

DESIGN, SYNTHESE UND ANALYSE VON
LIGANDEN ALS INHIBITOREN DES
HÄMAGGLUTININS DES AVIÄREN
INFLUENZA VIRUS H5N1

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
des Department Chemie der Universität Hamburg

vorgelegt von

Martin Hollinger

aus Güstrow



1. Gutachter: Prof. Dr. Bernd Meyer

2. Gutachter: Prof. Dr. Joachim Thiem

Datum der Disputation: 22.05.2009

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2005 bis März 2009 am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg, Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. Bernd Meyer, durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Bernd Meyer danke ich für die Überlassung des Themas sowie für die stets freundliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

*Glaube denen, die die Wahrheit suchen und
zweifle an denen, die sie gefunden haben.*

André Gide (1869-1951)
französischer Schriftsteller und Nobelpreisträger

1	<i>Einleitung</i>	1
1.1	Arzneimittelforschung	1
1.2	Protein-Ligand-Wechselwirkungen	3
1.2.1	Die Stärke von Protein-Ligand-Wechselwirkungen	3
1.2.2	Typen von Protein-Ligand-Wechselwirkungen	4
1.2.3	Entropische Faktoren der Protein-Ligand-Wechselwirkung	5
1.3	Influenza	5
1.3.1	Aufbau und Replikationszyklus des Influenza-Virus	6
1.3.2	Das Hämagglutinin	8
1.4	Das aviäre Influenza-Virus H5N1	9
1.4.1	Pathogenität und Spezifität des Hämagglutinins H5	9
1.4.2	Röntgenstrukturen des Hämagglutinins H5	10
1.5	Medikamente gegen Influenza	11
1.5.1	Inhibitoren des Hämagglutinins	12
2	<i>Methoden</i>	13
2.1	Molecular Modeling	13
2.2	Oberflächen-Plasmonen-Resonanz Studien (SPR)	13
2.3	Saturation Transfer Difference (STD) NMR-Spektroskopie	16
3	<i>Aufgabenstellung</i>	18
4	<i>Ergebnisse und Diskussion</i>	19
4.1	Wahl und Diskussion der Röntgenstruktur	19
4.1.1	Vorbereitung der Röntgenstruktur für das docking	20
4.2	Überprüfung des SPR-Systems für das H5 Protein	21
4.2.1	Überprüfung des SPR-Systems an bekannten Sialinsäureanaloga	22
4.3	Etablierung der STD-NMR-Methode für das H5-Protein	25
4.3.1	Optimierung der Sättigung des H5-Proteins	26
4.3.2	Überprüfung der STD-NMR Methode an Neu5Ac α 2Me 5	27
4.4	Modifikationen an der Sialinsäure	29
4.4.1	Diskussion der Rezeptorbindungsdomäne	29
4.4.2	Überprüfung seitenkettenverkürzter Sialinsäurederivate	31
4.4.3	Amino- und Amido-Konjugate der trunkierten Sialinsäure	34
4.4.4	Übersicht der an der Sialinsäure modifizierten Liganden	52

Inhaltsverzeichnis

4.5	Modifikationen am Aglycon	53
4.5.1	Entwicklung von am Aglycon modifizierten Sialinsäureglycoside	53
4.5.2	Entwicklung von am Aglycon peptidisch modifizierter Sialinsäureglycoside (I)	67
4.5.3	Entwicklung von am Aglycon peptidisch modifizierter Sialinsäureglycoside (II)	80
4.5.4	Übersicht zu den Aglycon-Modifizierungen	86
4.6	Vergleich der Ergebnisse des dockings mit den SPR-Studien	87
5	Zusammenfassung	88
6	Summary	91
7	Experimenteller Teil	94
7.1	Geräte und Methoden	94
7.2	Chemikalien	95
7.3	Molecular modeling	98
7.4	SPR-Experimente	99
7.5	STD-Experimente	100
7.6	Synthese und Charakterisierung	102
7.6.1	Allgemeine Arbeitsvorschriften	102
7.6.2	Synthesevorschriften und Charakterisierung	105
8	Literaturverzeichnis	153
9	Toxikologische Daten	159
10	Danksagung	161
11	Lebenslauf	162

Abkürzungsverzeichnis

1D	eindimensional
2D	zweidimensional
abs.	absolut
AcOH	Essigsäure
Ar	Aromat
Bn	Benzyl
BnBr	Benzylbromid
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DHB	2,5-Dihydroxy-benzoesäure
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxy ribonucleic acid</i>
eq	Äquivalent
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid hydrochlorid
EE	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
FID	<i>free induction decay</i>
Fmoc	Fluoren-9-ylmethyloxycarbonyl
HA	Hämagglutinin
H3	Hämagglutinin (Subtyp 3) des Influenza A-Virus
H5	Hämagglutinin (Subtyp 5) des Influenza A-Virus
HFIP	1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol

Abkürzungsverzeichnis

HPAI	<i>highly pathogenic influenza virus</i>
HBS-P	<i>HEPES buffered saline containing surfactant P20</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HSQC	<i>hetero single quantum coherence</i>
K _D	Gleichgewichtskonstante der Dissoziation
LPAI	<i>low pathogenic influenza virus</i>
M1	Matrixprotein 1
M2	Matrixprotein 2
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption ionization – time of flight</i>
MeCN	Acetonitril
MG	Molekulargewicht
MS	Massenspektrometrie
NASE	Neuraminidase
NAA	Naphtylacetamid
NES	Naphtylessigsäure
Neu5Ac	Sialinsäure (<i>N</i> -Acetylneuraminsäure)
Neu5Ac α 2Me	α 2- <i>O</i> -Methylglycosid der Sialinsäure
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NOES	Naphtyloxyessigsäure
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NOA	Naphtyloxyacetamid
NP	Nukleoprotein
PDB	<i>protein databank</i>
PE	Petrolether
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RP-HPLC	<i>reversed phase high performance liquid chromatography</i>

Abkürzungsverzeichnis

Rf	Rückfluss
R _f	<i>retention factor</i>
RT	Raumtemperatur
R _t	<i>retention time</i>
RU	<i>response units</i>
SPR	<i>surface plasmon resonance</i>
ssRNA	<i>single strand ribonucleic acid</i>
STD	<i>saturation transfer difference</i>
STD _{AMP}	STD-Amplifikationsfaktor
TBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium tetrafluoroborat
<i>t</i> -Bu	<i>tert</i> -Butyl
TCM	Trichlormethan
TFA	<i>trifluoro acetic acid</i>
TFE	Trifluorethanol
THF	Tetrahydrofuran

Verzeichnis in dieser Arbeit erwähnter Aminosäuren

Aminosäuren	Abkürzung	Code-Buchstabe
Alanin	Ala	A
Asparaginsäure	Asp	D
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

1 Einleitung

1.1 *Arzneimittelforschung*

Die gezielte Entwicklung von Arzneimitteln ist ein alter Menschheitstraum. Schon die Alchemisten haben nach einem Elixir, dem Arcanum, gesucht, welches alle Krankheiten zu heilen vermag.¹ Die Anfänge der Arzneimittelforschung liegen in der Volksmedizin. Bereits im Altertum kannte man die narkotische Wirkung des Mohns oder die Wirkung der Meerzwiebel bei Wassersucht. Im 19. Jahrhundert begann die systematische Untersuchung der biologischen Wirkungen von Pflanzenextrakten, tierischen Giften aber auch synthetisch hergestellter Substanzen am Tiermodell. Die Verwendung molekularer und anderer *in vitro*-Testsystemen, als gegenüber Tierversuchen präziseren Modellen, konnte die Medikamentenentwicklung in der Folgezeit erheblich voranbringen. Die technischen Fortschritte des zwanzigsten Jahrhundert bereicherte die Wirkstoffforschung um experimentelle und theoretische Methoden wie die Proteinkristallographie oder das gezielte computergestützte Design neuer Wirkstoffe.

Die Suche nach einem Medikament beginnt mit der Identifikation eines *targets*, als Angriffspunkt eines potentiellen Wirkstoffs.^{2,3} Dieses *target* ist in den meisten Fällen ein Protein. Anschließend erfolgt die Suche nach einer Leitstruktur. Diese ist oft der natürliche Ligand, kann aber auch durch *screenings* gewonnen werden oder ist eine aus der Literatur bekannte oder abgewandelte Verbindung. Diese wird anschließend, je nach therapeutischem Nutzen, chemisch modifiziert, z.B. zu einen Enzyminhibitor, Agonisten oder Antagonisten des Rezeptors. Anschließend wird die Substanz auf ihre Wirkung *in vitro* und *in vivo* getestet. Erfolgsversprechende Substanzen müssen hierbei in den meisten Fällen bezüglich ihrer pharmakologischen Eigenschaften in mehreren Designcyclen weiter optimiert werden, bis sie als Kandidaten für die weitere Entwicklung zur Verfügung stehen.

Bei der Entwicklung neuer, potenter Wirkstoffe hat sich in letzter Zeit vor allem das rationale *drug design* hervorgetan. Hierbei geht man häufig von einer dreidimensionalen Struktur des Proteins und des daran gebundenen Liganden aus. Dies hilft bei dem gezielten Entwerfen potentieller Liganden und führt im Gegensatz zu klassischen Methoden häufig zu potenteren und spezifischer wirkenden Strukturen. Ebenfalls ist es möglich, so mehr über die Struktur-

Wirkungsbeziehungen (*structure activity relationship* (SAR)) der Substanzen zu verstehen.

Es gibt mittlerweile einige erfolgreiche Beispiele für das rationale *drug design*, z.B. die Neuraminidase-Hemmer Oseltamivir und Zanamivir oder der HIV-Fusions-Inhibitor Enfuvirtide.

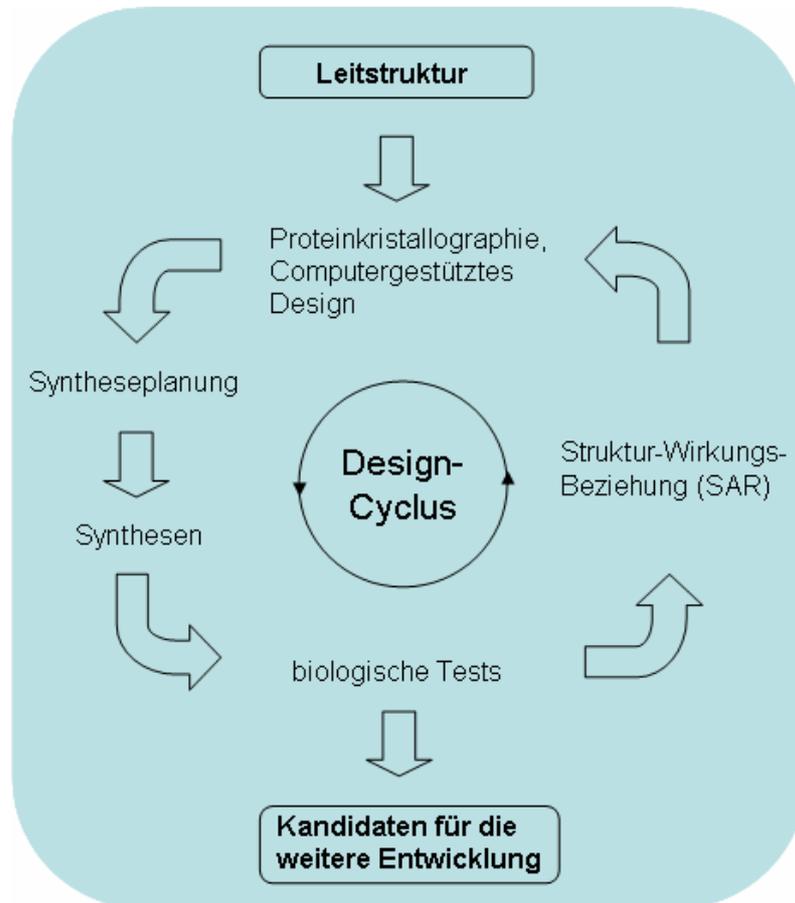


Abbildung 1: Wirkstoffentwicklung durch rationales *drug design*. Mittels dreidimensionaler Daten einer Röntgenkristallstruktur kann eine bekannte Leitstruktur gezielt modifiziert werden. Nach Planung und Durchführung der Synthesen werden die Verbindungen getestet. Die Ergebnisse können zum Verständnis von Struktur-Wirkungsbeziehungen beitragen.

Die Kandidaten für die weitere Entwicklung werden dann auf ihre toxikologischen und pharmakologischen Eigenschaften untersucht. Weiterhin muss eine nach ökonomischen Anforderungen großtechnische Synthese entwickelt werden. Die Entwicklungssubstanz wird anschließend am Tiermodell getestet. Nach positiven Ergebnissen der Versuche, kann das Medikament nach rechtlichen Zulassungsverfahren in umfangreichen klinischen Studien am Menschen bezüglich dessen Wirksamkeit, Verträglichkeit und Verfügbarkeit getestet werden. In allen Stadien der Entwicklung kann sich ein potentieller Kandidat oder eine ganze Wirkstoffklasse als ungeeignet erweisen und muss teilweise oder ganz verworfen werden.

Insbesondere diese Risiken und die lange Forschungsdauer von 5-15 Jahren begründen die hohen Kosten für die Entwicklung eines neuen Medikamentes von ca. 700-1000 Mio. US\$.

1.2 Protein-Ligand-Wechselwirkungen

1.2.1 Die Stärke von Protein-Ligand-Wechselwirkungen

Damit ein Medikament seine Wirkung ausüben kann, muss es an ein bestimmtes Zielmolekül, welches in den meisten Fällen ein Protein ist, binden.¹ Hierfür ist es erforderlich, dass das Molekül in seiner Größe und Gestalt optimal in die Proteinbindungstasche hineinpasst um spezifische Wechselwirkungen ausbilden zu können. Die Stärke dieser Interaktion lässt sich mit verschiedenen Methoden messen. Die charakteristische Größe hierfür ist die Bindungskonstante K_i bzw. die Dissoziationskonstante K_D . Sie ist eine thermodynamische Gleichgewichtsgröße und beschreibt wie hoch der Anteil der am Protein gebundenen Liganden ist:

$$K_D = \frac{[Ligand] \cdot [Protein]}{[Ligand \cdot Protein]}$$

Gleichung 1: Definition der Dissoziationskonstante K_D mit $[Ligand]$ = Konzentration des Liganden, $[Protein]$ = Konzentration des Proteins und $[Ligand \cdot Protein]$ = Konzentration des Protein-Ligand Komplexes

Die Einheit von K_D hat die Dimension einer Konzentration und ist in der Einheit mol/L angegeben. Entspricht die Ligandkonzentration dem K_D so ist die Hälfte der Bindungsstellen durch Ligandmoleküle belegt. Statt der Bindungskonstante kann auch die freie Bindungsenthalpie zur Quantifizierung der Bindungsstärke dienen. Diese hängt mit der Bindungskonstante wie folgt zusammen:

$$\Delta G = -RT \ln K_D$$

Gleichung 2: Zusammenhang zwischen freier Bindungsenthalpie (ΔG) und der Bindungskonstante (K_D) mit R = allgemeine Gaskonstante und T = Temperatur.

Ein guter Binder mit einem K_D -Wert von 1 nM entspricht somit bei 298 K einer freien Bindungsenthalpie von -51 kJ/mol.

Eine weitere häufig benutzte Größe ist der sogenannte IC_{50} Wert. Dieser gibt die

Ligandkonzentration an, bei der die Aktivität des Proteins auf die Hälfte absinkt. Dieser ist leichter ermittelbar und stimmt in guter Näherung mit dem K_D -Wert überein.

1.2.2 Typen von Protein-Ligand-Wechselwirkungen

Allgemein gibt es zwei Arten von molekularen Interaktionen zweier Bindungspartner: polare und unpolare Wechselwirkungen.

Zu den polaren Wechselwirkungen gehören Wasserstoffbrückenbindungen und ionische Wechselwirkungen. Wasserstoffbrücken werden durch Wasserstoffdonoren (protontragende NH- oder OH-Gruppen) und Wasserstoffakzeptoren (elektronegative O- oder N-Atome) gebildet. Der Abstand eines Wasserstoffdonors und dessen -akzeptors ist dabei in engen Grenzen zwischen 2.8-3.2 Å definiert. Auch die Geometrie einer Wasserstoffbrücke ist stark in ihrem Winkel eingeschränkt.

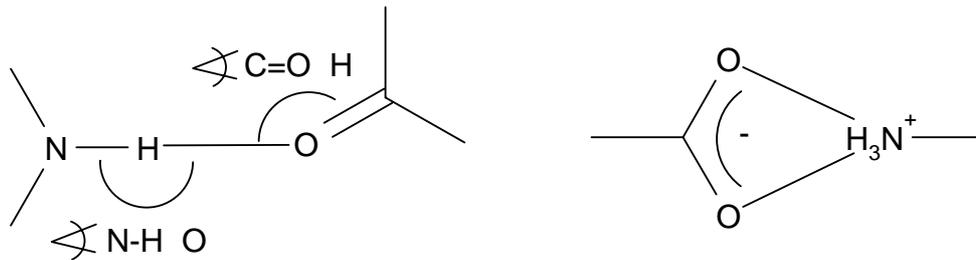


Abbildung 2: Schematische Abbildung einer Wasserstoffbrückenbindung (links) und einer ionischen Wechselwirkung (rechts). Die Wasserstoffbrückenbindung ist in Ihrer Geometrie stark winkelabhängig. Der Winkel N-H··O liegt zwischen 150-180°, der zwischen C=O··H in einem Bereich von 100-180°.

Die elektrostatische Anziehung von entgegengesetzt geladenen Gruppen, einer so genannten Salzbrücke, ist häufig besonders stark. Ein Beispiel hierfür ist die Interaktion einer positiv geladenen Aminogruppe des Lysins eines Liganden mit der Carboxylgruppe einer Asparaginsäure. Diese ionischen Wechselwirkungen können mit einem typischen Abstand von 2.7-3.0 Å einen großen Beitrag zur Bindung leisten.

Hydrophobe Kontakte spielen ebenfalls eine wichtige Rolle bei Ligand-Protein-Interaktionen. Typische Abstände zwischen den hydrophoben Gruppen zweier Bindungspartner betragen 3.5-4.0 Å.⁴ Im Gegensatz zu den polaren Wechselwirkungen sind diese ungerichtet, mit Ausnahme so genannter π - π Wechselwirkungen zwischen Aromaten (π -stacking).⁵ Diese haben dann bestimmte relative Anordnung zueinander. Bei hydrophoben Kontakten können

Wassermoleküle aus einer für sie ungünstigen Umgebung freigesetzt werden, wodurch die Zahl der H-Brücken steigt. Diese und entropische Faktoren sind Gründe, weshalb unpolare Wechselwirkungen trotz ihrer relativ geringen Anziehungskräfte eine tragende Rolle in Ligand-Protein Wechselwirkungen zukommen kann. Des Weiteren können Aromaten auch durch Kationen- π -Wechselwirkungen mit positiv polarisierten Aminogruppen konstruktiv zur Bindung beitragen.⁴

1.2.3 Entropische Faktoren der Protein-Ligand-Wechselwirkung

Eine große Bedeutung bei hydrophilen und hydrophoben Interaktionen ist die Verdrängung von Wassermolekülen aus den Bindungsarealen, da in biologischen Systemen Proteine und Liganden in wässriger Umgebung vorliegen. Steigt die Anzahl nicht assoziierter Wassermoleküle während der Bindung, so wird ein positiver entropischer Beitrag zur Bindung geleistet. Da polare Gruppen oft solvatisiert vorliegen, ist es bei hydrophilen Kontakten stark davon abhängig, wie viel Energie für das Abstreifen der Hydrathülle aufgewendet werden muss und wie stark die gebildeten H-Brücken des Liganden mit dem Protein sind. Bei hydrophoben Bindungsarealen liegen die Wassermoleküle lose assoziiert vor, so dass sie leicht und mit hohem entropischen Gewinn verdrängt werden können. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Flexibilität des Liganden. Durch die Bindung an das Protein verliert der Ligand an Translations- und Rotationsfreiheitsgraden. Dieser Effekt ist entropisch ungünstig. Durch die Erhöhung der Rigidität des Liganden, zum Beispiel durch die Etablierung von Doppel- oder Amidbindungen statt Alkylketten und unter Beibehaltung der für die Bindung relevanten Konformation, kann dieser negative Beitrag minimiert werden.

1.3 Influenza

Die Influenza (Grippe) ist eine gefährliche, durch Viren übertragende, respiratorische Erkrankung. Sie kann insbesondere bei jungen, alten und geschwächten Menschen zum Tode führen. Die vordergründige letale Ursache ist eine virale Pneumonie.⁶ Influenzaviren gehören der Familie der Orthomyxoviridae an⁷ und sind in drei verschiedene Gattungen unterteilt: Influenza A, B und C. Die Viren der Gattung A befallen Menschen und verschiedene Tiere, wie z.B. Schweine, Pferde und Vögel. Influenza B und C-Viren infizieren hauptsächlich den Menschen. Diese beiden Gattungen verursachen größtenteils lokale Epidemien bei Menschen, welche meist harmlos und mit schwachen Symptomen verlaufen. Im Gegensatz dazu

kann es aufgrund der genetischen Vielfaltigkeit von Influenza A Viren, dessen Wirte vor allem Wasservögel sind, und ihrer hohen Infektiosität, jederzeit zum Ausbruch einer gefährlichen Grippepandemie kommen. Bei dem größten pandemischen Grippeausbruch in den Jahren 1918 und 1919, welche auch unter dem Namen „Spanische Grippe“ in die Geschichte eingegangen ist, starben weltweit 20-50 Millionen Menschen an der Folge der Infektion.^{8,9} Weitere Grippepandemien folgten, jedoch nicht in dem gleichen verheerenden Ausmaß: z.B. 1957 (Asien), 1968 (Hongkong) und 1977 (Russland). Trotz ausbleibender großer pandemischer Ausbrüche infizieren sich jährlich 5-15% der Bevölkerung mit dem Influenza-Virus, wobei 250000-300000 Menschen weltweit an den Folgen der Krankheit sterben.¹⁰

1.3.1 Aufbau und Replikationszyklus des Influenza-Virus

Die Influenzatyphen A, B und C werden auf der Basis ihres inneren Hauptantigens, dem Nucleoprotein (NP) und dem Matrixprotein (M1) unterschieden.⁸ Die Klassifizierung der jeweiligen Virenstämme berücksichtigt die Gattung, gegebenenfalls den Wirt, den Ort der Isolierung, die fortlaufende Nummer am Ort der Isolierung, das Jahr und eventuell den Subtyp des Virus (z.B. A/Sydney/5/97 [H3N2] oder A/duck/HK/862/80 [H12N5]).¹¹

Das Genom des Influenza A Virus umfasst acht RNA Einzelstränge negativer Polarität. Diese sind von einer zweischichtig aufgebauten Zellwand umgeben (Abbildung 3). Die innere Schicht besteht aus Matrixproteinen (M1), die Äußere aus einer Lipiddoppelschicht. Auf der Oberfläche des Virus sind drei verschiedene Membranproteine, das Matrixprotein M2, und die beiden Hauptantigene der Hüllmembran, das Hämagglutinin (HA) und die Neuraminidase (NASE) eingebettet. Von den Influenza A Viren sind 16 verschiedene Typen des Hämagglutinins und neun verschiedene Typen der Neuraminidase bekannt.

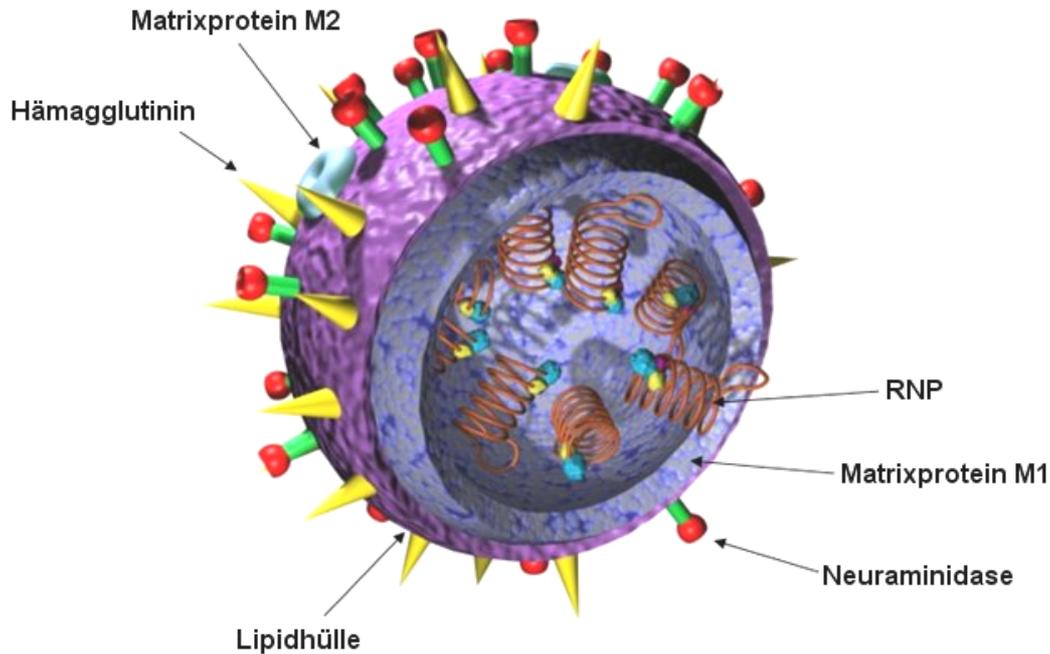


Abbildung 3: Aufbau des Influenza A Virus. Auf der Hüllmembran befinden sich die zwei Antigene, das Hämagglutinin (HA) und die Neuraminidase (NASE), die wichtige Aufgaben bei der Replikation des Virus übernehmen.¹²

Der Replikationszyklus des Influenza A-Virus beginnt mit dem Andocken eines Viruspartikels über das Hämagglutinin an $\alpha 2,3$ oder $\alpha 2,6$ verknüpfte Sialinsäure (*N*-Acetylneuraminsäure) -resten der Glycocalyx von Epithelzellen des oberen Atemwegstraktes.¹³

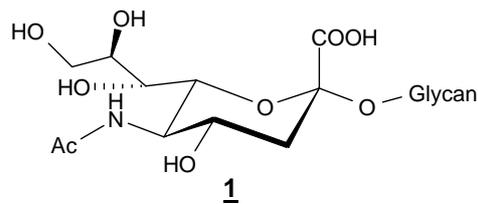


Abbildung 4: Sialinsäure (*N*-Acetylneuraminsäure) befindet sich $\alpha 2,3$ oder $\alpha 2,6$ glycosidisch verknüpft auf den Epithelzellen des oberen Atemwegstraktes. Das Hämagglutinin des Influenza-Virus bindet an diese und ermöglicht so das Andocken des Virus an die Wirtszelle.

Das Virus wird anschließend, als Endosom eingekapselt, in die Zelle eingeschleust. Die Matrixproteine M2 verringern anschließend den pH-Wert im Endolysosom. Dies führt zu einer Konformationsänderung im Subteil HA-2 des Hämagglutinins und zur Ausbildung einer Fusionspore (*uncoating*). Im Anschluss werden durch viruseigene Polymerasen (PB1, PB2 und PA) die RNA-Segmente repliziert.¹⁴ Dann werden das Genom und die in der Zelle synthetisierten Virusproteine durch den Golgi-Apparat in die Membran der Wirtszelle eingebaut. Letztlich erfolgt das Ausknospen (*budding*) der Virusnachkommen. Während

dieses Prozesses werden Sialinsäureglycoside auf der Oberfläche der Wirtszelle durch die viruseigene Neuraminidase katalytisch gespalten, wodurch sich das Virus vom Wirt ablösen kann.¹⁵ Das Influenzavirus ist aufgrund seiner hohen Mutationsrate sehr wandlungsfähig. Durch die hohen Reproduktionsfehler der RNA-Polymerase von 1 in 10^4 Basen, kommt es häufig zu Punktmutationen einzelner Aminosäuren.⁷ Dieser Vorgang ist auch als *antigenic drift* bekannt. Ein weiteres Phänomen ist der *antigenic shift*: Da die viruseigene RNA segmentiert vorliegt, kann es zu einer Kreuzung ganzer Genome (*reassortment*) kommen. Dies kann erfolgen, wenn eine Zelle gleichzeitig von verschiedenen Virenstämmen infiziert wird. Die daraus resultierenden Nachkommen können sich von ihren Vorfahren z. B. in ihrer Pathogenität stark unterscheiden. Der *antigenic shift* wird als Hauptursache für den Ausbruch der großen Grippepandemien angesehen. Die „Spanische“, „Asiatische“ und „Russische“ Grippepandemien sind Beispiele für die Entstehung gefährlicher neuer Virenstämme durch *reassortment* zwischen Mensch- und Tier-spezifischen Influenzaviren.

1.3.2 Das Hämagglutinin

Das Hämagglutinin ist ein homotrimeres Lektin mit einer Molmasse des Monomeren von maximal 76 kDa.¹⁶ Der Name rührt von seiner Eigenschaft bei 4°C Erythrozyten zu agglutinieren. Es wird auf der Oberfläche des Virus exprimiert, wobei sich auf 100 nm^2 2-4 Kopien befinden. Hierdurch ist das Virus in der Lage, trotz seiner relativ geringen Affinität des monomeren Hämagglutinins zur Sialinsäure ($K_D = 10^{-3} \text{ M}$), durch polyvalente Wechselwirkung eine deutlich höhere Bindungsstärke beim Andocken an die Wirtszelle zu erreichen. Dieser Faktor wird auf 10^{10} geschätzt.¹⁷ Das Hämagglutinin besteht aus zwei Untereinheiten, HA1 und HA2, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Das sechs Aminosäuren lange Verbindungsstück zwischen den beiden Untereinheiten, wird erst bei der Reifung des Virus außerhalb der Wirtszelle im Vorläufermolekül HA0 durch wirtseigene Proteasen gespalten.^{13,18} Das Hämagglutinin besitzt zwei Bindestellen.¹⁹ Die Rezeptorbindungstasche, mit der das Virus an Sialinsäureglycane bindet, befindet sich, als eine kleine Vertiefung ausgebildet, am Kopf des Lektins. Sie ist in ihrer Aminosäuresequenz bei allen Influenzasubtypen weitestgehend konserviert. Eine zweite Bindungstasche befindet sich im Trimer zwischen zwei HA1 Domänen und einer HA2 Domäne. Allerdings ist die Bindung viel schwächer. Es ist unklar, ob dieser zweiten Bindungstasche überhaupt eine biologische Rolle zukommt.

1.4 Das aviäre Influenza-Virus H5N1

Die aviäre Influenza H5N1 führte das erste Mal 1997 in Hongkong, verbunden mit Infektionen an Menschen, zu einer Epidemie an domestizierten Geflügelbeständen.⁸ Die Übertragung des Virus auf den Menschen erfolgte dabei durch direkten Kontakt mit infizierten Vögeln. Durch groß angelegte Massentötungen von Nutzvögeln schien man den pandemischen Ausbruch zunächst unter Kontrolle zu bekommen. Doch kehrte die aviäre Influenza, lange Zeit unentdeckt, 2003 nach Asien zurück und führte 2004 zu großen pandemischen Ausbrüchen in Thailand und Vietnam, wiederum mit Infektionen am Menschen verbunden. Zum Dezember 2007 bestätigte die WHO bis dahin insgesamt 340 Fälle einer H5N1 Infektion beim Menschen in Europa, Asien und Afrika. Die Mortalitätsrate des Virus ist mit 61% ungemein hoch und unterstreicht die Gefährlichkeit des Virus.²⁰

1.4.1 Pathogenität und Spezifität des Hämagglutinins H5

Der Grund für die hohe Pathogenität des H5N1-Virus wird im Hämagglutinin H5 gesehen. Sowohl das H5, als auch das H7 können sich in domestizierten Vögeln zu hoch pathogenen Influenzaviren (*highly pathogenic avian influenza* (HPAI)) entwickeln. Diese Variante kann sich, im Gegensatz zu den niedrig pathogenen Formen (*low pathogenic avian influenza* (LPAI)), welche nur Zellen des respiratorischen und Gastrointestinal-Traktes befallen, im ganzen Körper ausbreiten. Der Grund für das Ausbleiben einer humanen H5N1-Pandemie liegt in der Spezifität des Hämagglutinins H5. Dieses präferiert $\alpha 2,3$ glycosidisch verknüpfte Sialinsäureglycane, wie sie in den Epithelzellen von Vögeln vorkommen.¹³ Im Gegensatz dazu, befinden sich auf den Epithelzellen des oberen menschlichen Atemwegstraktes vorwiegend $\alpha 2,6$ verknüpfte Sialinsäureglycane. Deswegen sind pandemische Ausbrüche des H5N1 Virus bis jetzt auf Vögel beschränkt. Eine Übertragung auf den Menschen kann nur bei engem Kontakt mit infizierten Vögeln stattfinden. Es wird jedoch befürchtet, dass eine Mutation des Virus zu einer Änderung dieser Präferenz und damit zu einer effektiveren Mensch zu Mensch Übertragung, verbunden mit einem großen, humanen, pandemischen Risiko führen kann. Neuere Erkenntnisse zeigen, dass bereits zwei Aminosäuremutationen des Hämagglutinins zu einem Präferenzwechsel von $\alpha 2,3$ zu $\alpha 2,6$ verknüpften Sialinsäureglycanen führt.^{21,18,22,23}

1.4.2 Röntgenstrukturen des Hämagglutinins H5

Im Jahr 2001 wurde von Wiley et. al. die Röntgenstrukturen des Hämagglutinins H5 (A/duck/Singapore/3/97), als Monomer, kokristallisiert mit den natürlichen aviären und humanen Rezeptoren: α 2,3 (PDB: 1JSN) bzw. α 2,6 (PDB: 1JSO) verknüpfte Sialinsäureglycane, veröffentlicht.²⁴ Neben dem dargestellten Protein und den Kohlenhydraten enthält die Struktur Kristallwasser. In der Röntgenstruktur des α 2,6 verknüpften Pentasaccharides konnte nur die endständige Sialinsäure, in der des α 2,3 verknüpften Pentasaccharides nur die von der Sialinsäure ausgehenden ersten drei Kohlenhydrate abgebildet werden. Die 1JSO-Struktur ist in Abbildung 5 dargestellt.

