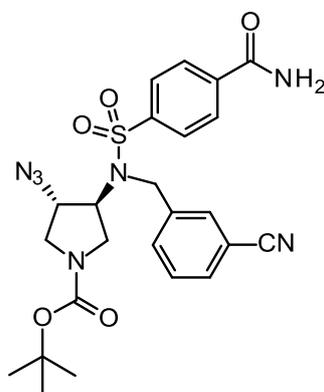
δ _H (ppm) =	8.25	<i>brs</i> , 1H, CONH ₂
	8.18, 8.16	<i>psdd</i> , 1H, ³ J=8.8 Hz, SO ₂ -C-CH-CH-C-CH-C-Cl
	8.12	<i>d</i> , 1H, ⁴ J=1.7 Hz, SO ₂ -C-CH-CH-C-CH-C-Cl
	7.95	<i>d</i> , 1H, ³ J=8.3 Hz, SO ₂ -C-CH-CH-C-CH-C-Cl
	7.73	<i>brs</i> , 1H, CO-NH ₂
	7.71	<i>d</i> , 2H, ³ J=8.3 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
	7.66	<i>d</i> , 2H, ³ J=8.3 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
	4.91-4.75	<i>sm</i> , 2H, CH ₂ -Ar
	3.98-3.89	<i>m</i> , 1H, CH ₂ (Pyrrolidin)
	3.41-3.23	<i>m</i> , 2H, CH ₂ (Pyrrolidin) (überlagert mit H ₂ O)
	3.19-3.08	<i>sm</i> , 1H, CH ₂ (Pyrrolidin)
	2.98, 2.89	<i>psdt</i> , 1H, ³ J=10.0 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin)
	2.77, 2.72	<i>psdt</i> , 1H, J=9.5 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin)
	1.48	<i>brs</i> , 2H, NH ₂
	1.32, 1.27	<i>psd</i> , 9H, O-C-(CH ₃) ₃

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

δ _C (ppm) =	165.1, 164.0	C=CONH ₂
	153.1, 153.0	N-C=COO-C
	143.5, 143.4	CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
	139.4	SO ₂ -C-CH-CH-C-CH-C-Cl
	139.1	SO ₂ -C-CH-CH-C-CH-C-Cl
	132.0, 131.9	SO ₂ -C-CH-CH-C-CH-C-Cl
	130.9, 130.8	SO ₂ -C-CH-CH-C-CH-C-Cl
	130.6	SO ₂ -C-CH-CH-C-CH-C-Cl
	128.1, 127.9	SO ₂ -C-CH-CH-C-CH-C-Cl
	127.6	<i>q</i> , ² J _{C,F} =42.0 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
	126.7	CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
	125.2	<i>q</i> , ³ J _{C,F} =2.4 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
	124.2	<i>q</i> , ¹ J _{C,F} =271.1 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
	78.5, 78.4	O-C-(CH ₃) ₃

62.8, 62.3	$\underline{\text{C}}\text{H}_{(\text{Pyrrolidin})}$
52.1, 51.4	$\underline{\text{C}}\text{H}_{(\text{Pyrrolidin})}$
51.0, 50.6	$\underline{\text{C}}\text{H}_2(\text{Pyrrolidin})$
47.6, 47.4	$\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-Ar}$
46.2, 45.5	$\underline{\text{C}}\text{H}_2(\text{Pyrrolidin})$
28.0, 27.9	$\text{O-C-}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$

***tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-azido-4-[(4-carbamoylphenyl)sulfonyl-[(3-cyanophenyl)methyl]amino]pyrrolidin-1-carboxylat (**123**)**



Unter Verwendung der AAV6 wurden 1.62 g *tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-azido-4-[(4-carbamoylphenyl)sulfonylamino]pyrrolidin-1-carboxylat **118** (3.94 mmol), 1.93 g Cs₂CO₃ (5.91 mmol) und 0.93 g 3-(Bromomethyl)benzonitril (4.73 mmol) in 40 ml MeCN 3 h erhitzt. Aufreinigung mittels MPLC (DCM/MeOH 99:1 - 90:10) ergab 1.50 g (72%) von **123** in Form eines farblosen Feststoffs.

Ausbeute: 1.50 g (72%) (farbloser Feststoff)

Smp.: 111 °C (DCM/MeOH)

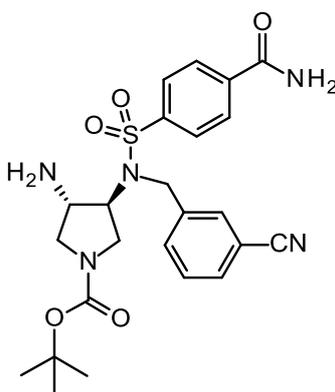
MS (ES⁺):

m/z (%) = 526 (6, [M+H]⁺), 543 (48, [M+NH₄]⁺), 548 (100, [M+Na]⁺)

HRMS (ES+):

m/z	berechnet für C ₂₄ H ₂₇ N ₇ O ₅ SNa	:	548.169209
	gefunden	:	548.167375

***tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-amino-4-[(4-carbamoylphenyl)sulfonyl]-[(3-cyanophenyl)methyl]amino]pyrrolidin-1-carboxylat (**124**)**



Zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung von *tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-azido-4-[(4-carbamoylphenyl)sulfonyl]-[(3-cyanophenyl)methyl]-amino]pyrrolidin-1-carboxylat **123** (1.06 g, 2.02 mmol) in DCM (8 ml) wurde unter Argonatmosphäre TPP (0.63 g, 2.42 mmol) in 5 ml DCM tropfenweise hinzugegeben, die Reaktion 0.5 h bei 0 °C und anschließend 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotavapor entfernt und danach 2.5 ml THF sowie 2.5 ml wässrige Ammoniak-Lösung (28%) zugegeben. Die Emulsion wurde 24 h bei 50 °C intensiv gerührt. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt. Aufreinigung mittels MPLC (DCM/MeOH 99:1 - 90:10) ergab 0.69 g (69%) von **124** in Form eines farblosen Feststoffs.

Ausbeute: 0.69 g (69%) (farbloser Feststoff)

Smp.: 130 °C (DCM/MeOH)

EA: C₂₄H₂₉N₅O₅S*0.5H₂O (508.59 g/mol)

Ber.: C:56.68 H:5.95 N:13.77

Gef: C:56.81 H:5.94 N:13.89

MS (ES+):

m/z (%) = 400 (100, [M-Boc+H]⁺), 500 (15, [M+H]⁺), 522 (40, [M+Na]⁺)

HRMS (ES+):

m/z berechnet für C₂₄H₃₀N₅O₅S : 500.196766
 gefunden : 500.191526

¹H-NMR (DMSO-d₆, 30.0 °C, 399.79 MHz, Rotamere):

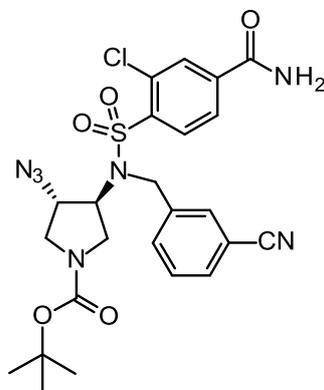
δ_{H} (ppm) = 8.21, 8.19 *brpsd*, 1H, CONH₂
 8.06 *d*, 2H, ³J=8.5 Hz, SO₂-C-CH-CH-C-C-NH₂
 7.99 *d*, 2H, ³J=8.5 Hz, SO₂-C-CH-CH-C-C-NH₂
 7.90 *s*, 1H, NC-C-CH-CH-CH-C-CH
 7.83 *d*, 1H, ³J=7.8 Hz, NC-C-CH-CH-CH-C-CH
 7.74 *d*, 1H, ³J=7.6 Hz, NC-C-CH-CH-CH-C-CH
 7.62 *brs*, 1H, CONH₂
 7.57 *dd*, 1H, ³J=7.8 Hz, NC-C-CH-CH-CH-C-CH
 4.60 *d*, 1H, ²J=17.4 Hz, CH₂-Ar
 4.49 *d*, 1H, ²J=17.6 Hz, CH₂-Ar
 4.16-4.03 *sm*, 1H, CH₂(Pyrrolidin)
 3.37 *dd*, 1H, ²J=10.2 Hz, ³J=7.9 Hz, CH₂(Pyrrolidin)
 3.20-3.02 *m*, 2H, CH₂(Pyrrolidin), CH₂(Pyrrolidin)
 2.82-2.68 *m*, 2H, CH₂(Pyrrolidin)
 1.50 *brs*, 2H, NH₂
 1.33, 1.29 *psd*, 9H, O-C-(CH₃)₃

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 30.0 °C, 125.77 MHz, Rotamere):

δ_{C} (ppm) = 166.4, 166.3 CONH₂
 153.1, 153.0 N-COO-C
 141.7 SO₂-C-CH-CH-C-C-NH₂
 140.6, 140.5 NC-C-CH-CH-CH-C-CH
 138.1 SO₂-C-CH-CH-C-C-NH₂
 132.2 NC-C-CH-CH-CH-C-CH
 132.1 NC-C-CH-CH-CH-C-CH
 130.9 NC-C-CH-CH-CH-C-CH

129.5	NC-C-CH- <u>C</u> H-CH-C-CH
128.40, 127.36	SO ₂ -C- <u>C</u> H-CH-C-C-NH ₂
127.1	SO ₂ -C-CH- <u>C</u> H-C-C-NH ₂
118.7	NC- <u>C</u> -CH-CH-CH-C-CH
111.1	NC- <u>C</u> -CH-CH-CH-C-CH
78.5, 78.4	O- <u>C</u> -(CH ₃) ₃
63.0, 62.5	<u>C</u> H(Pyrrolidin)
52.3, 51.6	<u>C</u> H(Pyrrolidin)
51.2, 50.8	<u>C</u> H ₂ (Pyrrolidin)
46.3, 46.2	CH ₂ -Ar
45.7, 45.0	<u>C</u> H ₂ (Pyrrolidin)
28.0, 27.9	O-C-(<u>C</u> H ₃) ₃

***tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-azido-4-[(4-carbamoyl-2-chloro-phenyl)sulfonyl-[(3-cyanophenyl)methyl]amino]pyrrolidin-1-carboxylat (**125**)**



Unter Verwendung der AAV6 wurden 1.45 g *tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-azido-4-[(4-carbamoyl-2-chloro-phenyl)sulfonylamino]pyrrolidin-1-carboxylat **119** (3.26 mmol), 1.59 g Cs₂CO₃ (4.89 mmol) und 0.77 g 3-(Bromomethyl)benzonnitril (3.91 mmol) in 30 ml MeCN 5 h erhitzt. Aufreinigung mittels MPLC (DCM/MeOH 99:1 - 90:10) ergab 0.72 g (40%) von **125** in Form eines farblosen Feststoffs.

Ausbeute: 0.72 g (40%)

(farbloser Feststoff)

Smp.: 119 °C (DCM/MeOH)

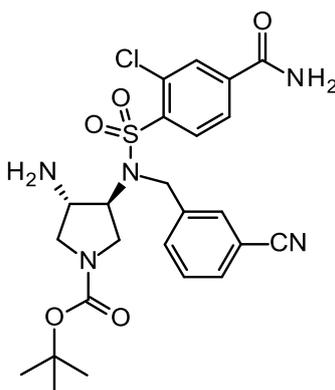
MS (ES+):

m/z (%) = 560 (14, [M+H]⁺), 577 (35, [M+NH₄]⁺), 582 (100, [M+Na]⁺)

HRMS (ES+):

m/z berechnet für C₂₄H₂₆ClN₇O₅SNa : 582.130237
gefunden : 582.133085

***tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-amino-4-[(4-carbamoyl-2-chloro-phenyl)sulfonyl-[(3-cyanophenyl)methyl]amino]pyrrolidin-1-carboxylat (**126**)**



Zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung von *tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-azido-4-[(4-carbamoyl-2-chloro-phenyl)sulfonyl-[(3-cyanophenyl)-methyl]amino]pyrrolidin-1-carboxylat **125** (0.59 g, 1.05 mmol) in DCM (4 ml) wurde unter Argonatmosphäre TPP (0.33 g, 1.26 mmol) in 3 ml DCM tropfenweise hinzugegeben, die Reaktion 0.5 h bei 0 °C und anschließend 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotavapor entfernt und danach 1.5 ml THF sowie 1.5 ml wässrige Ammoniak-Lösung (28%) zugegeben. Die Emulsion wurde 24 h bei 50 °C intensiv gerührt. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt. Aufreinigung mittels MPLC (DCM/MeOH 99:1 - 90:10) ergab 0.39 g (70%) von **126** in Form eines farblosen Feststoffs.

Ausbeute: 0.39 g (70%) (farbloser Feststoff)

Smp.: 147 °C (DCM/MeOH)

EA: C₂₄H₂₈ClN₅O₅S (534.03 g/mol)

Ber.: C:53.98 H:5.28 N:13.11

Gef.: C:53.66 H:5.53 N:12.83

MS (ES+):

m/z (%) = 434 (100, [M-Boc+H]⁺), 534 (22, [M+H]⁺), 556 (29, [M+Na]⁺), 1067 (3, [2M+H]⁺)

HRMS (ES+):

m/z berechnet für C₂₄H₂₉ClN₅O₅S : 534.157794

gefunden : 534.159495

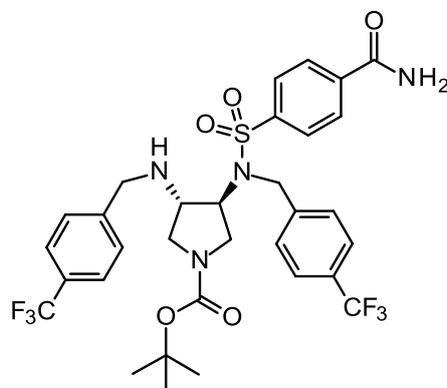
¹H-NMR (DMSO-d₆, 30.0 °C, 399.79 MHz, Rotamere):

δ _H (ppm) = 8.26	<i>brs</i> , 1H, CONH ₂
8.16	<i>d</i> , 1H, ³ J=8.2 Hz, SO ₂ -C-CH-CH-C-CH-C-Cl
8.13	<i>d</i> , 1H, ⁴ J=1.6 Hz, SO ₂ -C-CH-CH-C-CH-C-Cl
7.95	<i>dd</i> , 1H, ³ J=8.2 Hz, ⁴ J=1.6 Hz, SO ₂ -C-CH-CH-C-CH-C-Cl
7.86	<i>s</i> , 1H, NC-C-CH-CH-CH-C-CH
7.78	<i>d</i> , 1H, ³ J=8.0 Hz, NC-C-CH-CH-CH-C-CH
7.74	<i>s</i> , 1H, CONH ₂
7.73	<i>d</i> , 1H, ³ J=8.2 Hz, NC-C-CH-CH-CH-C-CH
7.56	<i>dd</i> , 1H, ³ J=7.8 Hz, NC-C-CH-CH-CH-C-CH
4.83	<i>d</i> , 1H, ² J=17.2 Hz, CH ₂ -Ar
4.73	<i>d</i> , 1H, ² J=17.9 Hz, CH ₂ -Ar
3.96	<i>ddd</i> , 1H, ³ J=8.9 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin)
3.42-3.23	<i>m</i> , 2H, CH ₂ (Pyrrolidin) (überlagert mit H ₂ O)
3.13	<i>dd</i> , 1H, ² J=10.3 Hz, ³ J=8.5 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin)
2.95	<i>ddd</i> , 1H, ³ J=10.5 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin)
2.75	<i>m</i> , 1H, CH ₂ (Pyrrolidin)
1.59	<i>brs</i> , 2H, NH ₂
1.33, 1.30	<i>psd</i> , 9H, O-C-(CH ₃) ₃

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

δ_{C} (ppm) =	165.04, 164.96	$\underline{\text{C}}\text{ONH}_2$
	153.1	N- $\underline{\text{C}}\text{OO-C}$
	140.3	NC-C-CH-CH-CH- $\underline{\text{C}}$ -CH
	140.2	SO ₂ -C-CH-CH- $\underline{\text{C}}$ -CH-C-Cl
	139.4	SO ₂ - $\underline{\text{C}}$ -CH-CH-C-CH-C-Cl
	139.0	SO ₂ -C-CH-CH-C-CH- $\underline{\text{C}}$ -Cl
	132.2, 132.1	NC-C- $\underline{\text{C}}\text{H}$ -CH-CH-C-CH
	132.0	NC-C-CH-CH-CH-C- $\underline{\text{C}}\text{H}$
	131.1	SO ₂ -C-CH-CH-C- $\underline{\text{C}}\text{H}$ -C-Cl
	130.9, 130.8	SO ₂ -C-CH- $\underline{\text{C}}\text{H}$ -C-CH-C-Cl
	130.6	NC-C-CH-CH- $\underline{\text{C}}\text{H}$ -C-CH
	129.6	NC-C-CH- $\underline{\text{C}}\text{H}$ -CH-C-CH
	126.7	SO ₂ -C- $\underline{\text{C}}\text{H}$ -CH-C-CH-C-Cl
	118.6	NC- $\underline{\text{C}}$ -CH-CH-CH-C-CH
	111.2	NC- $\underline{\text{C}}$ -CH-CH-CH-C-CH
	78.6, 78.5	O- $\underline{\text{C}}$ -(CH ₃) ₃
	62.7, 62.1	$\underline{\text{C}}\text{H}_{(\text{Pyrrolidin})}$
	52.0, 51.4	$\underline{\text{C}}\text{H}_{(\text{Pyrrolidin})}$
	51.2, 50.8	$\underline{\text{C}}\text{H}_2_{(\text{Pyrrolidin})}$
	47.1, 47.0	$\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-Ar}$
	46.1, 45.4	$\underline{\text{C}}\text{H}_2_{(\text{Pyrrolidin})}$
	28.0, 27.9	O-C-($\underline{\text{C}}\text{H}_3$) ₃

***tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-[(4-carbamoylphenyl)sulfonyl]-[[4-(trifluoromethyl)-phenyl]-methyl]amino]-4-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methylamino]pyrrolidin-1-carboxylat (**127**)**



Unter Verwendung der AAV8 wurden 0.60 g *tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-amino-4-[(4-carbamoylphenyl)sulfonyl]-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]-methyl]amino]pyrrolidin-1-carboxylat **42** (1.10 mmol) in 15 ml DMF mit 0.20 g K₂CO₃ (1.45 mmol) und 0.35 g 4-(Trifluoromethyl)benzylbromid (1.65 mmol) 36 h bei Raumtemperatur gerührt. Aufreinigung mittels MPLC (Hexan/EtOAc/NH₃(MeOH) 65:35:0.1) ergab 0.38 g (49%) von **127** in Form eines farblosen Feststoffs.