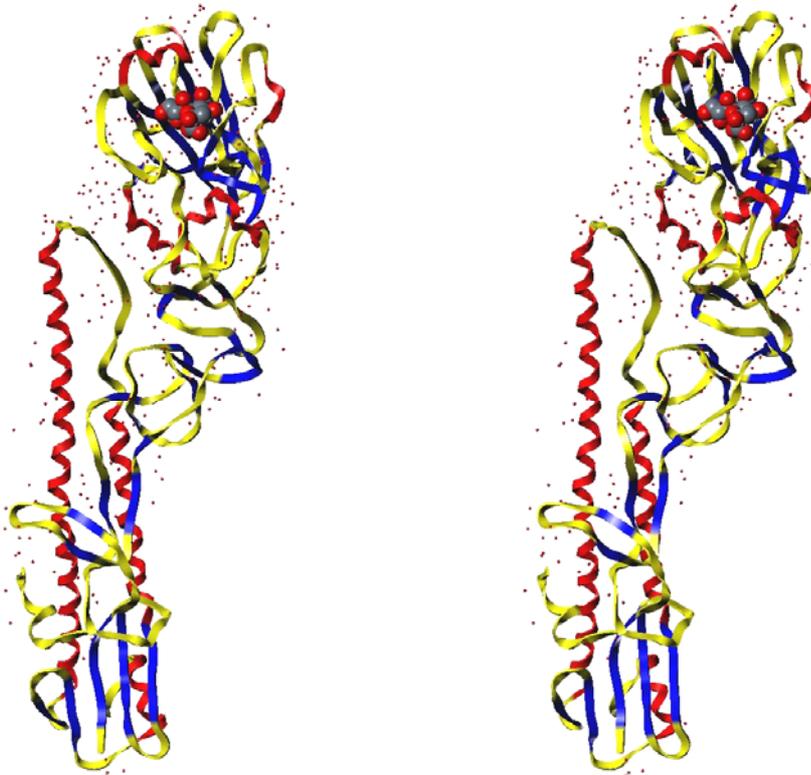


Abbildung 5: Stereo-Darstellung der Röntgenstruktur 1JSO. Das Hämagglutinin H5 ist als *ribbon*-Modell dargestellt: α -Helix (gelb), β -Faltblatt (blau) und *random-coil* (gelb). Am Kopf des Proteins befindet sich die Bindungstasche des Proteins mit der Sialinsäure. Rot gepunktet dargestellt sind Sauerstoffatome des Kristallwassers. Darstellung der Sialinsäure: *space fill*

Des Weiteren konnten 2006 zwei Röntgenstrukturen, die des trimeren H5, A/Vietnam/1203/2004 (PDB: 2FK0)¹⁸ und die des trimeren H5 A/Vietnam/1194/2004 (PDB: 2IBX)²² veröffentlicht werden. Diese wurden jedoch ohne die an dem Protein bindenden Sialylglycane kristallisiert.

1.5 Medikamente gegen Influenza

Allgemein gibt es zwei therapeutische Optionen gegen Influenza: Impfstoffe oder antivirale Medikamente. Erstere haben den Nachteil, dass sie aufgrund der Veränderung der Viren permanent angepasst werden müssen und dass die Entwicklung eines neuen Impfstoffes normalerweise 8 Monate dauert.²⁵ Für den Einsatz im Falle einer sich schnell ausbreitenden Grippepandemie kommt diese Option somit nicht in Frage. Bei den bisher zur Marktreife gelangten antiviralen Mitteln unterscheidet man zwei Wirkstoffklassen: M2-Ionenkanalinhibitoren und Neuraminidasehemmer.¹⁵ Die M2-Ionenkanalinhibitoren Adamantadin und Rimantadin sind die ersten, als antivirale Wirkstoffe gegen Influenza zugelassenen Medikamente. Sie wirken auf das M2-Membranprotein und inhibieren das *uncoating*. Beide Medikamente wirken nur gegen Influenza A Viren. Aufgrund bereits vieler gebildeter Resistenzen von Viren, sind diese Wirkstoffe nur zweite Wahl in der Behandlung von Grippe. Der Durchbruch in der Influenza Chemotherapie gelang durch die Entwicklung von Hemmern der Neuraminidase. Als Übergangszustandsanaloga der Sialinsäure-Neuraminidase Wechselwirkung, verhindern sie das Ablösen des Virus von der Wirtszelle. Ihre Erforschung gehört zu den ersten Beispielen des rationalen *drug designs*. Neuraminidasehemmer werden seit 1999 für die Behandlung von Influenza eingesetzt. Während Zanamivir (Handelsname: Relenza) als Aerosol inhaliert werden muss, ist Oseltamivir (Tamiflu) eine orale Formulierung.

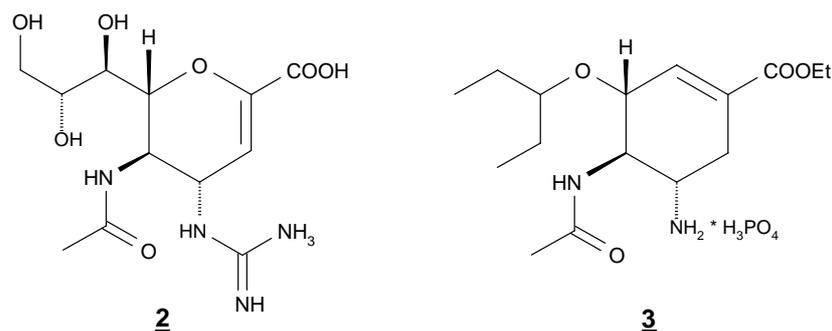


Abbildung 6: Die bekanntesten für die Behandlung von Influenza zugelassenen, antiviralen Wirkstoffe: die Neuraminidasehemmer Zanamivir 2, und Oseltamivir 3

Zanamivir und Oseltamivir sind effektive Wirkstoffe gegen alle Typen der Influenza. Rechtzeitig eingenommen verkürzen sie die Krankheitsdauer um 1-2 Tage und reduzieren die mit dem Virus verbundenen Folgekomplikationen.²⁶ Allerdings haben sich auch schon resistente Virenstämme gegen das oral verfügbare Oseltamivir entwickelt.^{20,27}

1.5.1 Inhibitoren des Hämagglutinins

Neben dem M2-Matrixprotein und der Neuraminidase ist ein weiterer möglicher Angriffspunkt für Medikamente das Hämagglutinin. Durch hochaffine Binder wäre es möglich das Andocken des Virus an die Wirtszelle zu verhindern. Allerdings gibt es auf dieser Basis bis jetzt noch keine bis zur Marktreife gelangten Medikamente. In bisherige Studien zu dieser Wirkstoffklasse gibt es sowohl Ansätze von Sialinsäurederivaten, Peptiden²⁸ und RNA-Aptamere.²⁹ Die zahlreichen Arbeiten von Sialinsäurederivaten unterteilen sich dabei in monovalente und polyvalente Liganden. Die entwickelten polyvalente Liganden zeigten, bei bivalenten eine bis zu 100-fach bessere Bindung³⁰, bei tetravalenten eine bis zu 1200-fach bessere Bindung³¹ und bei polyvalenten Bindern^{32,33} eine noch weiter verbesserte Affinität gegenüber dem monovalenten α -Methylglycosid der Sialinsäure (Neu5Ac α 2Me). Allerdings ist es fraglich, ob solche Verbindungen als Medikamente wirklich eingesetzt werden können. Insbesondere die Frage nach der Bioverfügbarkeit und nach einem geeigneten Trägergrundgerüst spielen hier eine große Rolle.¹⁷

Es gibt ebenfalls einige Arbeiten zu monovalenten Sialinsäurederivaten. Durch die Derivatisierung der Sialinsäure selber, bis auf an Position vier substituierte Derivate, konnte bis jetzt keine wesentliche Steigerung der Bindungsaffinität im Vergleich zu den monovalenten natürlichen α 2,3 und α 2,6 verknüpften Sialinsäureglycane, die einen $K_D \sim 2\text{mM}$ haben, erreicht werden.³⁴⁻³⁷ Im Gegensatz dazu zeigten Sialinsäureglycoside, die über einen Alkylspacer an einen Aromaten gebunden sind (Abbildung 7),³⁰ eine bis zu 64-fache Steigerung der Bindungsaffinität zum Hämagglutinin H3.³⁸ Von diesen konnten, kokristallisiert mit dem Protein, Röntgenstrukturen angefertigt werden.³⁹ Die Verbindung **4**, zusätzlich an Position 4-O-Dansylglycyl substituiert, zeigte sogar eine um den Faktor ~ 1000 gesteigerte Bindungsaffinität am Hämagglutinin H3 gegenüber dem Neu5Ac α 2Me.³⁸

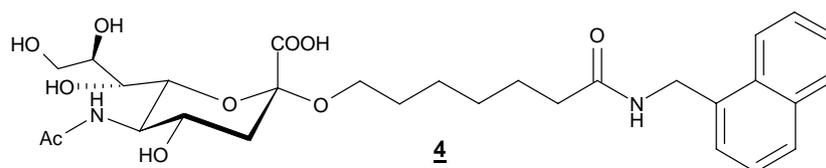


Abbildung 7: Beispiel eines glycosidisch, aromatisch verlinkten Sialinsäureliganden **4**, der in Agglutinationsstudien am Hämagglutinin H3 eine 64-fach höhere Bindungsaffinität gegenüber dem Methylglycosid (Neu5Ac α 2Me) der Sialinsäure aufzeigte.

2 Methoden

2.1 *Molecular Modeling*

Allgemein versteht man unter dem *molecular modeling* die computergestützte Darstellung, Bearbeitung und Berechnung dreidimensionaler Molekülstrukturen.¹ Die Grundlage hierfür können kristallographischen Daten einer Röntgenkristallstrukturanalyse oder durch NMR-Spektroskopie ermittelte Strukturinformationen darstellen. Die 3D-Strukturdaten sind über Datenbanken im Internet erhältlich, z.B. die Brookhaven-Proteindatenbank (PDB). Moleküle aus Röntgenstrukturen besitzen anfangs häufig eine sehr hohe Energie. Eine Minimierung (basierend auf einem Kraftfeld z.B. CHARMM⁴⁰, Amber⁴¹ oder Tripos⁴²) führt zu einem lokalen energetischen Minimum des Moleküls⁴⁰ und somit zu einer vernünftigeren Startkonformation. Durch die Modifizierung interessanter Molekülbereiche und deren Einpassung in die Bindungstasche können anschließend die Kontakte zwischen den Bindungspartnern verbessert werden. Hierbei muss allerdings auf eine sinnvolle Gestaltung der neuen Strukturen geachtet werden (siehe Abschnitt 1.2.2).

Die auf diesem Wege entwickelten und überprüften Strukturen können anschließend einem *docking* unterzogen werden, um die potentielle Bindungsaffinität zu überprüfen. Die hier angewandte Methode beginnt mit einer kurzen Minimierung (100 Iterationen) des Protein-Ligand-Komplexes. Anschließend werden die Energien des separierten Liganden und des Proteins von der Energie des Protein-Ligand-Komplexes abgezogen. Das Ergebnis ergibt einen theoretischen Wert für die Bindungsenergie und kann im Vergleich mit dem Wert eines Referenzliganden einen Hinweis auf die mögliche Bindungsaffinität des Liganden liefern.

2.2 *Oberflächen-Plasmonen-Resonanz Studien (SPR)*

Anfang der neunziger Jahre wurde von der damaligen Firma Biacore (Uppsala, Schweden) ein auf dem Oberflächen-Plasmonen-Resonanz Phänomen basierendes Sensorchip-Messverfahren entwickelt. Mit diesem System ist es unter anderem möglich, biologische Bindungsereignisse zwischen Liganden und deren Rezeptoren in Echtzeit zu verfolgen.^{43,44} Die Methode ist mittlerweile zu einem Standardmessverfahren der pharmazeutischen Industrie geworden. Ein

großer Vorteil dieses Assays gegenüber anderen Verfahren ist, dass die zu vermessenden Bindungspartner, im Gegensatz zu klassischen Verfahren, keine Markierung wie z.B. Fluoreszenzlabel benötigen. Weiterhin kann bei dieser Methode unter fast physiologischen Bedingungen mit verschiedenen wässrigen Puffersystemen gemessen werden. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit sind für die Untersuchungen nur sehr geringe Mengen des biologischen Materials notwendig. Neben chemischen Analyten ist die SPR-Methode mit geeigneten Geräten auch für die Untersuchung größerer Systeme anwendbar wie z.B. Viren⁴⁵, Bakterien⁴⁶ oder Zellen⁴⁷.

Wie in dieser Arbeit durchgeführt, können die Studien mit der Immobilisierung eines Proteins (H5) auf der dünnen Goldoberfläche des Sensorchips (CM5 von Biacore) beginnen, welche durch eine Dextranmatrix funktionalisiert ist. Die Verknüpfung erfolgt über die Aktivierung der Dextranmatrix mit EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid hydrochlorid) und NHS (*N*-Hydroxysuccinimid) und der anschließenden kovalenten Bindungsknüpfung des Proteins. Anschließend können die gelösten Liganden über den Chip geleitet werden. Im Falle einer Bindung kommt es zu einer Massenzunahme auf der Oberfläche des Chips. Der hierdurch veränderte Brechungsindex wirkt direkt auf die Plasmonen der Goldschicht. Dies kann auf der Rückseite der Oberfläche durch die Änderung des Totalreflexionswinkels des eingestrahlteten Lichtes detektiert werden. Dieser Winkel wird in *resonance units* (RU) angegeben, wobei eine Zunahme von einem RU etwa 1 pg gebundenem Material entspricht.

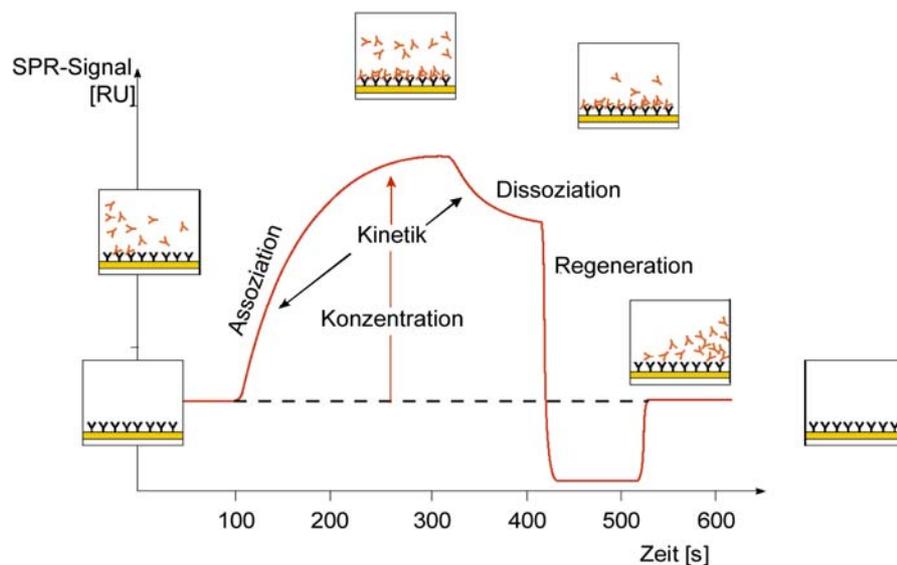


Abbildung 8: Idealisierte Messkurve eines SPR-Experiments mit Assoziation, Dissoziation und anschließender Regeneration.

Eine idealisierte Messkurve ist in Abbildung 8 abgebildet. Diese ist in Assoziation, Dissoziation und Regeneration unterteilt. Durch die Anpassung des Signalverlaufes einer Messung an die Langmuir-Funktion (Gleichung 3) kann man die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation (k_{on}) und Dissoziation (k_{off}) bestimmen. Aus diesen lässt sich nach Gleichung 4 die Dissoziationskonstante K_D berechnen.^{43,48}

Assoziation: $R(t) = R_{eq} - R_{eq} * e^{-k_{obs} * (t-t_0)}$ ($k_{obs} = k_{on} * C_1 + k_{off}$)

Dissoziation: $R(t) = R_1 * e^{-k_2 * (t-t_1)}$

Gleichung 3: Langmuir-Gleichung zur Beschreibung der Assoziation bzw. Dissoziation.
R(t) = RU-Antwort als Funktion der Zeit, R_{eq} = RU-Antwort im *steady state*, R_1 = RU-Antwort am Anfang der Dissoziation, k_{obs} = empirische Geschwindigkeitskonstante der Assoziation, C_1 = Konzentration des Analyten im Laufpuffer

$$K_D = \frac{k_{off}}{k_{on}}$$

Gleichung 4: Berechnung der Dissoziationskonstante aus den Geschwindigkeitskonstanten.

Die Bestimmung der Dissoziationskonstante K_D ist auch durch die Vermessung und Auswertung von Konzentrationsreihen möglich. Die im *steady state* gemessenen *response units* (RU) verhalten sich nach dem *one-site-binding* Modell proportional zur Konzentration (*conc.*), wie in Gleichung 5 angegeben. Die Auftragung der Gleichgewichts-RU-Werte gegen die Ligandkonzentrationen und eine anschließende Regressionsanalyse führen zu einer Funktion, deren Wert bei $RU_{max}/2$ der Dissoziationskonstante K_D entspricht.

$$RU = \frac{RU_{max} * conc.}{K_D + conc.}$$

Gleichung 5: *One-site-binding* Modell

2.3 Saturation Transfer Difference (STD) NMR-Spektroskopie

Eine sehr leistungsfähige Methode zur Untersuchung von Interaktionen zwischen Liganden und Proteinen stellt die STD-NMR Spektroskopie dar.^{49,50} Dieses Verfahren ermöglicht die Bestimmung der Dissoziationskonstante und die Charakterisierung des Bindungssepitopes von Liganden.⁵¹ Weiterhin können auch ganze Substanzbibliotheken nach bindenden Substanzen durchsucht werden.⁵⁰

Bei der STD-NMR Spektroskopie wird das Protein selektiv durch einen elektromagnetischen Puls gesättigt (Abbildung 9). Dies ist möglich, da Proteine aufgrund ihrer hohen Molmasse stark verbreitete Protonensignale haben, deren gemeinsame Hüllkurve über den üblichen ^1H -ppm Bereich hinausreicht. Aufgrund der so genannten Spindiffusion, die bei Molekülen mit einer Masse größer ca. 10 kDa auftritt, verteilt sich die Sättigung gleichmäßig über das Protein.⁵² Im Fall einer Bindung wird, je nach räumlicher Nähe, ein Teil dieser Sättigung auf den Liganden übertragen. Dies führt zu einem Intensitätsverlust der Ligandsignale, sobald der Ligand wieder dissoziiert in Lösung vorliegt.

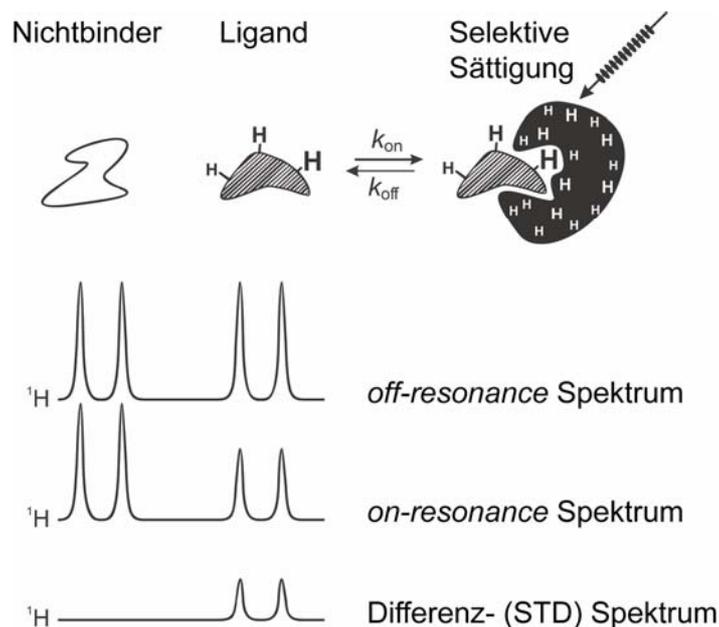


Abbildung 9: Prinzip der *saturation transfer difference* Spektroskopie. Die selektive Sättigung des Proteins wird während eines Bindungsereignisses auf den Liganden übertragen. Das resultierende *on-resonance* Spektrum des Liganden ist in seiner Signalintensität gegenüber dem *off-resonance* Spektrum vermindert. Die Differenz beider ergibt das STD-Spektrum.

Ein STD-Spektrum setzt sich zusammen aus dem *off-resonance*-Spektrum (ohne Vorsättigung des Proteins) und dem *on-resonance*-Spektrum. Die Differenz der beiden Spektren zeigt nur

noch Protonensignale bindender Liganden. Die Signale des Proteins können durch die Anwendung eines *spinlock*-Filters weitestgehend aus dem Spektrum entfernt werden. Da sich die Intensität der Protonensignale des Liganden mit zunehmender Nähe zum Protein aufgrund effektiveren Sättigungstransfers erhöht, kann mit Hilfe des STD-Spektrums ein Bindungsepitop formuliert werden. Die STD-Intensität jedes Ligandprotons wird im Allgemeinen durch dessen abs. STD% angegeben. Dieser berechnet sich aus dem Quotienten der Integrale des STD-Spektrums ($I_0 - I_{sat}$) und dem *off-resonance* Spektrums I_0 (Gleichung 6).

$$STD\% = \frac{I_0 - I_{sat}}{I_0} * 100$$

Gleichung 6: Berechnung der absoluten STD-Prozente

Nach Gleichung 7 erhält man den so genannten STD-Amplifikationsfaktor (STD_{Amp}).

$$STD_{Amp} = \frac{I_0 - I_{sat}}{I_0} * Ligandüberschuss$$

Gleichung 7: Berechnung des STD-Amplifikationsfaktors (STD_{Amp})

Trägt man den STD-Amplifikationsfaktor gegen die Konzentration des Liganden auf, kann man durch eine Regressionsanalyse, vergleichbar mit dem aus Abschnitt 2.2., durch einen *fit* nach dem *one-site-binding* Modell die Dissoziationskonstante (K_D) bestimmen. Durch die STD-Spektroskopie kann man die Dissoziationskonstanten in einem weiten Wertebereich untersuchen (pM-mM). Allerdings ist es notwendig, dass die Liganden eine für das System entsprechende Dissoziationsgeschwindigkeit (k_{off}) besitzen. Ist diese zu groß, kann nicht genügend Sättigung auf den Liganden übertragen werden. Im Gegensatz dazu liegen bei einer zu kleinen *off-rate* zu wenige gesättigte Moleküle dissoziiert in Lösung vor. In beiden Fällen führt dies zu einem STD-Spektrum mit schlechtem Signal-/Rauschverhältnis.

Neben den 1H -STD-Spektren lässt sich das Verfahren auch auf viele andere Pulsprogramme anwenden (z.B. das STD-HSQC). Die erfolgreiche Übertragung der Methode auf in Liposomen eingebettete Transmembranproteine⁵³ und auf ganze Zellen^{54,55} beweist das große Potential der STD-Spektroskopie.

3 Aufgabenstellung

Influenza ist eine gefährliche, durch Viren übertragende respiratorische Erkrankung. Das homotrimere Hämagglutinin des Influenzavirus ist hierbei essentiell für die Infektion, indem es den Kontakt zur Wirtszelle herstellt. Das Influenzavirus H5N1 gehört zu den besonders gefährlichen Stämmen, da es in einer hochpathogenen Form auftauchen kann. Bis jetzt führte diese Variante nur zu großen Pandemien an domestizierten Nutzvögeln, wobei allerdings vereinzelt Infektionen am Menschen auftraten. Eine mögliche Mutation des Virus, verbunden mit einer direkten Mensch zu Mensch Übertragung, könnte zu einer weltweiten, humanen Pandemie mit dramatischen sozioökonomischen Folgen führen. Aufgrund bereits vorkommender Resistenzen des H5N1-Virus gegen moderne Neuraminidasehemmer sind neue therapeutische Optionen unbedingt erforderlich. Ein möglicher Ansatzpunkt ist dabei die Inhibierung der adhäsiven Wechselwirkung des viralen Hämagglutinins mit Sialinsäureterminierten Glycoproteinen der Wirtszelle.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen Sialinsäureanaloga mit besseren Bindungseigenschaften zum Hämagglutinin H5, als die der natürlichen Sialinsäureglycane, mit Hilfe des *molecular modelings* entworfen und anschließend synthetisiert werden. Für eine Steigerung der Bindungsaffinität kommen sowohl Modifikationen an der Sialinsäure selber, als auch am Aglycon in Betracht.

Die synthetisierten und charakterisierten Verbindungen sollen anschließend auf ihre Bindungsaffinität und ihren Bindungsmodi zum Hämagglutinin H5 mittels Oberflächen-Plasmonen-Resonanz-(SPR)-Spektroskopie und Sättigungs-Transfer-Differenz-(STD)-NMR-Spektroskopie verifiziert werden.

4 Ergebnisse und Diskussion

Für die Entwicklung von Inhibitoren der Sialinsäure-Hämagglutinin (H5)-Wechselwirkung wurde ein iterativer Ansatz gewählt. Jeder Iterationsschritt sollte dabei den computergestützten Entwurf von Liganden, ihrer Überprüfung mittels *docking*, ihrer anschließenden Synthese und letztlich die Überprüfung der Bindungsaffinität zum Hämagglutinin H5 umfassen. Die Ergebnisse aus den Bindungsuntersuchungen sollten zu einer Verbesserung der Leitstruktur und somit zu potenteren Liganden führen. Für das computergestützte, rationale Design neuer Verbindungen wurde vorbereitend zunächst eine geeignete Röntgenstruktur ausgewählt und überprüft. Des Weiteren mussten sowohl die Methoden der SPR- und der STD-NMR-Spektroskopie, zur Bestimmung der Bindungsaffinität entwickelter Liganden, an bekannten Bindern validiert werden. Die anschließende Arbeit unterteilt sich in zwei Abschnitte: Der Erste (Abschnitt 4.4) befasst sich mit der Untersuchung von Ligandmodifikationen an der Kohlenhydratstruktur der Sialinsäure. Der zweite Abschnitt behandelt die Darstellung und Untersuchung von am Aglycon modifizierten und α -glycosidisch verknüpften Sialinsäurederivaten (Abschnitt 4.5).

4.1 *Wahl und Diskussion der Röntgenstruktur*

Für das computergestützte Design potentieller Liganden wurden zunächst die vier publizierten Röntgenstrukturen analysiert: PDB(**1JSO**): (H5(Monomer) A/duck/Singapore/3/97) kokristallisiert mit einem α 2,6 Sialylpentasaccharid, PDB(**1JSN**): (H5(Monomer) A/duck/Singapore/3/97) kokristallisiert mit einem α 2,3 Sialylpentasaccharid), PDB(**2IBX**): (H5(Trimer) A/Vietnam/1203/2004) und PDB(**2FK0**): (H5(Trimer) A/Vietnam/1194/2004).

Aufgrund der besten Auflösung von 2.4 Å, dem Vorhandensein des natürlichen Sialylliganden in der Röntgenkristallstruktur, des aufgelösten Kristallwassers und der besseren kristallographischen Qualität wurde die weitere Untersuchung mit der 1JSO-Röntgenstruktur durchgeführt.^{18,22,24} Um Aussagen über die Genauigkeit innerhalb der Rezeptorbindungsdomäne (RBD) und der daran gebundenen Sialinsäure zu treffen, wurden anschließend die Temperaturfaktoren (B-Faktoren) der Röntgenstruktur überprüft. Für die dargestellten Schweratome des vorliegenden Proteins im Bereich der RBD des HA1-Teils

betragen diese 20-40. Auch die B-Faktoren der Sialinsäure liegen mit 40-50 für Kohlenhydratatom in einem relativ zuverlässigen Bereich (Abbildung 10).

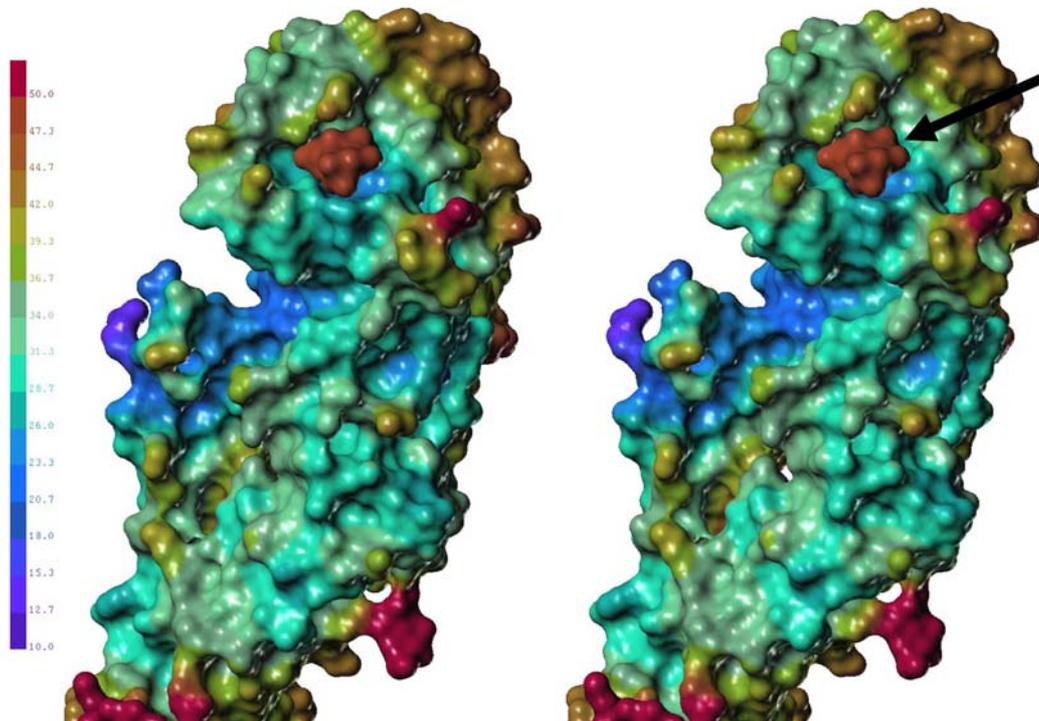


Abbildung 10: Ausschnitt aus der 1J50-Struktur. Im oberen Teil des Hämagglutinins H5 befindet sich die Rezeptorbindungsdomäne, mit der gebundenen Sialinsäure (Neu5Ac). Es sind die B-Faktoren der einzelnen Bereiche nach der links aufgeführten Farbskala von 10-50 dargestellt. Der Pfeil zeigt auf die Neu5Ac. (Darstellungsform: Protein: *connolly* Oberfläche, Neu5Ac: *connolly* Oberfläche, *crossed-eye* Modus)

4.1.1 Vorbereitung der Röntgenstruktur für das docking

Um eine gute Startkonformation für das Design und die *docking*-Studien der Liganden zu erhalten, wurde die Röntgenstruktur mit dem Programmpaket Sybyl 8.0 überprüft. Bei der Untersuchung der Struktur stellte sich heraus, dass 24 Aminosäureseitenketten des Proteins falsch dargestellt waren (allerdings keine davon in der RBD) und die vorhandene *N*-Acetylgruppen der Sialinsäure, als auch der Glycane des H5-Proteins, bezüglich ihres Torsionswinkels (NH-CO) von 180° abwichen. Diese Fehler wurden mit dem *structure-preparation-tool* von Sybyl 8.0 behoben. Im Anschluss daran wurden die terminalen Aminosäuren des HA1- und HA2-Subteils entsprechend positiv oder negativ geladen, das Wasser aus der Struktur entfernt und die Wasserstoffatome zu dem Protein und den Kohlenhydraten addiert. Die Atome der Struktur wurden mit Ladungen (Gasteiger-Marsili) versehen. Die Energie der daraus resultierenden Struktur war mit 500 Mio. kcal/mol sehr

hoch. Deswegen wurde eine Minimierung über 500 Iterationen bei einem $\epsilon = 15$ durchgeführt. Die hieraus resultierende Struktur besaß eine realistischere Energie von -797.23 kcal/mol, wobei die geringe Veränderung der Energie in den späten Iterationsschritten auf das Erreichen eines lokalen Minimums hindeutete. Der Unterschied in der Struktur, vor und nach der Minimierung, war mit einem RMSD Wert von 0.295 Å sehr gering. Eine Überprüfung der für die Arbeit wichtigen Rezeptorbindungsdomäne des Proteins und der Sialinsäure zeigte kaum eine Veränderung in Bezug auf Position und Konformation der Strukturen (Abbildung 11).

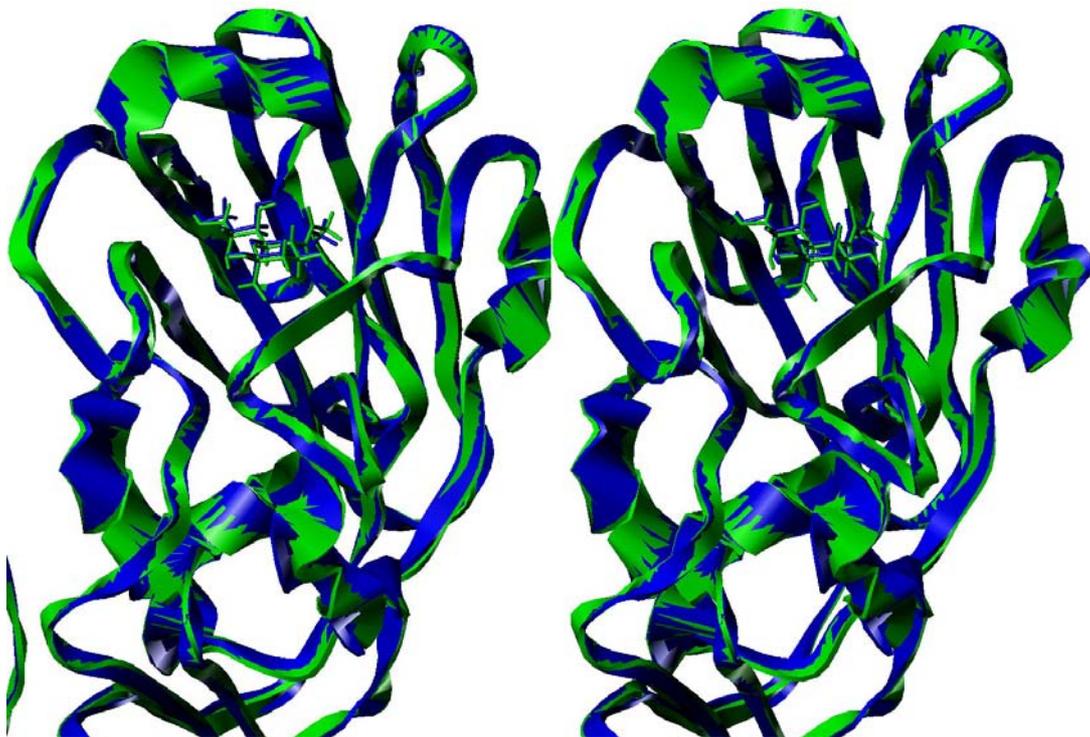


Abbildung 11: Darstellung der Rezeptorbindungsdomäne des H5 mit der bindenden Sialinsäure. Die Struktur vor der Minimierung ist in grün, die nach der Minimierung in blau dargestellt. (Darstellungsform: Protein: *ribbon/helix*, Neu5Ac: *capped sticks, crossed-eye Modus*)

4.2 Überprüfung des SPR-Systems für das H5 Protein

Wie bereits im Abschnitt 2.2 beschrieben, ist das Oberflächen-Plasmonen-Resonanz (*surface-plasmon-resonance* (SPR)) Experiment eine sehr empfindliche und schnelle Methode, um die Bindungsaffinität und -kinetik von Ligand-Rezeptor-Systemen zu bestimmen. Für die SPR-Studien kamen zwei Möglichkeiten bezüglich der zu immobilisierenden Spezies in Betracht. In der Literatur sind sowohl Systeme bekannt, bei denen das Hämagglutinin²⁹ als auch bei denen ein Ligand (sialinsäurehaltiges Glycoprotein)⁵⁶ immobilisiert wurden. Im Falle einer Ligandimmobilisierung führt das Hämagglutinin ($M \sim 72$ kDa) als Analyt zu sehr

hohen RU-Antworten und damit zu einem guten Signal-Rausch Verhältnis. Im umgekehrten Fall ist im Bereich niedermolekularer Liganden ($M = 300-1000 \text{ g/mol}$) die SPR-Antwort deutlich geringer und damit das Signal-Rausch-Verhältnis schlechter. Allerdings müssten geeignete Modifikationen von Sialinsäureliganden für die Immobilisierung gefunden werden. Des Weiteren ist das bei jeder Messung verbrauchte Hämagglutinin schwierig zurück zu gewinnen. Zusätzlich kann, im Falle der Immobilisierung des Kohlenhydrates, während der Messung ein so genanntes *rebinding* stattfinden, das die K_D Werte bis zu 10000fach verfälscht. Daher stellte sich die Immobilisierung des Proteins als praktikabler, günstiger und für die Messung genauer heraus.

4.2.1 Überprüfung des SPR-Systems an bekannten Sialinsäureanaloga

Für die Bestimmung der Bindungsaffinität potentieller Liganden wurden zunächst bekannte Binder des Hämagglutinins, das α -Methylglycosid der Sialinsäure (Neu5Ac α 2Me) **5**, und die α 2,3-Sialyllactose **6**, auf ihre Affinität zum H5 hin untersucht. Die Messungen wurden mit HBS-P als Laufpuffer an einem Biacore T100 durchgeführt.

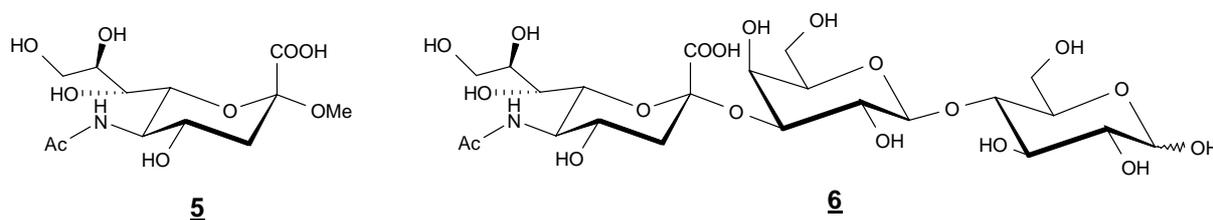


Abbildung 12: Literaturbekannte Binder des Hämagglutinins, das Neu5Ac α 2Me **5** und die α 2,3-Sialyllactose **6**

Für die Belegung wurden ca. 8221 pg (114 fmol (Monomer)) des gelösten Hämagglutinins auf einen CM5 Chip immobilisiert. Anschließend wurden die beiden Referenzliganden **5** und **6** in einem ansteigenden Konzentrationsbereich von 0, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 und 2 mM, einer Assoziationszeit von 120 s und einer Dissoziationszeit von 600 s vermessen. Die Flussgeschwindigkeit für die Messung betrug 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. Eine Regeneration brauchte aufgrund der gewählten Dissoziationszeit nicht vorgenommen zu werden.

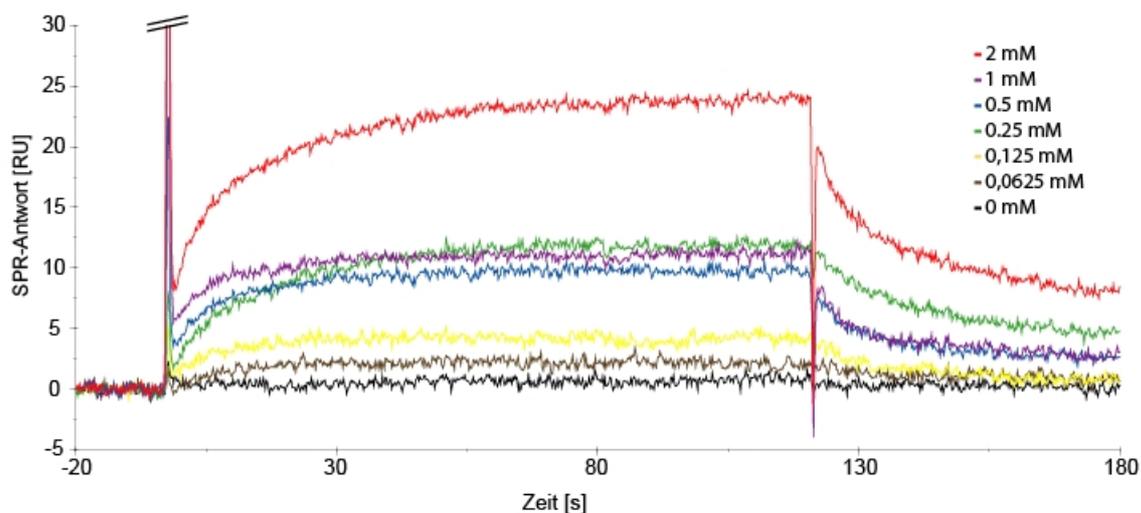


Abbildung 13: SPR-Sensorgramme der Konzentrationsreihe des Neu5Ac α 2Me 5, aufgenommen am Biacore T100.

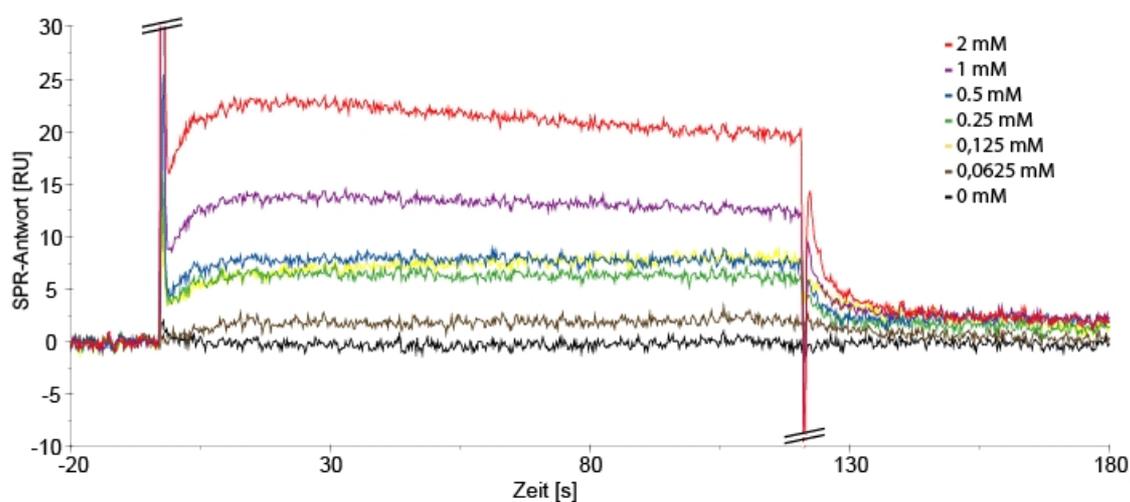


Abbildung 14: SPR-Sensorgramme der Konzentrationsreihe der α 2,3-Sialyllactose 6, aufgenommen am Biacore T100.

Wie aus Abbildung 13 und Abbildung 14 zu ersehen, sind die RU-Antworten der Verbindungen 5 bzw. 6 konzentrationsabhängig. Nach einer Assoziationszeit von 120 s ist bei allen Konzentrationen das *steady-state* erreicht. Die RU-Antworten der einzelnen Konzentrationen (4 s vor Injektionsende) wurden anschließend für den jeweiligen Liganden nach dem *one-site-binding* Modell angefitet (Abbildung 15).

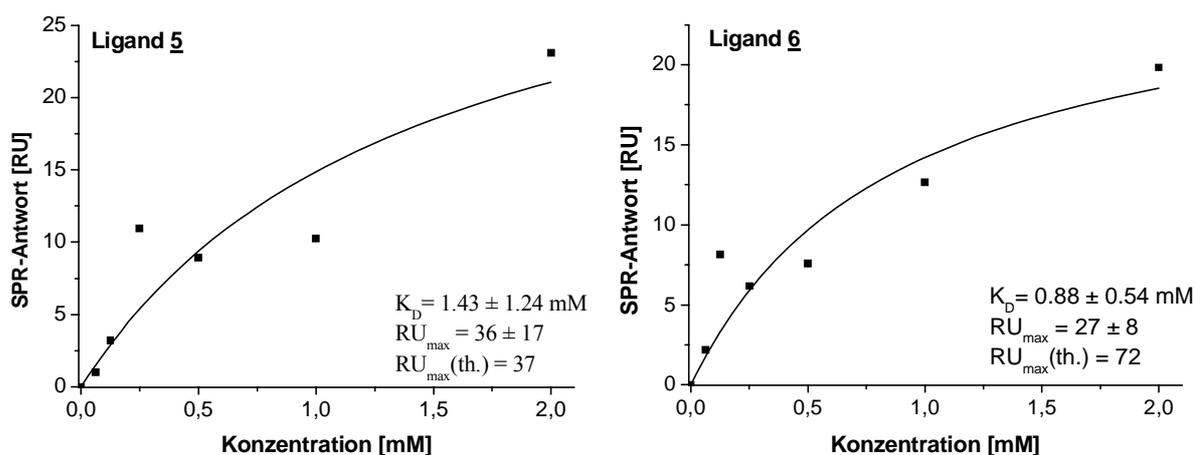


Abbildung 15: SPR-Antworten der Liganden 5 und 6 als Funktion ihrer Konzentration. Die Messdaten wurden mittels der Software Origin 6.0 an das *one-site-binding* Modell angeffittet.

Die sich nach dem *one-site-binding* Modell ergebenden Dissoziationskonstanten von $K_D = 1.43 \pm 1.24$ mM für Ligand 5 und $K_D = 0.88 \pm 0.54$ mM für Ligand 6 sind im erwarteten einstelligen, millimolaren Bereich. NMR-Bindungsstudien am Hämagglutinin H3 ergaben Dissoziationskonstanten von $K_D = 2.8$ mM für 5 und $K_D = 3.2$ mM für 6.^{34,35} Die gemessenen Werte liegen somit in der gleichen Größenordnung. Für die Verbindung 5 beträgt der $RU_{\max} = 36.1 \pm 17.0$. Dieser liegt sehr nahe am theoretischen RU_{\max} -Wert von 41.2. Im Falle des Liganden 6 beträgt der $RU_{\max} = 26.65 \pm 7.6$ gegenüber einem $RU_{\max}(\text{theoretisch}) = 80.8$. Neben der thermodynamischen Analyse der SPR-Bindungskurven kann aus den Sensorgrammen auch auf die Kinetik der Liganden geschlossen werden. Hierfür wurden die Bindungskurven der höchsten Konzentration von 5 und 6 mittels der Software Biaevaluation an die Langmuir-Gleichung angepasst, woraus sich die Geschwindigkeiten k_{on} und k_{off} ermitteln ließen, aus denen nach Gleichung 4 ebenfalls der K_D -Wert bestimmt werden konnte (Abbildung 16).

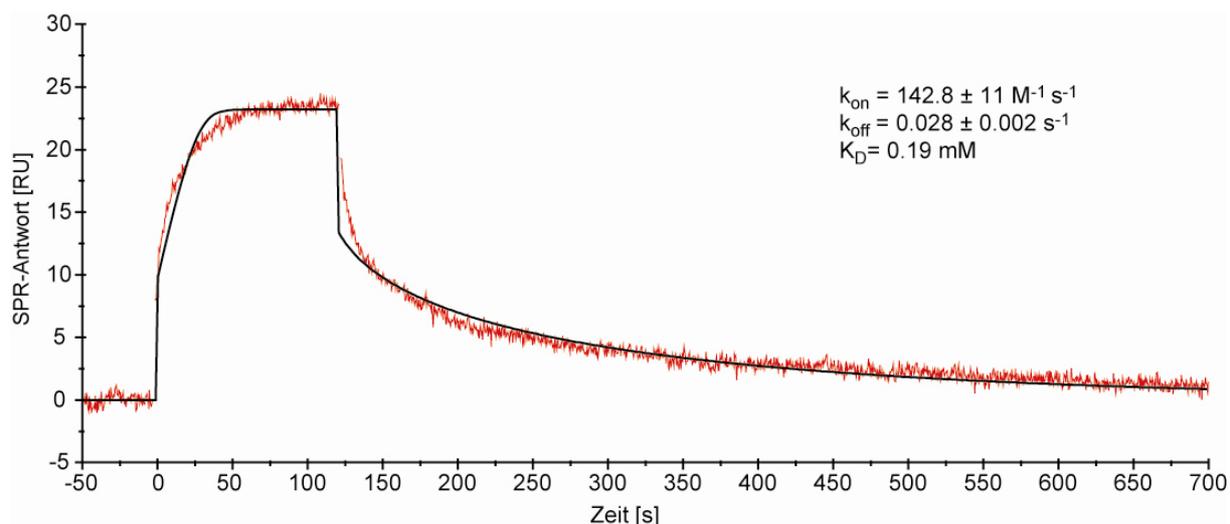


Abbildung 16: Die Anpassung des Sensorgrammes der höchsten Konzentration (2 mM) des Liganden **5** an die Langmuir-Gleichung. Hieraus lassen sich die Geschwindigkeitskonstanten k_{on} und k_{off} , und damit die Dissoziationskonstante K_D ermitteln.

Die bestimmten Geschwindigkeitskonstanten für **5** betragen für $k_{\text{on}} = 142.8 \pm 11 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und für $k_{\text{off}} = 0.028 \pm 0.002 \text{ s}^{-1}$. Aus den kinetischen Daten ergibt sich eine Dissoziationskonstante von $K_D = 0.19 \text{ mM}$. Diese liegt etwa eine Größenordnung niedriger als die der thermodynamischen Daten. Ähnlich verhielt es sich auch bei dem Liganden **6** mit $k_{\text{on}} = 1183 \pm 190 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{\text{off}} = 0.36 \pm 0.06 \text{ s}^{-1}$ und einer sich daraus ergebenden Dissoziationskonstante von $K_D = 0.03 \text{ mM}$. Der Unterschied in den Dissoziationskonstanten der thermodynamischen bzw. kinetischen Auswertung kann damit begründet werden, dass die kinetischen Ergebnisse von Liganden mit kleinem Molekulargewicht häufig sehr ungenau sind und die niedrigen Flussgeschwindigkeit von $5 \mu\text{L}/\text{min}$ zu Massentransportlimitierung unter Beeinträchtigung der *on-rate* und damit des K_D -Wertes führen kann.

4.3 Etablierung der STD-NMR-Methode für das H5-Protein

Eine zweite, sehr leistungsfähige Analysemethode von Bindungsereignissen ist das Sättigungs-Transfer-Differenz-(STD)-NMR Experiment (siehe Abschnitt 2.3). Für die STD-NMR-Untersuchungen wurde ein deuterierter PBS-Puffer mit einem $\text{pH} = 7.0$ verwendet.³⁴ Das Protein wurde in deuterierten PBS-Puffer mittels Dialysekappen überführt. Die Proteinkonzentration wurde nachfolgend mittels UV/VIS-Photometrie bestimmt.

4.3.1 Optimierung der Sättigung des H5-Proteins

Für die STD-Messungen war es zunächst erforderlich eine möglichst gute und selektive Sättigung des Proteins zu erreichen. Umso höher die Sättigung des Proteins ist, desto effizienter kann diese auf den Liganden übertragen werden. Entscheidende Parameter für die Optimierung der Sättigung sind der Einstrahlpunkt und die Sättigungsleistung.

Die Sättigungsbestimmungen wurden durch die Aufnahme von STD-NMR-Spektren am Hämagglutinin ohne Proteinunterdrückung bei unterschiedlichen Einstrahlpunkten von -1.0 ppm und -0.5 ppm und Sättigungsleistungen von 45-25 dB durchgeführt. Die jeweiligen ermittelten prozentualen Sättigungen sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Theoretisch sollte sich die Sättigung durch Spindiffusion gleichmäßig auf jedes Proton des Proteins ausbreiten. Im alkyliischen Bereich wurde das Protein jedoch stärker gesättigt. Deswegen wurde zur besseren Bestimmung der Sättigung das prozentuale Verhältnis der Integrale zwischen 0.7-1.0 ppm im *off-* bzw. *on-resonance* Spektrum verwendet.

Tabelle 1: Sättigungsbestimmung am H5-Protein durch die Variierung des Einstrahlpunktes und der Sättigungsleistung

Einstrahlpunkt [ppm]	Sättigungsleistung [dB]	Sättigung %
-1.0	45	6
-1.0	40	1
-1.0	35	17
-1.0	30	26
-0.5	30	35
-0.5	25	31

Wie zu erwarten, nimmt die Proteinsättigung mit einer sich näher an der Protonenresonanz befindenden Einstrahlfrequenz von -0.5 ppm und mit höherer Sättigungsleistung zu. Der wichtigere Faktor für eine verbesserte Sättigung des Proteins scheint in diesem Fall in einer Erhöhung der Sättigungsleistung zu liegen. Die Sättigung bei den Experimenten mit Einstrahlleistungen von 45 bzw. 25 dB weichen jedoch geringfügig in der Reihenfolge gegenüber den anderen Experimenten ab, was durch geringe Fehler in den Messungen bzw. in der Integration begründet werden kann. Ein Einstrahlpunkt von -0.5 ppm und Sättigungsleistungen von 30 oder 25 dB führten zu zufriedenstellenden Sättigungen.

4.3.2 Überprüfung der STD-NMR Methode an Neu5Ac α 2Me 5

Vorbereitend für die STD-Messungen des Liganden 5 wurden Artefaktmessungen mit der höchsten zu vermessenden Ligandkonzentration von 547.5 μ M durchgeführt. Eine Einstrahlfrequenz von -0.5 ppm und eine Sättigungsleistung von 25 dB führten nur zu geringen Artefaktsignalen (max. 1.3%). Für die STD-Titration der gepufferten H5-Proteinlösung wurden ansteigende Ligandkonzentrationen von 37.4 bis 547.5 μ M in der zu vermessenden Probe eingestellt und mit 2k *scans*, bei der höchsten Konzentration mit 1k *scans*, vermessen. Die einzelnen Messungen führten zu konzentrationsabhängigen, prozentualen STD-Antworten des Liganden bis in den oberen einstelligen Bereich. Das *off-resonance*-Spektrum und das Differenzspektrum bei der höchsten vermessenden Konzentration sind in Abbildung 17 dargestellt.

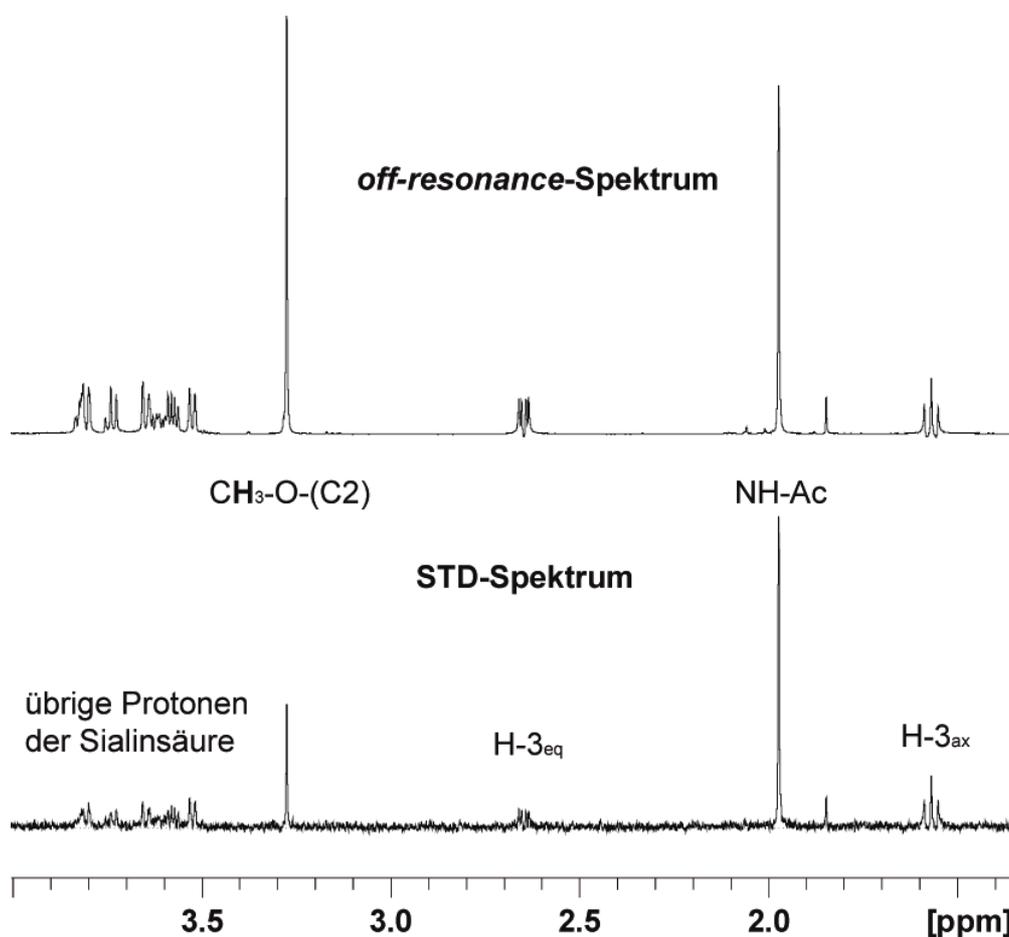


Abbildung 17: *Off-resonance*- und STD-Spektrum des Liganden 5. Im STD-Spektrum erkennt man die an der Bindung beteiligten Protonen. $c(\text{H5}) = 1.01 \mu\text{M}$, $c(\text{Neu5Ac}\alpha\text{2Me } \underline{5}) = 575 \mu\text{M}$, 700 MHz, $T = 298 \text{ K}$, $\text{sp13} = 25 \text{ dB}$, Sättigungsdauer = 2 s, Einstrahlpunkt des Sättigungspulses = -0.5 ppm. Das STD-Spektrum ist gegenüber dem *off-resonance* Spektrum um das 20fache vergrößert.

Für die Bestimmung des K_D -Wertes wurde aufgrund des besten Signal-Rausch Verhältnisses, das STD-Signal der *N*-Acetylgruppe ausgewählt. Die STD-Amplifikationsfaktoren wurden als Funktion der Konzentration an das *one-site-binding* Modell angefitet (Abbildung 18). Der sich ergebene K_D -Wert für Verbindung **5** betrug 2.78 ± 0.98 mM. Dies entspricht ziemlich genau dem K_D -Wert von 2.8 ± 0.3 mM der mittels NMR-Studien am Hämagglutinin H3 ermittelt wurde³⁴ und liegt nur geringfügig höher als die durch SPR bestimmte Dissoziationskonstante von $K_D = 1.43 \pm 1.24$ mM.

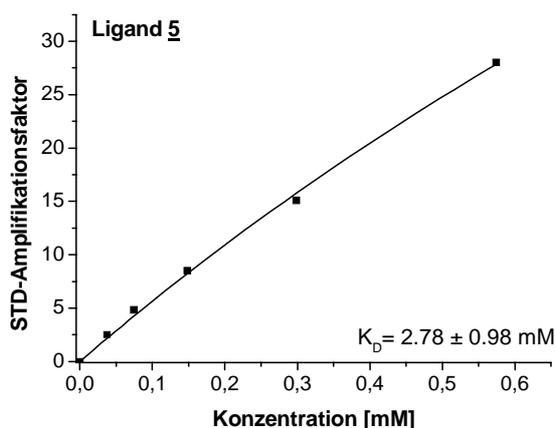


Abbildung 18: Auftragung des STD-Amplifikationsfaktors der *N*-Acetylgruppe des Liganden **5** als Funktion dessen Konzentration bei der Bindung am H5. Die einzelnen Messpunkte wurden nach dem *one-site-binding* Modell angefitet. Aus dem *fit* ergibt sich ein K_D -Wert für den Liganden **5** von $K_D = 2.78 \pm 0.98$ mM.

Aus den Daten der STD-NMR Messungen wurde zusätzlich das Bindungsepitop des Liganden **5** aufgestellt. Hierfür wurde das Proton mit dem höchsten absoluten STD-Prozent ($H-3_{ax}$) auf 100% gesetzt und die anderen Signale darauf normiert. Das so erhaltene Bindungsepitop zeigte besonders starke Wechselwirkungen des $H-3_{ax}$ und der *N*-Acetylgruppe. Die niedrigsten relativen STD-Prozente wurden für das H-8, das H-4 und die glycosidische Methylgruppe erhalten.

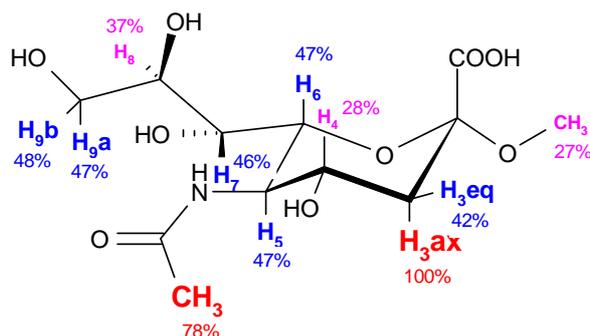


Abbildung 19: Aufgestelltes Bindungsepitop des Liganden **5**. Die relativen STD-Prozente der Protonen sind unterteilt in 100-70 % (rot), 70-40% (blau) und 40-0% (magenta) und geben die jeweilige Nähe zu Aminosäureprotonen des Hämagglutinin an. $c(\text{H5}) = 1.01 \mu\text{M}$, $c(\text{Neu5Ac}\alpha\text{2Me } \mathbf{5}) = 575 \mu\text{M}$, 700 MHz, $T = 298 \text{ K}$, $\text{sp13} = 25 \text{ dB}$, Sättigungsdauer = 2 s, Einstrahlpunkt des Sättigungspulses = -0.5 ppm.

Das erhaltene Bindungsepitop deckt sich nur teilweise mit den Daten der Röntgenstruktur. In dieser zeigten besonders die Protonen der *N*-Acetylgruppe sowie die Protonen H-4, H-7 und H-9a,b engen Kontakt zum Protein. Die hohen STD-Prozente des H-3_{ax} und die Niedrigen des H-4 weichen jedoch von den Daten der Röntgenstruktur ab. Ein möglicher Grund ist eine höhere Flexibilität des monosaccharidischen Liganden Neu5Ac α 2Me **5** in der Bindungstasche des H5 im Vergleich zur Sialinsäure des kokristallisierten Pentasaccharids der 1JSO-Struktur. Auch ist eine geringfügige Veränderung des Bindungsepitopes des monosaccharidischen Liganden **5** im Vergleich zu der Sialinsäure des Pentasaccharides aus der Kristallstruktur möglich.

4.4 Modifikationen an der Sialinsäure

4.4.1 Diskussion der Rezeptorbindungsdomäne

Für die Entwicklung potenter Sialinsäureanaloge wurden zunächst bestehende Wechselwirkungen der bindenden Sialinsäure mit den Aminosäuren des H5 überprüft, um anschließend deren Bindungsaffinität durch geeignete Modifizierungen zu erhöhen. Die *N*-Acetylgruppe der Sialinsäure liegt in der Röntgenstruktur in einer engen hydrophoben Tasche (Abbildung 20), wobei die NH-Gruppe der Sialinsäure eine H-Brücke zur Carbonylgruppe des Val 131 ausbildet. Neben diesen H-Brücken gibt es weitere von der Carboxylgruppe der Sialinsäure zum Ser 133 und Gln 222 und von den OH-Gruppen der Glycerolseitenkette des C-8 und C-9 zum Tyr 91, Gln 222 und Glu 186. Die OH-Gruppe am C-7 ist in der Röntgenstruktur zu weit von Aminosäuren entfernt, um bindende Interaktionen

einzugehen. Andere Gruppen wie die Carbonylfunktion der *N*-Acetylgruppe und das OH am C-4 zeigen aus der Bindungstasche heraus und besitzen nicht die Möglichkeit direkt mit den Aminosäuren des H5 zu interagieren.

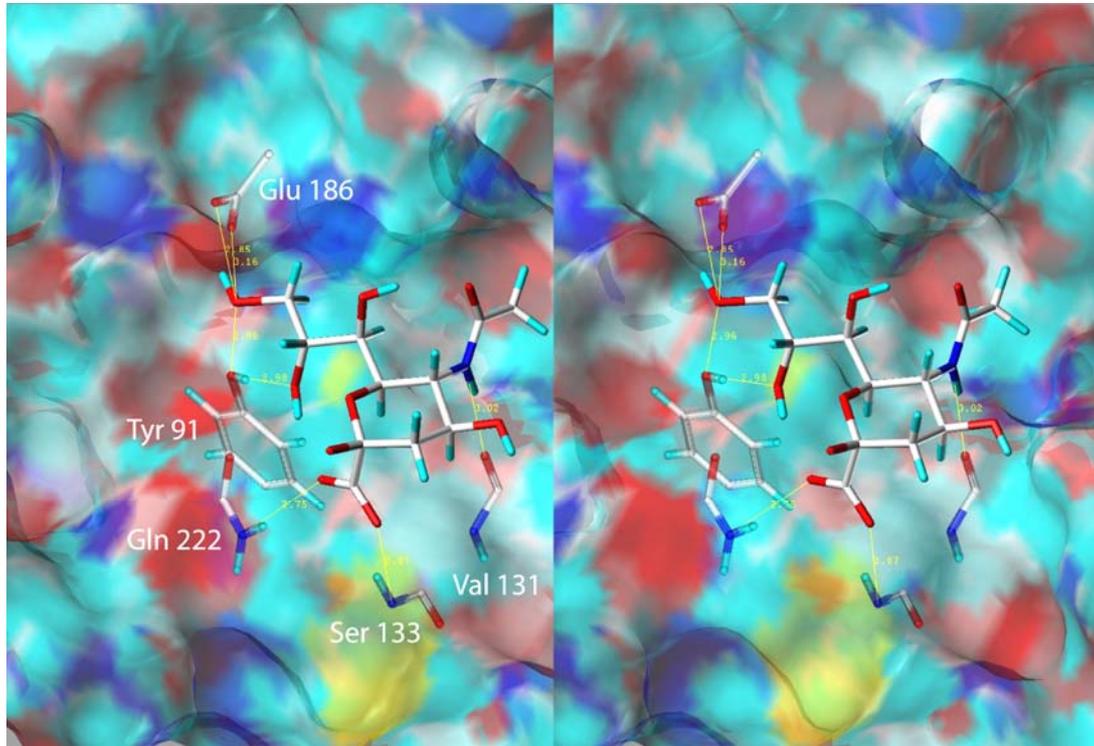


Abbildung 20: Darstellung der Sialinsäure in der Bindungstasche des Hämaggglutinins H5. Gelb dargestellt sind Wasserstoffbrückenkontakte zwischen den Schweratomen der Neu5Ac und Aminosäureatomen des Proteins. (Darstellungsform: Protein: *connolly* Oberfläche (*translucent*), Fragmente der an der Bindung beteiligter Aminosäuren: *capped sticks* (*translucent*), Neu5Ac: *capped sticks*, *crossed-eye* Modus)

Aufgrund des freien Platzes in der Bindungstasche des H5 im Bereich der Glycerolseitenkette, schien dieser Teil am vielversprechendsten für erfolgreiche Modifikationen zu sein. Versuche, wie die Substitutionen der *N*-Acetylgruppe durch andere Molekülfragmente, der Wechsel von α - zu β -glycosidischen Strukturen, oder Modifikationen an der Carboxylgruppe führten bei früheren Untersuchungen von Sialinsäureanaloga am Hämaggglutinin H3 in den meisten Fällen zu einem deutlichen Verlust oder Abbruch der Bindungsaffinität. Doch auch an der Glycerolseitenkette führten die in der Literatur bekannten Modifikationen bis jetzt, zu einer ähnlich starken oder schlechteren Bindung an das Hämaggglutinin.^{35,36}

4.4.2 Überprüfung seitenkettenverkürzter Sialinsäurederivate

Für Ligandmodifizierungen an der Glycerolseitenkette war es zunächst sinnvoll, die Wichtigkeit der ausgebildeten H-Brücken der OH-Gruppen am C-8 und C-9 in Hinblick auf die Bindung zum H5 zu überprüfen. Hierfür boten sich Sialinsäurederivate mit einfach **7** oder zweifach **8** verkürzter Glycerolseitenkette an. Für die direkte Vergleichbarkeit mit dem Referenzliganden Neu5Ac α 2Me **5** wurde ebenfalls das α -Methylglycosid der Glycane verwendet.

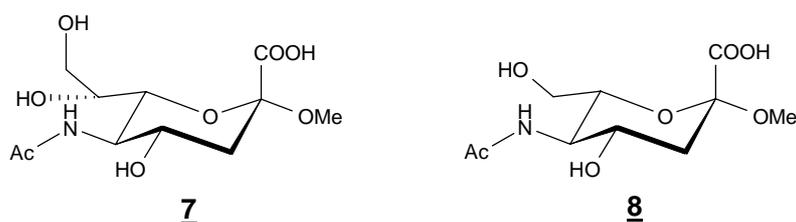


Abbildung 21: Das C-8 Konjugat **7** und das C-7 Konjugat **8** der trunkierten Sialinsäure. Die Verkürzung der Glycerolseitenkette erlaubt Rückschlüsse über die Relevanz der ausgebildeten Wasserstoffbrücken der OH-Funktionen am C-8 und C-9.

Die mittels des *docking* berechneten Bindungsenergien für Verbindung **7** und **8** zeigten eine deutliche Abnahme gegenüber dem Referenzliganden **5** auf (Tabelle 2). Insbesondere die OH-Gruppe am C-9 scheint theoretisch, durch die große Abnahme der berechneten Bindungsenergie, eine potentielle Rolle in der Bindung zum Hämagglutinin H5 zu spielen.

Tabelle 2: Die mit dem Programm Sybyl 8.0 berechneten theoretischen Bindungsenergien der einfach **7** und zweifach **8** trunkierten Sialinsäuremethylglycoside. Im Vergleich dazu ist der Referenzligand Neu5Ac α Me **5** aufgeführt.

Ligand	berechnete Bindungsenergie [kcal/mol]
5	-28.6
7	-23.9
8	-20.2

4.4.2.1 Synthese trunkiertes Sialinsäuremethylglycoside

Der erste Schritt in der Darstellung von Sialinsäurederivaten war die mehrstufige Überführung der Sialinsäure **9** in ihren entsprechenden α -Methylglycosidmethylester **13**. Dies begann mit der Umsetzung der Sialinsäure **9** im Säuren zum entsprechenden α -/ β -Anomerengemisch des Methylesters **10**.^{57,58} Anschließend wurden freie Hydroxygruppen mittels Essigsäureanhydrid und Pyridin acetyliert. Dies ergab das Produkt **11**.^{57,58} Im

Anschluss wurde die Verbindung **11** mit *in situ* hergestellten HCl, aus Acetylchlorid und Methanol in das β -Sialylchlorid **12** überführt. Die Verbindung **12** wurde bei pH = 9 mit einer methanolischen Natriummethanolatlösung umgesetzt, wodurch in einem Schritt selektiv das α -Methylglycosid gebildet und die *O*-Acetylenschutzgruppen entfernt wurden.^{59,60} Die Verbindung **13** wurde über alle Stufen in einer Ausbeute von 78% erhalten. Die direkte Verseifung von **13** mit 0.1 M Natronlauge ergab darüber hinaus den Referenzliganden **5**.