Ausbeute: 0.38 g (49%) (farbloser Feststoff)

Smp.: 105 °C (Hexan/EtOAc/NH₃(MeOH))

EA: C₃₂H₃₄F₆N₄O₅S (700.69 g/mol)

Ber.: C:54.85 H:4.89 N:8.00

Gef.: C:55.15 H:5.25 N:7.74

MS (ES⁺):

m/z (%) = 381 (100, [M-2CF₃Bn+H]⁺), 701 (44, [M+H]⁺), 723 (13, [M+Na]⁺)

HRMS (ES⁺):

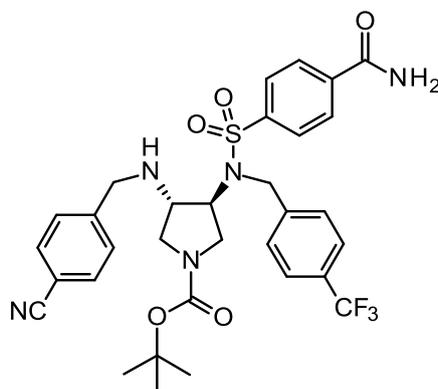
m/z berechnet für C₃₂H₃₅F₆N₄O₅S : 701.223237

gefunden : 701.224517

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 399.79 MHz, Rotamere):

δ_{H} (ppm) = 8.21	<i>brs</i> , 1H, CONH ₂
8.07	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> =8.5 Hz, SO ₂ -C-CH-CH-C-NH ₂
8.00	<i>d</i> , 2H, ³ <i>J</i> =8.5 Hz, SO ₂ -C-CH-CH-C-C-NH ₂
7.62	<i>m</i> , 7H, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃ , CONH ₂
7.28	<i>pst</i> , 2H, ³ <i>J</i> =9.1 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
4.68-4.46	<i>sm</i> , 2H, S-N-CH ₂ -Ar
4.30	<i>psqn</i> , 1H, ³ <i>J</i> =7.8 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin)
3.63-3.32	<i>m</i> , 3H, CH ₂ (Pyrrolidin), NH-CH ₂ -Ar
3.21-3.01	<i>m</i> , 2H, CH ₂ (Pyrrolidin)
2.86-2.72	<i>m</i> , 2H, CH ₂ (Pyrrolidin)
2.24	<i>q</i> , 1H, ³ <i>J</i> =7.3 Hz, CH-NH-CH ₂
1.32, 1.28	<i>psd</i> , 9H, O-C-(CH ₃) ₃

***tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-[(4-carbamoylphenyl)sulfonyl]-[[4-(trifluoromethyl)-phenyl]methyl]amino]-4-[(4-cyanophenyl)methylamino]pyrrolidin-1-carboxylat
(128)**



Unter Verwendung der AAV8 wurden 1.40 g *tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-amino-4-[(4-carbamoylphenyl)sulfonyl]-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]-methyl]amino]pyrrolidin-1-carboxylat **42** (2.58 mmol) in 30 ml DMF mit 0.43 g K₂CO₃ (3.12 mmol) und 0.51 g 4-(Bromomethyl)benzonitrile (2.60 mmol) 36 h bei Raumtemperatur gerührt. Aufreinigung mittels MPLC (Cyclohexan/EtOAc 65:35) ergab 0.81 g (47%) von **128** in Form eines farblosen Feststoffs.

Ausbeute: 0.81 g (47%) (farbloser Feststoff)

Smp.: 125 °C (Cyclohexan/EtOAc)

EA: C₃₂H₃₄F₃N₅O₅S (657.70 g/mol)

Ber.: C:58.44 H:5.21 N:10.65

Gef.: C:58.57 H:5.61 N:10.35

MS (ES+):

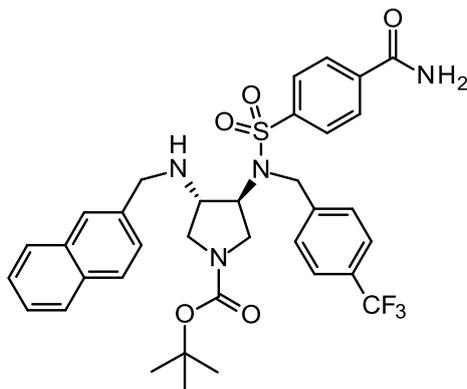
m/z (%) = 97 (100), 658 (39, [M+H]⁺)

HRMS (ES+):

m/z berechnet für C₃₂H₃₄F₃N₅O₅SNa : 680.213046

gefunden : 680.210975

***tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-[(4-carbamoylphenyl)sulfonyl]-[4-(trifluoromethyl)phenyl]-methylamino]-4-(2-naphthylmethylamino)pyrrolidin-1-carboxylat (**129**)**



Unter Verwendung der AAV8 wurden 0.80 g *tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-amino-4-[(4-carbamoylphenyl)sulfonyl]-[4-(trifluoromethyl)phenyl]-methylamino]pyrrolidin-1-carboxylat **42** (1.47 mmol) in 20 ml DMF mit 0.25 g K₂CO₃ (1.81 mmol) und 0.33 g 2-(Bromomethyl)naphthalene (1.47 mmol) 36 h bei Raumtemperatur gerührt. Aufreinigung mittels MPLC (Cyclohexan/EtOAc 65:35) ergab 0.45 g (45%) von **129** in Form eines farblosen Feststoffs.

Ausbeute: 0.45 g (45%) (farbloser Feststoff)

Smp.: 160 °C (Cyclohexan/EtOAc)

EA: C₃₅H₃₇F₃N₄O₅S (682.24 g/mol)

Ber.: C:61.57 H:5.46 N:8.21

Gef.: C:61.82 H:5.64 N:8.28

MS (ES+):

m/z (%) = 151 (100), 683 (61, [M+H]⁺)

HRMS (ES+):

m/z berechnet für C₃₅H₃₈F₃N₄O₅S : 683.251502

gefunden : 683.249504

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 399.79 MHz, Rotamere):

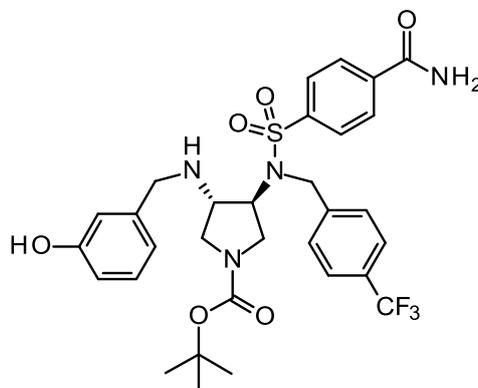
δ _H (ppm) = 8.21	<i>brs</i> , 1H, CONH ₂
8.09	<i>d</i> , 2H, ³ J=8.5 Hz, SO ₂ -C-CH-CH-C-C-NH ₂
8.03	<i>d</i> , 2H, ³ J=8.2 Hz, SO ₂ -C-CH-CH-C-C-NH ₂
7.90-7.78	<i>m</i> , 3H, CONH ₂ , CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
7.69-7.53	<i>m</i> , 6H, CH ₂ -C-CH-C-CH-CH-CH-CH-C-CH-CH
7.53-7.45	<i>m</i> , 2H, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃
7.27	<i>t</i> , 1H, ³ J=8.2 Hz, CH ₂ -C-CH-C-CH-CH-CH-CH-C-CH-CH
4.67-4.42	<i>sm</i> , 2H, S-N-CH ₂ -Ar
4.37-4.25	<i>sm</i> , 1H, CH ₂ (Pyrrolidin)
3.58	<i>dd</i> , 1H, ² J=13.5 Hz, ³ J=6.0 Hz, NH-CH ₂ -Ar
3.52-3.34	<i>m</i> , 2H, NH-CH ₂ -Ar, CH ₂ (Pyrrolidin)
3.22-3.04	<i>m</i> , 2H, CH ₂ (Pyrrolidin)
2.88-2.72	<i>m</i> , 2H, CH ₂ (Pyrrolidin)
2.24	<i>brs</i> , 1H, CH-NH-CH ₂
1.30, 1.27	<i>psd</i> , 9H, O-C-(CH ₃) ₃

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 20.7 °C, 125.77 MHz, Rotamere):

δ _C (ppm) = 166.5, 166.4	C=O
153.2, 153.1	N-COO-C
143.6, 143.5	CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃

141.8	SO ₂ - <u>C</u> -CH-CH-C-C-NH ₂
138.2	SO ₂ -C-CH-CH- <u>C</u> -C-NH ₂
138.0	CH ₂ - <u>C</u> -CH-C-CH-CH-CH-CH-C-CH-CH
132.9	CH ₂ -C-CH-C-CH-CH-CH-CH- <u>C</u> -CH-CH
132.2	CH ₂ -C-CH- <u>C</u> -CH-CH-CH-CH-C-CH-CH
128.5	SO ₂ -C-CH- <u>CH</u> -C-C-NH ₂
128.1	<i>q</i> , ² J _{C,F} =33.7 Hz, CH ₂ -C-CH-CH- <u>C</u> -CF ₃
128.1, 128.0	CH ₂ -C- <u>CH</u> -CH-C-CF ₃
127.7	CH ₂ -C-CH-C- <u>CH</u> -CH-CH-CH-C-CH-CH
127.50	CH ₂ -C-CH-C-CH-CH-CH-CH-C-CH- <u>CH</u>
127.46	CH ₂ -C-CH-C-CH-CH-CH- <u>CH</u> -C-CH-CH
127.2	SO ₂ -C- <u>CH</u> -CH-C-C-NH ₂
126.6	CH ₂ -C- <u>CH</u> -C-CH-CH-CH-CH-C-CH-CH
126.1	CH ₂ -C-CH-C-CH-CH- <u>CH</u> -CH-C-CH-CH
125.9	CH ₂ -C-CH-C-CH-CH-CH-CH-C- <u>CH</u> -CH
125.6	CH ₂ -C-CH-C-CH- <u>CH</u> -CH-CH-C-CH-CH
125.0	<i>q</i> , ³ J _{C,F} =2.9 Hz, CH ₂ -C-CH- <u>CH</u> -C-CF ₃
124.3	<i>q</i> , ¹ J _{C,F} =272.6 Hz, CH ₂ -C-CH-CH-C- <u>CF</u> ₃
78.64, 78.55	O- <u>C</u> -(CH ₃) ₃
60.9, 60.3	<u>CH</u> (Pyrrolidin)
58.1, 57.2	<u>CH</u> (Pyrrolidin)
51.2	NH- <u>CH</u> ₂ -Ar
49.6, 49.2	<u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)
46.8, 46.7	S-N- <u>CH</u> ₂ -Ar
45.8, 45.1	<u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)
28.0, 27.9	O-C-(<u>CH</u> ₃) ₃

***tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-[(4-carbamoylphenyl)-sulfonyl]-[[4-(trifluoromethyl)-phenyl]methyl]-amino]-4-[(3-hydroxyphenyl)methylamino]-pyrrolidin-1-carboxylat (**130**)**



Unter Verwendung der AAV3 wurden 0.54 g (1.00 mmol) *tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-amino-4-[(4-carbamoylphenyl)sulfonyl]-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]-methyl]amino]pyrrolidin-1-carboxylat **42** in 14 ml MeOH mit 0.25 g Molsieb und 0.73 g 3-Hydroxybenzaldehyd (6.00 mmol) 1.5 h und anschließend mit 0.30 g NaBH₄ (7.90 mmol) 1 h gerührt. Zweimalige Aufreinigung mittels MPLC (1. Cyclohexan/EtOAc 50:50 2. DCM/Cyclohexan/MeOH 70:25:5) ergab 0.42 g (65%) von **130** in Form eines farblosen Feststoffs.

Ausbeute: 0.42 g (65%) (farbloser Feststoff)

Smp.: 117 °C (DCM/Cyclohexan/MeOH)

EA: C₃₁H₃₅F₃N₄O₆S*0.5H₂O (657.70 g/mol)

Ber.: C:56.61 H:5.52 N:8.52

Gef.: C:56.66 H:5.82 N:8.63

MS (ES⁺):

m/z (%) = 649 (100, [M+H]⁺), 671 (5, [M+Na]⁺)

HRMS (ES⁺):

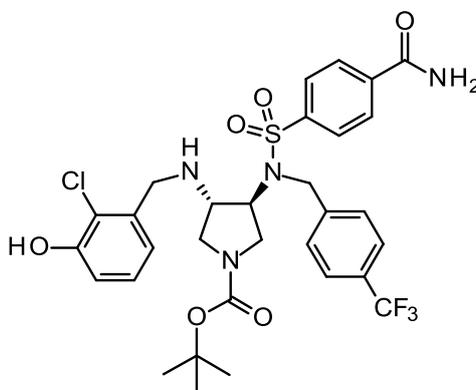
m/z berechnet für C₃₁H₃₆F₃N₄O₆S : 649.230767

gefunden : 649.229954

¹H-NMR (DMSO-d₆, 30.0 °C, 399.79 MHz, Rotamere):

δ _H (ppm) = 9.22	s, 1H, OH-C-CH-CH-CH-C-CH
8.17, 8.15	<i>psd</i> , 1H, CONH ₂
8.07	<i>d</i> , 2H, ³ J=8.5 Hz, SO ₂ -C-CH-CH-C-C-NH ₂
7.98	<i>d</i> , 2H, ³ J=8.2 Hz, SO ₂ -C-CH-CH-C-C-NH ₂
7.66-7.56	<i>m</i> , 5H, CH ₂ -C-CH-CH-C-CF ₃ , CONH ₂
7.05-6.98	<i>m</i> , 1H, OH-C-CH-CH-CH-C-CH
6.59	<i>d</i> , 2H, ³ J=7.1 Hz, OH-C-CH-CH-CH-C-CH
6.46	<i>pst</i> , 1H, J=8.5 Hz, OH-C-CH-CH-CH-C-CH
4.67-4.38	<i>sm</i> , 2H, S-N-CH ₂ -Ar
4.31-4.17	<i>sm</i> , 1H, CH ₂ (Pyrrolidin)
3.41-2.92	<i>m</i> , 5H, CH ₂ (Pyrrolidin), CH ₂ (Pyrrolidin), NH-CH ₂ -Ar (überlagert mit H ₂ O)
2.81-2.66	<i>m</i> , 2H, CH ₂ (Pyrrolidin)
2.00	<i>brs</i> , 1H, CH-NH-CH ₂
1.29, 1.24	<i>psd</i> , 9H, O-C-(CH ₃) ₃

***tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-[(4-carbamoylphenyl)sulfonyl]-[4-(trifluoromethyl)phenyl]-methylamino]-4-[(2-chloro-3-hydroxy-phenyl)methylamino]pyrrolidin-1-carboxylat (131)**



Unter Verwendung der AAV3 wurden 0.19 g (0.36 mmol) *tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-amino-4-[(4-carbamoylphenyl)sulfonyl]-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]-methyl]amino]pyrrolidin-1-carboxylat **42** in 3 ml MeOH mit 80 mg Molsieb und 84 mg 2-Chloro-3-hydroxy-benzaldehyd (0.54 mmol) 5 h und anschließend mit 27 mg NaBH₄ (0.72 mmol) 1 h gerührt. Zweimalige Aufreinigung mittels MPLC (DCM/MeOH/NH₃(MeOH) 99:1:0.1-90:10:0.1) ergab 0.13 g (53%) von **131** in Form eines farblosen Feststoffs.

Ausbeute: 0.13 g (53%)

(farbloser Feststoff)

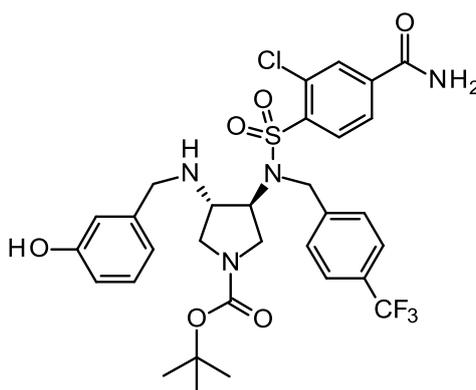
MS (ES+):

m/z (%) = 683 (100, [M+H]⁺), 705 (14, [M+Na]⁺)

HRMS (ES+):

m/z	berechnet für C ₃₁ H ₃₅ ClF ₃ N ₄ O ₆ S:	683.191795
	gefunden	: 683.191477

***tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-[(4-carbamoyl-2-chloro-phenyl)sulfonyl]-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]amino]-4-[(3-hydroxyphenyl)methylamino]pyrrolidin-1-carboxylat (**132**)**



Unter Verwendung der AAV3 wurden 1.25 g (2.17 mmol) *tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-azido-4-[(4-carbamoyl-2-chloro-phenyl)sulfonyl]-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]amino]pyrrolidin-1-carboxylat **122** in 15 ml MeOH mit 0.50 g Molsieb und 0.32 g 3-Hydroxy-

benzaldehyd (2.60 mmol) 5 h und anschließend mit 0.17 g NaBH₄ (4.34 mmol) 2 h gerührt. Aufreinigung mittels MPLC (DCM/MeOH 99:1 - 90:10) ergab 1.30 g (88%) von **132** in Form eines farblosen Feststoffs.

Ausbeute: 1.30 g (88%) (farbloser Feststoff)

Smp.: 133 °C (DCM/MeOH)

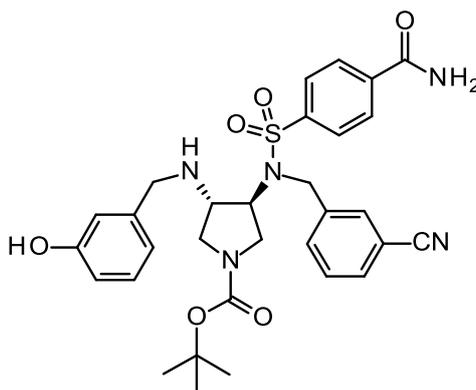
MS (ES+):

m/z (%) = 627 (100, [M-t-Butyl+H]⁺), 683 (81, [M+H]⁺), 705 (1, [M+Na]⁺)

HRMS (ES+):

m/z berechnet für C₃₁H₃₅ClF₃N₄O₆S: 683.191795
gefunden : 683.190691

***tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-[(4-carbamoylphenyl)sulfonyl]-[(3-cyanophenyl)methyl]amino]-4-[(3-hydroxyphenyl)methylamino]pyrrolidin-1-carboxylat (**133**)**



Unter Verwendung der AAV3 wurden 0.49 g (0.98 mmol) *tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-amino-4-[(4-carbamoylphenyl)sulfonyl]-[(3-cyanophenyl)methyl]amino]pyrrolidin-1-carboxylat **124** in 8 ml MeOH mit 0.25 g Molsieb und 0.18 g 3-Hydroxybenzaldehyd (1.47 mmol) 5 h und anschließend mit 74 mg NaBH₄ (1.96 mmol) 2 h gerührt. Aufreinigung mittels

MPLC (DCM/MeOH 99:1 - 90:10) ergab 0.49 g (66%) von **133** in Form eines farblosen Feststoffs.

Ausbeute: 0.49 g (66%) (farbloser Feststoff)

Smp.: 109 °C (DCM/ MeOH)

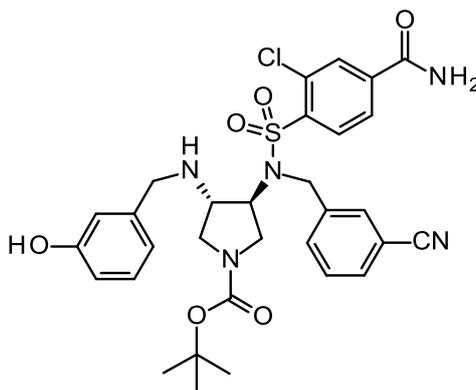
MS (ES+):

m/z (%) = 550 (100, [M-t-Butyl+H]⁺), 606 (34, [M+H]⁺), 628 (46, [M+Na]⁺)

HRMS (ES+):

m/z	berechnet für C ₃₁ H ₃₆ N ₅ O ₆ S	:	606.238631
	gefunden	:	606.241170

***tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-[(4-carbamoyl-2-chloro-phenyl)sulfonyl]-[(3-cyanophenyl)methyl]amino]-4-[(3-hydroxyphenyl)methylamino]pyrrolidin-1-carboxylat (**134**)**



Unter Verwendung der AAV3 wurden 0.35 g (0.66 mmol) *tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-amino-4-[(4-carbamoyl-2-chloro-phenyl)sulfonyl]-[(3-cyanophenyl)methyl]amino]pyrrolidin-1-carboxylat **126** in 5 ml MeOH mit 0.17 g Molsieb und 0.12 g 3-Hydroxybenzaldehyd (0.99 mmol) 5 h und anschließend mit 50 mg NaBH₄ (1.32 mmol) 2 h gerührt.

Aufreinigung mittels MPLC (DCM/MeOH 99:1 - 90:10) ergab 0.33 g (77%) von **134** in Form eines farblosen Feststoffs.

Ausbeute: 0.33 g (77%) (farbloser Feststoff)

Smp.: 110 °C (DCM/ MeOH)

MS (ES+):

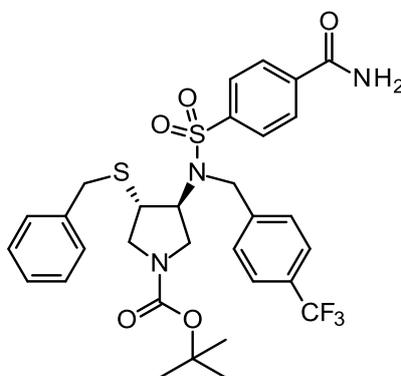
m/z (%) = 540 (26, [M-Boc+H]⁺), 584 (100, [M-t-Butyl+H]⁺), 640 (67, [M+H]⁺), 662 (3, [M+Na]⁺)

HRMS (ES+):

m/z berechnet für C₃₁H₃₅ClN₅O₆S : 640.199659

gefunden : 640.197265

***tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-benzylsulfanyl-4-[(4-carbamoylphenyl)sulfonyl]-[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]amino]pyrrolidin-1-carboxylat (**135**)**



Zu einer Lösung von 150 mg Phenylmethanthiol (1.20 mmol) und 180 µl DBU (1.20 mmol) in DMF (3 ml) wurde nach 10 minütigem rühren bei Raumtemperatur 150 mg *tert*-Butyl-(3*S*,4*R*)-3-[(4-carbamoylphenyl)sulfonyl]-[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]amino]-4-methylsulfonyloxy-pyrrolidin-1-carboxylat **63** (0.24 mmol) hinzugegeben und die Reaktionsmischung 24 h bei 40 °C gerührt. Anschließend wurde mit gesättigter NaHCO₃ Lösung (10 ml) versetzt, mit DCM (3 x 10 ml) extrahiert, mit ge-

sättigter Kochsalzlösung gewaschen (1 x 10 ml), über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt. Zweimalige Aufreinigung mittels MPLC (1. DCM/MeOH 100:0 - 90:10, 2. Cyclohexan/EtOAc 20:80) ergab 25 mg von **135** in Form eines farblosen Feststoffs, der direkt weiter umgesetzt wurde.

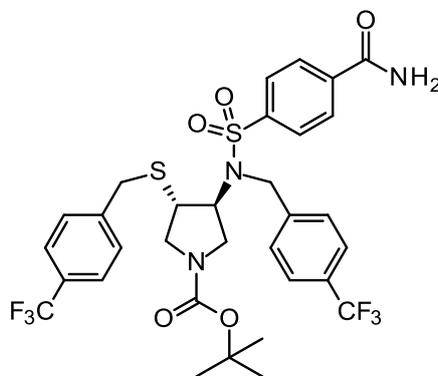
MS (ES⁺):

m/z (%) = 672 (100, [M+Na]⁺)

HRMS (ES⁺):

m/z	berechnet für C ₃₁ H ₃₄ F ₃ N ₃ O ₅ S ₂ Na	:	672.178970
	gefunden	:	672.179576

***tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-[(4-carbamoylphenyl)sulfonyl]-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]-methyl]amino]-4-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methylsulfanyl]pyrrolidin-1-carboxylat (**136**)**



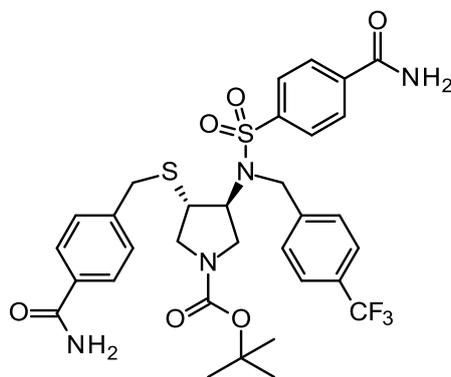
Zu einer auf 0 °C gekühlten Suspension von 76 mg NaH 60% in Mineralöl (1.90 mmol) in DMF (3.5 ml) wurden 484 mg [4-(Trifluoromethyl)phenyl]methanethiol (2.52 mmol) langsam hinzugegeben und das Reaktionsgemisch 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde erneut auf 0 °C gekühlt und 390 mg *tert*-Butyl-(3*S*,4*R*)-3-[(4-carbamoylphenyl)sulfonyl]-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]-amino]-4-methylsulfonyloxy-pyrrolidin-1-carboxylat **63** (0.63 mmol) in 1.5 ml DMF hinzugegeben. Nachdem 24 h bei Raumtemperatur gerührt wurde, wurden 94 µl (0.63 mmol) DBU und weitere 484 mg [4-(trifluoromethyl)phenyl]methanethiol (2.52 mmol) zugegeben

und weitere 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde mit gesättigter NaHCO₃ Lösung (50 ml) versetzt, mit EtOAc (3 x 50 ml) extrahiert, mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen (1 x 50 ml), über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt. Aufreinigung mittels MPLC (Cyclohexan/EtOAc 4:6 - 3:7) ergab 195 mg von **136** in Form eines beigen Feststoffs, der ohne weitere Aufreinigung direkt weiter umgesetzt wurde.

MS (ES⁺):

m/z (%) = 740 (100, [M+Na]⁺), 1457 (63, [2M+Na]⁺)

***tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-[(4-carbamoylphenyl)methylsulfanyl]-4-[(4-carbamoylphenyl)sulfonyl]-[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]amino]pyrrolidin-1-carboxylat (**137**)**



Zu einer Lösung von 108 mg 4-(Sulfanylmethyl)benzamid (0.65 mmol) und 47 µl DBU (0.32 mmol) in DMF (2 ml) wurde nach 10 minütigem rühren bei Raumtemperatur 100 mg *tert*-Butyl-(3*S*,4*R*)-3-[(4-carbamoylphenyl)sulfonyl]-[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]amino]-4-methylsulfonyloxy-pyrrolidin-1-carboxylat **63** (0.16 mmol) hinzugegeben und die Reaktionsmischung 5 h bei Raumtemperatur und im Anschluss über Nacht bei 40 °C gerührt. Anschließend wurde mit gesättigter NaHCO₃ Lösung (10 ml) versetzt, mit DCM (3 x 10 ml) extrahiert, mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen (1 x 10 ml), über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt. Aufreinigung mittels MPLC (DCM/MeOH 100:0

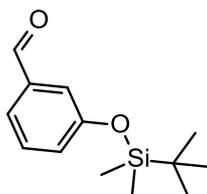
- 90:10) ergab 40 mg von **137** in Form eines beigen Feststoffs, der ohne weitere Aufreinigung direkt weiter umgesetzt wurde.

MS (ES+):

m/z (%) = 715 (100, [M+Na]⁺)

HRMS (ES+):

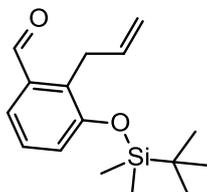
m/z	berechnet für C ₃₂ H ₃₅ F ₃ N ₄ O ₆ S ₂ Na	:	715.184783
	gefunden	:	715.185852

3-[*tert*-Butyl(dimethyl)silyl]oxybenzaldehyd (138**)**

Zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung von 3-Hydroxybenzaldehyd (3.00 g, 24.00 mmol) in DCM (100 ml) wurden nacheinander Imidazol (4.80 g, 72.00 mmol) und TBDMSCl (4.50 g, 30.00 mmol) hinzugegeben und die Reaktion 4.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Quenchen mit Wasser (100 ml) wurde dreimal mit 50 ml DCM extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter Kochsalzlösung (50 ml) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Filtrat am Rotavapor eingeeengt. MPLC (Cyclohexan/EtOAc 59:1) ergab 5.61 g (99%) von **138** in Form eines farblosen Öls. Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein. [107]

Ausbeute: 5.61 g (99%)

(farbloses Öl)

2-Allyl-3-[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy-benzaldehyd (139)

Zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung von 2-Allyl-3-hydroxy-benzaldehyd (0.65 g, 4.00 mmol) in DCM (20 ml) wurden nacheinander Imidazol (0.82 g, 12.00 mmol) und TBDMSCl (0.72 g, 4.80 mmol) hinzugegeben und die Reaktion über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wurde filtriert und das Lösungsmittel des Filtrates am Rotavapor entfernt. Der Rückstand wurde mittels MPLC (Cyclohexan/EtOAc 100:0 – 90:10) aufgereinigt, was zu 1.02 g (93%) von **139** in Form eines blassgelben Öls führte.