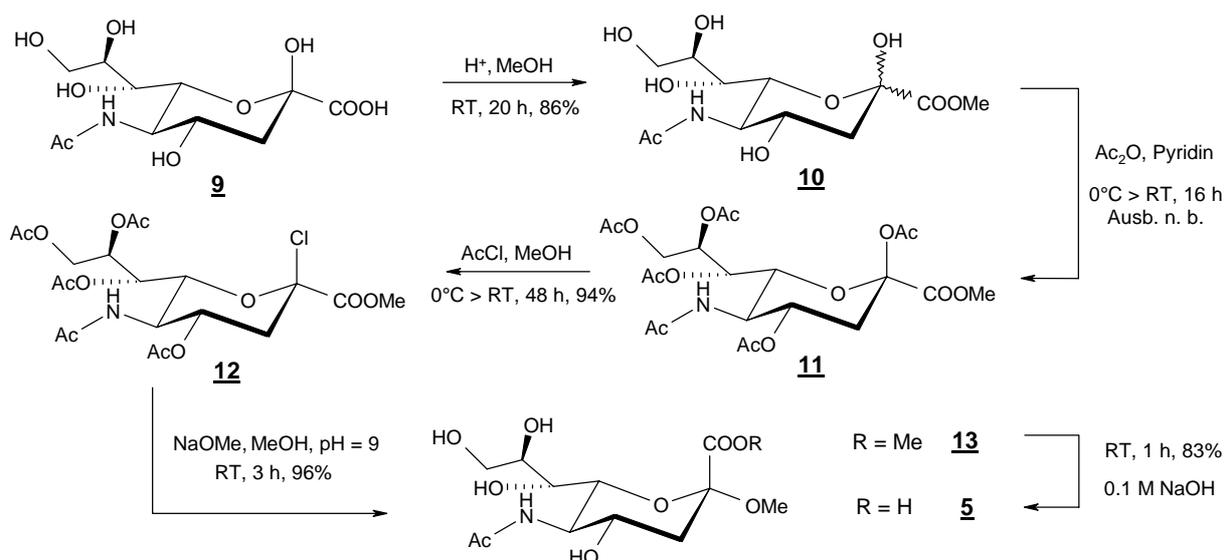


Abbildung 22: Darstellung des Methylster **13** und des Neu5Ac α 2Me **5**.

Anschließend wurden der Methylster **13** in zwei Ansätzen mittels 0.9 bzw. 2.4 Äquivalenten Natriumperodat zu den jeweiligen Aldehydhydraten **14** bzw. **15** oxidativ gespalten (Abbildung 23) und *in situ* mit Natriumcyanoborhydrid zu den entsprechenden Alkoholen **16** und **17** reduziert.⁶¹ Die Verbindung **16** und **17** wurden im Basischen zu den Liganden **7** und **8** verseift. Die Ausbeuten der Verbindung **16** von 10% bzw. von **17** mit 15% waren hinsichtlich gleicher oder analoger Verbindungen gegenüber der Literaturvorschrift allerdings sehr gering. Der Grund könnte an einem unzureichend sauren pH-Wert liegen, da Aldehyde erst unter pH = 4 optimal mit Natriumcyanoborhydrid zu den entsprechenden Alkoholen reduziert werden.⁶² Eine andere Möglichkeit zur Verbesserung der Ausbeute besteht in der Verwendung des stärkeren Reduktionsmittels Natriumborhydrid.

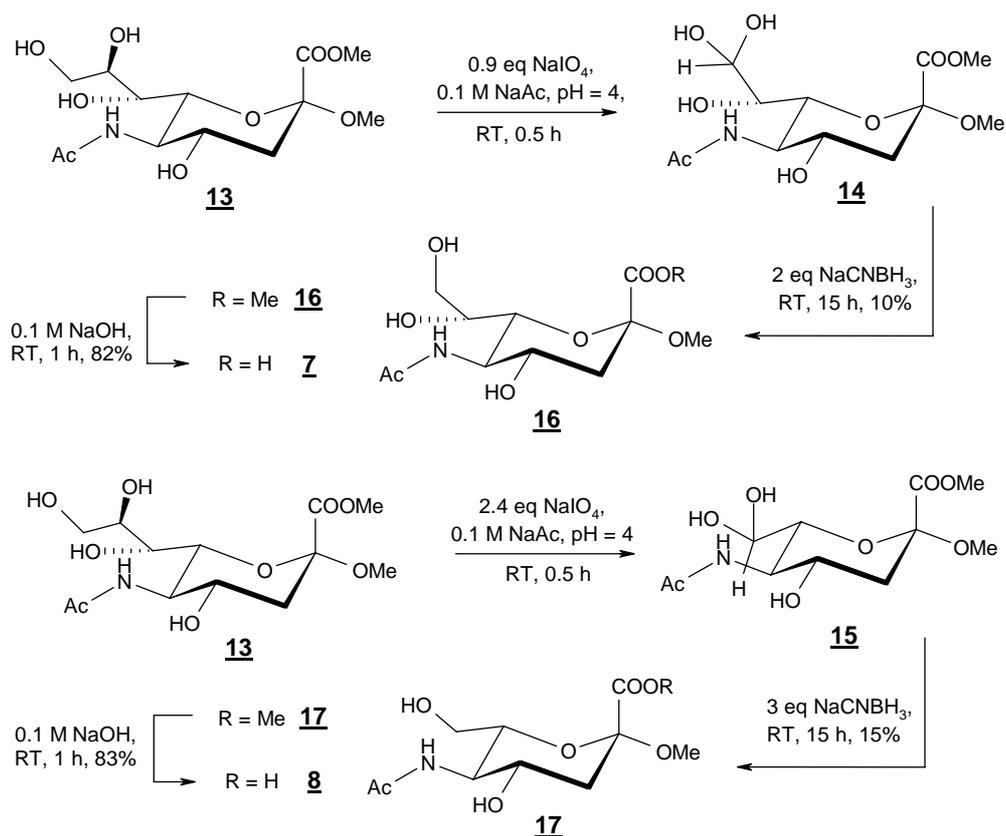


Abbildung 23: Darstellung der trunkierten Sialinsäuremethylglycoside. Die Synthese des C-8 Konjugates **7** ist oben, die des C-7 Konjugates **8** unten illustriert.

4.4.2.2 Untersuchung der trunkierten Sialinsäuremethylglycoside mittels SPR

Die Verbindungen **7** und **8** wurden anschließend auf ihre Bindungsaffinität zum H5 mittels SPR untersucht. Hierbei zeigten beide Liganden eine Bindung zum H5. Die aus dem *one-site-binding* Modell ermittelten Bindungskonstanten betragen für **7** $K_D = 1.28 \pm 0.18 \text{ mM}$ und für **8** $K_D = 1.35 \pm 0.18 \text{ mM}$ (Abbildung 24).

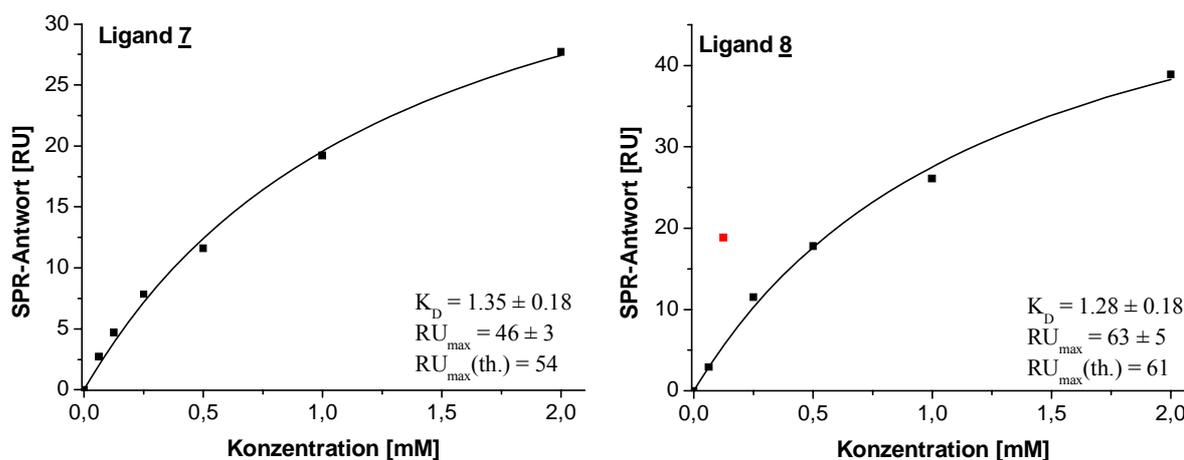


Abbildung 24: SPR-Antworten der Liganden 7 und 8 als Funktion ihrer Konzentration. Die Messdaten wurden mittels der Software Origin 6.0 an das *one-site-binding* Modell angefitet. Der rot markierte Datenpunkt des Liganden 8 wurde aufgrund seiner großen relativen Abweichung nicht berücksichtigt.

Dieses Ergebnis ist überraschend, da die Bindungskonstanten der Verbindungen 7 und 8 nahezu identisch mit dem Referenzliganden Neu5Ac α 2Me 5 ($K_D = 1.43 \pm 1.24$ mM) sind und die *docking*-Studien auf eine deutliche Abnahme der theoretischen Bindungsaffinität im Vergleich zum Referenzliganden 5 hindeuteten. Die Ergebnisse für den Liganden 7 decken sich in etwa mit denen aus der Literatur. Dort führte ein zu 7 ähnliches 9-Desoxyderivat des Neu5Ac α 2Me zu keiner Abnahme der Bindungsaffinität zum H3, verglichen mit dem Neu5Ac α 2Me 5. Demgegenüber führte die Modifikation des Neu5Ac α 2Me zum Liganden 8 zu einer Abnahme der Bindungsaffinität zum H3 um den Faktor 23.³⁶ Die Ergebnisse ließen darauf schließen, dass für die Bindung zum Hämagglutinin H5, die ausgebildeten H-Brücken durch die OH Gruppen des Neu5Ac α 2Me am C-8 und C-9 nicht essentiell sind. Aufgrund dessen schienen vor allem Modifikationen unter Beibehaltung der C-7 OH-Funktion vielversprechend.

4.4.3 Amino- und Amido-Konjugate der trunkierten Sialinsäure

4.4.3.1 Design und molecular modeling

Ausgehend von den vorangegangenen Untersuchungen wurden computergestützt Liganden mit Modifikationen an der Glycerolseitenkette des Methylglycosides 13 entworfen. Dabei wurden verschiedene Motive zur Steigerung der Bindungsaffinität berücksichtigt. Diese sind in Abbildung 25 zu sehen. Ein aussichtsreiches Ziel bestand zum einen in der Etablierung von

Wechselwirkungen mit der Glu 186 der RBD. Zu dessen Carboxylfunktion könnte eine Salzbrücke durch eine Amino- oder Guanidiniumgruppe ausgebildet werden. Ein weiteres Motiv war der freie hydrophobe Bereich der Bindungstasche. Unpolare Gruppen könnten diesen optimal ausfüllen. Außerdem wäre durch die Verdrängung des wahrscheinlich vorliegenden Hydratwassers in der RBD (in der Röntgenstruktur sind dort zwei Wassermoleküle dargestellt), ein zusätzlicher entropischer und enthalpischer Gewinn an Bindungsenergie zu erwarten. Ein drittes potentiell Ziel ist das sich in der Nähe der Bindungstasche befindliche Lys 218. Eine sich in Reichweite befindende Carboxylgruppe könnte eine Salzbrücke zur Aminogruppe des Lysins ausbilden.

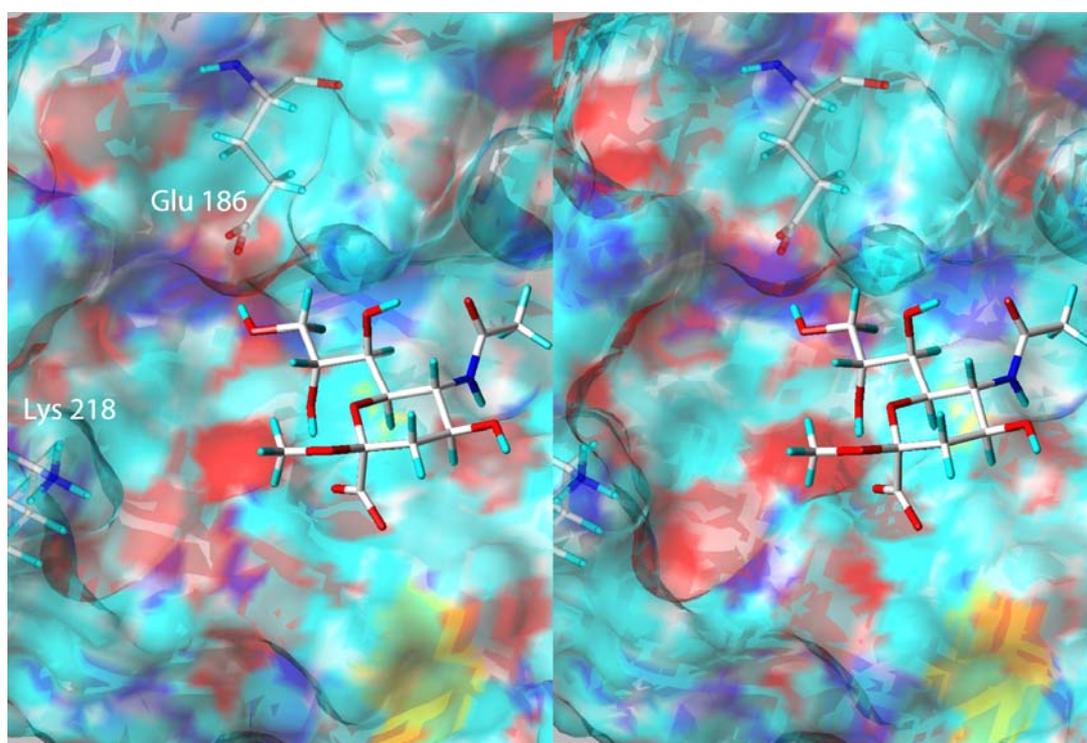


Abbildung 25: Darstellung des Glu 186 und des Lys 218 in der Bindungstasche des H5, zu denen zusätzliche Interaktionen durch modifizierte Sialinsäure-Liganden aufgebaut werden könnten. Sowohl die Glutaminsäure, wie auch das Lysin sind potentielle Ziele zur Ausbildung von starken ionischen Wechselwirkungen oder Wasserstoffbrücken. Zwischen den beiden Aminosäuren befindet sich ein relativ hydrophober Bereich, welcher durch unpolare Gruppen optimal ausgefüllt werden könnte. (Darstellungsform: Protein: *connolly* Oberfläche (*translucent*), sowie *capped sticks* (*translucent*), Neu5Aca2Me 5: *capped sticks*, *crossed-eye* Modus)

Unter Berücksichtigung dieser Motive wurden entsprechend modifizierte Liganden entworfen. Aminokunjugate der trunkierten Sialinsäure stellten hierbei eine synthetisch praktikable Verbindungsklasse dar. Hierdurch konnten entsprechende funktionelle Gruppen zur Ausbildung der angesprochenen Interaktionen an Sialinsäureanaloga etabliert werden.

Aussichtsreiche mittels des *molecular modelings* entworfene C-8 Aminokonjugate sind in Abbildung 26 dargestellt.

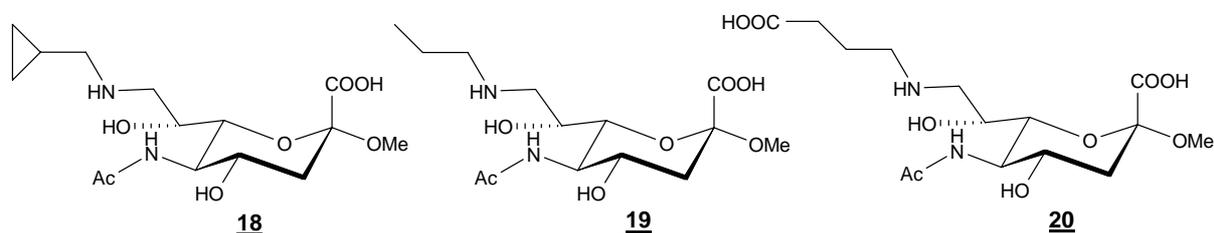


Abbildung 26: Mit der Software Sybyl 8.0 entworfene C-8 Aminokonjugate der trunktierten Sialinsäure. Die Modifikationen an der Glycerolseitenkette zielen auf zusätzliche Interaktionen in der Bindungstasche des Hämagglutinins H5.

Alle drei Verbindungen nutzen den hydrophoben Teil der Bindungstasche durch ihren Alkylanteil in der Seitenkette optimal aus. Der Ligand **18** ist gegenüber den anderen beiden Liganden allerdings durch eine Cyclopropylgruppe sterisch anspruchsvoller und rigider. Trotz dessen hat die Cyclopropylgruppe genügend Platz im hydrophoben Bereich der Bindungstasche (Abbildung 27). Die Aminofunktion am C-8 befindet sich bei allen drei Liganden im Abstand einer Salzbrücke von 2.8-3.0 Å zur Carboxylfunktion des Glu 186.

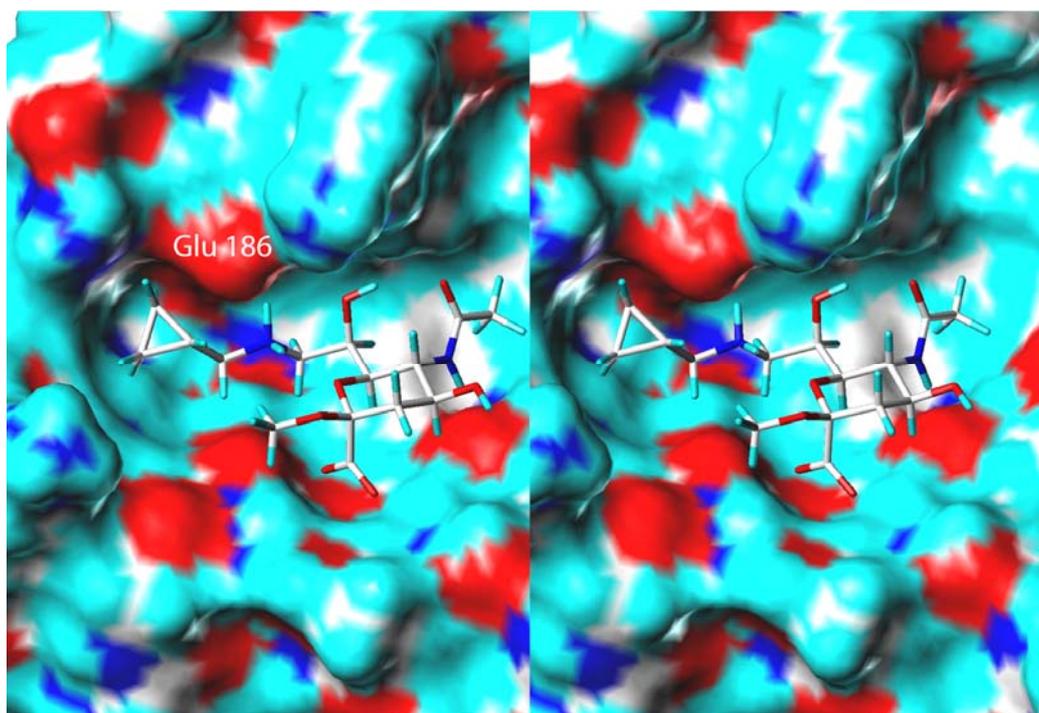


Abbildung 27: Darstellung des Liganden **18** in der Bindungstasche des H5 nach der Minimierung. Die positiv geladene Aminofunktion des Liganden befindet sich in einem Abstand von 2.8 Å zur Carboxylgruppe der Glutaminsäure 186 des H5. Der Cyclopropylrest füllt die hydrophobe Tasche optimal aus. (Darstellungsform: Protein: *connolly* Oberfläche, Ligand: *capped sticks, crossed-eye* Modus)

Die Carboxylfunktion von Ligand **20** könnte mit einem Abstand von $\sim 3 \text{ \AA}$ zusätzlich Interaktionen mit der Aminofunktion der flexiblen Seitenkette des Lys 218 ausbilden (Abbildung 28).

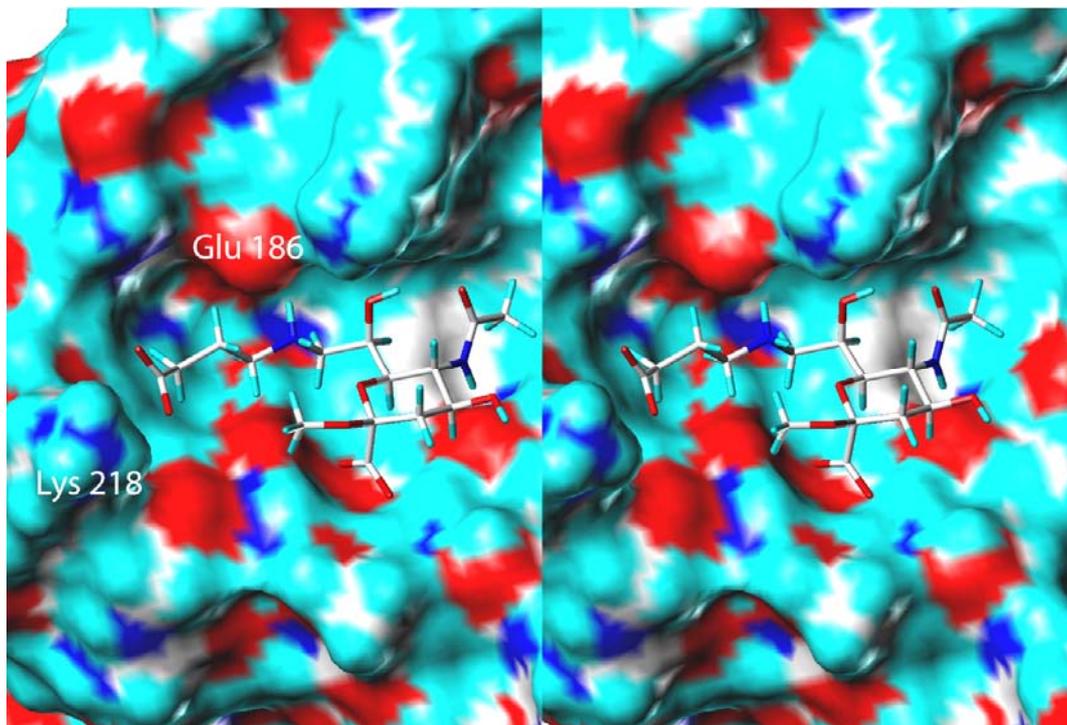


Abbildung 28: Darstellung des Liganden **20** in der Bindungstasche des H5 nach der Minimierung. Die positive geladene Aminofunktion des Liganden befindet sich in einem Abstand von 2.9 \AA zum Carboxylsauerstoff der Glutaminsäure 186 des H5. Die endständige Carboxylgruppe könnte zusätzlich eine Salzbrücke zur Aminogruppe des Lysins 218 aufbauen. (Darstellungsform: Protein: *connolly* Oberfläche, Ligand: *capped sticks*, *crossed-eye* Modus)

Neben den C-8 Konjugaten wurden ebenfalls C-7 Aminokonjugate entworfen. Diese erlaubten den Einbau sterisch anspruchsvollerer Aromaten, die in dem hydrophoben Teil der Bindungstasche so genügend Platz hatten.

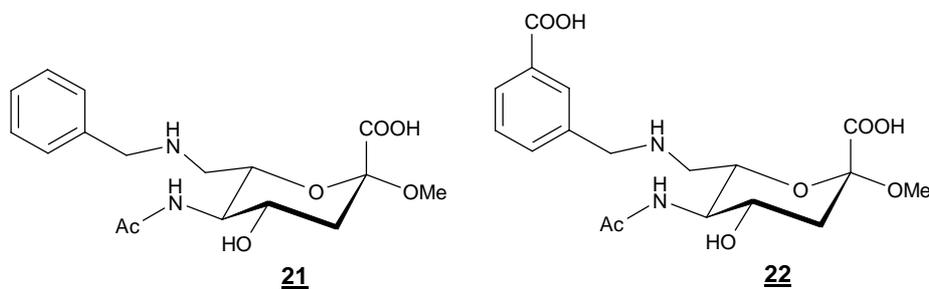


Abbildung 29: Mit der Software Sybyl 8.0 entworfene C-7 Aminokonjugate der trunkierten Sialinsäure.

Während der Ligand **21** nur zusätzliche hydrophobe Kontakte in der RBD nutzt, zielt die Carboxylgruppe des Liganden **22** ebenfalls auf die Ausbildung einer Salzbrücke zum Lys 218 (Abbildung 30).

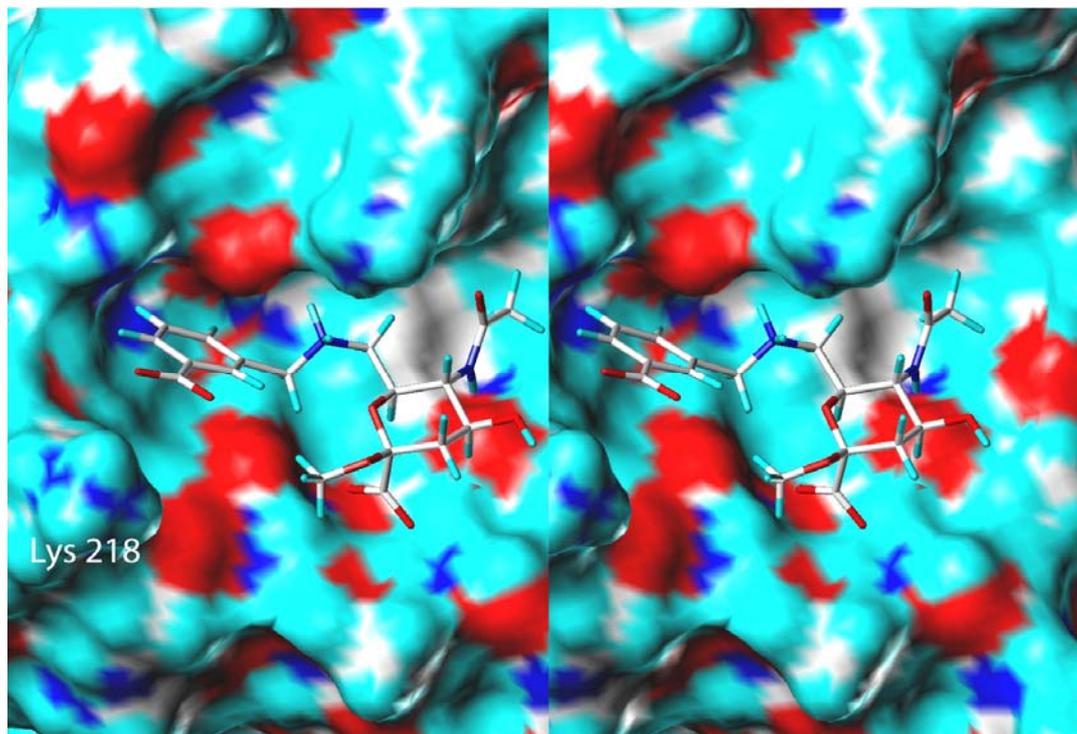


Abbildung 30: Darstellung des Liganden **22** in der Bindungstasche des H5 nach der Minimierung. Die endständige Carboxylgruppe könnte eine ionische Wechselwirkung zur Aminogruppe des Lys 218 aufbauen. (Darstellungsform: Protein: *connolly* Oberfläche, Ligand: *capped sticks*, *crossed-eye* Modus)

Neben den C-8 Aminokonjugaten kamen ebenfalls C-8 Amidkonjugate der trunkierten Sialinsäure in Betracht. Die Amidfunktion ist zum einen rigider als die Aminofunktion und zum anderen besitzt sie aufgrund ihres weniger polaren Charakters bessere pharmakologische Eigenschaften. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde das zur Verbindung **19** analoge Amidkonjugat **23** ausgewählt.

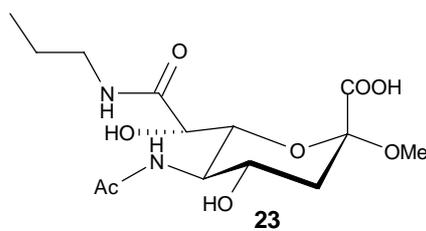


Abbildung 31: Entworfenes C-8 Amidkonjugat **23** der trunkierten Sialinsäure als Analogon zum C-8 Aminokonjugat **19**.

Anschließend wurden die entworfenen Liganden mit der *docking*-Methode auf ihre berechnete relative Bindungsenergie hin überprüft. Hierbei stellte sich insbesondere bei den C-8 Aminokonjugaten der trunkierten Sialinsäure in allen Fällen eine theoretische Steigerung der Bindungsaffinität gegenüber dem Referenzliganden Neu5Ac α 2Me **5** heraus, wobei für die Verbindung **20** (Tabelle 3) die beste Bindungsenergie berechnet wurde. Die beiden C-7 Aminokonjugate zeigten nur im Fall des Liganden **22** eine Verbesserung der berechneten Bindungsenergie gegenüber dem Referenzliganden **5**. Sowohl bei den C-8 als auch bei den C-7 Aminokonjugaten scheint somit theoretisch vor allem ein Salzbrückenkontakt zum Lys 218 durch eine Carboxylgruppe einen großen Beitrag zur Bindung zu leisten. Das C-8 Amidokonjugat **23** konnte im Vergleich mit den anderen Verbindungen nur eine relativ geringe Verbesserung der theoretischen Bindungsaffinität gegenüber dem Referenzliganden **5** aufweisen.

Tabelle 3: Die mit dem Programm Sybyl 8.0 berechneten theoretischen Bindungsenergien der C-8 Aminokonjugate **18**, **19**, **20** und C-7 Aminokonjugate **21**, **22** und des C-8 Amidokonjugates **23** des Neu5Ac α 2Me **5**.

Ligand	berechnete Bindungsenergie [kcal/mol]
5	-28.6
18	-30.8
19	-30.7
20	-32.7
21	-27.7
22	-32.6
23	-29.8

4.4.3.2 NMR-spektroskopische Untersuchung der Periodatspaltung des Methylesters **13**

Durch die geringen Ausbeuten bei der Synthese der trunkierten Sialinsäurederivate **7** und **8** und bekannten Schwierigkeiten bei der reduktiven Aminierung von Aldehydanaloga der Sialinsäure^{63,64} wurde vorbereitend für die Synthesen der Amino- und Amidokonjugate die Periodatspaltung des Methylesters **13** untersucht. Dies sollte Aufschluss über die Quantität der für die reduktive Aminierung eingesetzten Edukte geben und zu einer eventuellen Verbesserung der Reaktionsbedingungen führen. Die Glycerolseitenkette des Methylesters **13** kann zweimal nacheinander oxidativ gespalten werden. In Abbildung 32 ist die Reaktionskaskade vereinfacht illustriert.⁶⁵

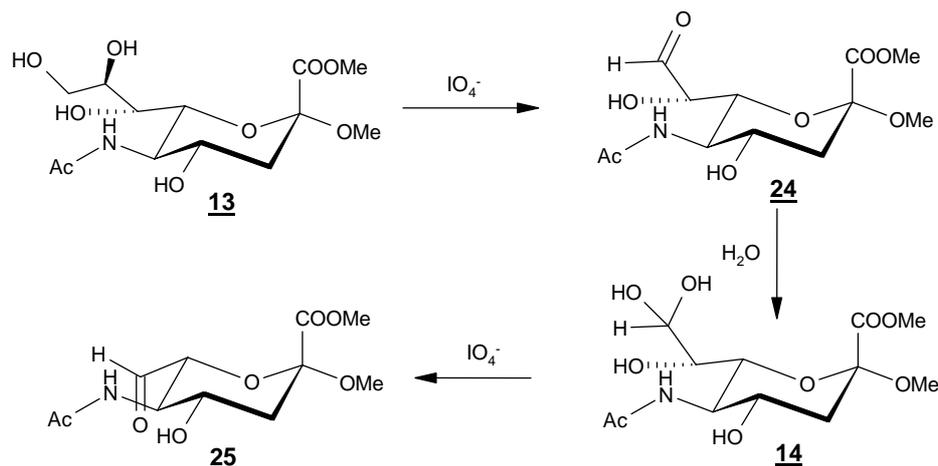


Abbildung 32: Vereinfachte Illustrierung der Periodatspaltung von **13** zum einfach **24** oder zweifach **25** verkürzten Aldehyd der trunkierten Sialinsäure.

Während bei Anwendung von 2 eq NaIO_4 das Methylglycosid **13** vollständig zum C-7 Aldehyd **25** umgesetzt wird, ist die selektive Darstellung des C-8 Aldehydes **24** durch die Zugabe von 1 eq NaIO_4 aufgrund der Weiterreaktion zum C-7 Aldehyd nicht möglich. Es wird hierbei ein Gemisch aus Edukt, C-8 und C-7 Aldehyd erhalten. Somit wurde als erstes überprüft, wie hoch der Anteil am C-8 Aldehyd in der Reaktionslösung durch Zugabe von 0.8 eq, 1 eq und 1.2 eq NaIO_4 ist. Hierzu wurden zu einer Lösung von **13**, gelöst in D_2O schrittweise NaIO_4 , gelöst in D_2O , zugegeben. Die Reaktion wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie verfolgt. Hierbei stellte sich heraus, dass die Reaktion sehr schnell verlief, da bereits das jeweils erste Spektrum (aufgenommen ca. 3 min nach Zugabe) einen quantitativen Umsatz durch das zugegebene Periodat aufzeigte. Die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren des jeweiligen H-3_{eq} der Aldehydanaloga und des Eduktes **13** sind in Abbildung 33 zu sehen. Die Aldehyde lassen sich im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum aufgrund der chemischen Verschiebung als entsprechende Hydrate deuten. Eine mögliche intermolekulare Hemiacetalbildung im Falle der Verbindung **24** (C-4 Sauerstoff mit dem C-8) ist auszuschließen, da dies mit einer Konformationsänderung des Kohlenhydrates einhergehen müsste. Dies hätte sich in dem Verlust der diaxialen Kopplungskonstante von ~ 12 Hz zwischen dem H-3 und H-4 geäußert, was jedoch nicht beobachtet wurde.

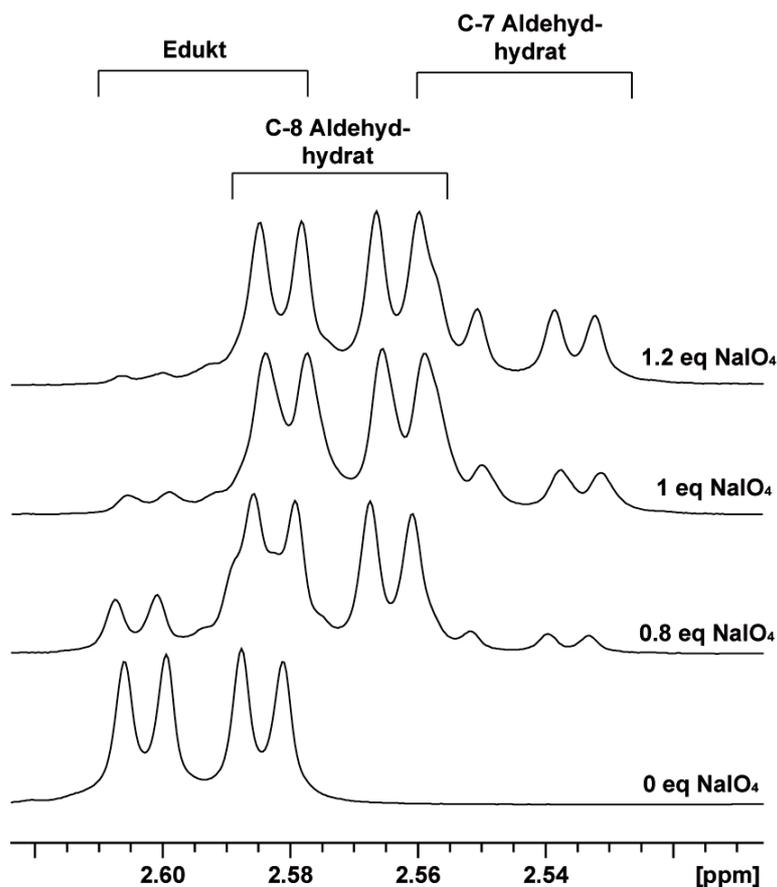


Abbildung 33: Untersuchung der Periodatspaltung am Methylglycosid **13**. Abgebildet ist das jeweilige $H-3_{eq}$ im 1H -NMR-Spektrum nach Zugabe unterschiedlicher Äquivalente Natriumperiodat.

Aus den Verhältnissen der Teilintegrale der $H-3_{eq}$ -Protonen des Eduktes **13** und dem C-7 Aldehydhydrat **15** zu dem Integralgemisch aller $H-3_{ax}$ -Protonen, kann man auf die Verbindungsanteile im Reaktionsgemisch schließen. Der Anteil des C-8 Aldehydhydrates ist dabei nach Zugabe von einem Äquivalent $NaIO_4$ mit 72% am höchsten. Anschließend wurde überprüft, ob der Anteil des C-8 Aldehydes durch kontinuierliche Einstellung des pH-Wertes auf $pH = 7$ während der Periodatspaltung oder durch Pufferung der Reaktionslösung beeinflusst werden kann. Die entsprechenden 1H -NMR-Spektren sind in Abbildung 34 zu sehen.

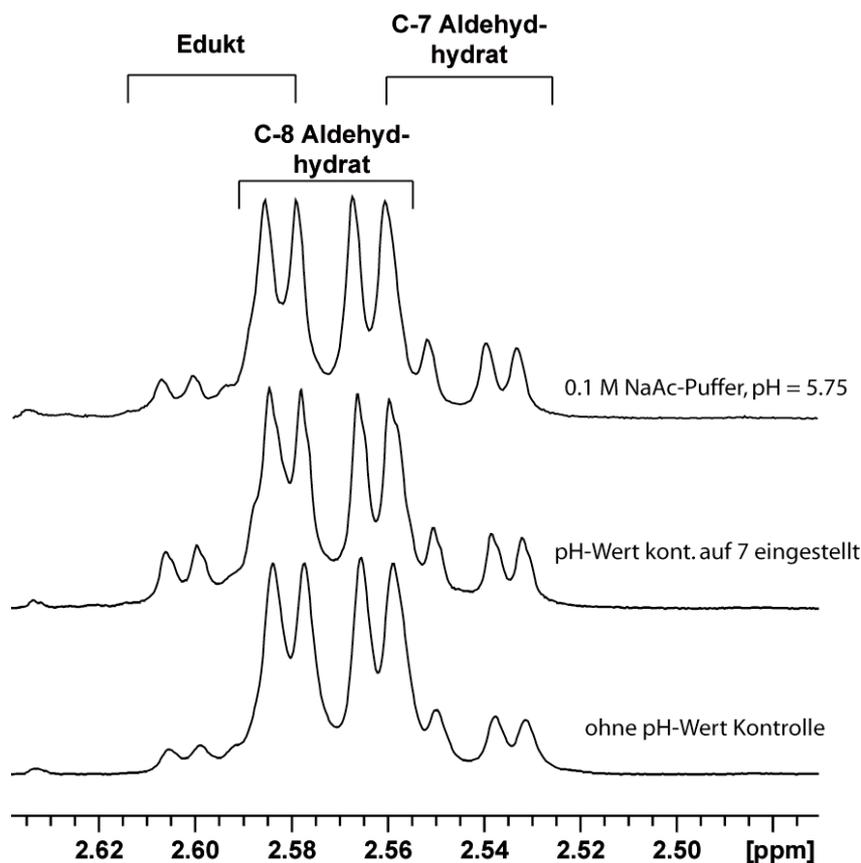


Abbildung 34: Untersuchung der Periodatspaltung am Methylglycosid **13**. Abgebildet ist das jeweilige H-3_{eq} im ¹H-NMR-Spektrum nach Zugabe eines Äquivalentes Natriumperiodat. Eine kontinuierliche pH-Wert Korrektur auf pH = 7, während der Zugabe von NaIO₄ oder eine Pufferung der Lösung mittels 0.1 M Acetatpuffers pH = 5.5 führt nicht zu einem höheren Anteil des C-8 Aldehydhydrates in der Reaktionslösung.

Die Anteile des Eduktes, des C-8 Aldehydhydrates und des C-7 Aldehydhydrates in der Reaktionslösung sind bei allen drei Versuchen relativ ähnlich. Tendenziell nimmt der Anteil des C-8 Aldehydhydrates sogar leicht ab wenn man eine pH-Wert-Korrektur auf pH = 7 vornimmt (62%) oder die Reaktionslösung bei pH = 5.5 gepuffert wird (66%).

4.4.3.3 Synthese von C-7 Aminokonjugaten der trunkierten Sialinsäure

Die Darstellung der zweifach verkürzten Aminokonjugate der Sialinsäure begann mit der oxidativen Spaltung von **13** mit 2.2 eq Natriumperiodat. Das Rohprodukt von **15** wurde ohne weitere Reinigung für die nächste Reaktion eingesetzt. Die anschließende reduktive Aminierung von **15** mit Benzylamin **26** in methanolischem Acetatpuffer pH = 5 und Natriumcyanoborhydrid als Reduktionsmittel ergab das Produkt **27**. Durch die basische Verseifung von **27** wurde der Ligand **21** erhalten.

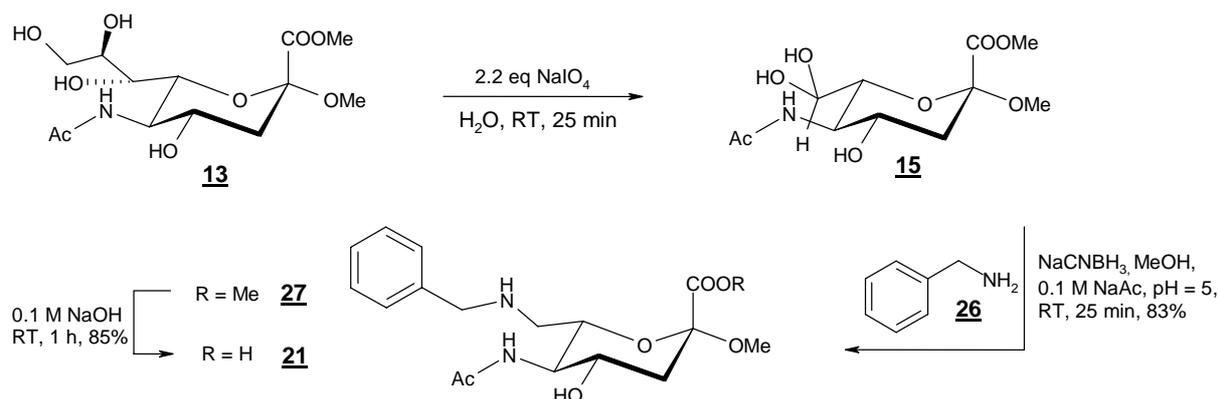


Abbildung 35: Synthese des C-7 Aminokonjugates **21** der trunkierten Sialinsäure.

Durch eine analoge reduktive Aminierung des Aldehydhydrates **15** mit 3-Aminomethylbenzoesäure **28** konnte das Amin **29** erhalten werden. Die nachfolgende basische Verseifung ergab den Liganden **22**.

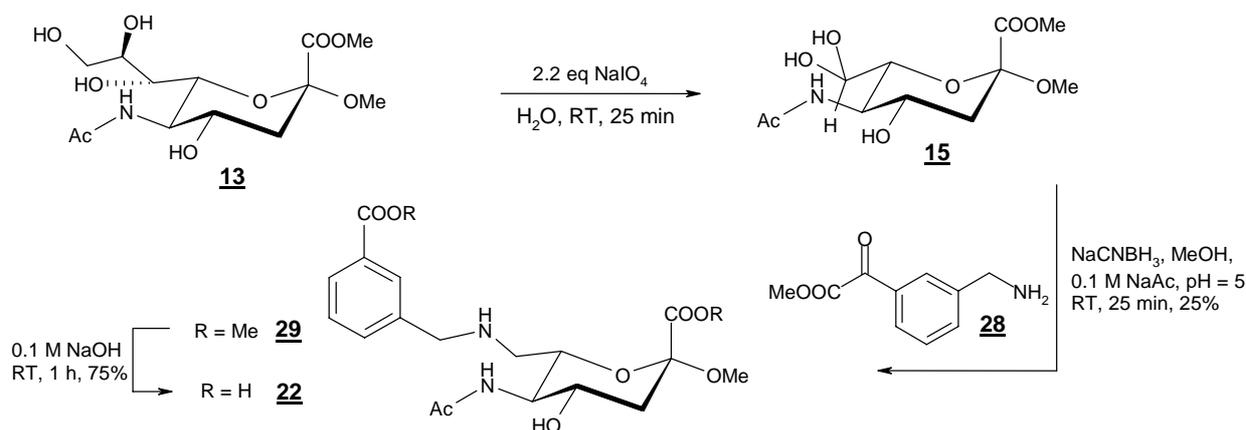


Abbildung 36: Synthese des C-7 Aminokonjugates **22** der trunkierten Sialinsäure.

Die Ausbeuten des Aminokonjugates **21** von 83% sind im Gegensatz zum Analogon **22** mit 25% deutlich höher. Ein Grund für die geringere Ausbeute von **22** könnte in der unterschiedlichen Nucleophilie des Aminostickstoffes der Amine **26** und **28** liegen. Der pH-Wert von $\text{pH} = 5.0$ scheint für die reduktive Aminierung mit Benzylamin in einem vorteilhaften Bereich zu liegen. Demgegenüber ist dieser pH-Wert für die reduktive Aminierung mit 3-Aminomethylbenzoesäure vermutlich zu niedrig, um eine optimale Nucleophilie des Aminostickstoffes für die vorgelagerte Bildung des Imins zu gewährleisten.

4.4.3.4 Synthese von C-8 Aminokonjugaten der trunkierten Sialinsäure

Für die Darstellung der C-8 Aminokonjugate der Sialinsäure wurde der Methylester **13** im

ersten Schritt mit einem Äquivalent Natriumperiodat oxidativ gespalten. Die anschließende reduktive Aminierung zu C-8 Aminokonjugaten führte an ähnlichen Aminokonjugaten nur zu sehr geringen und nicht reproduzierbaren Ausbeuten.⁶³ Deswegen wurde die reduktive Aminierung an C-8 Aldehydhydraten, unter Schlenk-Bedingungen und mit Molsieb 3 Å durchgeführt, um die Bildung des vorgelagerten Imins zu begünstigen. Des Weiteren wurde der pH-Wert im Verlauf der Reaktion regelmäßig überprüft und gegebenenfalls auf pH = 7 korrigiert, da das pH-Optimum für die reduktive Aminierung zwischen pH = 6-8 liegt.⁶²

Durch die Umsetzung des Rohproduktes **14** mit den Aminen **30** bzw. **32** und Natriumcyanoborhydrid konnten erfolgreich die entsprechenden C-8 Aminokonjugate mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie identifiziert werden. Allerdings war in diesem Schritt eine Reinsolierung von **31** und **33** nicht möglich, da im Eluenten für die Säulenchromatographie notwendiges Triethylamin selbst durch mehrmalige Codestillation mit Toluol und Trocknung nicht abgetrennt werden konnte. Eine Abtrennung des Triethylamins durch Gelpermeationschromatographie an Biogel P2 war ebenfalls nicht möglich. Die basische Verseifung von **31** und **33** ergab die Liganden **18** und **19**.

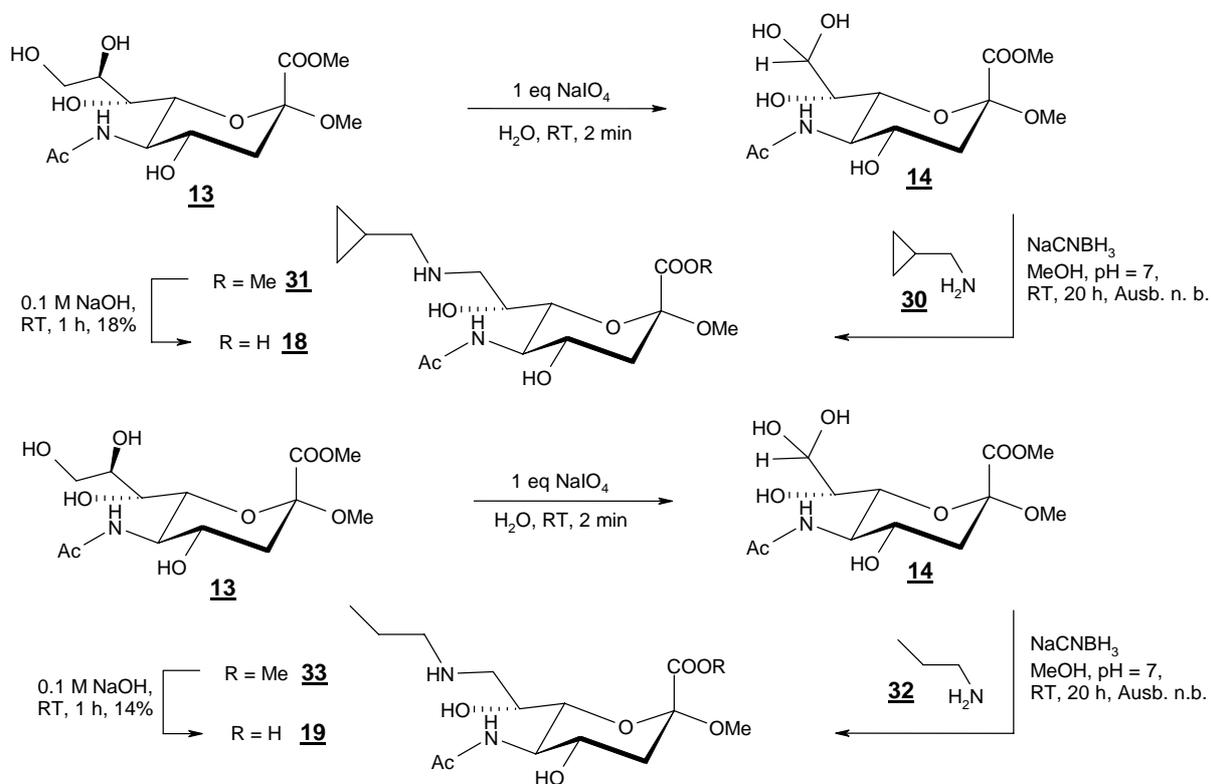


Abbildung 37: Darstellung der C-8 Aminokonjugate **18** und **19** der trunktierten Sialinsäure.

Die Darstellung von **35** (Abbildung 38) erfolgte durch reduktive Aminierung von **14** mit γ -Aminobuttersäure **34**. In diesem Fall war eine Isolierung des Produktes **35** durch Gelpermeationschromatographie an Biogel P2 möglich. Die anschließende basische Verseifung ergab quantitativ den Liganden **20**.

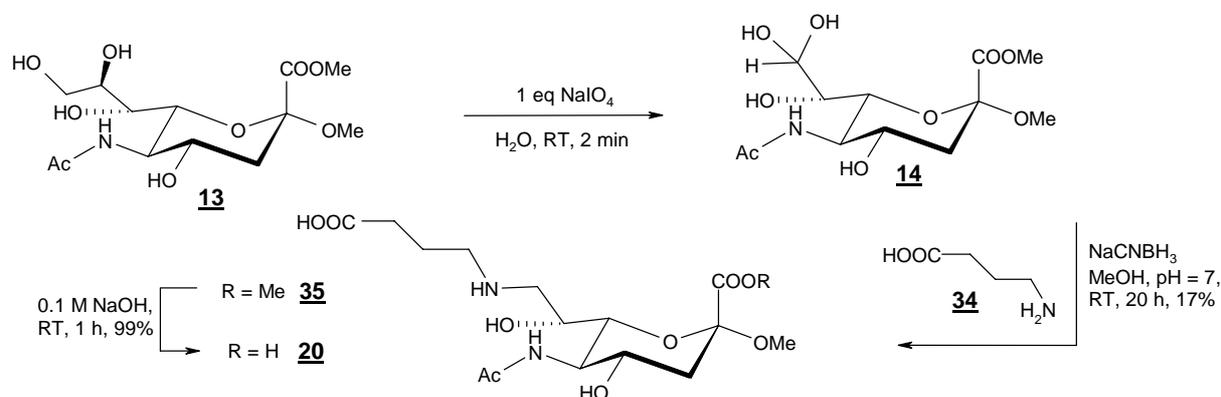


Abbildung 38: Darstellung des C-8 Aminokonjugates **20 der trunkierten Sialinsäure.**

Die Ausbeuten aller drei aminierten Verbindungen **18**, **19**, **20** von durchschnittlich 16% sind trotz der Tatsache, dass nur ca. 72% des Eduktgemisches für die reduktive Aminierung den C-8 Aldehydhydrat **14** darstellt (siehe Abschnitt 4.4.3.2) nicht sehr hoch, wenn man die anschließende Verseifung von **31** und **33** als quantitativ betrachtet. Diese liegen mit unterschiedlichen Aminen als Edukte allerdings in einem reproduzierbaren Bereich. Eine Steigerung der Ausbeute ist durch eine weitere Optimierung der Reaktionsbedingungen (z.B. pH-Wert, Aminkonzentration, Lösungsmittel oder Reduktionsmittel) und der Aufarbeitung denkbar.

4.4.3.5 Versuch der Darstellung eines C-8 Amidokonjugates der trunkierten Sialinsäure

Für die Darstellung von **14** wurden im ersten Schritt das Neu5Acα2Me **13** mit nur 0.6 Äquivalenten Natriumperiodat oxidativ gespalten. Dies sollte das Entstehen des C-7-Aldehydhydrates weitestgehend verhindern, um Aufarbeitungsprobleme des nachfolgenden Reaktionsschrittes zu vermeiden. Das Rohprodukt von **14** wurde anschließend mit Natriumchlorit und Wasserstoffperoxid umgesetzt, um das C-8 Aldehydhydrat in die entsprechende Säure **36** zu überführen. Um Nebenreaktionen der im nächsten Reaktionsschritt folgenden Amidverknüpfung zu vermeiden, wurden die freien Hydroxyfunktionen acetyliert. Aus der anschließenden Umsetzung der acetylierten Säure **37** mit *n*-Propylamin **32**, Dicyclohexylcarbodiimid und kat. DMAP konnte die Produktmasse des Amides **38** per

MALDI-TOF-Massenspektrometrie gefunden werden. Eine Aufarbeitung und Isolierung von Verbindung **38** gelang jedoch nicht, so dass der Ligand **23** durch eine mögliche basische Verseifung des Methylesters sowie der Acetylgruppen nicht erhalten werden konnte.

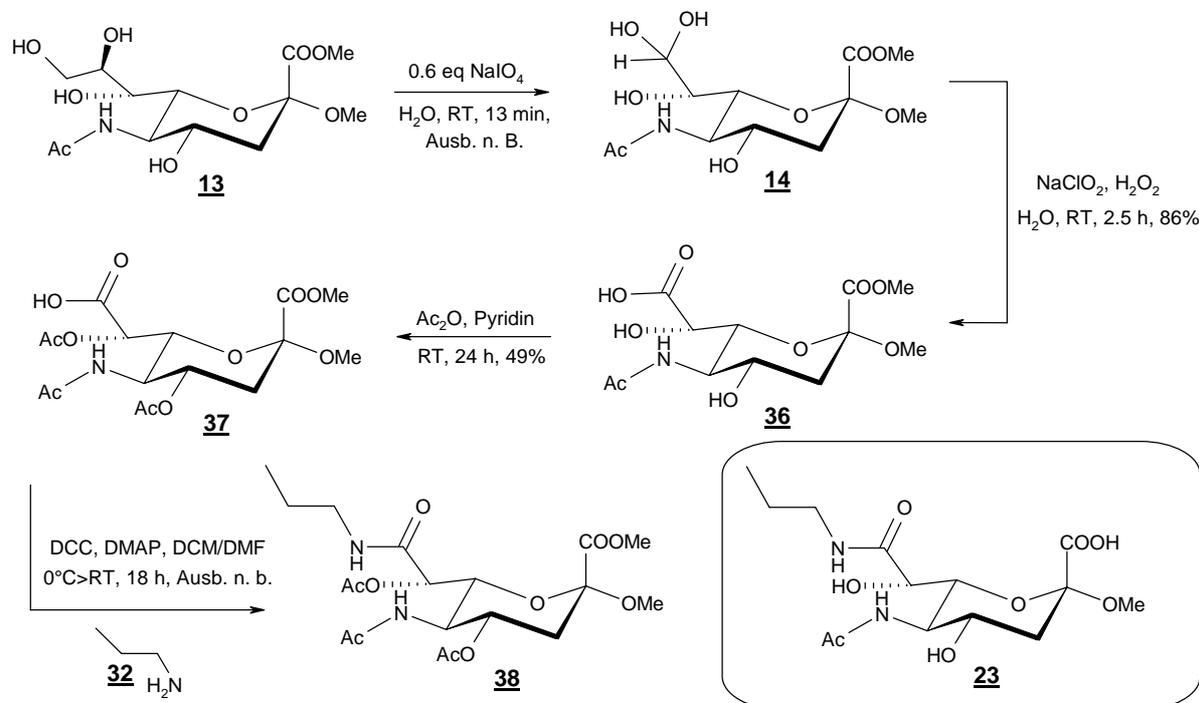


Abbildung 39: Versuch der Darstellung des Amidkonjugates **23** der trunkierten Sialinsäure. Das Produkt **38** konnte nicht isoliert werden. Die basische Verseifung der Verbindung **38** würde zum Liganden **23** führen.

4.4.3.6 Bindungsanalyse mittels SPR

Im Anschluss wurden die synthetisierten Liganden mittels SPR vermessen. Die ermittelten Datenpunkte aus den Sensorgrammen des C-7 Aminokonjugates **21** sind in Abbildung 40 aufgeführt. Aufgrund des linearen Verlaufes der Datenpunkte höherer Konzentrationen, kann nur dann das *one-site-binding* Modell angewandt werden, wenn man die beiden höchsten Konzentrationen nicht berücksichtigt. Dies ergibt eine Dissoziationskonstante von $K_D = 1075 \pm 668 \mu\text{M}$ und ist damit dem K_D -Wert des Referenzliganden **5** mit $K_D = 1430 \pm 1240 \mu\text{M}$ sehr ähnlich.

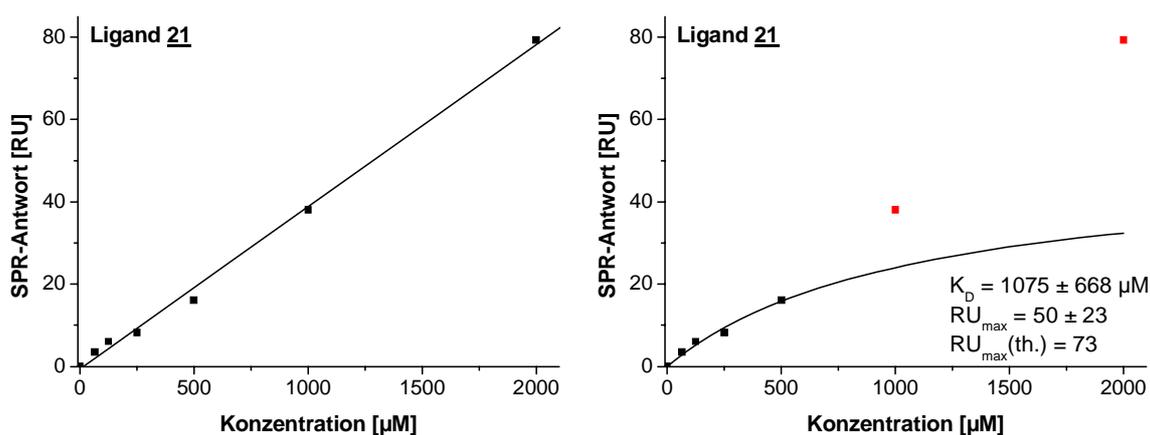


Abbildung 40: SPR-Antworten des C-7 Aminokonjugates **21** als Funktion dessen Konzentration. Aufgrund des linearen Verlaufes der Datenpunkte im oberen Konzentrationsbereich, kann durch ein *fit* über alle Datenpunkte keine Dissoziationskonstante erhalten werden (links). Dies ist vermutlich ein Resultat von unspezifischen Wechselwirkungen im höheren Konzentrationsbereich des Liganden. Lässt man stattdessen die Datenpunkte der beiden höchsten Konzentrationen bei der Kurvenanpassung unberücksichtigt, ist ein K_D -Wert durch das *one-site-binding* Modell bestimmbar (rechts).

Die Auswertung der Datenpunkte des C-7 *m*-Carboxybenzylaminokonjugates **22** nach dem *one-site-binding* Modell ist in Abbildung 41 zu sehen. Hierbei konnte über alle Datenpunkte angefitet werden.

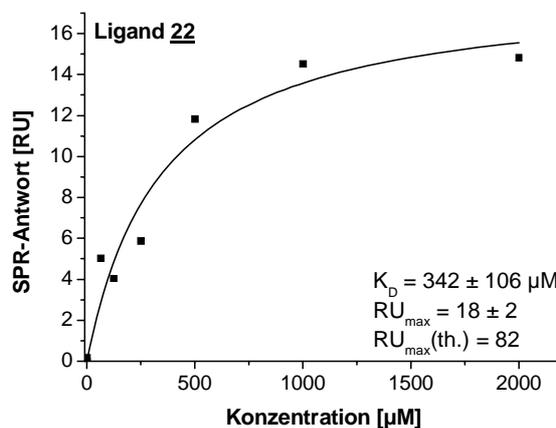


Abbildung 41: SPR-Antworten des C-7 Aminokonjugates **22** als Funktion dessen Konzentration. Diese Datenpunkte sind an das *one-site-binding* Modell angefitet.

Der hierdurch bestimmte K_D -Wert für Verbindung **22** beträgt $342 \pm 106 \mu\text{M}$, was einer etwa vierfachen Verbesserung gegenüber dem Referenzliganden Neu5Aca2Me **5** mit einem $K_D = 1430 \pm 1240 \mu\text{M}$, entspricht. Der bestimmte RU_{max} -Wert von 18.2 ist jedoch gegenüber dem theoretischen RU_{max} -Wert von 81.9 deutlich geringer. Deswegen wurde im Fall

der Verbindung 22 ebenfalls die kinetische Anpassung der Bindungskurve an die Langmuir-Gleichung überprüft (Abbildung 42).

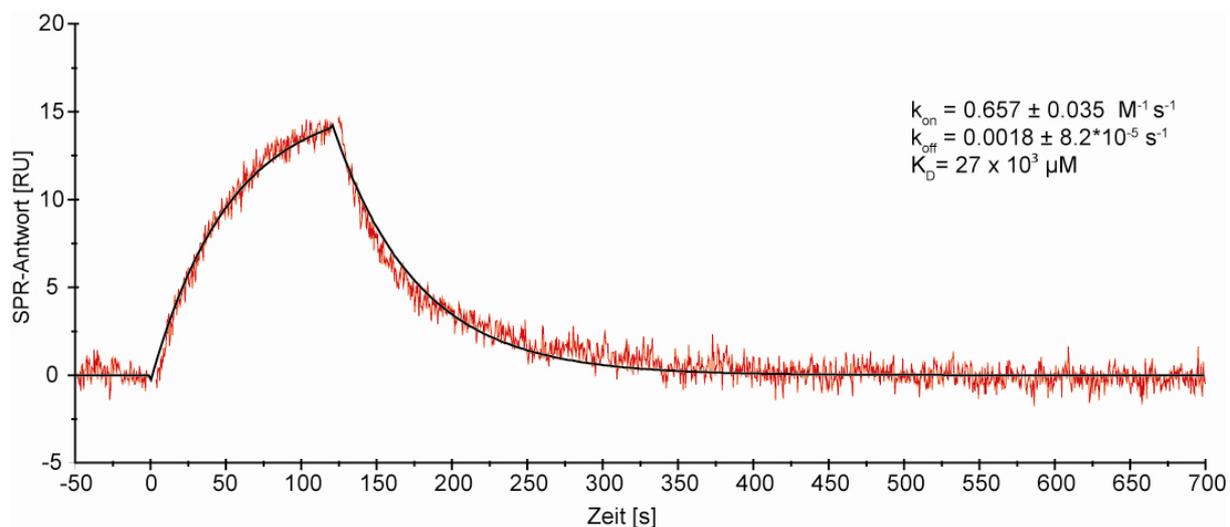


Abbildung 42: Anpassung des SPR-Sensorgramms der höchsten Konzentration des Liganden 22 an die Langmuir-Gleichung.

Die hierdurch bestimmte Dissoziationskonstante von $K_D = 27 \times 10^3 \text{ } \mu\text{M}$ ist um den Faktor ~ 100 schlechter als die des thermodynamischen *fits*. Die Größenordnung dieser Abweichung der kinetischen bzw. thermodynamischen Auswertung wurde allerdings schon bei den Referenzliganden 5 und 6, festgestellt, wenn auch dort die kinetische Auswertung zu einem kleineren K_D -Wert führte.

Die Vermessung der C-8 Aminokonjugate wurde an einem anderen Biacore-Chip vorgenommen. Exemplarisch für die C-8 Aminokonjugate (20-22) sind die Sensorgramme des Liganden 20 in Abbildung 43 aufgeführt. Bei der Betrachtung der Rohsensorgramme ist festzustellen, dass am Anfang und Ende einer Messreihe schon die Pufferinjektionen zu starken RU-Antworten führten. Die RU-Antworten des Puffers waren zudem nicht stabil, sondern nahmen im Verlauf der Injektionen ab. Des Weiteren zeigt ein Vergleich der beiden Sensorgramme der Pufferinjektionen zueinander einen RU-Unterschied von ca. 5 RU. Dies führt dazu, dass die RU-Antworten der einzelnen Sensorgramme aus der Konzentrationsreihe des Liganden relativ zueinander eine Unsicherheit aufwiesen. Ein ähnlicher Verlauf der Sensorgramme der Pufferinjektionen konnte auch bei den Liganden 18 und 19 festgestellt werden.

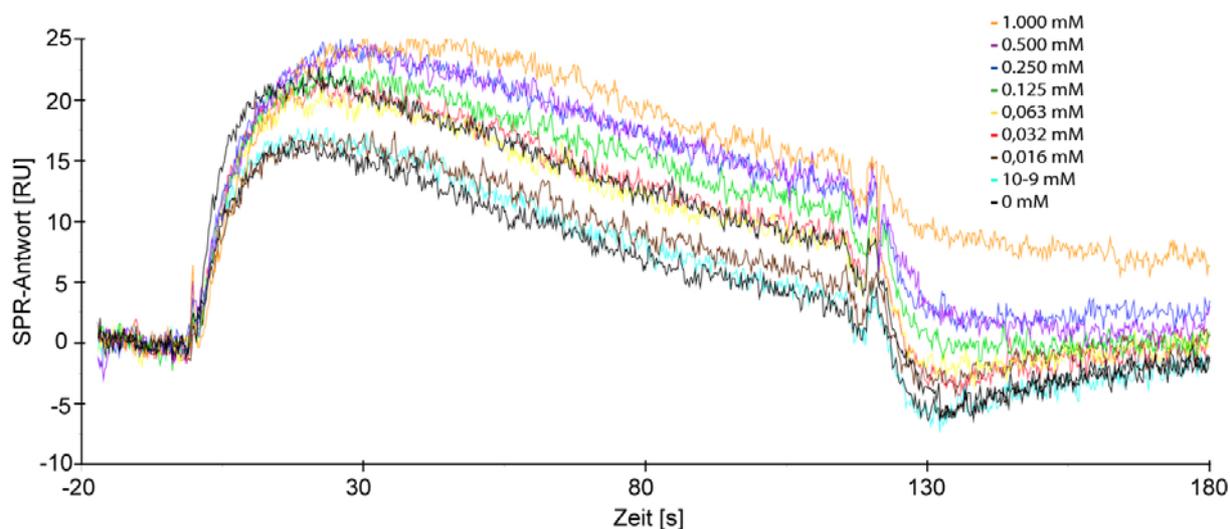


Abbildung 43: Sensorgramme der Konzentrationsreihe des Liganden 20. Die Sensorgramme der reinen Pufferinjektionen sind in schwarz dargestellt. Die positiven sowie am Anfang und Ende der Messreihe unterschiedlichen RU-Antworten der Pufferblindinjektionen können nicht erklärt werden und lassen auf eine Unsicherheit in den Messergebnissen schließen.

Ein eindeutiger Grund für das Signal der Pufferinjektion, dessen Abnahme während der Injektion und der RU-Unterschied der Pufferinjektionen am Anfang und am Ende der Messreihe, konnte bisher nicht gefunden werden. Bereinigt man jedoch die SPR-Signale der einzelnen Konzentrationen von dem Signal der Pufferinjektion, so kommt man für die Liganden 18 und 20 zu konzentrationsabhängigen RU-Antworten, die sich sehr gut an das *one-site-binding* Modell anfitzen ließen. Für den Ligand 19 konnte allerdings keine Konzentrationsabhängigkeit der RU-Antworten gefunden werden.

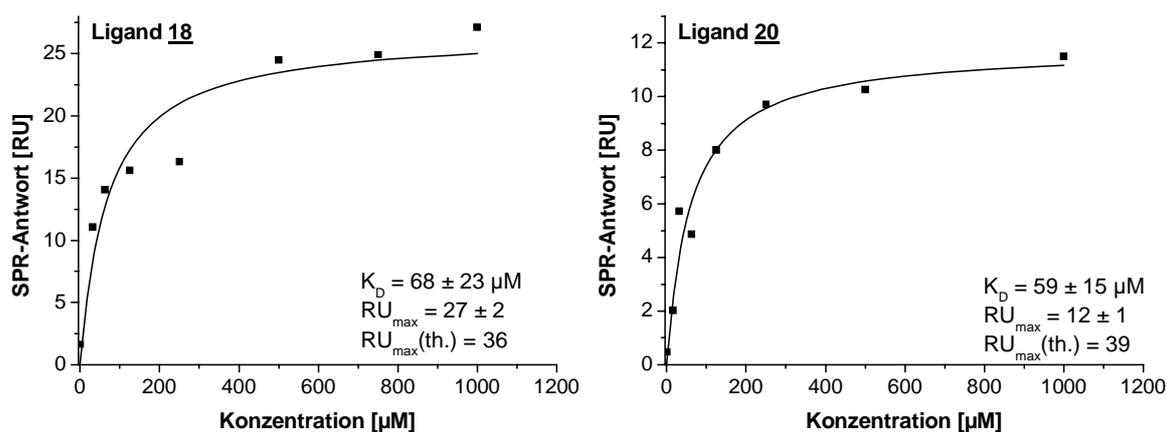


Abbildung 44: SPR-Antworten der C-8 Aminokonjugate 18 und 20 als Funktion ihrer Konzentration. Die einzelnen Datenpunkte sind an das *one-site-binding* Modell angefitzt.