Ausbeute: 1.02 g (93%) (blassgelbes Öl)

EA: C₁₆H₂₄O₂Si (276.45 g/mol)

Ber.: C: 69.51 H: 8.75 N: 0.00

Gef.: C: 69.71 H: 8.76 N: 0.07

MS (ES+):

m/z (%) = 277 (36, [M+H]⁺), 294 (100, [M+NH₄]⁺), 570 (60, [2M+NH₄]⁺), 575 (67, [2M+Na]⁺)

HRMS (EI+):

m/z	berechnet für C ₁₆ H ₂₄ O ₂ Si	:	276.154559
	gefunden	:	276.154914

¹H-NMR (CDCl₃, 21.0 °C, 399.79 MHz):

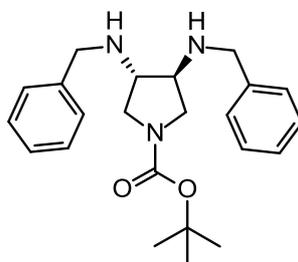
δ _H (ppm) =	10.22	s, 1H, O=CH
	7.48	dd, 1H, ³ J=7.7 Hz, ⁴ J=1.2 Hz, O-CH-C-CH-CH
	7.25	t, 1H, ³ J=7.8 Hz, O-CH-C-CH-CH
	7.06	dd, 1H, ³ J=8.0 Hz, ⁴ J=1.1 Hz, O-CH-C-CH-CH

6.00	<i>ddt</i> , 1H, $^3J=17.2$ Hz, $^3J=10.1$ Hz, $^3J=5.5$ Hz, CH ₂ -CH=CH ₂
5.01	<i>ddd</i> , 1H, $^3J=10.1$ Hz, $^4J=3.3$ Hz, $^4J=1.6$ Hz, CH ₂ -CH=CH ₂
4.86	<i>ddd</i> , 1H, $^3J=17.2$ Hz, $^4J=3.7$ Hz, $^4J=1.8$ Hz, Si-O-C-C-CH ₂ -CH-CH ₂
3.83	<i>dt</i> , 2H, $^3J=5.6$ Hz, $^4J=1.8$ Hz, Si-O-C-C-CH ₂ -CH-CH ₂
1.02	<i>s</i> , 9H, Si-C-(CH ₃) ₃
0.25	<i>s</i> , 6H, Si-(CH ₃) ₂

¹³C-NMR (CDCl₃, 23.4 °C, 125.77 MHz):

δ _C (ppm) = 192.5	O=C
154.4	Si-O-C-C-CH ₂ -CH-CH ₂
136.9	Si-O-C-C-CH ₂ -CH-CH ₂
135.7	O-CH-C-CH-CH-CH
132.8	Si-O-C-C-CH ₂ -CH-CH ₂
127.3	O=CH-C-CH-CH-CH
123.9, 123,6	O=CH-C-CH-CH-CH
115.6	Si-O-C-C-CH ₂ -CH-CH ₂
28.6	Si-O-C-C-CH ₂ -CH-CH ₂
25.9	Si-(CH ₃) ₂
18.4	Si-C-(CH ₃) ₃
-4.0	Si-C-(CH ₃) ₃

***tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3,4-bis(benzylamino)pyrrolidin-1-carboxylat (140)**



Unter Verwendung der AAV3 wurden 0.52 g (2.60 mmol) *tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3,4-diaminopyrrolidin-1-carboxylat **16** [52] in 20 ml MeOH mit 0.65 g Molsieb und 0.79 ml

Benzaldehyd (7.80 mmol) 1 h gerührt und nach Zugabe von 0.40 g NaBH₄ (10.40 mmol) für weitere 1.0 h gerührt. Aufreinigung mittels MPLC (Cyclohexan/EtOAc 3:7) ergab 0.58 g (59 %) von **140** in Form eines blassgelben Öls.

Ausbeute: 0.58 g (59 %) (blassgelbes Öl)

EA: C₂₃H₃₁N₃O₂ *0.5 H₂O (390.52 g/mol)

Ber.: C: 70.74 H: 8.26 N: 10.76

Gef.: C: 70.71 H: 8.04 N: 10.60

MS (ES+):

m/z (%) = 382 (100, [M+H]⁺), 763 (45, [2M+H]⁺), 785 (24, [2M+Na]⁺)

HRMS (EI+):

m/z berechnet für C₂₃H₃₂N₃O₂ : 382.249453

gefunden : 382.250741

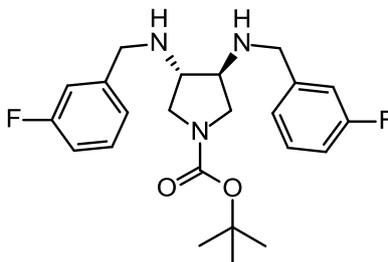
¹H-NMR (CDCl₃, 21.0 °C, 399.79 MHz, Rotamere):

δ _H (ppm) = 7.36-7.22	<i>m</i> , 10H, Ar- <u>H</u>
3.87-3.58	<i>m</i> , 6H, Ar- <u>CH</u> ₂ , <u>CH</u> _(Pyrrolidin)
3.14-3.00	<i>m</i> , 4H, <u>CH</u> _{2(Pyrrolidin)}
1.51	<i>s</i> , 2H, CH- <u>NH</u> -CH ₂
1.46	<i>s</i> , 9H, O-C-(<u>CH</u> ₃) ₃

¹³C-NMR (CDCl₃, 21.0 °C, 100.53 MHz, Rotamere):

δ _C (ppm) = 154.7	N- <u>C</u> OO-C
140.1	CH ₂ - <u>C</u> -CH-CH-CH
128.6	CH ₂ -C-CH- <u>CH</u> -CH
128.2	CH ₂ -C- <u>CH</u> -CH-CH
127.2	CH ₂ -C-CH-CH- <u>CH</u>
79.4	O- <u>C</u> -(CH ₃) ₃
62.1, 61.2	<u>CH</u> _(Pyrrolidin)
52.4	Ar- <u>CH</u> ₂
51.0, 50.4	<u>CH</u> _{2(Pyrrolidin)}
28.6	O-C-(<u>CH</u> ₃) ₃

***tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3,4-bis[(3-fluorophenyl)methylamino]pyrrolidin-1-carboxylat
(141)**



Unter Verwendung der AAV3 wurden 0.40 g (2.00 mmol) *tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3,4-diaminopyrrolidin-1-carboxylat **16** [52] in 15 ml MeOH mit 0.50 g Molsieb und 0.74 g 3-fluorobenzaldehyd (6.00 mmol) 2.5 h gerührt und nach Zugabe von 0.30 g NaBH₄ (8.00 mmol) für weitere 1.5 h gerührt. Aufreinigung mittels MPLC (Cyclohexan/EtOAc 8:2 - 0:100) ergab 0.64 g (77 %) von **141** in Form eines blassgelben Öls.

Ausbeute: 0.64 g (77%) (blassgelbes Öl)

EA: C₂₃H₂₉F₂N₃O₂ (417.49 g/mol)

Ber.: C: 66.17 H: 7.00 N: 10.06

Gef.: C: 66.11 H: 7.04 N: 10.12

MS (ES+):

m/z (%) = 418 (100, [M+H]⁺), 835 (26, [2M+H]⁺), 1252 (7, [3M+H]⁺)

HRMS (EI+):

m/z berechnet für C₂₃H₂₉F₂N₃O₂ : 417.222784

gefunden : 417.222662

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 399.79 MHz):

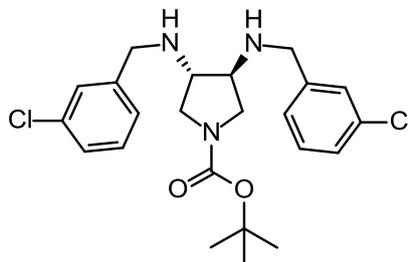
δ _H (ppm) = 7.33	<i>td</i> , 2H, ³ <i>J</i> =8.0 Hz, ⁴ <i>J</i> _{H,F} =6.2 Hz, F-C-CH-CH-CH-C
7.18-7.11	<i>m</i> , 4H, F-C-CH-CH-CH-C-CH
7.02	<i>td</i> , 2H, ³ <i>J</i> =8.6 Hz, ⁴ <i>J</i> =2.6 Hz, ⁵ <i>J</i> _{H,F} =0.7 Hz, F-C-CH-CH-CH-C
3.69	<i>s</i> , 4H, Ar-CH ₂
3.48 - 3.38	<i>sm</i> , 2H, CH ₂ (Pyrrolidin)
3.02	<i>dd</i> , 2H, ² <i>J</i> =10.8 Hz, ³ <i>J</i> =4.1 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin)

3.01-2.90	<i>sm</i> , 2H, $\underline{\text{CH}}$ (Pyrrolidin)
2.43	<i>brs</i> , 2H, $\text{CH-NH-}\underline{\text{CH}}_2$
1.38	<i>s</i> , 9H, $\text{O-C-}(\underline{\text{CH}}_3)_3$

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO-*d*₆, 22 °C, 100.53 MHz, Rotamere):

δ_{C} (ppm) = 162.5	<i>d</i> , $^1J_{\text{C,F}}=241.8$ Hz, $\text{F-C-}\underline{\text{C}}\text{-CH-CH-CH-C-CH}$
153.7	$\text{N-}\underline{\text{C}}\text{OO-C}$
144.2	<i>d</i> , $^3J_{\text{C,F}}=5.8$ Hz, $\text{F-C-CH-CH-CH-}\underline{\text{C}}\text{-CH}$
129.9	<i>d</i> , $^3J_{\text{C,F}}=5.8$ Hz, $\text{F-C-CH-}\underline{\text{C}}\text{H-CH-C-CH}$
123.8	$\text{F-C-CH-CH-}\underline{\text{C}}\text{H-C-CH}$
114.4	<i>d</i> , $^2J_{\text{C,F}}=23.12$ Hz, $\text{F-C-CH-CH-CH-C-}\underline{\text{C}}\text{H}$
113.2	<i>d</i> , $^2J_{\text{C,F}}=22.16$ Hz, $\text{F-C-}\underline{\text{C}}\text{H-CH-CH-C-CH}$
78.0	$\text{O-}\underline{\text{C}}\text{-(CH}_3)_3$
61.1, 60.3	$\underline{\text{C}}\text{H(Pyrrolidin)}$
50.4	$\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{(Pyrrolidin)}$
50.0	$\text{Ar-}\underline{\text{C}}\text{H}_2$
28.2	$\text{O-C-}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$

**tert-Butyl-(3S,4S)-3,4-bis[(3-chlorophenyl)methylamino]pyrrolidin-1-carboxylat
(142)**



Unter Verwendung der AAV3 wurden 0.30 g (1.50 mmol) tert-Butyl-(3S,4S)-3,4-diaminopyrrolidin-1-carboxylat **16** [52] in 10 ml MeOH mit 0.40 g Molsieb und 0.64 g 3-chlorobenzaldehyd (4.50 mmol) über Nacht gerührt und nach Zugabe von 0.23 g NaBH₄ (6.00 mmol) für weiter 2 h gerührt. Aufreinigung mittels MPLC (Cyclohexan/EtOAc 6.7:3.3) ergab 0.51 g (75 %) von **142** in Form eines blassgelben Öls.

Ausbeute: 0.51 g (75 %) (blassgelbes Öl)

EA: C₂₃H₂₉Cl₂N₃O₂ (450.40 g/mol)

Ber.: C: 61.33 H: 6.49 N: 9.33

Gef.: C: 61.49 H: 6.56 N: 9.42

MS (ES+):

m/z (%) = 450 (100, [M^{Cl35}+H]⁺), 472 (17, [M^{Cl35}+Na]⁺), 474 (11, [M^{Cl37}+Na]⁺), 901 (67, [M^{Cl35}+M^{Cl37}+H]⁺), 903 (41, [2M^{Cl37}+H]⁺), 1350 (35, [2M^{Cl35}+M^{Cl37}+H]⁺)

HRMS (EI+):

m/z berechnet für C₂₃H₂₉Cl³⁵₂N₃O₂ : 449.163683

gefunden : 449.161999

¹H-NMR (DMSO-d₆, 30.0 °C, 399.79 MHz):

δ_H (ppm) = 7.39 *brt*, 2H, ⁴J=1.5 Hz, Cl-C-CH-CH-CH-C-CH

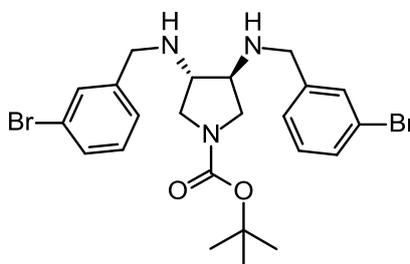
7.35-7.22 *m*, 6H, Cl-C-CH-CH-CH-C-CH

3.68	s, 4H, Ar-CH ₂
3.46 - 3.38	sm, 2H, CH ₂ (Pyrrolidin)
3.02	dd, 2H, ² J=10.8 Hz, ³ J=4.1 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin)
3.00-2.91	sm, 2H, CH(Pyrrolidin)
2.44	brs, 2H, CH-NH-CH ₂
1.38	s, 9H, O-C-(CH ₃) ₃

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 21.9 °C, 100.53 MHz, Rotamere):

δ _C (ppm) = 153.7	N-COO-C
143.83, 143.78	Cl-C-CH-CH-CH-C-CH
132.9	Cl-C-CH-CH-CH-C-CH
129.9	Cl-C-CH-CH-CH-C-CH
127.6	Cl-C-CH-CH-CH-C-CH
126.54	Cl-C-CH-CH-CH-C-CH
126.45	Cl-C-CH-CH-CH-C-CH
78.1	O-C-(CH ₃) ₃
61.2, 60.3	CH(Pyrrolidin)
50.3	CH ₂ (Pyrrolidin)
50.0	Ar-CH ₂
28.2	O-C-(CH ₃) ₃

***tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3,4-bis[(3-bromophenyl)methylamino]pyrrolidin-1-carboxylat
(143)**



Unter Verwendung der AAV3 wurden 0.40 g (2.00 mmol) *tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3,4-diaminopyrrolidin-1-carboxylat **16** [52] in 15 ml MeOH mit 0.50 g Molsieb und 1.11 g

3-Bromobenzaldehyd (6.00 mmol) 2.5 h gerührt und nach Zugabe von 0.30 g NaBH₄ (8.00 mmol) für weitere 1.5 h gerührt. Aufreinigung mittels MPLC (Cyclohexan/EtOAc 8:2 - 0:100) ergab 0.78 g (73 %) von **143** in Form eines blassgelben Öls.

Ausbeute: 0.78 g (73 %) (blassgelbes Öl)

EA: C₂₃H₂₉Br₂N₃O₂ (539.30 g/mol)

Ber.: C: 51.22 H: 5.42 N: 7.79

Gef.: C: 51.30 H: 5.47 N: 7.86

MS (ES+):

m/z (%) = 540 (100, [M^{Br79Br81}+H]⁺), 543 (11, [M^{Br81}+H]⁺), 1079 (12, [M^{Br79}+M^{Br81}+H]⁺)

HRMS (EI+):

m/z berechnet für C₂₃H₂₉Br⁷⁹₂N₃O₂ : 537.062650

gefunden : 537.066058

¹H-NMR (DMSO-d₆, 30.0 °C, 399.79 MHz):

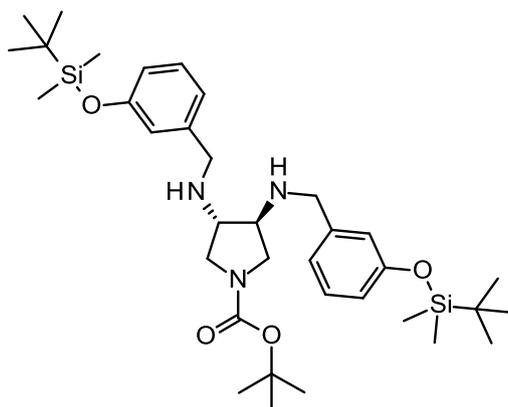
δ _H (ppm) = 7.54	<i>t</i> , 2H, ⁴ J=1.6 Hz, Br-C-CH-CH-CH-C-CH
7.41	<i>ddd</i> , 2H, ³ J=7.7 Hz, ⁴ J=1.7 Hz, ⁴ J=1.7 Hz, Br-C-CH-CH-CH-C-CH
7.30	<i>ddd</i> , 2H, ³ J=7.6 Hz, ⁴ J=1.4 Hz, ⁴ J=1.4 Hz, Br-C-CH-CH-CH-C-CH
7.27	<i>t</i> , 2H, ³ J=7.6 Hz, Br-C-CH-CH-CH-C-CH
3.67	<i>s</i> , 4H, Ar-CH ₂
3.46 - 3.38	<i>sm</i> , 2H, CH ₂ (Pyrrolidin)
3.02	<i>dd</i> , 2H, ² J=10.8 Hz, ³ J=4.1 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin)
3.00-2.91	<i>sm</i> , 2H, CH(Pyrrolidin)
2.45	<i>brs</i> , 2H, CH-NH-CH ₂
1.38	<i>s</i> , 9H, O-C-(CH ₃) ₃

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 22.2 °C, 100.53 MHz, Rotamere):

δ _C (ppm) = 153.7	N-COO-C
144.1	Br-C-CH-CH-CH-C-CH
130.2	Br-C-CH-CH-CH-C-CH

129.3	Br-C-CH-CH-CH-C- <u>CH</u>
126.9	Br-C-CH-CH- <u>CH</u> -C-CH
121.6	Br- <u>C</u> -CH-CH-CH-C-CH
78.1	O- <u>C</u> -(CH ₃) ₃
61.1, 60.2	<u>CH</u> (Pyrrolidin)
50.3	<u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)
50.0	Ar- <u>CH</u> ₂
28.2	O-C-(<u>CH</u> ₃) ₃

***tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3,4-bis[[3-[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxyphenyl]methylamino]-pyrrolidin-1-carboxylat (144)**



Unter Verwendung der AAV3 wurden 1.00 g (4.97 mmol) *tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3,4-diaminopyrrolidin-1-carboxylat **16** [52] in 40 ml MeOH mit 1.25 g Molsieb und 3.52 g 3-[*tert*-Butyl(dimethyl)silyl]oxybenzaldehyd **138** (14.91 mmol) über Nacht gerührt und nach Zugabe von 0.76 g NaBH₄ (19.88 mmol) weitere 1.5 h gerührt. Aufreinigung mittels MPLC (Cyclohexan/EtOAc 8:2) ergab 3.10 g (97%) von **144** in Form eines blassgelben Öls.