Die Dissoziationskonstanten der beiden C-8 Aminokonjugate betragen für Ligand **18** $K_D = 68 \pm 23 \mu\text{M}$ bzw. für Ligand **20** $K_D = 59 \pm 15 \mu\text{M}$. Sie weisen damit beide eine wesentlich höhere Bindungsaffinität auf als der Referenzligand Neu5Ac α 2Me **5** mit einem $K_D = 1430 \pm 1240 \mu\text{M}$.

4.4.3.7 Bindungsanalyse mittels STD-NMR

Das C-7 Aminokonjugat **22** und die C-8 Aminokonjugate **18-20** wurden anschließend mittels der STD-NMR Methode auf ihre Bindungseigenschaften zum H5 hin untersucht. Für die STD-Messungen wurde sowohl die Leistung des Sättigungspuls sp13 (30 dB), als auch dessen Einstrahlpunkt (-1.5 ppm) zur Minimierung der Artefaktsignale angepasst. Eine anschließende Überprüfung der veränderten Parameter zeigte weiterhin eindeutige STD-Signale des schon vermessenden Referenzliganden **5**. Allerdings konnten bei den vermessenen Aminokonjugaten **22** sowie **18-20** für keine der Verbindungen STD-Signale detektiert werden. Dies kann zwei Gründe haben: Zum einen kann eine zu niedrige *off-rate* der Liganden dazu führen, dass zu wenig gesättigte Ligandmoleküle undissoziiert in Lösung vorliegen, wodurch aufgrund des niedrigen Signal-Rausch-Verhältnis im STD-Spektrum kein Signal detektiert werden kann. Ein anderer Grund wäre eine viel schlechtere Bindung oder ein vollständiger Bindungsabbruch. Dies ist aber eher unwahrscheinlich, da die Liganden **18**, **20**, **21** und **22** in den SPR-Studien auf spezifische Interaktionen mit dem H5-Protein hindeuteten.

Um dies zu verifizieren wurde eine exemplarische STD-Kompetitionstitration des Referenzliganden Neu5Ac α 2Me **5** mit einem der C-8 Aminokonjugate (Ligand **20**) durchgeführt. Durch die Zugabe des Liganden **20** sollte, im Falle einer spezifischen Bindung, der Referenzligand **5** aus der Bindungstasche verdrängt werden. Dies würde sich in einer Abnahme der STD-Amplifikationsfaktoren der individuellen Protonen von **5** bemerkbar machen. In Abbildung 45 sind die STD-Amplifikationsfaktoren der *N*-Acetylgruppe von **5** gegen die logarithmische Konzentration des Liganden **20** aufgetragen (mit Ausnahme des Datenpunktes bei 10^3 mM). Die STD-Amplifikationsfaktoren der *N*-Acetylgruppe von **5** nehmen durch die Zugabe von **20** ab. Diese Abnahme ist allerdings nicht vollständig und hätte durch die Vermessung von höheren Konzentrationen des Liganden **20** verstärkt werden können. Trotzdem ist es möglich unter der Annahme, dass bei hohen Konzentrationen des Liganden **20** (10^3 mM) die STD-Signale des Liganden **5** auf null gehen, aus den Werten einen IC_{50} -Wert des Liganden **20** zu bestimmen.⁴⁹

Die Bestimmung des IC_{50} -Wertes erfolgt durch eine Anpassung der Datenpunkte an das *one-site-competition*-Modell.

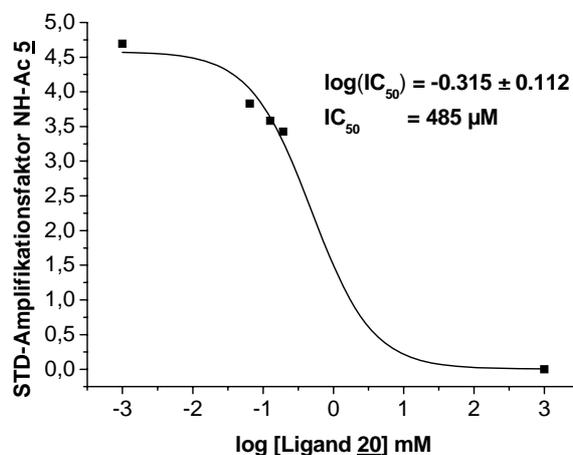


Abbildung 45: Auftragung der STD-Amplifikationsfaktoren der *N*-Acetylgruppe des Neu5Aca2Me 5 gegen die logarithmische Konzentration des Liganden 20. Ein *fit* nach dem *one-site-competition*-Modell ergibt den IC_{50} -Wert des Inhibitors 20. $c(\text{H5}) = 1.15 \mu\text{M}$, $c(\text{Ligand } 5) = 210 \mu\text{M}$, $c(\text{Ligand } 20) = 65\text{-}193 \mu\text{M}$, 700 MHz, $T = 298 \text{ K}$, $sp13 = 30 \text{ dB}$, Sättigungsdauer = 2 s, Einstrahlpunkt des Sättigungspulses = -1.5 ppm

Durch den bestimmten IC_{50} -Wert von 20, der Konzentration des Liganden 5 und dessen ermittelten K_D -Wert kann man nach Gleichung 8 die Bindungskonstante des Liganden 20 berechnen.

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{c(\text{Ligand } 5)}{K_D(\text{Ligand } 5)}}$$

Gleichung 8: Bestimmung des K_i -Wertes des Inhibitors 20 durch die Cheng-Prusoff-Gleichung.

Der so bestimmte K_i -Wert für Ligand 20 beträgt $K_i = 450 \mu\text{M}$ und bestätigt den Erhalt der Bindung und darüber hinaus die Verbesserung der Bindungsaffinität des Liganden 20 gegenüber dem Referenzliganden 5. Im Vergleich zu dem aus den SPR-Studien ermittelten Wert von $K_D = 58.9 \mu\text{M}$ ist dieser um den Faktor ~ 8 höher. Die Abweichung liegt vermutlich an der geringen Anzahl der Datenpunkte der STD-Kompetitionstitration und dem damit einhergehenden Fehler bzw. an dem Fehler aus dem SPR-Experiment. Weiterhin sind die durch STD-NMR bestimmten Dissoziationskonstanten, wie schon beim Neu5Aca2Me 5, häufig etwas höher als die durch SPR bestimmten Werte.

4.4.4 Übersicht der an der Sialinsäure modifizierten Liganden

In Tabelle 4 sind die Ergebnisse des *dockings* und der Bindungsanalyse der Liganden zusammengefasst.

Tabelle 4: Zusammenstellung der berechneten Bindungsenergien der modifizierten Sialinsäurederivate und deren mittels SPR oder STD-NMR ermittelten K_D -Werte. Im ersten Cyclus wurde die Relevanz der Glycerolseitenkette durch die trunkierten Sialinsäurederivate **7** und **8** überprüft. Dies führte im zweiten Designcyclus zu C-8 und C-7 Aminokonjugaten, die gegenüber dem Neu5Ac α 2Me deutlich verbesserte Bindungsaffinitäten aufwiesen.

	Ligand	berechnete Bindungsenergie [kcal/mol]	K_D (SPR) [μ M]	K_D (NMR) [μ M]
Referenz	5	-28.6	1430	2780
1. Cyclus	7	-23.9	1350	n.b.
	8	-20.2	1280	n.b.
2. Cyclus	18	-30.8	68.0	kein STD
	19	-30.7	-	kein STD
	20	-32.7	58.9	$K_i = 450 \mu$ M
	21	-27.7	1075	n.b.
	22	-32.6	342	kein STD

Nach den vorliegenden Ergebnissen sind zwei der C-8 Aminokonjugate mit K_D -Werten von $K_D = 68 \pm 2 \mu$ M für Ligand **18** bzw. $K_D = 59 \pm 15 \mu$ M für Ligand **20** die besten Binder der an der Glycerolseitenkette modifizierten Liganden. Dies korrespondiert mit den durchgeführten *docking*-Studien, bei denen sich die Liganden **18** und **20**, sowie Verbindung **22** als am aussichtsreichsten herausstellten. Somit führten zum ersten Mal Modifizierungen an der Glycerolseitenkette der Sialinsäure zu einer deutlichen Verbesserung der Bindungsaffinität am Hämagglutinin.

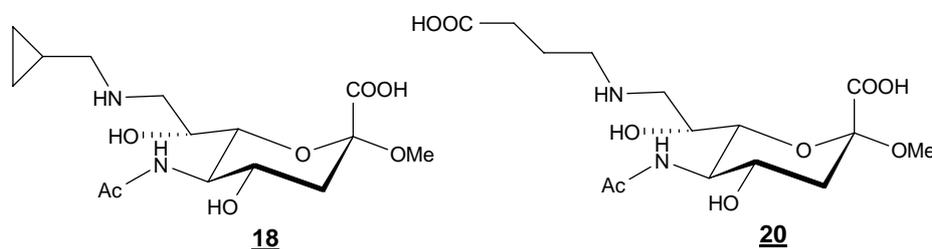


Abbildung 46: Die Liganden **18** und **20**, die im Vergleich zur Referenzsubstanz Neu5Ac α 2Me **5** eine um den Faktor 21 bzw. 24-fache Bindung in den SPR-Studien zeigten.

4.5 Modifikationen am Aglycon

Der zweite Forschungsschwerpunkt dieser Arbeit war die Entwicklung von am Aglycon modifizierten Sialinsäureglycosiden. Hierdurch sollten zusätzliche Interaktionen außerhalb der eigentlichen Bindungstasche ausgebildet werden, die ebenfalls zu einer Steigerung der Bindungsaffinität führen sollten.

4.5.1 Entwicklung von am Aglycon modifizierten Sialinsäureglycoside

Das *O*-Glycosid der Sialinsäureglycoside ist je nach Aglycon mehr oder weniger säurelabil. Deswegen war es neben der Entwicklung hochaffiner Liganden durch die Modifizierung am Aglycon wichtig, zu überprüfen, ob stabilere Analoga von *O*-Glycosiden nicht zu einer Beeinträchtigung der Bindungsaffinität zum Hämagglutinin führen. Da der glycosidische Sauerstoff der Sialinsäure aus der Bindungstasche heraussteht und somit vermutlich keine bindenden Wechselwirkungen leistet, ist dies eigentlich nicht zu erwarten. Das *O*-Glycosid **39** sollte für diese Zwecke mit dem ähnlichen *C*-Glycosid **40**, welches von S. Meinke zur Verfügung gestellt wurde,^{66,67} verglichen werden.

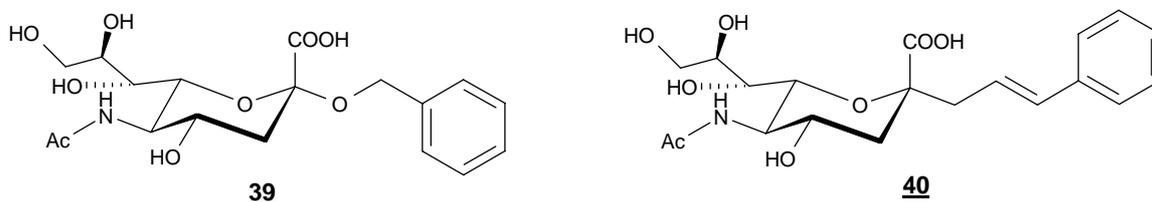


Abbildung 47: Zwei ähnlich aufgebaute Glycoside der Sialinsäure. Verbindung **39** ist das α 2-*O*-Benzylglycosid, Verbindung **40** ein ähnliches α 2-*C*-Glycosid.

Für die Entwicklung hochaffiner Sialinsäureglycoside des Hämagglutinin H5 stellten die von der Arbeitsgruppe um Toogood für das H3 des H3N2-Virus entwickelten *O*-Glycoside, eine interessante Leitstruktur dar.³⁰ Das gemeinsame Strukturelement dieser Liganden (Abbildung 48) besteht aus der Sialinsäure, welche am Aglycon über einen Alkyl linker mit verschiedenen Aromaten verbunden ist. Die Bindungskonstanten dieser Verbindungen waren zum Hämagglutinin H3 bis zu 64-fach besser als zum Referenzliganden Neu5Ac α 2Me **5**.

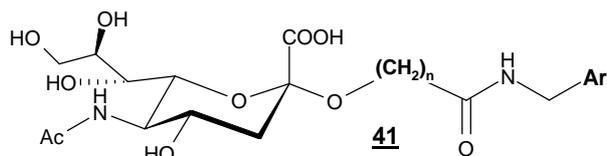


Abbildung 48: Allgemeines Strukturelement der von der Arbeitsgruppe um Toogood entwickelten Sialinsäureglycoside. Die beste Verbindung hatte eine um den Faktor 64 bessere Bindungsaffinität zum H3 als der Referenzligand Neu5Ac α 2Me 5.

Des Weiteren konnten zwei dieser Verbindungen mit dem H3 kokristallisiert und Röntgenstrukturen der Protein-Ligand-Komplexe erhalten werden.³⁹

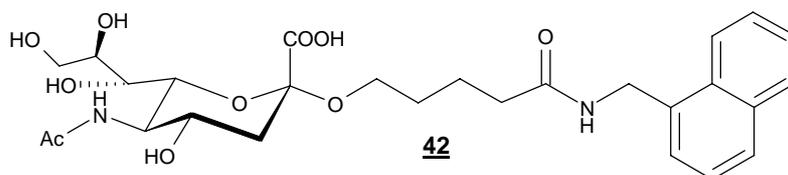


Abbildung 49: Der in Abbildung 50 an dem Hämagglutinin H3 gebundene Ligand 42.

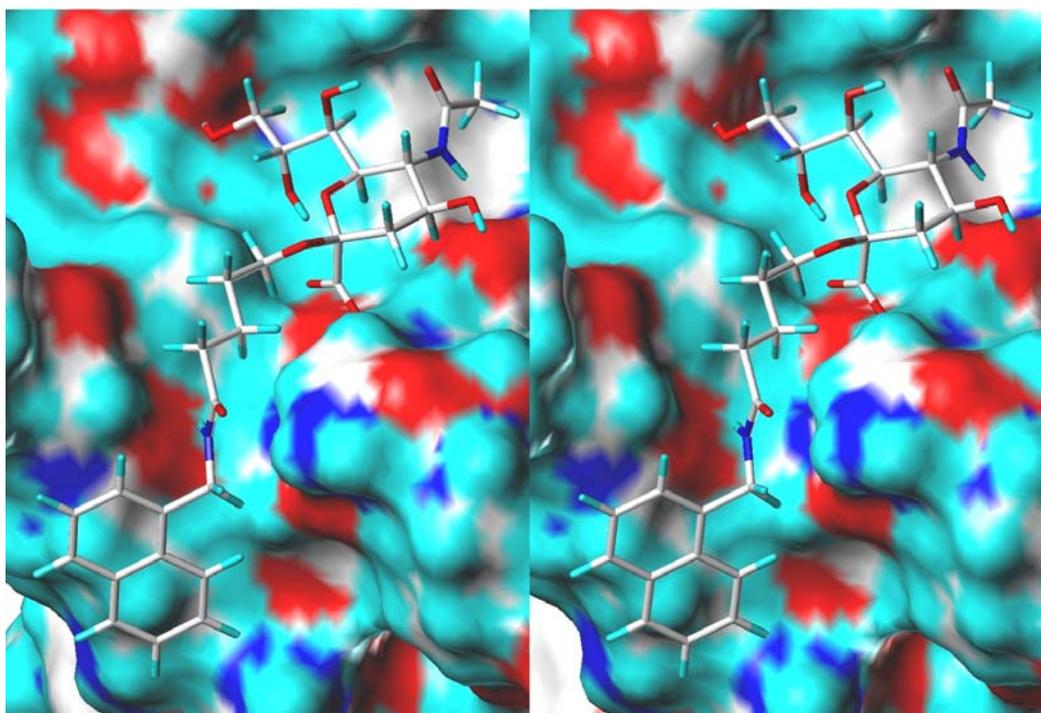


Abbildung 50: Röntgenstruktur des H3 mit daran gebundenen Liganden 42.⁶⁸ Die alkyliche Seitenkette nutzt einen hydrophoben Bindungskanal des Hämagglutinins H3 aus. Der Naphtylacetamidrest steht in nahem Kontakt zu den hydrophoben Aminosäuren des Proteins. (Darstellungsform: Protein: *connolly* Oberfläche, Ligand: *capped sticks, crossed-eye* Modus)

Die unpolare Seitenkette im Falle beider Liganden befindet sich in einem hydrophoben Kanal des H3, welcher aus der Bindungstasche herausführt. Der endständige Naphtylring zeigt nahen Kontakt zu Aminosäuren des Proteins. Die Röntgenstruktur des Komplexes, bestehend

aus dem H3 und dem daran gebundenen Liganden **42** wurde für diese Arbeit von S. J. Watowich zur Verfügung gestellt.⁶⁸ In Abbildung 50 ist dieser Komplex im Bereich der Protein-Ligand-Interaktion dargestellt. Bei dem anschließenden Vergleich des H3 mit dem H5 stellte sich heraus, dass das H5 an gleicher Position nahe der Bindungstasche ebenfalls einen hydrophoben Kanal ausbildet. Dieser ist allerdings nicht ganz so stark ausgeprägt wie im H3. Um die Position des Liganden vom H3 auf das H5-Protein zu übertragen, wurde ein *protein-alignment* beider Proteine (H3 mit Ligand **42** und H5) durchgeführt. Die daraus resultierende Struktur zeigte einen ähnlichen Bindungsmodus des Liganden **42** zum H5, wie zu der Originalstruktur des H3 auf (Abbildung 51).

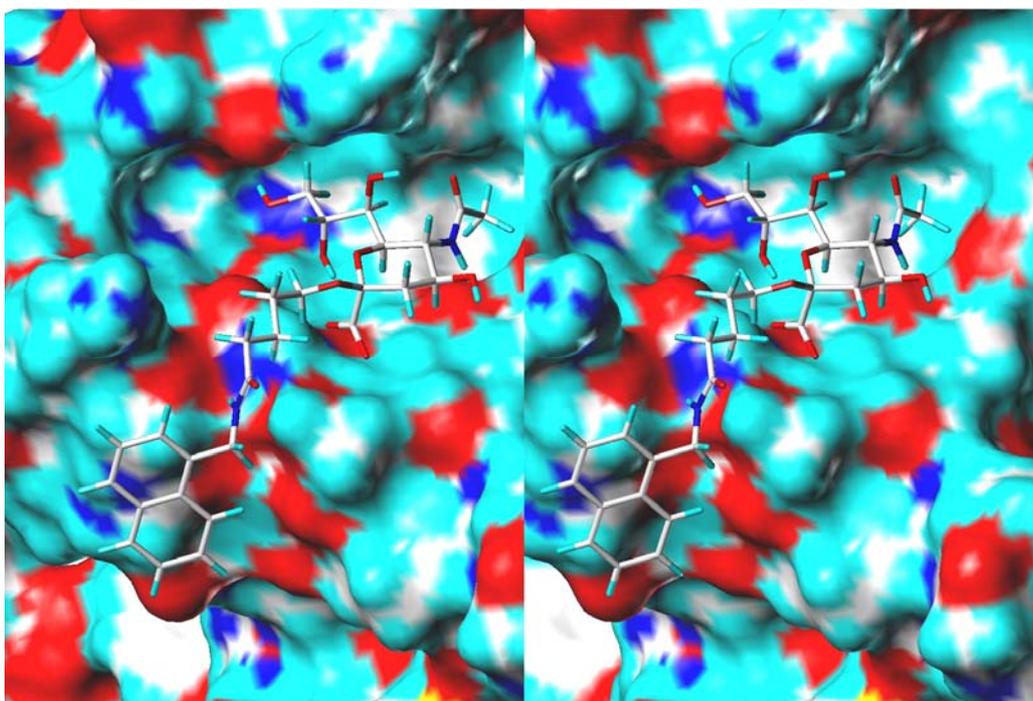


Abbildung 51: Durch ein *protein-alignment* des H3 mit dem Liganden **42** auf das H5 konnte die Position und Struktur des Liganden auf das H5 übertragen werden. (Darstellungsform: Protein: *connolly* Oberfläche, Ligand: *capped sticks, crossed-eye* Modus)

Um zu überprüfen, ob dieses Strukturelement auch beim Hämagglutinin H5 eine Steigerung der Bindungsaffinität zur Folge hat, wurde nach gleichen oder ähnlichen Verbindungen gesucht, die am H5 vermessen werden sollten und aus verfügbaren Chemikalien darstellbar waren. Als Basis wurde aus der Struktur des besten von Toogood et al. publizierten Binders **4** der Ligand **43** abgeleitet, bei dem der Amid-Stickstoff und der Carbonyl-Kohlenstoff miteinander ausgetauscht wurden.

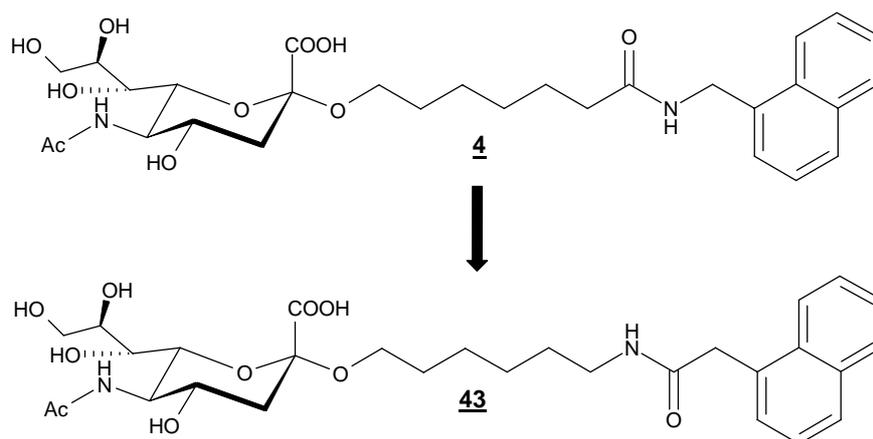


Abbildung 52: Der aus der Struktur **4** abgeleitete Ligand **43**.

Basierend auf der Position des Liganden **42** wurden die zusätzlichen Molekülfragmente des Liganden **43** in die H5-Röntgenstruktur eingepasst (Abbildung 53).

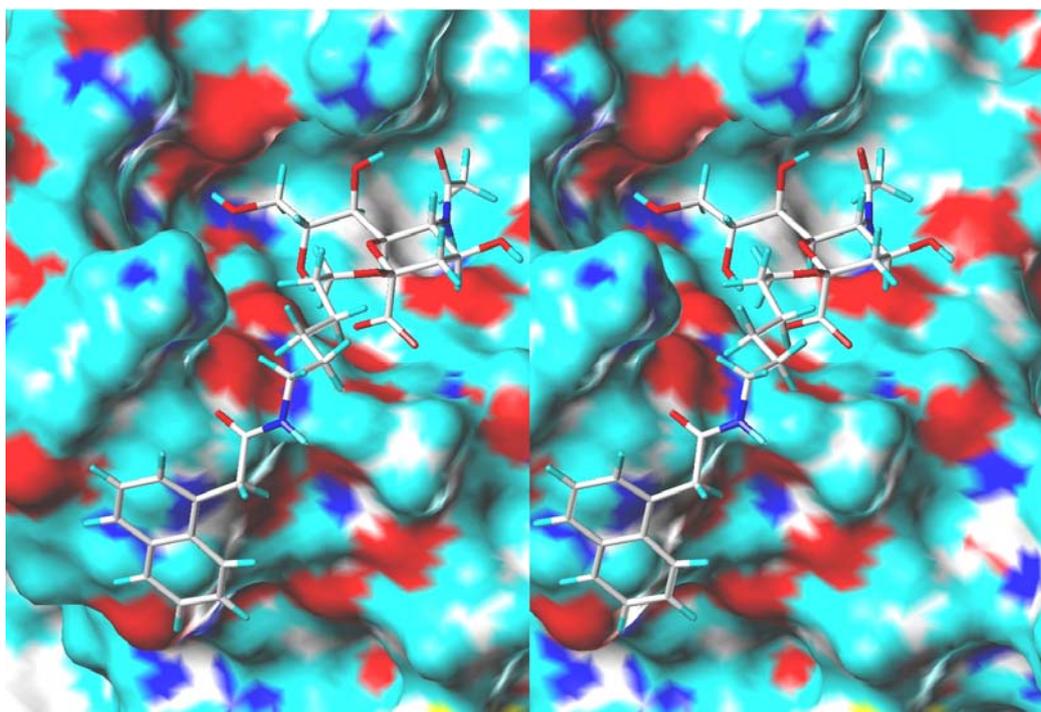


Abbildung 53: In die Struktur des H5 eingepasster potentieller Ligand **43**. Dessen Alkylkette kann den ebenfalls im H5 ausgebildeten, aus der RBD führenden Kanal nutzen. Der Naphtylacetamidrest kann Interaktionen mit einem hydrophoben Bereich des Proteins eingehen. (Darstellungsform: Protein: *connolly* Oberfläche, Ligand: *capped sticks, crossed-eye* Modus)

Bei der Betrachtung der resultierenden Struktur wird deutlich, dass es im Bereich der Amidbindung des Liganden schwierig ist, potentielle Kontakte zum H5-Protein durch Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden. Hierdurch sollte der Austausch der amidischen Carbonylgruppe mit dem Stickstoff keine Beeinträchtigung der Bindung zur Folge haben. Der

Naphtylacetamidrest hat positionell gute Kontakte zu einem hydrophoben Bereich des Proteins. Durch die Variierung, sowohl in der Länge der Seitenkette wie auch des Aromaten, sollte ein potentieller Bereich bindender Interaktionen überprüft werden (Abbildung 54). Die aus dem Liganden **43** hervorgehenden, modifizierten Verbindungen zeigten beim Einpassen in die Röntgenstruktur des H5 ebenfalls gute, unpolare Kontakte des Aromaten zu den Aminosäuren des Proteins.

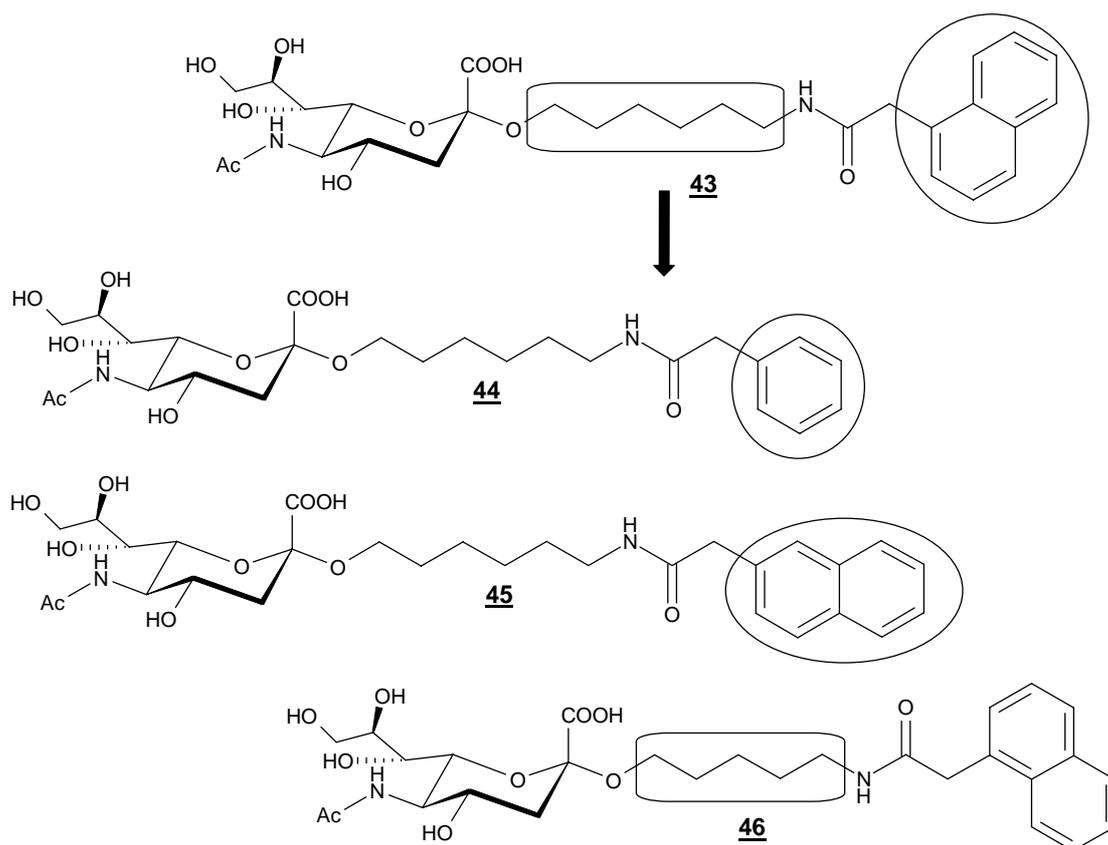


Abbildung 54: Durch die Modifizierungen der Länge der glycosidischen Seitenkette bzw. der Art des Aromaten ergeben sich aus dem Liganden **43** die Verbindungen **44**, **45** und **46**.

Im Anschluss an das Design wurde das theoretische Potenzial der Liganden durch das *docking* überprüft (Tabelle 5). Während vor allem das *O*-Glycosid Neu5Ac α 2Bn **39** im *docking* kaum eine theoretisch bessere Bindungsaffinität im Vergleich zum Neu5Ac α 2Me **5** zeigte, deuteten die entworfenen Glycoside (**43-46**) auf eine deutliche Zunahme dieser hin. Überraschenderweise zeigte hier auch schon das *C*-Glycosid eine theoretische Zunahme der berechneten Bindungsenergie.

Tabelle 5: Die mit dem Programm Sybyl 8.0 berechneten theoretischen Bindungsenergien des 2-O-Benzylglycosides **39** und des C-Glycosides **40** der Sialinsäure, sowie der O-Glycoside (**43-46**). Im Vergleich dazu ist der Referenzligand Neu5Ac α 2Me **5** aufgeführt.

Ligand	berechnete Bindungsenergie [kcal/mol]
5	-28.6
39	-31.6
40	-35.3
43	-40.6
44	-38.4
45	-42.1
46	-35.6

4.5.1.1 Synthese des 2-O-Benzylglycosides der Sialinsäure

Für die Synthese des α -Benzylglycosides **39** wurde der von S. Scheid bereitgestellte Methylester **47**⁶³ basisch verseift.

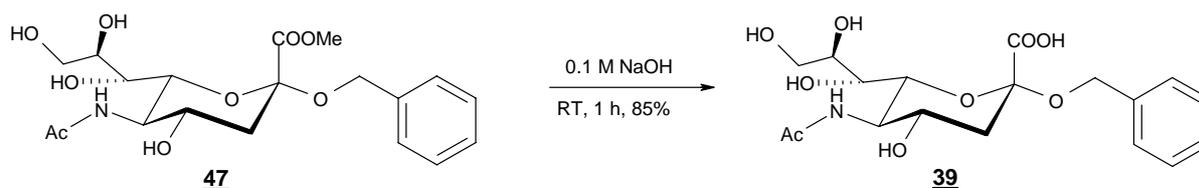


Abbildung 55: Darstellung des Liganden **39**.

4.5.1.2 Synthese der Aglycon-modifizierten Sialinsäureglycoside

Im ersten Schritt zur Synthese der O-Glycoside wurden die amidischen Strukturen des Aglycons dargestellt. Die amidischen Verknüpfungsreaktionen zu den aromatischen Linkern wurden mit der jeweiligen aromatischen Säure, dem Aminoalkohol und mittels des Aktivatorengemisches TBTU/DIPEA durchgeführt (Abbildung 56).

4 Ergebnisse und Diskussion

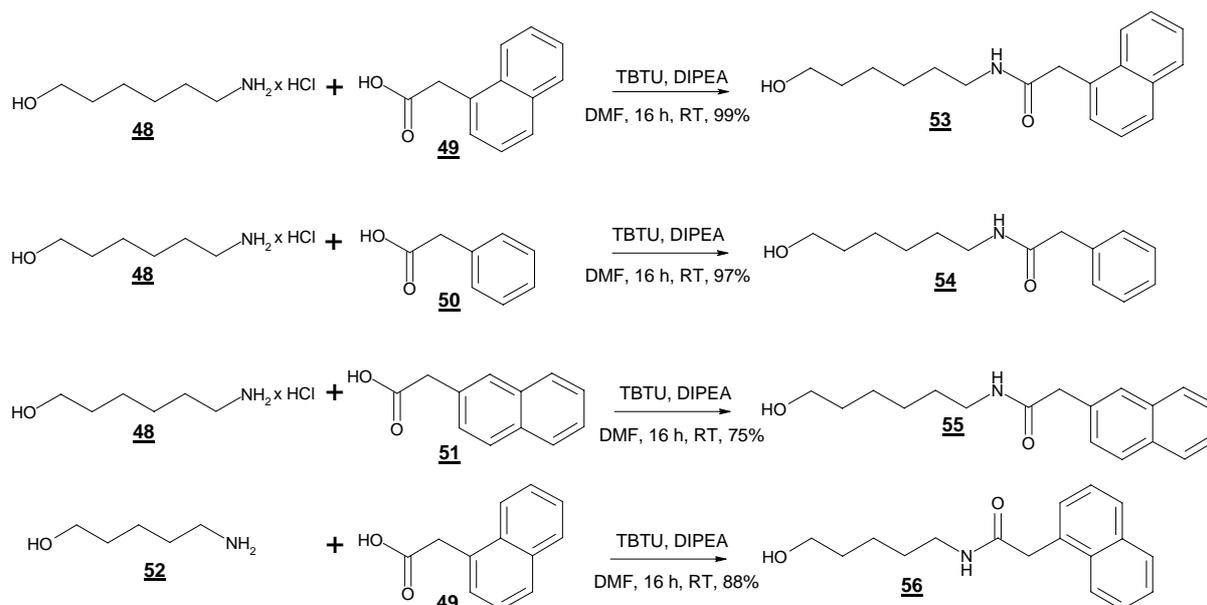


Abbildung 56: Synthese der Linker durch amidische Verknüpfung von Aminoalkoholen und entsprechenden aromatischen Säuren mittels TBTU und DIPEA.

Anschließend wurden die Alkohole **53** und **54** unter Königs-Knorr-Bedingungen^{69,70} mit Ag_2CO_3 in Dichlormethan glycosidisch mit dem β -Sialylchlorid **12** verknüpft (Abbildung 57).