Ausbeute: 3.10 g (97%) (blassgelbes Öl)

EA: C₃₅H₅₉N₃O₄Si₂ (642.03 g/mol)
Ber.: C: 65.48 H: 9.26 N: 6.54

Gef: C: 65.91 H: 9.29 N: 6.40

MS (ES+):

m/z (%) = 642 (100, [M+H]⁺), 664 (21, [M+Na]⁺), 1284 (74, [2M+H]⁺)

HRMS (EI+):

m/z berechnet für C₃₅H₅₉N₃O₄Si₂ : 641.404415
 gefunden : 641.407317

¹H-NMR (DMSO-d₆, 30.0 °C, 399.79 MHz):

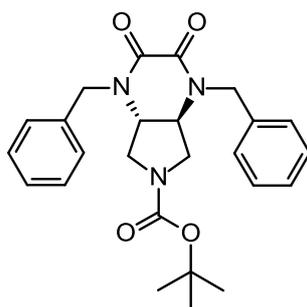
δ _H (ppm) = 7.15	<i>t</i> , 2H, ³ J=7.8 Hz, O-C-CH-CH- <u>CH</u> -C-CH
6.88	<i>brd</i> , 2H, ³ J=7.6 Hz, O-C-CH-CH-CH- <u>CH</u> -C-CH
6.80	<i>brs</i> , 2H, O-C-CH-CH-CH-C- <u>CH</u>
6.68	<i>ddd</i> , 2H, ³ J=8.0 Hz, ⁴ J=2.4 Hz, ⁴ J=0.8 Hz, O-C- <u>CH</u> -CH-CH-C-CH
3.70-3.53	<i>m</i> , 4H, Ar- <u>CH</u> ₂
3.40	<i>dd</i> , 2H, ² J=10.5 Hz, ³ J=5.3 Hz, <u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)
3.03-2.89	<i>m</i> , 4H, <u>CH</u> (Pyrrolidin), <u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)
2.34-2.23	<i>sm</i> , 2H, CH-NH- <u>CH</u> ₂
1.37	<i>s</i> , 9H, O-C-(<u>CH</u> ₃) ₃
0.94	<i>s</i> , 18H, Si-C-(<u>CH</u> ₃) ₃
0.16	<i>s</i> , 12H, Si-(<u>CH</u> ₃) ₂

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 35.0 °C, 125.77 MHz, Rotamere):

δ _C (ppm) = 154.9	O- <u>C</u> -CH-CH-CH-C-CH
153.6	N- <u>C</u> OO-C
142.7	O-C-CH-CH-CH- <u>C</u> -CH
128.9	O-C-CH- <u>CH</u> -CH-C-CH
120.9	O-C-CH-CH- <u>CH</u> -C-CH
119.2	O-C- <u>CH</u> -CH-CH-C-CH
117.8	O-C-CH-CH-CH-C- <u>CH</u>
77.8	O- <u>C</u> -(CH ₃) ₃
61.1, 60.3	<u>CH</u> (Pyrrolidin)
50.8, 50.3	<u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)
50.0	Ar- <u>CH</u> ₂
28.1	O-C-(<u>CH</u> ₃) ₃

25.5	Si-C-(<u>C</u> H ₃) ₃
17.8	Si- <u>C</u> -(CH ₃) ₃
-4.6	Si-(<u>C</u> H ₃) ₂

***tert*-Butyl-(4a*S*,7a*S*)-1,4-dibenzyl-2,3-dioxo-4a,5,7,7a-tetrahydropyrrolo[3,4-*b*]pyrazin-6-carboxylat (**145**)**



0.50 g (1.31 mmol) *tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3,4-bis(benzylamino)pyrrolidin-1-carboxylat **140** wurden in 40 ml DCM gelöst und mit 0.91 ml DIPEA (5.24 mmol) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde auf -50 °C gekühlt, innerhalb von 2 h 110 µl (1.31 mmol) Oxalylchlorid (alle 30 min 27.5 µl) zugegeben und weitere 30 min gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotavapor und Aufreinigung mittels MPLC (DCM/EtOAc 30:70) wurden 112 mg (20 %) von **145** in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

Ausbeute: 112 mg (20 %) (weißer Feststoff)

Smp.: 204 °C (DCM/EtOAc)

EA: C₂₅H₂₉N₃O₄ (435.52 g/mol)

Ber.: C: 68.95 H: 6.71 N: 9.65

Gef.: C: 68.98 H: 6.89 N: 9.47

MS (ES+):

m/z (%) = 453 (100, [M+NH₄]⁺), 458 (90, [M+Na]⁺), 888 (46, [2M+NH₄]⁺), 893 (69, [2M+Na]⁺)

HRMS (EI+):

m/z	berechnet für C ₂₅ H ₂₉ N ₃ O ₄	:	435.215807
	gefunden	:	435.214505

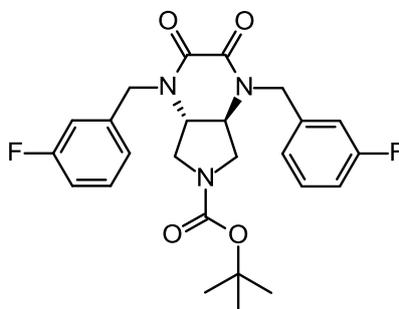
¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 399.79 MHz):

δ _H (ppm) =	7.40-7.25	<i>m</i> , 10H, Ar- <u>H</u>
	4.75	<i>d</i> , 1H, ² <i>J</i> =15.8 Hz, Ar- <u>CH</u> ₂
	4.70	<i>d</i> , 1H, ² <i>J</i> =15.8 Hz, Ar- <u>CH</u> ₂
	4.50	<i>d</i> , 1H, ² <i>J</i> =15.6 Hz, Ar- <u>CH</u> ₂
	4.48	<i>d</i> , 1H, ² <i>J</i> =15.8 Hz, Ar- <u>CH</u> ₂
	4.22-4.05	<i>sm</i> , 2H, <u>CH</u> (Pyrrolidin)
	3.59	<i>pst</i> , 2H, <i>J</i> =7.8 Hz, <u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)
	3.13	<i>psdt</i> , 2H, <i>J</i> =9.9 Hz, <i>J</i> =16.5 Hz, <u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)
	1.33	<i>s</i> , 9H, O-C-(<u>CH</u> ₃) ₃

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 35.0 °C, 125.77 MHz, Rotamere):

δ _C (ppm) =	157.9	O= <u>C</u> - <u>C</u> =O
	153.1	N- <u>C</u> OO-C
	136.7	CH ₂ - <u>C</u> -CH-CH-CH
	128.51, 128.47	CH ₂ -C-CH- <u>CH</u> -CH
	127.23	CH ₂ -C- <u>CH</u> -CH-CH
	127.16	CH ₂ -C-CH-CH- <u>CH</u>
	79.2	<u>C</u> -O-C-N
	56.7, 56.1	<u>CH</u> (Pyrrolidin)
	47.8, 47.7	Ar- <u>CH</u> ₂
	46.1, 45.7	<u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)
	27.7	C-(<u>CH</u> ₃) ₃

***tert*-Butyl-(4a*S*,7a*S*)-1,4-bis[(3-fluorophenyl)methyl]-2,3-dioxo-4a,5,7,7a-tetrahydropyrrolo[3,4-*b*]pyrazin-6-carboxylat (**146**)**



4-Nitrophenol (2.78 g, 20 mmol) wurde in Toluol (50 ml) gelöst und mit DIPEA (3.74 ml, 22mmol) versetzt. Nach 15 min rühren bei -10 bis -15 °C wurde langsam Oxalylchlorid (0.86 ml, 20 mmol) zugetropft. Die Reaktion wurde innerhalb von einer Stunde auf Raumtemperatur erwärmt, das Präzipitat abgesaugt und mit Aceton gewaschen. Nach Umkristallisieren aus Chloroform wurden 2.78 g (84 %) des beigen Feststoffs Bis(4-nitrophenyl)oxalat erhalten und direkt weiter umgesetzt.

¹H-NMR von bis(4-nitrophenyl)oxalat (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 399.79 MHz):

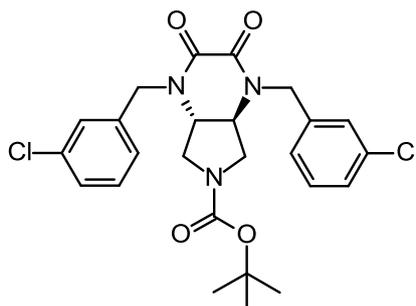
δ_{H} (ppm) = 8.41	<i>ddd</i> , 4H, $^3J=9.2$ Hz, $^4J=3.4$ Hz, $^5J=2.1$ Hz, N-C- <u>CH</u>
7.61	<i>ddd</i> , 4H, $^3J=8.9$ Hz, $^4J=3.4$ Hz, $^5J=2.1$ Hz, O-C- <u>CH</u>

57 mg Bis(4-nitrophenyl)oxalat (0.17 mmol) wurden zu *tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3,4-bis[(3-fluorophenyl)methylamino]pyrrolidin-1-carboxylat **141** (60 mg, 0.14 mmol) in DMF (1 ml) gegeben. 51 μ l DBU (0.34 mmol) wurden zu getropft und die Lösung 4 d bei 80 °C im geschlossenen Druckgefäß gerührt. Dabei wurden im Abstand von 12 bis 24 h jeweils weitere 57 mg von bis(4-nitrophenyl)oxalat zugegeben, insgesamt 7.2 Äquivalente. Das Gemisch wurde mit gesättigter NaHCO₃ Lösung (10 ml) versetzt, mit DCM (3 x 10 ml) extrahiert, mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen (1 x 10 ml), über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt. Aufreinigung mittels MPLC (DCM/MeOH 99:1) ergab 45 mg (68%) von **146** in Form eines farblosen Feststoffs.

MS (ES+):

m/z (%) = 472 (100, $[M+H]^+$), 489 (59, $[M+NH_4]^+$), 494 (37, $[M+Na]^+$)

***tert*-Butyl-(4a*S*,7a*S*)-1,4-bis[(3-chlorophenyl)methyl]-2,3-dioxo-4a,5,7,7a-tetrahydropyrrolo[3,4-*b*]pyrazin-6-carboxylat (**147**)**



Unter Verwendung der AAV4 wurden 1.10 g (2.44 mmol) *tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3,4-bis[(3-chlorophenyl)methylamino]pyrrolidin-1-carboxylat **142** in 120 ml DCM gelöst und mit 850 μ l + 430 μ l + 430 μ l DIPEA (9.76 mmol) und 209 μ l + 105 μ l + 105 μ l Oxalylchlorid (4.88 mmol) umgesetzt. Aufreinigung mittels MPLC (Cyclohexan/EtOAc 100:0 - 0:100) ergab 0.71 g (57 %) von **147** in Form eines farblosen Feststoffs.

Ausbeute: 0.71 g (57 %) (farbloser Feststoff)

Smp.: 151 °C (Cyclohexan/EtOAc)

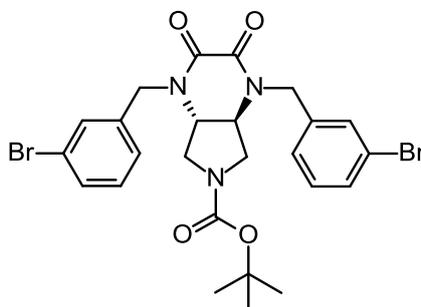
MS (ES+):

m/z (%) = 504 (30, $[M^{35Cl}+H]^+$), 506 (12, $[M^{35Cl,37Cl}+H]^+$), 526 (100, $[M^{35Cl}+Na]^+$), 528 (27, $[M^{35Cl,37Cl}+Na]^+$)

HRMS (EI+):

m/z	berechnet für $C_{25}H_{27}N_3O_4Cl^{35Cl}_2$:	503.137862
	gefunden	:	503.139057

***tert*-Butyl-(4a*S*,7a*S*)-1,4-bis[(3-bromophenyl)methyl]-2,3-dioxo-4a,5,7,7a-tetrahydropyrrolo[3,4-*b*]pyrazin-6-carboxylat (**148**)**



Unter Verwendung der AAV4 wurden 0.42 g (0.78 mmol) *tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3,4-bis[(3-bromophenyl)methylamino]pyrrolidin-1-carboxylat **143** in 40 ml DCM gelöst und mit 272 μ l + 136 μ l + 136 μ l DIPEA (3.12 mmol) und 67 μ l + 33 μ l + 33 μ l Oxalylchlorid (1.56 mmol) umgesetzt. Aufreinigung mittels MPLC (Cyclohexan/EtOAc 100:0 - 0:100) ergab 0.24 g (53 %) von **148** in Form eines farblosen Feststoffs.

Ausbeute: 0.24 g (53%) (farbloser Feststoff)

Smp.: 218 °C (Cyclohexan/EtOAc)

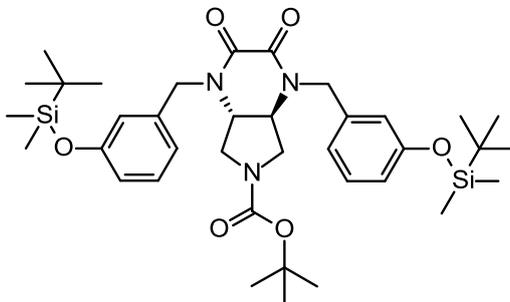
MS (EI+):

m/z (%) = 591 (49, [M^{79Br}]⁺), 593 (100, [$M^{79Br,81Br}$]⁺), 595 (49, [M^{81Br}]⁺)

HRMS (EI+):

m/z	berechnet für C ₂₅ H ₂₇ N ₃ O ₄ Br ₂	:	591.036829
	gefunden	:	591.039068

***tert*-Butyl-(4a*S*,7a*S*)-1,4-bis[[3-[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxyphenyl]methyl]-2,3-dioxo-4a,5,7,7a-tetrahydropyrrolo[3,4-*b*]pyrazin-6-carboxylat (**149**)**



1.60 g (2.50 mmol) *tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3,4-bis[[3-[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxyphenyl]methylamino]pyrrolidin-1-carboxylat **144** wurden in 80 ml DCM gelöst und mit 1.74 ml DIPEA (10.00 mmol) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde auf -50 °C gekühlt und bei dieser Temperatur alle 30 min 107 µl Oxalylchlorid zugegeben, insgesamt 429 µl (5.00 mmol) Oxalylchlorid. Es wurde weitere 30 min gerührt und anschließend das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt. Zweimalige Aufreinigung mittels MPLC (1. Cyclohexan/EtOAc 90:10, 2. TBME 100%) ergab 245 mg (14 %) von **149** in Form eines farblosen Feststoffs.

Ausbeute: 245 mg (14 %) (farbloser Feststoff)

Smp.: 81 °C (TBME)

EA: C₃₇H₅₇N₃O₆Si₂ (696.04 g/mol)

Ber.: C: 63.85 H: 8.25 N: 6.04

Gef.: C: 63.84 H: 8.22 N: 6.07

MS (ES+):

m/z (%) = 713 (100, [M+NH₄]⁺), 718 (87, [M+Na]⁺)

HRMS (ESI+):

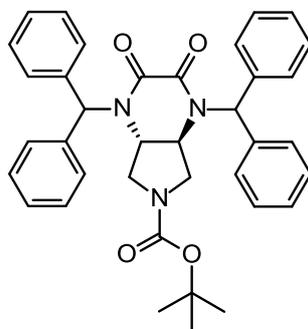
m/z berechnet für C₃₇H₅₈N₃O₆Si₂ : 696.386419

gefunden : 696.383339

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 399.79 MHz):

δ_{H} (ppm) = 7.23	<i>dd</i> , 2H, $^3J=8.6$ Hz, $^3J=7.8$ Hz, O-C-CH- <u>CH</u> -CH-C-CH
6.89	<i>brd</i> , 2H, $^3J=7.6$ Hz, O-C-CH-CH- <u>CH</u> -C-CH
6.79-6.74	<i>brm</i> , 4H, O-C- <u>CH</u> -CH-CH-C- <u>CH</u>
4.70	<i>d</i> , 1H, $^2J=15.1$ Hz, Ar- <u>CH</u> ₂
4.66	<i>d</i> , 1H, $^2J=15.1$ Hz, Ar- <u>CH</u> ₂
4.45	<i>d</i> , 2H, $^2J=15.3$ Hz, Ar- <u>CH</u> ₂
4.12-3.93	<i>sm</i> , 2H, <u>CH</u> (Pyrrolidin)
3.66-3.55	<i>sm</i> , 2H, <u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)
3.11	<i>psqn</i> , 2H, $J=10.1$ Hz, <u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)
1.33	<i>s</i> , 9H, O-C-(<u>CH</u> ₃) ₃
0.92	<i>s</i> , 18H, Si-C-(<u>CH</u> ₃) ₃
0.16	<i>s</i> , 12H, Si-(<u>CH</u> ₃) ₂

***tert*-Butyl-(4a*S*,7a*S*)-1,4-dibenzhydryl-2,3-dioxo-4a,5,7,7a-tetrahydropyrrolo[3,4-*b*]pyrazin-6-carboxylat (150)**



0.20 g (0.37 mmol) *tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3,4-bis(benzhydrylamino)pyrrolidin-1-carboxylat **93** wurden in 20 ml DCM gelöst und mit 260 μ l DIPEA (1.48 mmol) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde auf -10 °C gekühlt und bei dieser Temperatur portionsweise 64 μ l Oxalylchlorid (0.74 mmol) zugegeben. Es wurden weitere 5 h bei -10 °C und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Ansatz mit gesättigter Na₂CO₃ Lösung versetzt (50 ml), mit EtOAc extrahiert (3 x 50 ml), mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen (1 x 50 ml), über MgSO₄ getrocknet, filtriert

und das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt. Aufreinigung mittels MPLC (Cyclohexan/EtOAc 70:30) ergab 90 mg (41 %) von **150** in Form eines farblosen Feststoffs.

Ausbeute: 90 mg (41 %) (farbloser Feststoff)

Smp.: 239 °C (Cyclohexan/EtOAc)

EA: C₃₇H₃₇N₃O₄ (587.71 g/mol)

Ber.: C: 75.62 H: 6.35 N: 7.15

Gef.: C: 75.74 H: 6.77 N: 7.37

MS (ES+):

m/z (%) = 588 (9, [M+H]⁺), 610 (100, [M+Na]⁺)

HRMS (EI+):

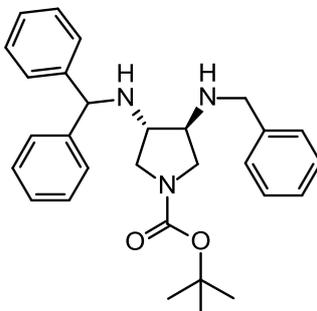
m/z berechnet für C₃₇H₃₇N₃O₄ : 587.278407

gefunden : 587.275715

¹H-NMR (DMSO-d₆, 30.0 °C, 399.79 MHz):

δ _H (ppm) = 7.44-7.20	<i>m</i> , 20H, Ar-H
6.39	<i>s</i> , 1H, Ar-CH-N
6.33	<i>s</i> , 1H, Ar-CH-N
4.49-4.33	<i>sm</i> , 2H, CH ₂ (Pyrrolidin)
3.00	<i>dd</i> , 1H, ² J=9.9 Hz, ³ J=6.6 Hz, CH ₂ (Pyrrolidin)
2.88	<i>ddd</i> , 2H, ³ J=9.1 Hz, CH(Pyrrolidin)
2.70-2.62	<i>m</i> , 1H, CH ₂ (Pyrrolidin)
1.22	<i>s</i> , 9H, O-C-(CH ₃) ₃

***tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-(benzhydrylamino)-4-(benzylamino)pyrrolidin-1-carboxylat
(151)**



Unter Verwendung der AAV3 wurden 0.15 g (0.41 mmol) *tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3,4-diaminopyrrolidin-1-carboxylat **91** in 7 ml MeOH mit 0.20 g Molsieb und 62 μ l Benzaldehyd (0.61 mmol) über Nacht und anschließend mit 31 mg NaBH₄ (0.82 mmol) 2 h gerührt. Aufreinigung mittels MPLC (Cyclohexan/EtOAc 100:0 - 50:50) ergab 0.16 g (83 %) von **151** in Form eines farblosen Öls.

Ausbeute: 0.16 g (83 %) (farbloses Öl)

EA: C₂₉H₃₅N₃O₂ (457.61 g/mol)

Ber.: C: 76.12 H: 7.71 N: 9.18

Gef: C: 75.83 H: 7.95 N: 8.96

MS (ES+):

m/z (%) = 458 (100, [M+H]⁺), 480 (4, [M+Na]⁺), 915 (13, [2M+H]⁺)

HRMS (EI+):

m/z berechnet für C₂₉H₃₅N₃O₂ : 457.272928

gefunden : 457.274999

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 30.0 °C, 399.79 MHz):

δ_{H} (ppm) = 7.40 *brd*, 4H, ³*J*=8.2 Hz, NH-CH-C-CH-CH-CH

7.33-7.25 *m*, 8H, Ar-H

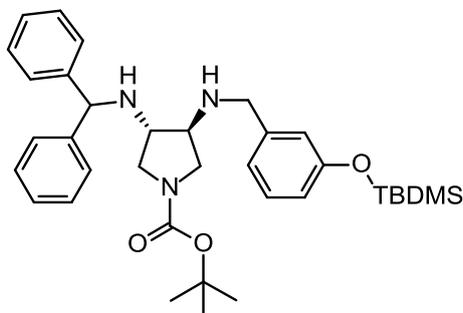
7.24-7.16 *m*, 3H, Ar-H

4.87	<i>d</i> , 1H, $^3J=5.7$ Hz, Ar- <u>CH</u> -NH
3.63	<i>s</i> , 2H, Ar- <u>CH</u> ₂
3.49-3.40	<i>m</i> , 1H, <u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)
3.36-3.27	1H, <u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin) (überlagert mit H ₂ O)
3.12-2.99	<i>m</i> , 2H, <u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)
2.98-2.83	<i>m</i> , 2H, <u>CH</u> (Pyrrolidin)
2.71	<i>brs</i> , 1H, Ar-CH- <u>NH</u>
2.33	<i>brs</i> , 1H, Ar-CH ₂ - <u>NH</u>
1.36	<i>s</i> , 9H, O-C-(<u>CH</u> ₃) ₃

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

δ _C (ppm) =	153.6	N- <u>C</u> OO-C
	144.7	NH-CH ₂ - <u>C</u> -CH-CH-CH
	144.3, 141.0	NH-CH- <u>C</u> -CH-CH-CH
	128.2, 128.1	NH-CH-C-CH- <u>CH</u> -CH
	128.0	NH-CH ₂ -C- <u>CH</u> -CH-CH
	127.8	NH-CH ₂ -C-CH- <u>CH</u> -CH
	127.1	NH-CH-C-CH-CH- <u>CH</u>
	126.6	NH-CH-C- <u>CH</u> -CH-CH
	126.4	NH-CH ₂ -C-CH-CH- <u>CH</u>
	78.0	O- <u>C</u> -(CH ₃) ₃
	64.4	NH- <u>CH</u> -Ar
	61.3, 60.6	<u>CH</u> (Pyrrolidin)
	59.8, 59.0	<u>CH</u> (Pyrrolidin)
	51.0	NH- <u>CH</u> ₂ -Ar
	50.34, 50.26	<u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)
	50.01, 49.95	<u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)
	28.1	O-C-(<u>CH</u> ₃) ₃

***tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-(benzhydrylamino)-4-[[3-*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxyphenyl]methylamino]pyrrolidin-1-carboxylat (**152**)**



Unter Verwendung der AAV3 wurden 0.20 g (0.54 mmol) *tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3,4-diaminopyrrolidin-1-carboxylat **91** in 10 ml MeOH mit 0.20 g Molsieb und 0.19 g 3-[*tert*-Butyl(dimethyl)silyl]oxybenzaldehyd **138** (0.82 mmol) über Nacht und anschließend mit 41 mg NaBH₄ (1.09 mmol) 2 h gerührt. Aufreinigung mittels MPLC (Cyclohexan/EtOAc 100:0 - 50:50) ergab 0.23 g (72 %) von **152** in Form eines farblosen Öls.

Ausbeute: 0.23 g (72 %) (farbloses Öl)

EA: C₃₅H₄₉N₃O₃Si (587.87 g/mol)

Ber.: C: 71.51 H: 8.40 N: 7.15

Gef.: C: 71.34 H: 8.46 N: 7.19

MS (ES+):

m/z (%) = 588 (100, [M+H]⁺), 610 (4, [M+Na]⁺), 1175 (13, [2M+H]⁺)

HRMS (EI+):

m/z berechnet für C₃₅H₄₉N₃O₃Si : 587.354321

gefunden : 587.351416

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

δ_H (ppm) = 7.39 *brd*, 4H, ³J=7.7 Hz, NH-CH-C-CH₂-CH-CH

7.27 *t*, 4H, ³J=7.8 Hz, NH-CH-C-CH-CH₂-CH

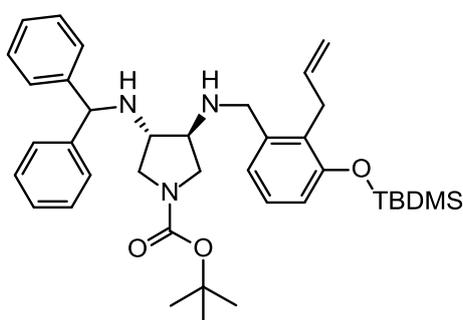
7.21-7.14	<i>m</i> , 3H, NH-CH-C-CH-CH- <u>CH</u> , O-C-CH- <u>CH</u> -CH-C-CH
6.87	<i>t</i> , 1H, $^3J=6.9$ Hz, O-C-CH- <u>CH</u> -CH-C-CH
6.82	<i>brs</i> , 1H, O-C-CH-CH-CH-C- <u>CH</u>
6.70	<i>dd</i> , 1H, $^3J=8.0$ Hz, $^4J=1.7$ Hz, O-C-CH-CH- <u>CH</u> -C-CH
4.87	<i>s</i> , 1H, Ar- <u>CH</u> -NH
3.61	<i>d</i> , 1H, $^2J=13.8$ Hz, Ar- <u>CH</u> ₂
3.56	<i>d</i> , 1H, $^2J=14.3$ Hz, Ar- <u>CH</u> ₂
3.48-3.39	<i>m</i> , 1H, <u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)
3.33	<i>dd</i> , 1H, $^2J=10.7$ Hz, $^3J=6.4$ Hz, <u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)
3.09-2.97	<i>m</i> , 2H, <u>CH</u> ₂ (Pyrrolidin)
2.97-2.83	<i>m</i> , 2H, <u>CH</u> (Pyrrolidin)
2.68	<i>brs</i> , 1H, Ar-CH-N <u>H</u>
2.36	<i>brs</i> , 1H, Ar-CH ₂ -N <u>H</u>
1.36	<i>s</i> , 9H, O-C-(<u>CH</u> ₃) ₃
0.95	<i>s</i> , 9H, Si-C-(<u>CH</u> ₃) ₃
0.18	<i>s</i> , 6H, Si-(<u>CH</u> ₃) ₂

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

δ_C (ppm) = 155.0	O- <u>C</u> -CH-CH-CH-C-CH
153.5	N- <u>C</u> OO-C
144.7	O-C-CH-CH-CH- <u>C</u> -CH
144.3, 142.8	CH- <u>C</u> -CH-CH-CH
129.0	O-C-CH- <u>CH</u> -CH-C-CH
128.14, 128.09	CH-C-CH- <u>CH</u> -CH
127.10, 127.06	O-C-CH-CH- <u>CH</u> -C-CH
126.5	CH-C-CH-CH- <u>CH</u>
120.9	CH-C- <u>CH</u> -CH-CH
119.2	O-C- <u>CH</u> -CH-CH-C-CH
117.8	O-C-CH-CH-CH-C- <u>CH</u>
77.9	O- <u>C</u> -(CH ₃) ₃
64.6, 64.5	NH- <u>CH</u> -Ar
61.3, 60.5	<u>CH</u> (Pyrrolidin)
59.8, 59.1	<u>CH</u> (Pyrrolidin)
50.8, 50.7	<u>CH</u> ₂
50.3, 50.2	<u>CH</u> ₂
50.0, 49.9	<u>CH</u> ₂

28.1	O-C-(CH ₃) ₃
25.5	Si-C-(CH ₃) ₃
17.8	Si-C-(CH ₃) ₃
-4.6	Si-(CH ₃) ₂

***tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-[[2-allyl-3-[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy-phenyl]methyl-amino]-4-(benzhydrylamino)pyrrolidin-1-carboxylat (**153**)**



Unter Verwendung der AAV3 wurden 0.20 g (0.54 mmol) *tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3,4-diaminopyrrolidin-1-carboxylat **91** in 10 ml MeOH mit 0.20 g Molsieb und 0.23 g 2-Allyl-3-[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy-benzaldehyd **139** (0.82 mmol) über Nacht und anschließend mit 41 mg NaBH₄ (1.09 mmol) 2 h gerührt. Aufreinigung mittels MPLC (Cyclohexan/EtOAc 100:0 - 60:40) ergab 0.30 g (88 %) von **153** in Form eines farblosen Öls.

Ausbeute: 0.23 g (72 %)

(farbloses Öl)

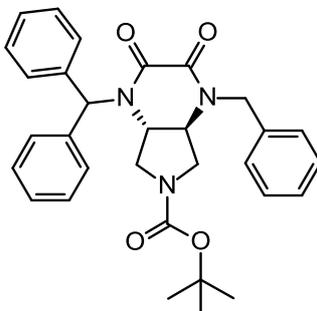
MS (ES⁺):

m/z (%) = 628 (100, [M+H]⁺), 650 (4, [M+Na]⁺)

HRMS (EI⁺):

m/z	berechnet für C ₃₈ H ₅₃ N ₃ O ₃ Si	:	627.385621
	gefunden	:	627.388165

***tert*-Butyl-(4a*S*,7a*S*)-4-benzhydryl-1-benzyl-2,3-dioxo-4a,5,7,7a-tetrahydropyrrolo[3,4-*b*]pyrazin-6-carboxylat (**154**)**



Unter Verwendung der AAV4 wurden 0.32 g (0.70 mmol) *tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-(benzhydrylamino)-4-(benzylamino)pyrrolidin-1-carboxylat **151** in 35 ml DCM mit 244 μ l + 122 μ l + 122 μ l DIPEA (2.80 mmol) und 60 μ l + 30 μ l + 30 μ l Oxalylchlorid (1.40 mmol) umgesetzt. Die Reaktion wurde nach dem Erwärmen auf Raumtemperatur abweichend von der AAV4 über Nacht gerührt. Aufreinigung mittels MPLC (Cyclohexan/EtOAc 100:0 - 0:100) ergab 0.13 g (36 %) von **154** in Form eines farblosen Feststoffs.

Ausbeute: 0.13 g (36 %)

(weißer Feststoff)

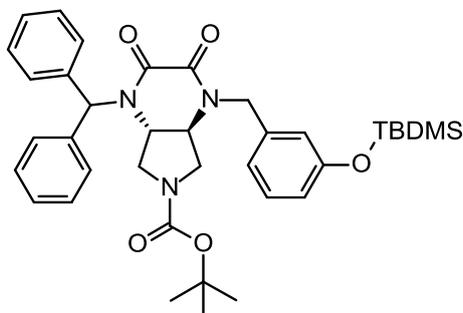
MS (ES+):

m/z (%) = 512 (3, [M+H]⁺), 529 (57, [M+NH₄]⁺), 534 (100, [M+Na]⁺)

HRMS (EI+):

m/z	berechnet für C ₃₁ H ₃₃ N ₃ O ₄	:	511.247107
	gefunden	:	511.247670

***tert*-Butyl-(4a*S*,7a*S*)-4-benzhydryl-1-benzyl-2,3-dioxo-4a,5,7,7a-tetrahydropyrrolo[3,4-*b*]pyrazin-6-carboxylat (155)**



0.20 g (0.34 mmol) *tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-(benzhydrylamino)-4-[[3-[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxyphenyl]methylamino]pyrrolidin-1-carboxylat **152** wurden in 15 ml DCM gelöst und mit 0.24 ml DIPEA (1.36 mmol) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde auf -10 °C gekühlt und bei dieser Temperatur 29 µl Oxalylchlorid (0.34 mmol) zugegeben. Es wurden weitere 5 h bei -10 °C und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Ansatz mit gesättigter Na₂CO₃ Lösung (50 ml) versetzt, mit EtOAc extrahiert (3 x 50 ml), mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen (1 x 50 ml), über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt. Aufreinigung mittels MPLC (DCM/EtOAc 95:5 - 70:30) ergab 20 mg (9 %) von **155** in Form eines farblosen Feststoffs.