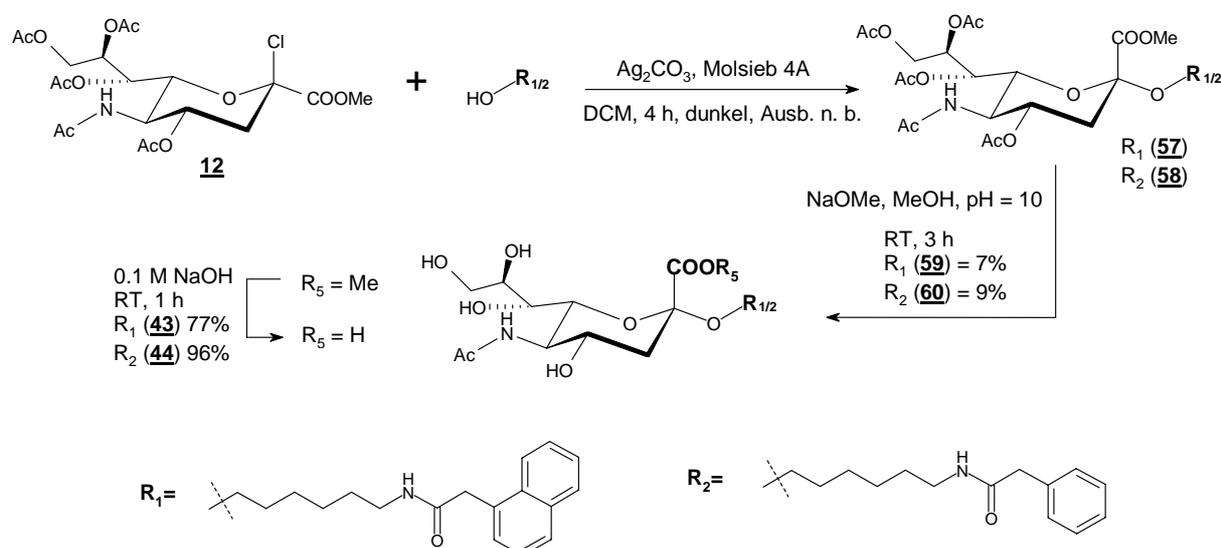


Abbildung 57: Synthese der Liganden **43 und **44**.**

Die anschließende Reinigung der Glycoside **57** und **58** war aufgrund eines nahezu identischen R_f -Wertes von Nebenprodukten trotz mehrmaliger Säulenchromatographie nicht vollständig möglich. Somit wurden die Rohprodukte der Glycoside **57** und **58** zur besseren Abtrennung der Verunreinigungen direkt mit Natriummethanolat umgesetzt.⁶⁰ Dies ergab die entschützten Glycoside **59** und **60**. Diese wurden im nächsten Schritt im Basischen zu den Liganden **43**

und **44** umgesetzt. Für die Darstellung der anderen zwei Liganden **45** und **46** wurden die entsprechenden Alkohole im ersten Schritt auf gleiche Weise glycosidisch mit dem β -Sialylchlorid **12** verknüpft (Abbildung 58). Anschließend wurden die Rohprodukte der *O*-Glycoside **61** und **62** direkt im Basischen verseift, um so in einem Schritt die *O*-Acetylgruppen und den Methylester zu entschütten. Dieser Weg führte jedoch zu Problemen bei der anschließenden Reinigung der Liganden. Nur durch mehrmalige Reinigung mittels Gelpermeationschromatographie an Biogel P2 war es möglich, die Liganden **45** und **46** zu erhalten. Durch die notwendigen Reinigungsschritte reduzierten sich die Ausbeuten allerdings erheblich.

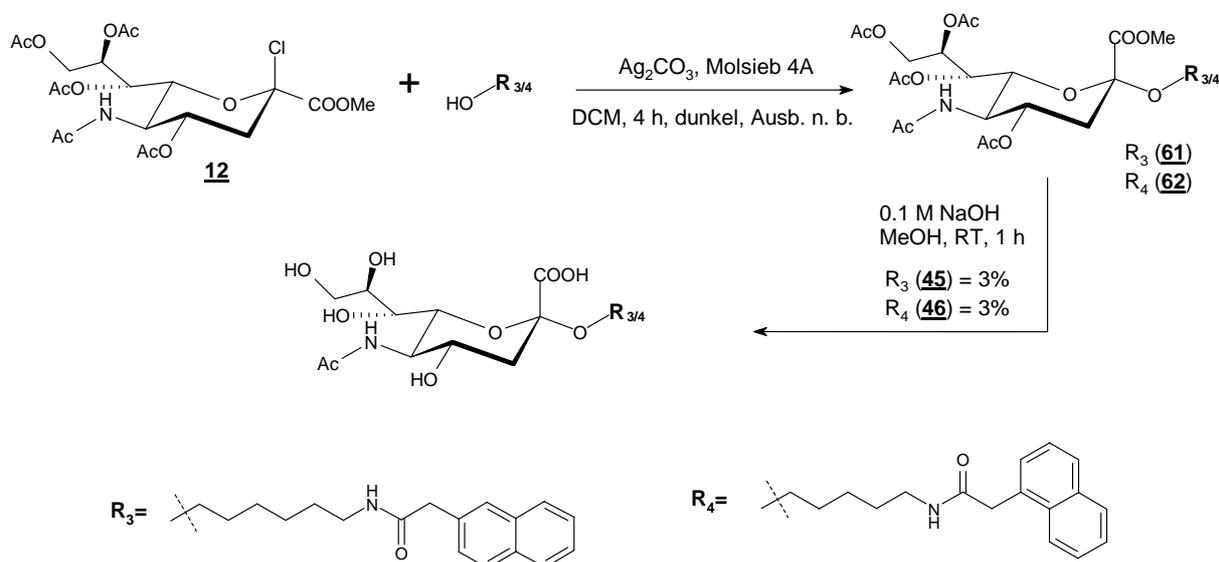


Abbildung 58: Synthese der Liganden **45** und **46**.

4.5.1.3 Bindungsstudien der Liganden mittels SPR

Die SPR-Experimente mit dem aromatischen *O*-Glycosid **39** und dem aromatischen *C*-Glycosid **40** zeigten in beiden Fällen eine konzentrationsabhängige Zunahme der RU-Antworten, die sich nach dem *one-site-binding* Modell anfitten ließen (Abbildung 59).

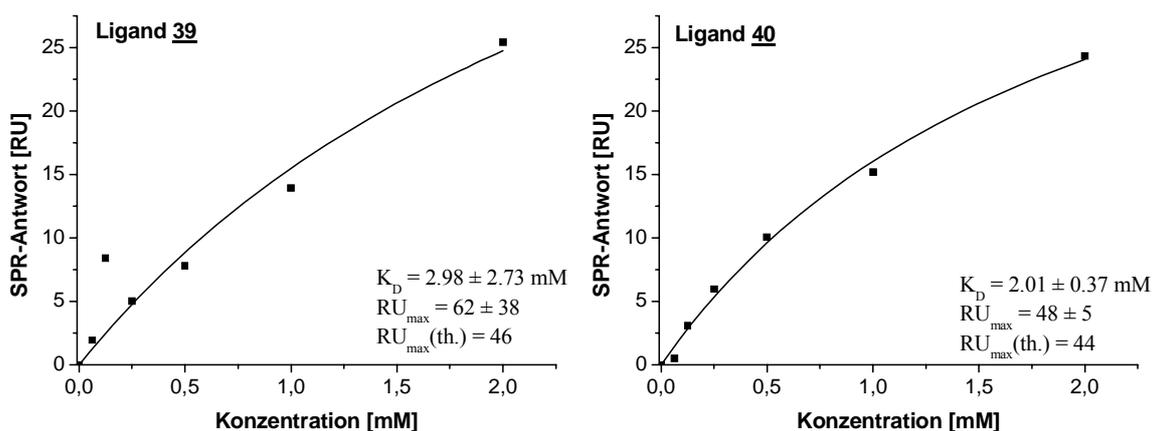


Abbildung 59: SPR-Antworten der Liganden **39** und **40** als Funktion ihrer Konzentration. Die Datenpunkte sind nach dem *one-site-binding* Modell angefitet.

Wie erwartet wurde, zeigen beide Liganden eine Bindung zum Hämagglutinin H5 im niedrigen millimolaren Bereich. Dies deckt sich beim Liganden **39** mit literaturbekannten Ergebnissen bei Bindungsstudien am H3-Protein.^{36,37} Die Bindungskonstanten von $K_D = 2.98 \pm 2.73 \text{ mM}$ bzw. $2.01 \pm 0.37 \text{ mM}$ des *O*- bzw. *C*-Glycosides sind sehr ähnlich und deuten darauf hin, dass die Art des Glycosides keinen oder nur geringen Einfluss auf die Bindungsaffinität der Sialinsäure zum H5 hat.

Die SPR-Studien der am Aglycon modifizierten *O*-Glycoside zeigten ebenfalls konzentrationsabhängige Zunahmen der RU-Antwort. Diese konnte man über alle Datenpunkte nach dem *one-site-binding* Modell anfiten (Abbildung 60). Bei der Betrachtung der Graphen ist jedoch festzustellen, dass die RU-Antworten der höchsten Ligandkonzentrationen zu einem linearen Verlauf im oberen Bereich der Datenpunkte führen. Hierdurch kann der *fit* nach dem *one-site-binding* Modell fehlerbehaftet sein. Des Weiteren ist der sich nach dem *fit* ergebene RU_{\max} -Wert im Fall des Liganden **45** ca. dreimal so hoch, als dessen theoretischer RU_{\max} -Wert. Ein Grund für das Abweichen der RU-Werte der höheren Konzentrationen können unspezifische oder unbekannte Interaktionen darstellen.

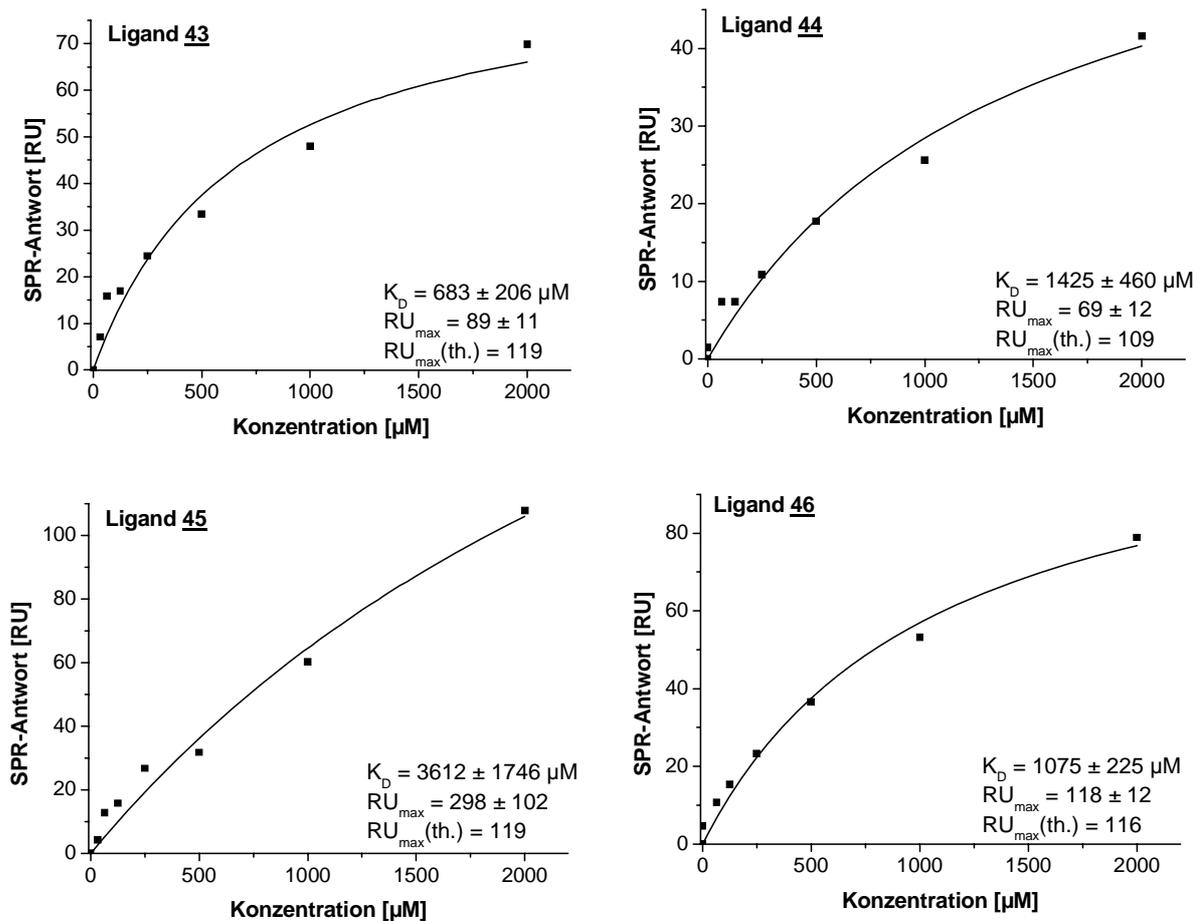


Abbildung 60: SPR-Antworten der Liganden 43-46 als Funktion ihrer Konzentration. Der beginnende lineare Verlauf der Kurven im oberen Konzentrationsverlauf führt beim Anfitzen der Datenpunkte an das *one-site-binding* Modell zu ungenauen Ergebnissen. Mögliche Gründe können unspezifische oder unbekannte Wechselwirkung im höheren Konzentrationsbereich der Liganden sein.

Lässt man die RU-Werte der höchsten Konzentrationen der Liganden bei dem *fit* jedoch unberücksichtigt, kommt man zu an das *one-site-binding* Modell besser angepassten Kurven (Abbildung 61).

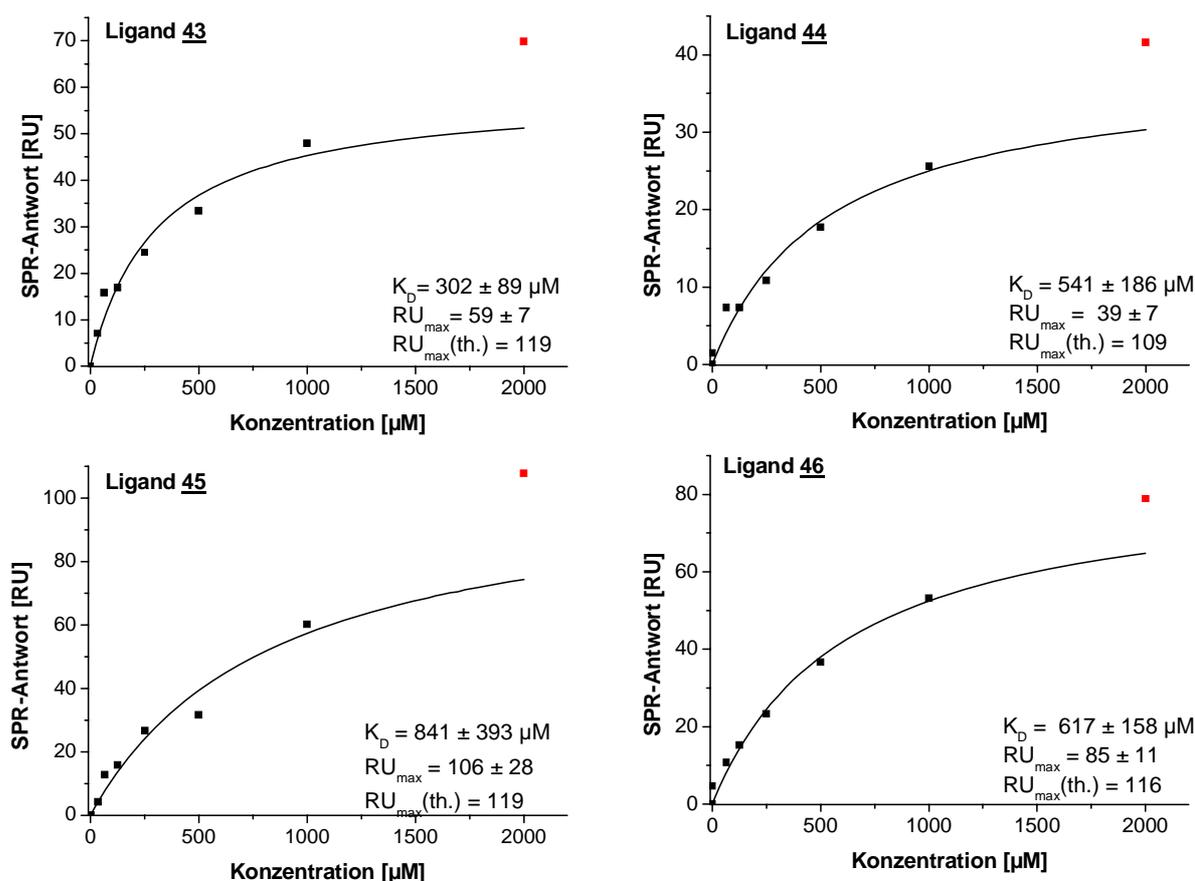


Abbildung 61: SPR-Antworten der Liganden **43-46** als Funktion ihrer Konzentration. Die RU-Antworten der höchsten Konzentration des jeweiligen Liganden (in rot dargestellt) wurde für die Kurvenanpassung nicht berücksichtigt. Dies führt zu besseren *fits* nach dem *one-site-binding* Modell.

Die sich hierdurch ergebenden Dissoziationskonstanten zeigen bei allen Verbindungen eine Verbesserung der Bindungsaffinität gegenüber der des Referenzliganden **5** mit $K_D = 1430 \pm 1240 \mu\text{M}$. Der beste Ligand **43** hat, bezogen auf die SPR-Studien, mit $302 \pm 89 \mu\text{M}$ eine fünffach bessere Bindungsaffinität gegenüber dem Referenzliganden **5**. Die vom Liganden **43** abgeleiteten Strukturen **44-46** führen jeweils zu etwas schlechteren Bindungskonstanten, sind jedoch ebenfalls besser als die des Referenzliganden **5**. Demnach scheint eine Affinitätssteigerung unter Ausnutzung hydrophober Kontakte glycosidischer Seitenkettenstrukturen auch beim H5-Protein zum Tragen zu kommen. Die Steigerung der Bindungsaffinität sind hierdurch jedoch nicht so stark wie am Hämagglutinin H3.

4.5.1.4 Bindungsstudien der Liganden mittels STD-NMR

Um die ermittelten Dissoziationskonstanten zu bestätigen und genauere Informationen über die Proteinkontakte der Liganden zu erhalten, wurden anschließend STD-Titrationsstudien mit den aus den SPR-Studien besten und schlechtesten Liganden **43** und **45** durchgeführt. Die Parameter sp_{13} und die Einstrahlfrequenz mussten hierbei zur Minimierung von Artefaktensignalen angepasst werden. Bei der Messung zeigten beide Liganden, insbesondere im aromatischen Bereich, starke STD-Antworten. Als Beispiel ist hier das *off-resonance*- und STD-Spektrum des Liganden **43** illustriert.

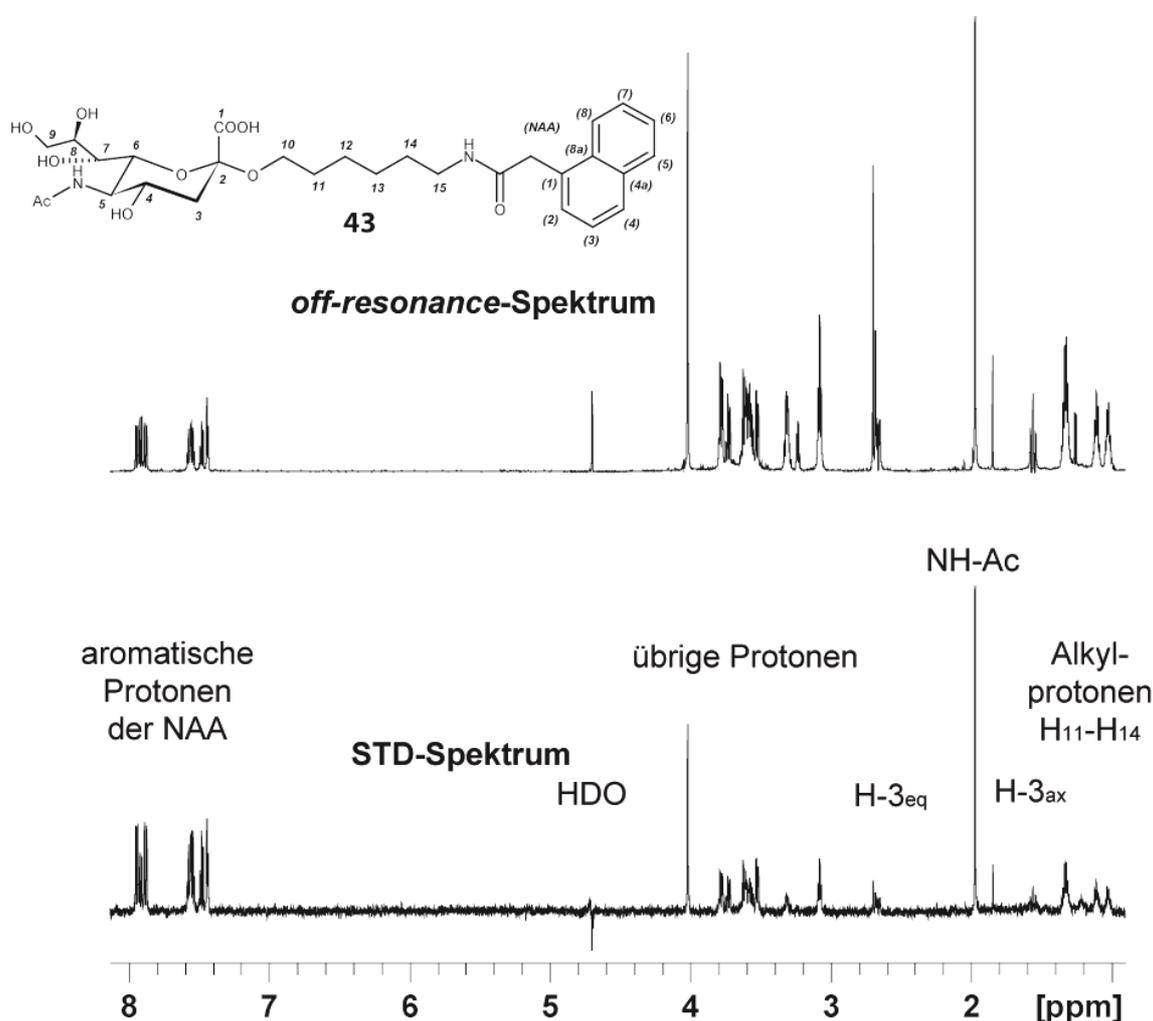


Abbildung 62: *Off-resonance*- und STD-Spektrum des Liganden **43**. Im STD-Spektrum erkennt man die an der Bindung beteiligten Protonen. Im Bereich von 2.7 ppm befindet sich ein zusätzliches Protonensignal, welches vermutlich eine Verunreinigung der Probe mit DMSO ist. Dieses Signal macht sich jedoch im STD-Spektrum bis auf geringe Artefakte unter 1% nicht bemerkbar. $c(H_5) = 1.51 \mu\text{M}$, $c(\text{Ligand } 43) = 336 \mu\text{M}$, 700 MHz, $T = 298 \text{ K}$, $sp_{13} = 30 \text{ dB}$, Sättigungsdauer = 2 s, Einstrahlpunkt des Sättigungspulses = -1.5 ppm.

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten der Verbindungen, wurden die ermittelten STD-Amplifikationsfaktoren gegen die jeweiligen Ligandkonzentrationen aufgetragen. Wie schon bei den SPR-Studien wurde bei höheren Konzentrationen der Beginn eines linearen Verlaufes der Datenpunkte beobachtet. Diese wurden daher im Kontext einer besseren Kurvenanpassung nicht berücksichtigt.

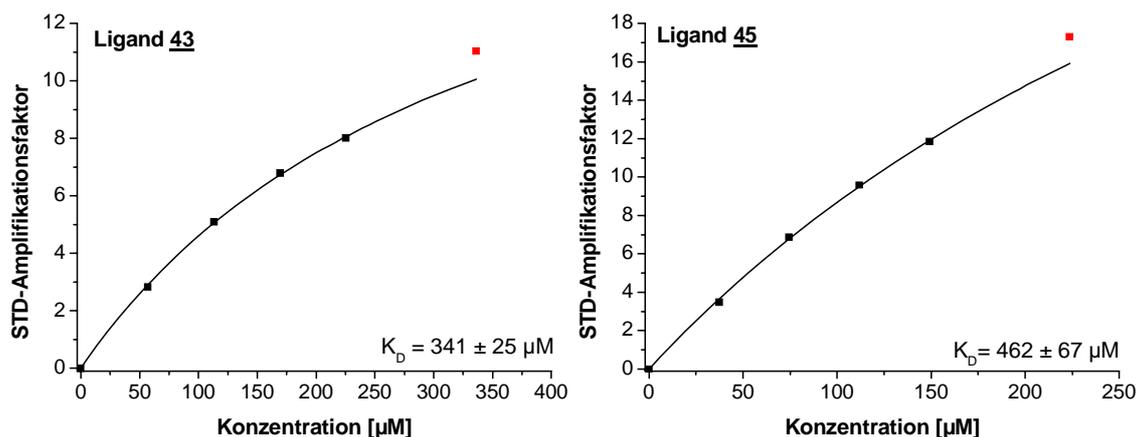


Abbildung 63: Bestimmung der K_D -Werte der Protonen der *N*-Acetylgruppe der Liganden **43** und **45** durch STD-Titration. Die rot markierten Datenpunkte lassen keinen optimalen *fit* an das *one-site-binding* Modell zu, was vermutlich ein Resultat unspezifischer Wechselwirkungen ist. Deswegen wurden diese bei der Kurvenanpassung nicht berücksichtigt.

Die durch die STD-Titration erhaltene Dissoziationskonstante von $K_D = 341 \mu\text{M} \pm 25 \mu\text{M}$ für Ligand **43** deckt sich sehr gut mit den Ergebnissen der SPR-Studien mit $K_D = 302 \pm 89 \mu\text{M}$, für Ligand **45** ist der $K_D = 462 \pm 67 \mu\text{M}$ etwas besser (SPR: $K_D = 841 \pm 393 \mu\text{M}$). Die Dissoziationskonstante des Liganden **43** ist bezüglich der STD-Studien um den Faktor 8 besser als die des Referenzliganden **5** mit $K_D = 2780 \pm 980 \mu\text{M}$. Aus den ^1H -STD-NMR-Messungen konnten ebenfalls die Bindungsepitope beider Liganden erhalten werden (Abbildung 64, Abbildung 65). Aufgrund einiger im ^1H -Spektrum überlappender Signale waren die relativen STD-Prozente aller Ligandprotonen jedoch nicht bestimmbar.

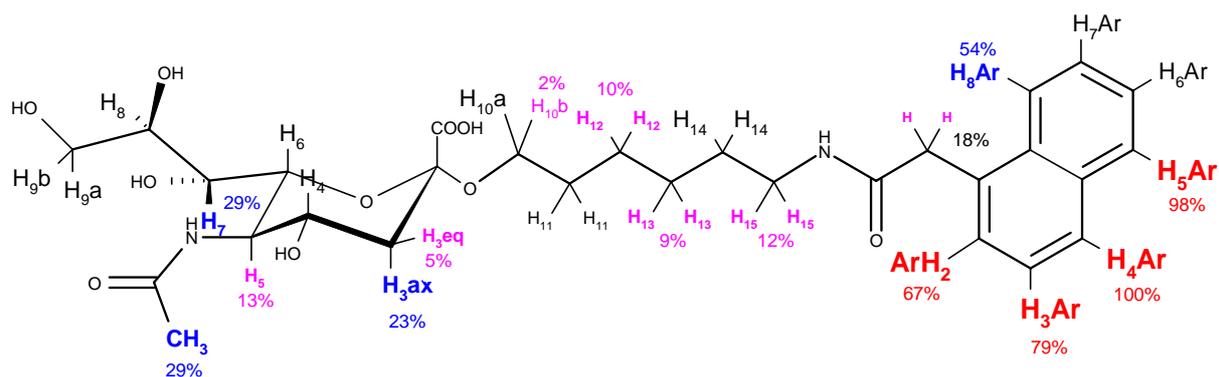


Abbildung 64: Bindungsepitop des Liganden **43**. Die relativen STD-Prozente sind farblich abgegrenzt in 0-20% (magenta), 20-60% (blau) und 60-100% (rot). Es konnten nicht alle relativen STD-Prozente der Protonen aufgrund der Überlagerung ihrer Integrale bestimmt werden. $c(\text{H5}) = 1.51 \mu\text{M}$, $c(\text{Ligand } 43) = 336 \mu\text{M}$, 700 MHz, $T = 298 \text{ K}$, $\text{sp13} = 30 \text{ dB}$, Sättigungsdauer = 2 s, Einstrahlpunkt des Sättigungspulses = -1.5 ppm.

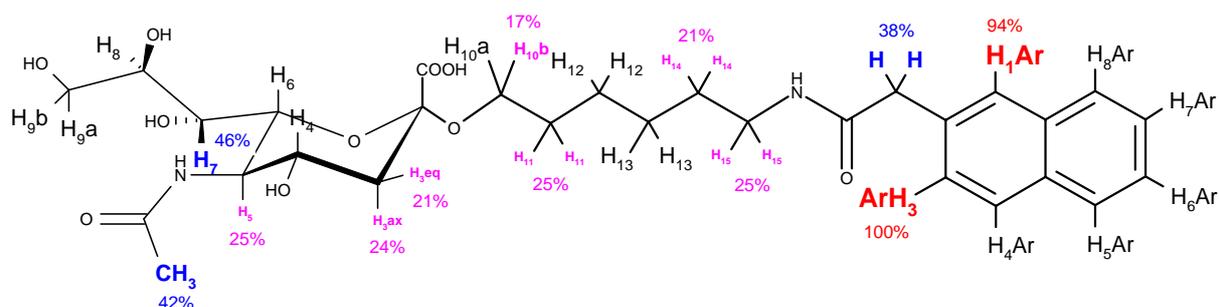


Abbildung 65: Bindungsepitop des Liganden **45**. Die relativen STD-Prozente sind farblich abgegrenzt in 0-30% (magenta), 30-60% (blau) und 60-100% (rot). Es konnten nicht alle relativen STD-Prozente der Protonen aufgrund der Überlagerung ihrer Integrale bestimmt werden. $c(\text{H5}) = 1.17 \mu\text{M}$, $c(\text{Ligand } 45) = 259 \mu\text{M}$, 700 MHz, $T = 298 \text{ K}$, $\text{sp13} = 30 \text{ dB}$, Sättigungsdauer = 2 s, Einstrahlpunkt des Sättigungspulses = -1.5 ppm.

Die Bindungsepitope der Liganden **43** und **45** sind zueinander relativ ähnlich: Die größten rel. STD-Prozente sind in beiden Fällen an den aromatischen Protonen zu erkennen. Dies unterstreicht nahe und damit vermutlich bindungsunterstützende Kontakte des Aromaten zum Protein. Demgegenüber zeigen die Kohlenhydratprotonen nur relative STD-Prozente im mittleren Bereich, wobei die jeweils stärksten an den Methylprotonen der *N*-Acetylgruppe und dem H-7 zu finden sind. Die geringen rel. STD-Prozente der Alkyl-Seitenkette deuten auf nur geringe Wechselwirkungen mit dem Protein hin. Allerdings ist der Unterschied zwischen den rel. STD-Prozenten der aromatischen Protonen und den Kohlenhydratprotonen im Falle des Liganden **43** größer. Unter der Annahme, dass sich die Position des Kohlenhydrates in der Bindungstasche durch das jeweilige Aglycon nicht verändert, kann dieser relative Unterschied auf einen engeren Kontakt des Aromaten von Ligand **43** zum Protein hindeuten.

Die Bindungsepitope der Liganden bestärken darüber hinaus die durch das *modeling* in die Röntgenstruktur eingepassten und minimierten Strukturen, bezüglich ihrer Position und Konformation. Auch in der modellierten Struktur des Liganden haben sowohl der Aromat als auch das Kohlenhydrat die engsten Kontakte zum H5-Protein, während besonders der Anfang der glycosidische Seitenkette (C-10 und C-11) der Liganden **43** und **45** aus dem Protein herausragt. Hinsichtlich der Position des Naphtylacetamidrestes bestätigen die höheren rel. STD-Prozente der äußeren Aromatenprotonen die Position des 1-Naphtylacetamidrestes des Liganden **43** zum H5-Protein.

4.5.2 Entwicklung von am Aglycon peptidisch modifizierter Sialinsäureglycoside (I)

4.5.2.1 Design von am Aglycon modifizierten peptidischen Sialinsäurestrukturen

Da der Ligand **43** den besten K_D -Wert dieser Ligandgruppe aufwies, wurde dieser als Leitstruktur für eine weitere Optimierung in den Fokus genommen. Für eine deutliche Verbesserung dessen Bindungsaffinität können zwei Möglichkeiten in Betracht gezogen werden. Zum einen sollte eine Versteifung des Aglycons zu einer stärkeren Bindung führen (siehe Abschnitt 1.2.3). Hierfür kann sowohl die Anbringung einer Doppelbindung als auch einer Amidbindung in Frage kommen. Eine weitere Möglichkeit der Affinitätssteigerung stellt die Etablierung zusätzlicher Interaktionen zwischen dem Aglycon des Liganden und dem Protein dar.

Zur Überprüfung dieser Optionen wurde zunächst der zu optimierende Ligand **43** in der Röntgenstruktur betrachtet und analysiert (Abbildung 66). Hierbei stellte sich heraus, dass eine *trans*-Doppelbindung zwischen Position 13 und 14 die gleiche bindende Konformation des Aglycons, wie die in der Leitstruktur **43** ermöglicht. In nahem Abstand zu dieser befindet sich zudem die Aminogruppe eines Lysins (Lys 218) des H5-Proteins. Zu diesem könnten polare Interaktionen oder eine π -Aromatenwechselwirkung ausgebildet werden.

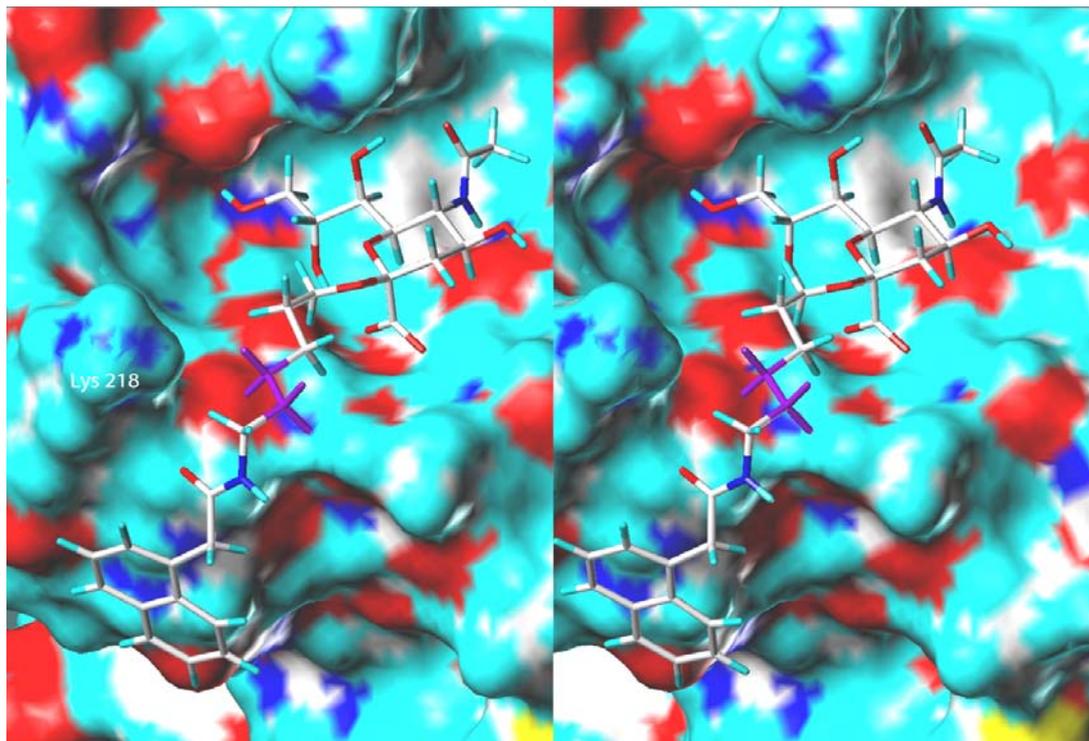


Abbildung 66: Abbildung der Leitstruktur **43** in der Bindungstasche des H5. Die Kohlenstoffe 13 und 14 des Aglycons (mit den daran gebundenen H-Atomen violett dargestellt) könnten durch ihre bereits bestehende *trans*-Orientierung (180° -Winkel-Torsionswinkel mit den angrenzenden C-Atomen) durch eine *trans*-Doppelbindung ersetzt werden. Dies würde mit einer Zunahme der Rigidität des Liganden einhergehen. In der Nähe der Position befindet sich außerdem das Lys 218, zu dem eine polare Interaktion oder eine π -Aromatenwechselwirkung aufgebaut werden könnte. (Darstellungsform: Protein: *connolly* Oberfläche, Ligand: *capped sticks, crossed-eye* Modus)

Anschließend wurde nach einer synthetisch praktikablen Möglichkeit zur Etablierung der oben genannten Modifikationen gesucht. Eine beide Aspekte berücksichtigende Möglichkeit, sowohl bezüglich einer Erhöhung der Rigidität, als auch der Etablierung zusätzlicher Wechselwirkungen, stellt hierbei das Einsetzen von Aminosäuren in die Seitenkette der Leitstruktur **43** dar (Abbildung 67). Hierdurch kommt es zur gewünschten Versteifung der Seitenkette, durch die ausgebildete Amidbindung. Des Weiteren ist es aufgrund der Diversität erhältlicher Aminosäuren möglich, die gewünschten Interaktionen zum Lys 218 auszubilden.