Ausbeute: 20 mg (9 %)

(weißer Feststoff)

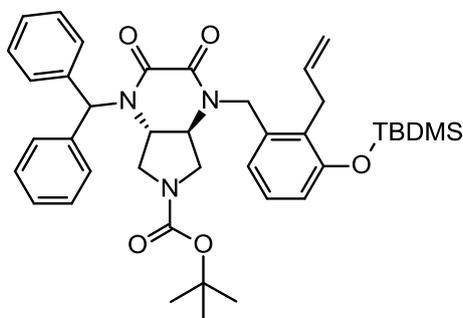
MS (ES+):

m/z (%) = 659 (83, [M+NH₄]⁺), 664 (100, [M+Na]⁺)

HRMS (EI+):

m/z	berechnet für C ₃₇ H ₄₇ N ₃ O ₅ Si	:	641.328501
	gefunden	:	641.332110

***tert*-Butyl-(4a*S*,7a*S*)-1-[[2-allyl-3-[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy-phenyl]methyl]-4-benzhydryl-2,3-dioxo-4a,5,7,7a-tetrahydropyrrolo[3,4-*b*]pyrazin-6-carboxylat
(156)**



0.26 g (0.41 mmol) *tert*-Butyl-(3*S*,4*S*)-3-[[2-allyl-3-[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy-phenyl]methylamino]-4-(benzhydrylamino)pyrrolidin-1-carboxylat **153** wurden in 15 ml DCM gelöst und mit 0.27 ml DIPEA (1.53 mmol) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde auf -10 °C gekühlt und bei dieser Temperatur 36 µl Oxalylchlorid (0.42 mmol) zugegeben. Es wurden weitere 5 h bei -10 °C und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Ansatz mit gesättigter Na₂CO₃ Lösung (50 ml) versetzt, mit EtOAc extrahiert (3 x 50 ml), mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen (1 x 50 ml), über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt. Aufreinigung mittels MPLC (DCM/EtOAc 97:3 - 90:10) ergab 51 mg (18 %) von **156** in Form eines farblosen Feststoffs.

Ausbeute: 51 mg (18 %)

(farbloser Feststoff)

MS (ES⁺):

m/z (%) = 682 (8, [M+H]⁺), 704 (100, [M+Na]⁺), 1385 (13, [2M+Na]⁺)

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Bedeutung
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
ART	Antiretrovirale Therapie
Ag	Abgangsgruppe
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Boc ₂ O	Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat
C	Celsius
CYP	Cytochrom P
DBU	Diazabicykloundekan
DCM	Dichlormethan
DEAD	Diethylazodicarboxylat
DIAD	Diisopropylazodicarboxylat
DIPEA	Diisopropylethylamin oder Hünig-Base
DMAP	Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMPU	Dimethylpropylenharnstoff
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPPA	Diphenylphosphorylazid
DTD	Dithiandiol
EA	Elementaranalyse
EI	electron impact
ES	Elektrospray-Ionisation
ESI	Elektrospray-Ionisation
EtOAc	Ethylacetat
Et ₂ O	Diethylether
FC	Flüssigkeits-Säulen-Chromatographie
FDA	Food and Drug Administration
g	gramm
Δg	Ligandeneffizienz
ΔG	Freie Bindungsenergie

h	Stunde
HAART	Hochaktive antiretrovirale Therapie
HIV	Humane Immundefizienz-Virus
HR-MS	Hochauflösende Massenspektrometrie
Hz	Hertz
Inh.	Inhibition
IUPAC	The International Union of Pure and Applied Chemistry
K_i	Inhibitionskonstante
K_M	Gleichgewichtskonstante
l	Liter
LE	Ligandeneffizienz
m	Masse
M	Molar [mol/l]
m/z	Masse-Ladungsverhältnis
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol	Millimol
MPLC	Mitteldruck-Flüssigkeits-Chromatographie
MS	Massenspektrometrie
Ms	Mesyl
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether
MW	Molekulargewicht
n	Nano
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (von engl. <i>nuclear magnetic resonance</i>)
NNRTIs	Nicht-Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren
NRTIs	Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren
Nu	Nukleophil
PDB	Protein Data Bank
Ph	Phenyl
Py	Pyridin

R	Allgemeine Gaskonstante
r	Radius
rac	razemisch
RFU	Relative Fluoreszenzeinheit
RNA	Ribonukleinsäure
SAR	Struktur-Aktivitäts-Beziehung
T	Temperatur
TBAF	<i>Tetra-n</i> -butylammoniumfluorid
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilylether
TBDMSCl	<i>tert</i> -Butyldimethylsilylchlorid
TBME	<i>tert</i> -Butylmethylether
TEA	Tetraethylammonium
Tf ₂ O	Trifluormethansulfonsäureanhydrid
THF	Tetrahydrofuran
TPP	Triphenylphosphin
UV	Ultraviolett
wt%	Gewichtsprozent
z	Ladungszahl
δ	Chemische Verschiebung
λ	Wellenlänge
μ	micro

9 LITERATURVERZEICHNIS

1. Klebe, G., *Recent developments in structure-based drug design*. Journal of Molecular Medicine, 2000. **78**(5): p. 269-281.
2. *Protein Data Bank*. Available from: www.pdb.org.
3. *UNAIDS REPORT ON THE GLOBAL AIDS EPIDEMIC 2010*. Available from: www.unaids.org
4. *World AIDS Day Report*. 2011. Available from: www.unaids.org
5. *GLOBAL HIV/AIDS RESPONSE – Epidemic update and health sector progress towards Universal Access – Progress Report*. 2011. Available from: www.unaids.org
6. Weiss, R.A., *Gulliver's travels in HIVland*. Nature, 2001. **410**(6831): p. 963-967.
7. Christian Hoffmann, J.K.R., *HIV 2012*. HIV Buch, 2012.
8. Ho, D.D. and P.D. Bieniasz, *HIV-1 at 25*. Cell, 2008. **133**(4): p. 561-565.
9. Rockstroh, J.K., *Epidemiologie und Transmission der HIV-Infektion*. Pharmazie in unserer Zeit, 1999. **28**(2): p. 95-101.
10. Hightower, M. and E.G. Kallas, *Diagnosis, antiretroviral therapy, and emergence of resistance to antiretroviral agents in HIV-2 infection: a review*. Brazilian Journal of Infectious Diseases, 2003. **7**: p. 07-15.
11. Esté, J.A. and T. Cihlar, *Current status and challenges of antiretroviral research and therapy*. Antiviral Research, 2010. **85**(1): p. 25-33.
12. Virgin, H.W. and B.D. Walker, *Immunology and the elusive AIDS vaccine*. Nature, 2010. **464**(7286): p. 224-231.
13. Fanales-Belasio, E., et al., *HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview*. Annali dell'Istituto Superiore di Sanità, 2010. **46**: p. 5-14.
14. Adamson, C.S. and E.O. Freed, *Novel approaches to inhibiting HIV-1 replication*. Antiviral Research, 2010. **85**(1): p. 119-141.
15. *U.S. Food and Drug Administration*. Available from: <http://www.fda.gov/>.
16. Broder, S., *The development of antiretroviral therapy and its impact on the HIV-1/AIDS pandemic*. Antiviral Research, 2010. **85**(1): p. 1-18.
17. *Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents*. 2012. Available from: <http://aidsinfo.nih.gov/guidelines>
18. WHO. *Antiretroviral Therapy*. Available from: http://www.who.int/topics/antiretroviral_therapy/en/.
19. Mehellou, Y. and E. De Clercq, *Twenty-Six Years of Anti-HIV Drug Discovery: Where Do We Stand and Where Do We Go?* Journal of Medicinal Chemistry, 2009. **53**(2): p. 521-538.
20. *Arzneimittelinformationen für Ärzte und Apotheker*. Available from: www.fachinfo.de.
21. Sun, L.-Q., et al., *Optimization of 2,4-diarylanilines as non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2012. **22**(7): p. 2376-2379.
22. Navia, M.A.F., P. M. D.; McKeever, B. M.; Leu, J.C.H. C.-T.; Heimbach, W. K.; Sigal, I. S.; Drake, P., and J.P. L.; Springer, *Three-dimensional structure of aspartyl protease from human immunodeficiency virus HIV-1* Nature, 1989. **337**: p. 6.
23. *HIV-1 Protease A Target for AIDS Therapy*. 2000. Available from: www.pdb.org

24. Mager, P.P., *The active site of HIV-1 protease*. Medicinal Research Reviews, 2001. **21**(4): p. 348-353.
25. Dunn, B.M., *HIV Protease*, in *Encyclopedia of Biological Chemistry*, J.L. Editors-in-Chief: William and M.D. Lane, Editors. 2004, Elsevier: New York. p. 384-387.
26. Castro, H.C., et al., *Looking at the proteases from a simple perspective*. Journal of Molecular Recognition, 2011. **24**(2): p. 165-181.
27. Kovalevsky, A.Y., et al., *Caught in the Act: The 1.5 Å Resolution Crystal Structures of the HIV-1 Protease and the I54V Mutant Reveal a Tetrahedral Reaction Intermediate*. Biochemistry, 2007. **46**(51): p. 14854-14864.
28. DEBOUCK, C., *The HIV-1 Protease as a Therapeutic Target for AIDS*. AIDS Research and Human Retroviruses, 1992. **8**(2).
29. Pokorná, J.M., L.; Řezáčová, P.; Konvalinka, J., *Current and Novel Inhibitors of HIV Protease*. Viruses, 2009. **1**(3).
30. D'Aquila, R.T.S., J. M.; Brun-Vézinet, F.; Clotet, B.; Conway, B.; Demeter, L. M.; Grant, R. M.; Johnson, V. A.; Kuritzkes, D. R.; Loveday, C.; Shafer, R. W.; Richman, D. D., *Drug Resistance Mutations in HIV-1*. Top. HIV Med, 2002. **10**(5): p. 21-25.
31. *The Public Health Agency of Canada, HIV/AIDS Epi Updates - July 2010*. Available from: <http://www.phac-aspc.gc.ca/aids-sida/publication/epi/2010/12-eng.php>.
32. *HIV&Virology News 2*. 2012; Available from: www.hivvirology.com.
33. *Neue antiretrovirale Substanzen*. Available from: www.hivinfo.de.
34. Lam, P., et al., *Rational design of potent, bioavailable, nonpeptide cyclic ureas as HIV protease inhibitors*. Science, 1994. **263**(5145): p. 380-384.
35. De Lucca, G.V., et al., *Nonsymmetric P2/P2' Cyclic Urea HIV Protease Inhibitors. Structure-Activity Relationship, Bioavailability, and Resistance Profile of Monoindazole-Substituted P2 Analogues*. Journal of Medicinal Chemistry, 1998. **41**(13): p. 2411-2423.
36. Richter, M., et al., *P-Glycoprotein Effects of Cyclic Urea HIV Protease Inhibitor DMP 323 in Competitional Absorption Studies*. Archiv der Pharmazie, 2006. **339**(11): p. 625-628.
37. Rajapakse, H.A., et al., *Strategies towards Improving the Pharmacokinetic Profile of ε-Substituted Lysinol-Derived HIV Protease Inhibitors*. ChemMedChem, 2011. **6**(2): p. 253-257.
38. Dandache, S., et al., *PL-100, a novel HIV-1 protease inhibitor displaying a high genetic barrier to resistance: An in vitro selection study*. Journal of Medical Virology, 2008. **80**(12): p. 2053-2063.
39. B.L.E.C. [BE] and K.G. [BE], *TREATMENT AND PREVENTION OF HIV INFECTION*, T.P.L. WO/2011/036159, 2011.
40. Lalezari, J.P., et al., *Preliminary safety and efficacy data of brexanavir, a novel HIV-1 protease inhibitor: 24 week data from study HPR10006*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2007. **60**(1): p. 170-174.
41. Callebaut, C., et al., *In Vitro Characterization of GS-8374, a Novel Phosphonate-Containing Inhibitor of HIV-1 Protease with a Favorable Resistance Profile*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2011. **55**(4): p. 1366-1376.
42. Maksimovic-Ivanic, D., et al., *The antitumor properties of a nontoxic, nitric oxide-modified version of saquinavir are independent of Akt*. Molecular Cancer Therapeutics, 2009. **8**(5): p. 1169-1178.

43. Canducci, F., et al., *The new and less toxic protease inhibitor saquinavir–NO maintains anti-HIV-1 properties in vitro indistinguishable from those of the parental compound saquinavir*. *Antiviral Research*, 2011. **91**(3): p. 292-295.
44. GlaxoSmithKline. Available from: <http://www.gsk.com/>
45. Concert Pharmaceuticals, Inc. Available from: <http://www.concertpharma.com/>
46. Dierynck, I., et al., *TMC310911, a Novel Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease Inhibitor, Shows In Vitro an Improved Resistance Profile and Higher Genetic Barrier to Resistance Compared with Current Protease Inhibitors*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2011. **55**(12): p. 5723-5731.
47. Böttcher, J., et al., *Targeting the Open-Flap Conformation of HIV-1 Protease with Pyrrolidine-Based Inhibitors*. *ChemMedChem*, 2008. **3**(9): p. 1337-1344.
48. 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**(10): p. 1397-1402.
49. John, V., et al., *Human β -Secretase (BACE) and BACE Inhibitors*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2003. **46**(22): p. 4625-4630.
50. 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*, 2005. **44**(20): p. 3140-3144.
51. 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**(1): p. 106-117.
52. Blum, A., *Strukturbasiertes Design und Synthese von Pyrrolidinen als Inhibitoren der HIV-1-Protease*. Dissertation, Philipps-Universität Marburg, 2007.
53. Blum, A., et al., *Structure-Guided Design of C2-Symmetric HIV-1 Protease Inhibitors Based on a Pyrrolidine Scaffold*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2008. **51**(7): p. 2078-2087.
54. Böttcher, J., et al., *Structural and Kinetic Analysis of Pyrrolidine-Based Inhibitors of the Drug-Resistant Ile84Val Mutant of HIV-1 Protease*. *Journal of Molecular Biology*, 2008. **383**(2): p. 347-357.
55. Hopkins, A.L., C.R. Groom, and A. Alex, *Ligand efficiency: a useful metric for lead selection*. *Drug Discovery Today*, 2004. **9**(10): p. 430-431.
56. Klebe, G., *Wirkstoffdesign 2009*: Spektrum.
57. Bagossi, P., et al., *Development of a microtiter plate fluorescent assay for inhibition studies on the HTLV-1 and HIV-1 proteinases*. *Journal of Virological Methods*, 2004. **119**(2): p. 87-93.
58. Blum, A., et al., *Two Solutions for the Same Problem: Multiple Binding Modes of Pyrrolidine-Based HIV-1 Protease Inhibitors*. *Journal of Molecular Biology*, 2011. **410**(4): p. 745-755.
59. Kramer, B., M. Rarey, and T. Lengauer, *Evaluation of the FLEXX incremental construction algorithm for protein–ligand docking*. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 1999. **37**(2): p. 228-241.
60. Jones, G., et al., *Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking*. *Journal of Molecular Biology*, 1997. **267**(3): p. 727-748.
61. Dunitz, J.D. and R. Taylor, *Organic Fluorine Hardly Ever Accepts Hydrogen Bonds*. *Chemistry – A European Journal*, 1997. **3**(1): p. 89-98.
62. Bräse, S., et al., *Organic Azides: An Exploding Diversity of a Unique Class of Compounds*. *Angewandte Chemie International Edition*, 2005. **44**(33): p. 5188-5240.
63. Chau, C.-M. and K.-M. Liu, *Diels-Alder reactions of three fused nitrogen-containing bicyclic enones: an efficient method toward novel nitrogen-containing*

- angular tricyclic skeletons*. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2008. **6**(17): p. 3127-3134.
64. Swamy, K.C.K., et al., *Mitsunobu and Related Reactions: Advances and Applications*. *Chemical Reviews*, 2009. **109**(6): p. 2551-2651.
65. Kim, A. and J.H. Hong, *Synthesis and Antiviral Evaluation of Novel Exomethylene Acyclic Nucleosides and Phosphonic Acid Nucleosides*. *Archiv der Pharmazie*, 2005. **338**(11): p. 528-533.
66. Gololobov, Y.G., I.N. Zhmurova, and L.F. Kasukhin, *Sixty years of staudinger reaction*. *Tetrahedron*, 1981. **37**(3): p. 437-472.
67. Demko, Z.P. and K.B. Sharpless, *An Intramolecular [2 + 3] Cycloaddition Route to Fused 5-Heterosubstituted Tetrazoles*. *Organic Letters*, 2001. **3**(25): p. 4091-4094.
68. Varala, R., S. Nuvula, and S.R. Adapa, *Molecular Iodine-Catalyzed Facile Procedure for N-Boc Protection of Amines*. *The Journal of Organic Chemistry*, 2006. **71**(21): p. 8283-8286.
69. Pantoliano, M.W., et al., *High-Density Miniaturized Thermal Shift Assays as a General Strategy for Drug Discovery*. *Journal of Biomolecular Screening*, 2001. **6**(6): p. 429-440.
70. Lindemann, I., *Strukturbasiertes Wirkstoffdesign am Beispiel der Zielproteine HIV-1 Protease, Transglutaminase 2 und Faktor XIII*. Dissertation, Philipps-Universität Marburg, 2011.
71. Stieler, M., *Strukturbasiertes Wirkstoffdesign am Beispiel von N-heterozyklischen HIV-1 Protease-Inhibitoren*. Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg, 2011.
72. Du, Z., et al., *pKa Coupling at the Intein Active Site: Implications for the Coordination Mechanism of Protein Splicing with a Conserved Aspartate*. *Journal of the American Chemical Society*, 2011. **133**(26): p. 10275-10282.
73. Linde, K., *Design und Synthese neuartiger Grundstrukturen zur Inhibition von Aspartat-Proteasen der Familien A1 und A2*. Dissertation, Philipps-Universität Marburg, 2012.
74. Johnson, J.A.B., D. C. , *In Espacenet 2009*: GB.
75. Davies, S.G., et al., *Asymmetric synthesis of 3,4-anti- and 3,4-syn-substituted aminopyrrolidines via lithium amide conjugate addition*. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2007. **5**(12): p. 1961-1969.
76. Blum, A., et al., *Achiral oligoamines as versatile tool for the development of aspartic protease inhibitors*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2008. **16**(18): p. 8574-8586.
77. Simona Koščová, M.B., Jana Hodačová, *A Facile Synthesis of Selectively Protected Linear Oligoamines*. *Collect. Czech. Chem. Commun.* , 2003. **68**: p. 7.
78. 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**(21): p. 6607-6619.
79. Spitzmüller, A., H.F.G. Velec, and G. Klebe, *MiniMuDS: A New Optimizer using Knowledge-Based Potentials Improves Scoring of Docking Solutions*. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2011. **51**(6): p. 1423-1430.
80. Neudert, G. and G. Klebe, *DSX: A Knowledge-Based Scoring Function for the Assessment of Protein-Ligand Complexes*. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2011. **51**(10): p. 2731-2745.
81. Neudert, G. and G. Klebe, *fconv: format conversion, manipulation and feature computation of molecular data*. *Bioinformatics*, 2011. **27**(7): p. 1021-1022.

82. Ala, P.J., et al., *Molecular Recognition of Cyclic Urea HIV-1 Protease Inhibitors*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(20): p. 12325-12331.
83. Koike, R., et al., *Unprecedented chemiluminescence behaviour during peroxyoxalate chemiluminescence of oxalates with fluorescent or electron-donating aryloxy groups*. Luminescence, 2006. **21**(3): p. 164-173.
84. Izdebski, J. and D. Pawlak, *A New Convenient Method for the Synthesis of Symmetrical and Unsymmetrical N,N'-Disubstituted Ureas*. Synthesis, 1989. **1989**(06): p. 423-425.
85. Jacobsen, E.J., et al., *3-Phenyl-Substituted Imidazo[1,5-a]quinoxalin-4-ones and Imidazo[1,5-a]quinoxaline Ureas That Have High Affinity at the GABAA/Benzodiazepine Receptor Complex*. Journal of Medicinal Chemistry, 1996. **39**(19): p. 3820-3836.
86. Bernard Loev, J.H.M., Richard E. Brown, Howard Jones, Robert Kahen, Fu-Chih Huang, and P.S.-G. Atul Khandwala, and Mitchell J. Leibowitd, *1,2,4-Triazolo[4,3-a]quinoxaline-1,4-diones as Antiallergic Agents*. J. Med. Chem., 1985. **28**: p. 4.
87. Group, C.C. *Molecular Operating Environment*. Available from: <http://www.chemcomp.com/software.htm>.
88. Vargas, R., et al., *How Strong Is the Ca-H...OC Hydrogen Bond?* Journal of the American Chemical Society, 2000. **122**(19): p. 4750-4755.
89. Hilderbrand, S.A., M.H. Lim, and S.J. Lippard, *Fluorescence-based Nitric Oxide Detection Topics in Fluorescence Spectroscopy*, C.D. Geddes and J.R. Lakowicz, Editors. 2005, Springer US. p. 163-188.
90. Bermejo, M., et al., *PAMPA—a drug absorption in vitro model: 7. Comparing rat in situ, Caco-2, and PAMPA permeability of fluoroquinolones*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2004. **21**(4): p. 429-441.
91. Kell, D.B., P.D. Dobson, and S.G. Oliver, *Pharmaceutical drug transport: the issues and the implications that it is essentially carrier-mediated only*. Drug Discovery Today, 2011. **16**(15–16): p. 704-714.
92. Dell'Amico, D.B., F. Calderazzo, and U. Giurlani, *Metal-assisted electrophilic reactions on carbon dioxide: synthesis of mixed carboxylato-carbamato anhydrides*. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, 1986(13): p. 1000-1001.
93. Murphy, M.D., G.I. Marousek, and S. Chou, *HIV protease mutations associated with amprenavir resistance during salvage therapy: importance of I54M*. Journal of Clinical Virology, 2004. **30**(1): p. 62-67.
94. Liu, F., et al., *Effect of Flap Mutations on Structure of HIV-1 Protease and Inhibition by Saquinavir and Darunavir*. Journal of Molecular Biology, 2008. **381**(1): p. 102-115.
95. Scott, D.E., et al., *Fragment-Based Approaches in Drug Discovery and Chemical Biology*. Biochemistry, 2012. **51**(25): p. 4990-5003.
96. Perryman, A.L., et al., *Fragment-Based Screen against HIV Protease*. Chemical Biology & Drug Design, 2010. **75**(3): p. 257-268.
97. Köster, H., et al., *A Small Nonrule of 3 Compatible Fragment Library Provides High Hit Rate of Endothiapepsin Crystal Structures with Various Fragment Chemotypes*. Journal of Medicinal Chemistry, 2011. **54**(22): p. 7784-7796.
98. GRID. Available from: http://www.moldiscovery.com/soft_grid.php.
99. Thaisrivongs, S., et al., *Structure-Based Design of Novel HIV Protease Inhibitors: Carboxamide-Containing 4-Hydroxycoumarins and 4-Hydroxy-2-pyrones as Potent Nonpeptidic Inhibitors*. Journal of Medicinal Chemistry, 1995. **38**(18): p. 3624-3637.

100. *nmrshiftdb2*. Available from: <http://nmrshiftdb.nmr.uni-koeln.de/>
101. Banfi, D. and L. Patiny, *www.nmrdb.org: Resurrecting and Processing NMR Spectra On-line*. CHIMIA International Journal for Chemistry, 2008. **62**(4): p. 280-281.
102. Williams, D.B.G. and M. Lawton, *Drying of Organic Solvents: Quantitative Evaluation of the Efficiency of Several Desiccants*. The Journal of Organic Chemistry, 2010. **75**(24): p. 8351-8354.
103. Toth, M.V. and G.R. Marshall, *A simple, continuous fluorometric assay for HIV protease*. International Journal of Peptide and Protein Research, 1990. **36**(6): p. 544-550.
104. Yung-Chi, C. and W.H. Prusoff, *Relationship between the inhibition constant (KI) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction*. Biochemical Pharmacology, 1973. **22**(23): p. 3099-3108.
105. Lineweaver, H. and D. Burk, *The Determination of Enzyme Dissociation Constants*. Journal of the American Chemical Society, 1934. **56**(3): p. 658-666.
106. Buchwald, S.L. and R.B. Nielsen, *Kinetics and substituent effects in the formation of zirconocene thioaldehyde complexes: .beta.-hydride elimination versus cyclometalation*. Journal of the American Chemical Society, 1988. **110**(10): p. 3171-3175.
107. Faler, C.A. and M.M. Joullié, *The Kulinkovich Reaction in the Synthesis of Constrained N,N-Dialkyl Neurotransmitter Analogues*. Organic Letters, 2007. **9**(10): p. 1987-1990.

10 ANHANG

10.1 Erklärung

Ich versichere, daß ich meine Dissertation

„Strukturbasiertes Design, Synthese und Affinitätsbestimmung neuartiger HIV-1-Protease-Inhibitoren“

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 29.11.2012

Nina Klee

10.2 Danksagung

Mein größter Dank richtet sich an meine Doktormutter Prof. Dr. Wibke E. Diederich, die mich seit dem Beginn meines Hauptstudiums sowohl fachlich als auch persönlich inspiriert hat. Während meiner Zeit als Doktorandin in ihrem Arbeitskreis, unterstützte sie mich durch eine exzellente Betreuung und viele fachliche Anregungen, wobei Sie mir genügend Freiraum für eigene Ideen ließ. Weiterhin möchte ich ihr für das ausgezeichnete persönliche Verhältnis, den hohen Einsatz besonders bei der Fertigstellung dieser Arbeit und nicht zuletzt für das spannende Forschungsprojekt danken.

Herrn Prof. Dr. Gerhard Klebe möchte ich besonders für die Unterstützung während der Vorbereitung meines Forschungsaufenthalts an der University of Dundee und für seinen Rat zur beruflichen Entscheidungsfindung danken. Weiterhin danke ich ihm für die Möglichkeit zur Durchführung der Enzymassays und der Dockingexperimente, die zahlreichen fachlichen Anregungen sowie für die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit und für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Dr. Andreas Blum, Dr. Nan-Si Brass und Dr. Sascha Brass danke ich für die interessanten Einblicke und Aufgaben während meiner Vertiefungspraktika, welche mich gut auf die Promotion vorbereitet haben.

Meinen Kooperationspartnern Dr. Holger Steuber, Martin Stieler und Ina Lindemann danke ich für ihren Einsatz bei der Kristallisation und Strukturaufklärung.

Dr. Holger Steuber und Dr. Andreas Heine möchte ich für ihren Rat zur Auswertung der gewonnenen Strukturen danken.

Steffi Dörr danke ich für die Proteinexpression, die Synthese von Startstufen und ihre Unterstützung bei der Messung der Enzymaffinität.

Abbas Raza danke ich für die Vermessung ausgewählter Verbindungen im Zellassay.

Kornelia Harges möchte ich für die Synthese eines Peptids danken, welches leider nicht in diese Arbeit aufgenommen werden konnte.

Michael Betz, Felix Gut, Dr. Tobias Craan, Sven Siebler, Timo Krotzky, Dr. Andreas Spitzmüller, Dr. Gerd Neudert und Felix Terwesten danke ich für ihre Hilfe bei Fragen zum Computer-gestütztem Wirkstoffdesign sowie für die Netzwerkadministration. Mein besonderer Dank gilt Michael Betz für seinen Einsatz beim Software-Troubleshooting während dieser Arbeit, bis hin zu ihrer endgültigen Fertigstellung.

Den Mitarbeitern der Analytik-Abteilungen und allen weiteren Service-Einrichtungen danke ich dafür, dass sie mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Lydia Hartleben möchte ich für die Unterstützung bei allen administrativen Angelegenheiten danken.

Für das genaue und kritische Korrekturlesen dieser Arbeit danke ich Dr. Christof Wegscheid-Gerlach, Sascha Klee, Frithjof Scheer, Dr. Nan-Si Brass, Maren Kuhnert, Fabian Ehlert, Michael Betz und Timo Krotzky.

Der Studienstiftung des deutschen Volkes danke ich für die finanzielle und die exzellente ideelle Förderung.

Meinen Kolleginnen und Kollegen im AK Diederich, auch den Ehemaligen, Steffi Dörr, Dr. Nan-Si Brass, Dr. Kerstin Linde, Zeynel Can, Philipp Toth, Frithjof Scheer, Maren Kuhnert, Michael Schäfer, Fabian Ehlert und Manuel Kanitz danke ich für die ausgelassene und freundschaftliche Atmosphäre und die kreativen fachlichen und außerfachlichen Diskussionen.

Hans-Dieter Gerber danke ich für seinen fachlichen Rat und die vielen interessanten Gespräche auf dem Weg zur Mensa.

Reiner Müller möchte ich für die Unterstützung beim Upscaling und seine Hilfe bei allen praktischen Fragen zur Labortätigkeit danken.

Meinen Kolleginnen Maren Kuhnert und Rixa Kraut danke ich für die aktiven Pausen während der Promotion.

Meinem Mann Sascha Klee möchte für seine unendliche Geduld sowie für seine einzigartigen Aufmunterungsmethoden in schwierigen Phasen der Promotion danken und dafür, dass er mich während der Fertigstellung dieser Arbeit stets unterstützt und mir den Rücken frei gehalten hat.

Meinen Eltern Heidi Klee und Johannes Demmler möchte ich für ihre große und bedingungslose Unterstützung vor allem während der Schulzeit und des Studiums danken. Sie haben diese Arbeit erst möglich gemacht.

10.3 Lebenslauf

Persönliche Informationen

Name: Nina Julienne Silvana Klee Geburtsdatum: 26.04.1984
Geburtsort: Marburg Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung

Feb. 2009 **Erteilung der Approbation als Apothekerin**

seit **Doktorandin**
Dez. 2008 Philipps-Universität Marburg, Prof. Dr. W. Diederich
Strukturbasiertes Design, Synthese und Affinitätsbestimmung neuartiger HIV-1-
Protease-Inhibitoren
Promotionsstipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes Juli 2009 -
März 2012

Mai 2008 - **Pharmazeutin im Praktikum**
Nov. 2008 University of Dundee, Schottland, Prof. Dr. I. Gilbert
Design und Synthese von möglichen Arzneistoffen gegen Trypanosomale
Erkrankungen
Auslandsstipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes

Nov. 2007 - **Pharmazeutin im Praktikum**
Apr. 2008 Metropolitan Pharmacy Apotheke, Flughafen Frankfurt am Main

Okt. 2003 - **Studium der Pharmazie**
Okt. 2007 Philipps-Universität Marburg
Studienförderung der Studienstiftung des deutschen Volkes Juni 2006 - Okt.
2007

Jun. 2003 **Allgemeine Hochschulreife**
Landschulheim Steinmühle, Marburg

Tagungen, Poster und Vorträge

März 2011 **Frontiers in Medicinal Chemistry, Universität des Saarlandes**

Dez. 2010 **Doktorandenforum der Studienstiftung des deutschen Volkes, Köln**
Vortrag „HIV: Impfprophylaxe weiterhin nicht möglich – Forschung an virus-
hemmenden Mitteln bleibt notwendig“

Sep. 2010 **Summerschool of Medicinal Chemistry, Universität Regensburg**
N. Klee, I. Lindemann, G. Klebe, W. E. Diederich, Pyrrolidin based bicycles: A

promising new scaffold for HIV Protease Inhibitors. (Poster, ausgezeichnet mit einem Posterpreis)

- März 2010 **GDCh Fachgruppentagung "Frontiers in Medicinal Chemistry", Universität Münster**
N. Klee, K. Linde, I. Lindemann, G. Klebe, W. E. Diederich, New Inhibitors for an Old Target: Piperidines and Pyrrolidines to Block HIV Protease. (Poster)
- Nov. 2009 **Doktorandenforum der Studienstiftung des deutschen Volkes, Koppelsberg**
Vortrag „Wege zu neu neuartigen HIV-Protease Inhibitoren“
- Okt. 2009 **2. Internationales Symposium „Novel Agents against Infectious Diseases – An Interdisciplinary Approach“, Universität Würzburg**

Publikationen

N. Klee, P. E. Wong, B. Baragana, F. El Mazouni, M. A. Phillips, M. P. Barrett, I. H. Gilbert
Selective delivery of 2-hydroxy APA to Trypanosoma brucei using the melamine motif.
Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters (2010), 20(15), 4364-4366

T. Luksch, A. Blum, N. Klee, W. E. Diederich, C. A. Sotriffer, G. Klebe
Pyrrolidine Derivatives as Plasmepsin Inhibitors: Binding Mode Analysis Assisted by
Molecular Dynamics Simulations of a Highly Flexible Protein.
CHEMMEDCHEM (2010), 5, 443-454