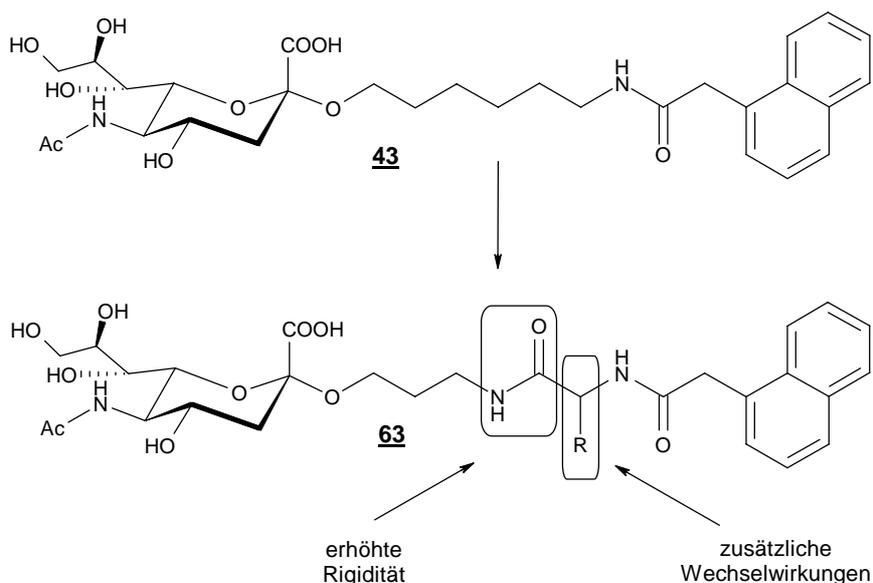


Abbildung 67: Durch das Einsetzen von Aminosäuren in die glycosidische Alkylkette des Liganden **43** wird einerseits eine Versteifung der Seitenkette erreicht. Zum anderen können durch funktionelle Gruppen der Aminosäuren neue bindende Kontakte etabliert werden. Diese Modifikationen könnten zu einer starken Verbesserung der Bindungsaffinität führen.

Eine Möglichkeit der Modifikation stellt das Einbinden der Aminosäure Glycin in die Seitenketten dar. Hierdurch kann man den separaten Einfluss der Rigiditätszunahme überprüfen, da keine zusätzlichen Kontakte aufgrund der fehlenden Aminosäureseitenkette ausgebildet werden können (Abbildung 68).

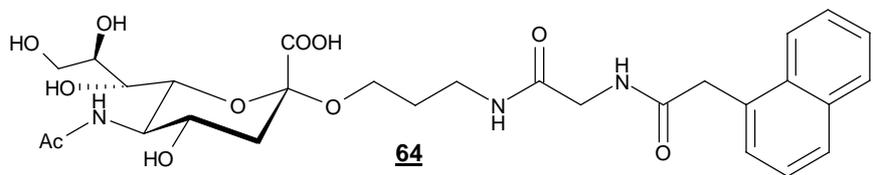


Abbildung 68: Der Einbau der Aminosäure Glycin führt zu einer Versteifung der glycosidischen Seitenkette des Liganden **64**.

Wählt man statt des Glycins die L-Asparaginsäure, so befindet sich deren Säurefunktion etwa im Abstand einer Salzbrücke zu der Aminogruppe des Lys 218 (Abbildung 69).

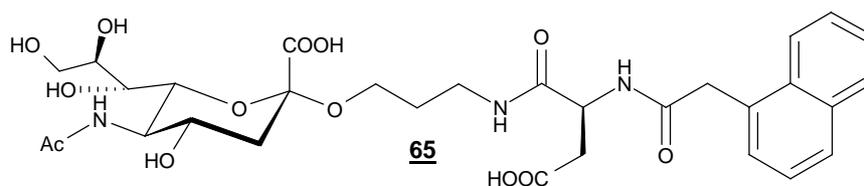


Abbildung 69: Die Säurefunktion der L-Asparaginsäure des Liganden **65** könnte eine potentielle Salzbrücke zur Aminogruppe des Lys 218 ausbilden.

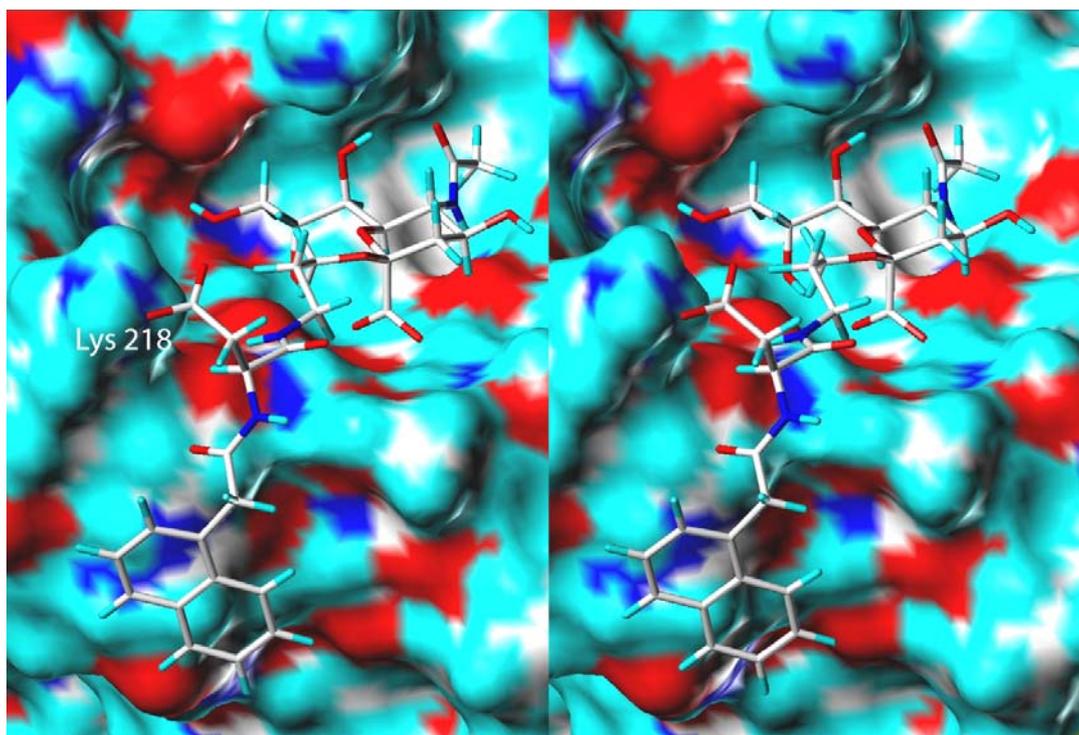


Abbildung 70: Darstellung des Liganden **65** in der Bindungstasche des H5. Das Einsetzen der L-Asparaginsäure in die Seitenkette erlaubt zusätzliche Interaktionen dessen Carboxylgruppe mit dem Lys 218 des H5. (Darstellungsform: Protein: *connolly* Oberfläche, Ligand: *capped sticks, crossed-eye* Modus)

Die erwähnte π -Aromatenwechselwirkung ist durch die Aminosäure L-Phenylalanin des Liganden **66** prüfbar (Abbildung 71).

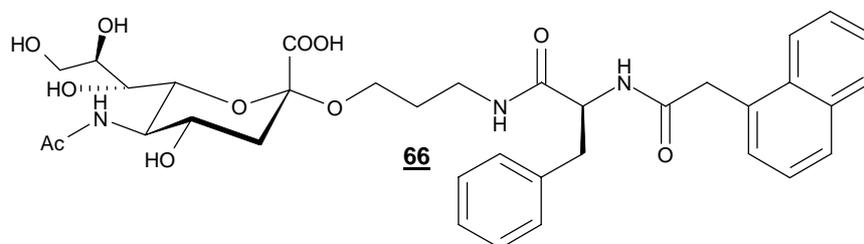


Abbildung 71: Durch das Phenylalanin in der Seitenkette des entworfenen Liganden **66** ist die Etablierung eine π -Aromatenwechselwirkung zum Lys 218 denkbar.

Zur Kontrolle der durch das *modeling* entworfenen Strukturen wurden diese anschließend wiederum durch *docking*-Berechnungen überprüft. Die berechneten Bindungsenergien sind in Tabelle 6 angegeben. Diese sind bei den Liganden **64** und **66** gegenüber der Leitstruktur **43** verbessert. Die theoretische Bindungsenergie des Liganden **65** ist allerdings etwas schlechter.

Tabelle 6: Die mit dem Programm Sybyl 8.0 berechneten theoretischen Bindungsenergien der aus der Verbindung **43** abgeleiteten peptidischen Sialinsäureglycoside (**64-66**). Im Vergleich dazu sind die Leitstruktur **43** und der Referenzligand Neu5AcαMe **5** aufgeführt.

Ligand	berechnete Bindungsenergie [kcal/mol]
5	-28.6
43	-40.6
64	-41.8
65	-39.4
66	-46.2

4.5.2.2 *Synthesedesign der am Aglycon peptidisch modifizierten Sialinsäureglycoside*

Anschließend wurde nach einer effizienten Synthesestrategie zur Darstellung der Liganden gesucht. Das Augenmerk fiel hierbei auf zwei Eigenschaften der Zielmoleküle. Zum einen besteht die Seitenkette aller drei Liganden aus den gleichen Grundelementen (*n*-Propylamido-Einheit, Aminosäure und 1-Naphtylacetamid), die amidisch miteinander verknüpft sind. Zum anderen ist die Carbonsäurefunktion der gemeinsamen Sialinsäurestruktur an ein Harz verankerbar. Dies macht eine Festphasensynthese der Liganden möglich.

Aus der Literatur sind bereits Festphasensynthesen von Sialinsäurederivaten bekannt.⁷¹ Da in diesem Fall jedoch die freie Carboxylfunktion nach der Abspaltung wieder erhalten werden sollte, musste ein geeignetes Harz gefunden werden. Eine Möglichkeit stellt hier das 2-Chlorotritylharz dar.^{72,73} Die Abspaltung, der an der Festphase dargestellten Sialinsäureanaloge, kann bei Verwendung dieses Harzes im leicht sauren Milieu und unter Wiederherstellung der Carboxylfunktion durchgeführt werden. Ein geeignetes Vorläufermolekül für die Festphasensynthese zur Darstellung der allgemeinen Zielstruktur **63** ist die Verbindung **67** (Abbildung 72). Diese beinhaltet bereits die *n*-Propylamino-Einheit in der glycosidischen Seitenkette, welche als Carbamat Fmoc-geschützt ist.⁷⁴ Die Hydroxygruppen der Sialinsäure sind acetyliert, um Nebenreaktionen während der Amidkupplungen zu vermeiden. Das Vorläufermolekül **67** ist mehrstufig durch die Wahl geeigneter Schutzgruppen aus Sialinsäure **9** und dem Fmoc-geschützten Linker **68**

synthetisierbar. Für die glycosidische Verknüpfung an das Glycan kann nicht, wie in vorherigen Synthesen, der Methyl ester des β -Sialylchlorides **12** verwendet werden. Weder die Fmoc-Schutzgruppe, noch die Acetylschutzgruppen sind orthogonal zu dieser. Stattdessen ist ein Benzylester **69** als Schutzgruppe der Säurefunktion geeignet.⁷⁵

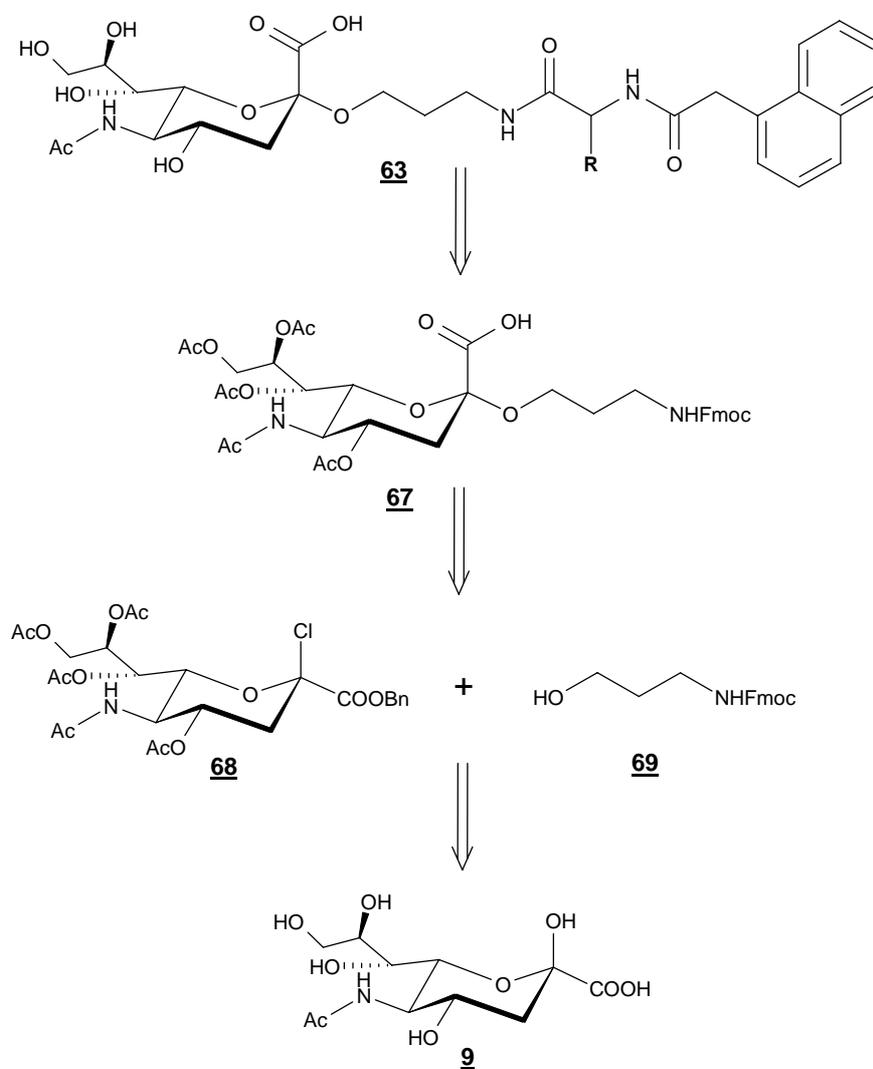


Abbildung 72: Allgemeine Synthesestrategie zur Darstellung peptidisch verlinkter Sialinsäureglycoside. Diese erhält man effizient durch Festphasensynthese des gemeinsamen Vorläufermoleküls **67**. Dieses ist aus dem β -Sialylchloridbenzylester **68** und Fmoc-Propanolamin **69** darstellbar.

4.5.2.3 Synthese der am Aglycon peptidisch modifizierten Sialinsäureglycoside

Für die Synthese des für die Festphasensynthese einsatzfähigen Sialylglycans **67** wurde als erstes der Fmoc-geschützte Linker **69** dargestellt (Abbildung 73). Dieser konnte durch die Umsetzung von *n*-Propanolamin **70** mit Fmoc-succinimidylcarbonat erhalten werden.^{76,77}

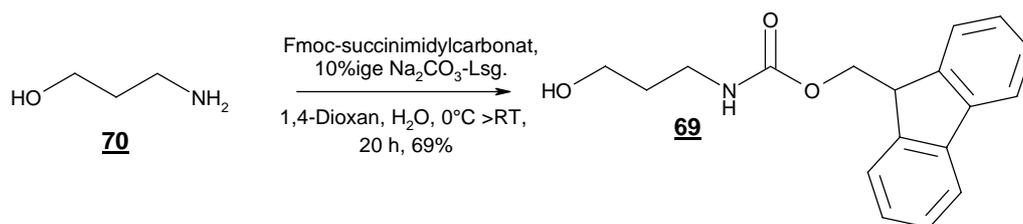


Abbildung 73: Darstellung des Carbamates **69**.

Im Anschluss wurde die Sialinsäure **9** mit Essigsäureanhydrid in Pyridin und unter Zusatz von DMAP acetyliert (Abbildung 74). Das aufgearbeitete Rohprodukt **71** wurde mit Cäsiumcarbonat in das entsprechende Salz überführt und mit Benzylbromid in DMF zu Verbindung **72** umgesetzt.

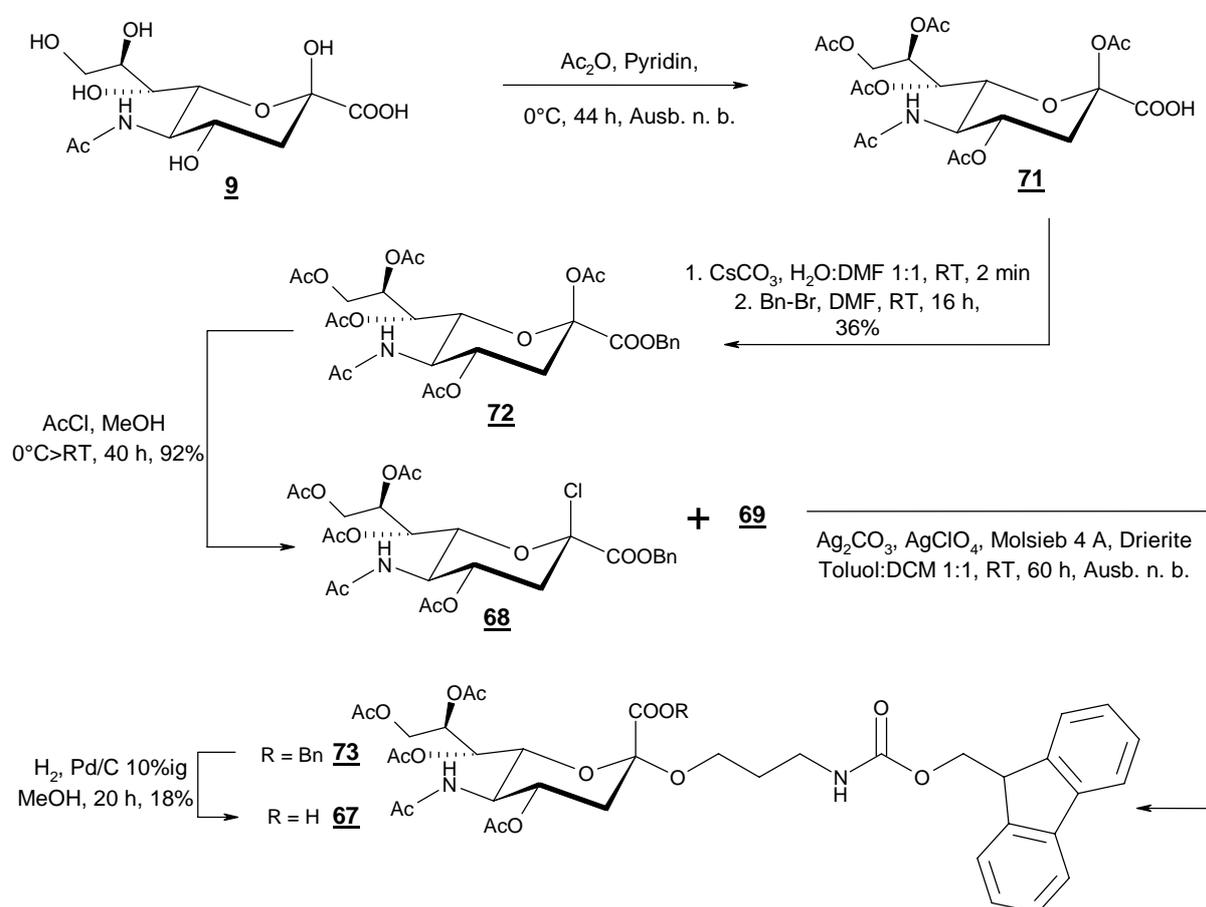


Abbildung 74: Synthese des für die Festphasensynthese einsatzfähigen Bausteins **67**.

Die anschließende Reaktion mit Acetylchlorid und Methanol ergab den Benzylester des β -Sialylchlorides **68**.^{78,79} Dieser konnte mit dem Fmoc-geschützten *n*-Propanolamin **69** zum entsprechenden α -Glycosid **73** umgesetzt werden. Zur Steigerung der Ausbeute wurde im Gegensatz zur den vorherigen Glycosidverknüpfungen neben Silbercarbonat und

Molsieb 4 Å, zusätzlich katalytische Mengen an Silberperchlorat und außerdem Drierite als Trockenmittel zugesetzt.⁸⁰ Eine vollständige Reinigung des Produktes **73** war jedoch auch hier, durch zu geringe Unterschiede der R_f -Werte mit Verunreinigungen, nicht möglich. Die anschließende hydrogenolytische Entschützung von **73** mit Wasserstoff und Palladium/Aktivkohle (10%) ergab den für die Festphasensynthese einsatzfähigen Baustein **67**.

Die Festphasensynthese der peptidisch verlinkten Sialylglycane begann mit der Kupplung der Carbonsäurefunktion des Bausteins **67** an das 2-Chlortritylchloridharz in abs. Dichlormethan unter Zusatz von DIPEA (Abbildung 75). Eine photometrische Überprüfung der Methylfluoren-Werte ergab eine Kupplungsausbeute an das Harz von 30-46%.

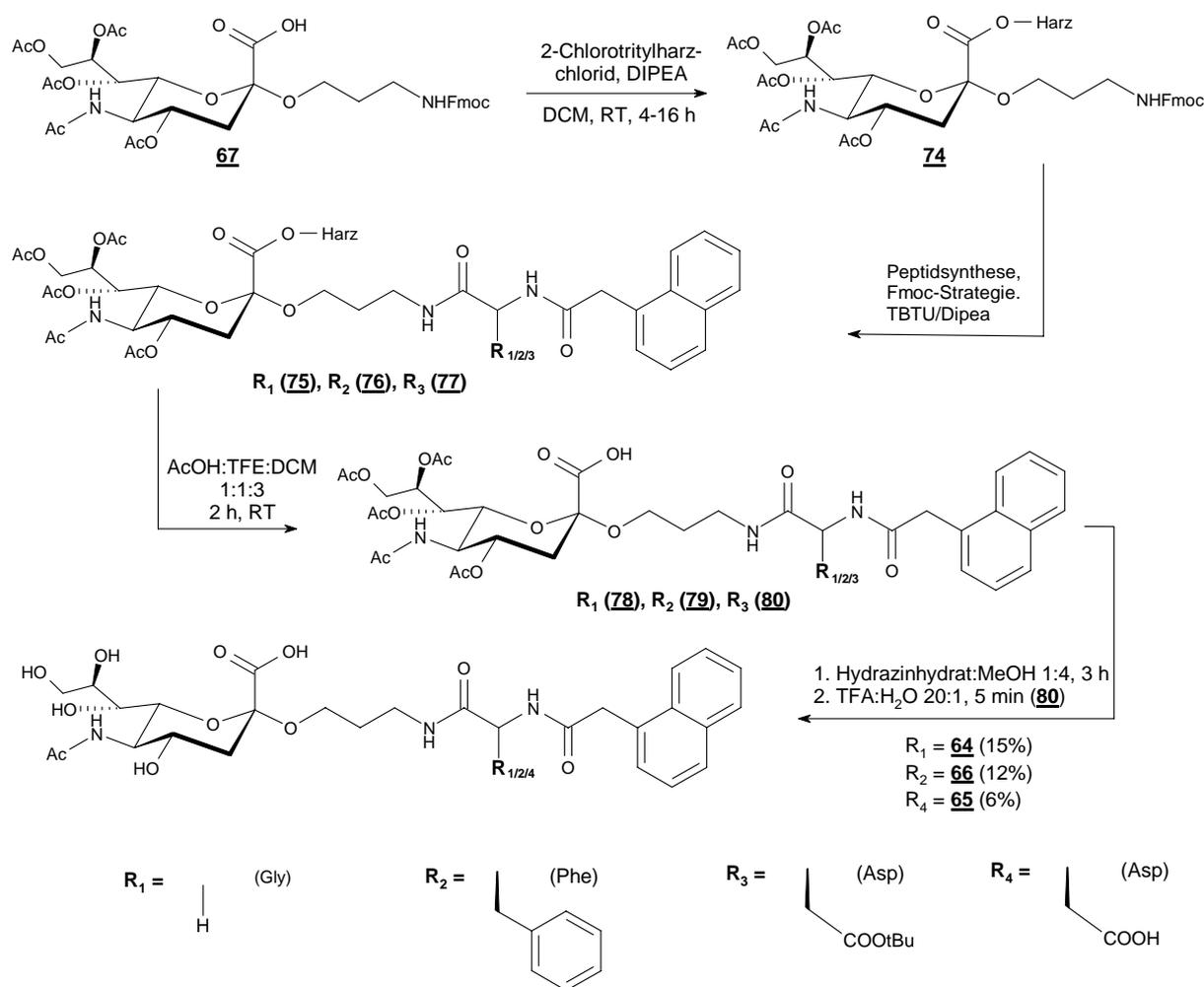


Abbildung 75: Festphasensynthese der Liganden **64**, **65** und **66**.

Im Anschluss wurden durch Peptidsynthesen nach Fmoc-Strategie die entsprechenden Aminosäuren und nachfolgend die 1-Naphtylelessigsäure durch jeweils Zweifachkupplungen an

das verankerte Sialylglycan geknüpft. Als Aktivatorengemisch hierfür wurde TBTU/DIPEA verwendet.⁸¹ Die dargestellten Verbindungen **75**, **76** und **77** wurden im Anschluss mittels Essigsäure:Trifluorethanol:Dichlormethan (1:1:3) vom Harz abgespalten. Die Acetylschutzgruppen der Sialylglycane wurden durch Hydrazinhydrat:Methanol (1:4) entfernt. Die Verbindung **80** musste zusätzlich mit Trifluoressigsäure:H₂O (20:1) behandelt werden, um die *tert*-Butylgruppe der L-Asparaginsäure abzuspalten. Die Reaktionsdauer wurde mit 5 min sehr kurz gewählt, um eine säurekatalytische Zersetzung des Sialylglycosides zu unterdrücken. Nach der anschließenden Reinigung der Rohprodukte an der HPLC konnten die Liganden **64**, **65** und **66** erfolgreich erhalten werden. In Abbildung 76 ist das ¹H-NMR Spektrum des Liganden **65** nach Reinigung an der HPLC illustriert.

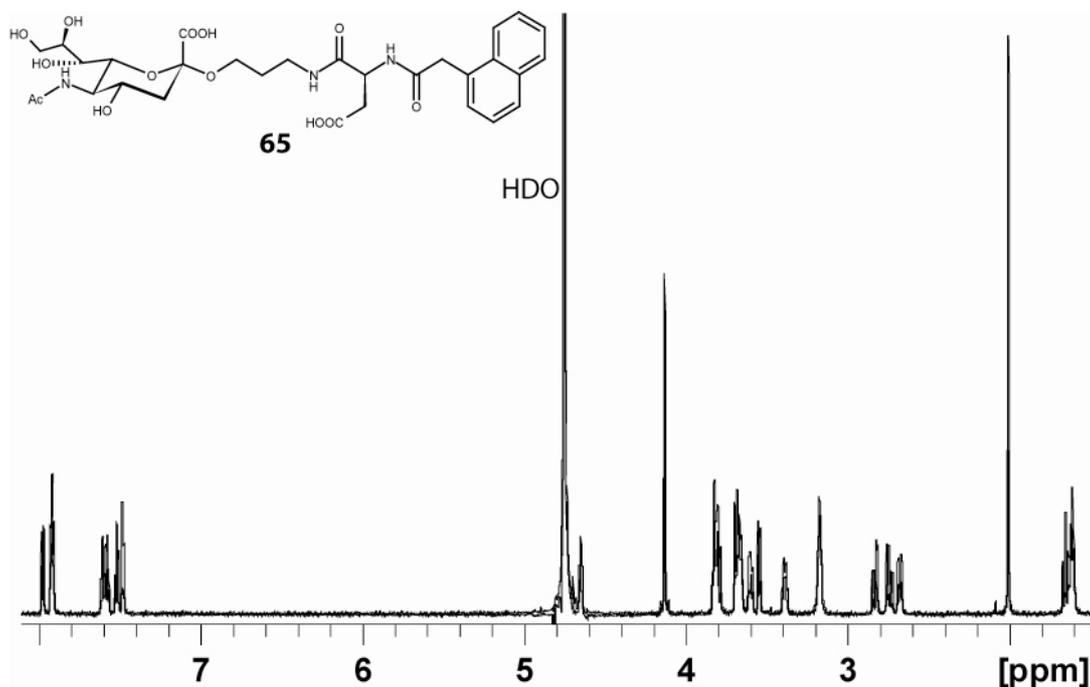


Abbildung 76: Exemplarisches ¹H-NMR-Spektrum des mittels Festphasensynthese dargestellten Liganden **65**. D₂O, 700 MHz, T = 300 K.

Die Ausbeuten waren mit 15% für Ligand **64** und 12% für **66** im niedrigen zweistelligen Bereich. Der Hauptgrund hierfür ist wahrscheinlich die geringe Belegung des Glycans **67** an das 2-Chlortritylchloridharz, aufgrund der abgeschirmten Säurefunktion der sterisch anspruchsvollen Sialinsäure. Die Ausbeute des Liganden **65** ist mit 6% deutlich niedriger. Trotz der geringen Reaktionsdauer von 5 min, scheint durch die saure Abspaltung der *tert*-Butylgruppen ein Teil des Produktes an der glycosidischen Bindung gespalten worden zu sein.

4.5.2.4 Bindungsstudien der Liganden mittels SPR

Für die mittels Festphasensynthese synthetisierten Liganden **64-66** wurden für die SPR-Studien niedrigere Konzentrationen von bis zu $c = 250 \mu\text{M}$ gewählt, um mögliche unspezifische Wechselwirkungen im höheren Konzentrationsbereich von vornherein zu vermeiden. Die sich daraus ergebenden RU-Antworten ließen sich über alle Datenpunkte sehr gut an das *one-site-binding* Modell anfitten (Abbildung 77).

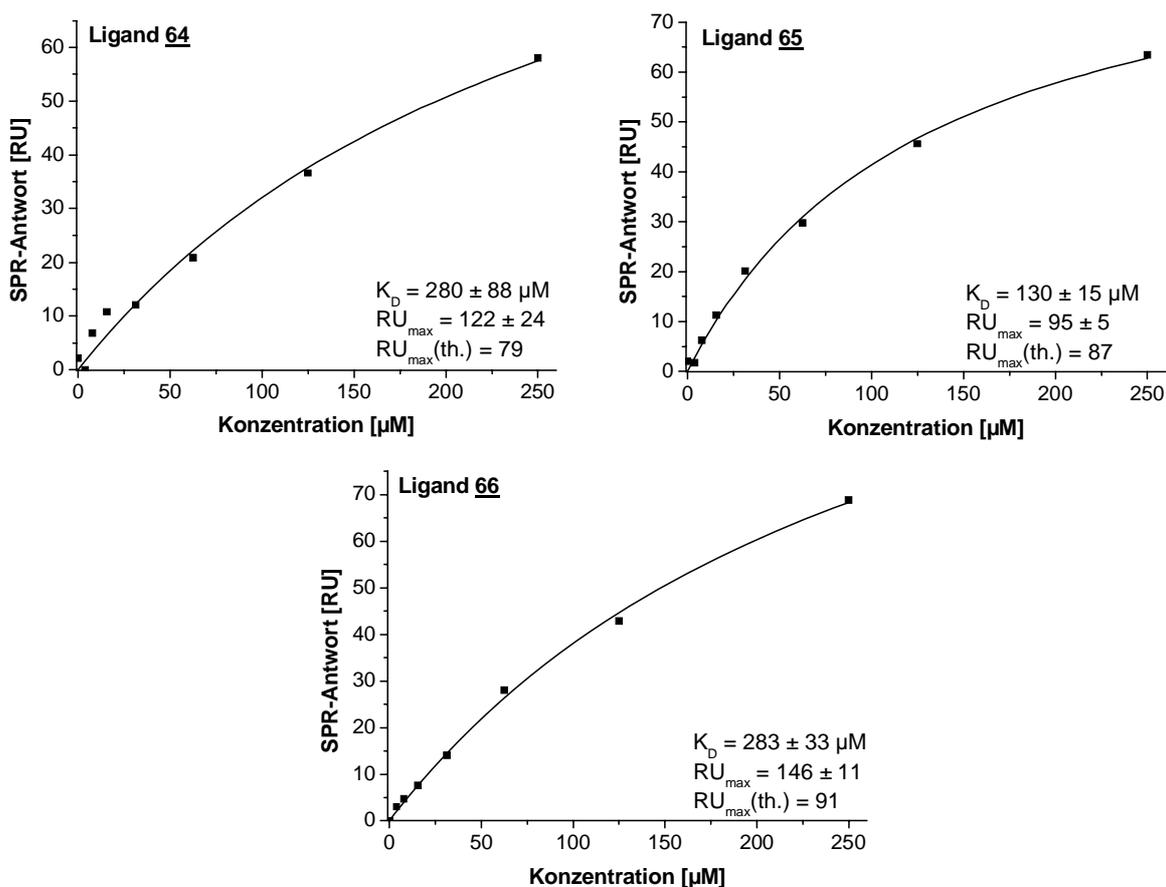


Abbildung 77: SPR-Antworten der Liganden **64-66** als Funktion ihrer Konzentration. Die Anpassung der Datenpunkte an das *one-site-binding* Modell ergibt die Dissoziationskonstanten.

Die bestimmten Dissoziationskonstanten aus den SPR-Studien der Liganden **64** und **66** sind mit jeweils $K_D \sim 280 \mu\text{M}$ sehr ähnlich zu der Leitstruktur **43** mit einem $K_D = 302 \pm 89 \mu\text{M}$. Demgegenüber zeigt der Ligand **65** mit einem $K_D = 130 \pm 15 \mu\text{M}$ eine Verbesserung der Bindungsaffinität.

4.5.2.5 Bindungsstudien der Liganden durch ^1H -STD-NMR

Anschließend wurden alle drei Liganden ebenfalls mittels ^1H -STD-NMR auf ihre Bindungseigenschaften zum H5 hin überprüft. Die sich aus der STD-Titration ergebenden *fits* und K_D -Werte sind in Abbildung 78 abgebildet.

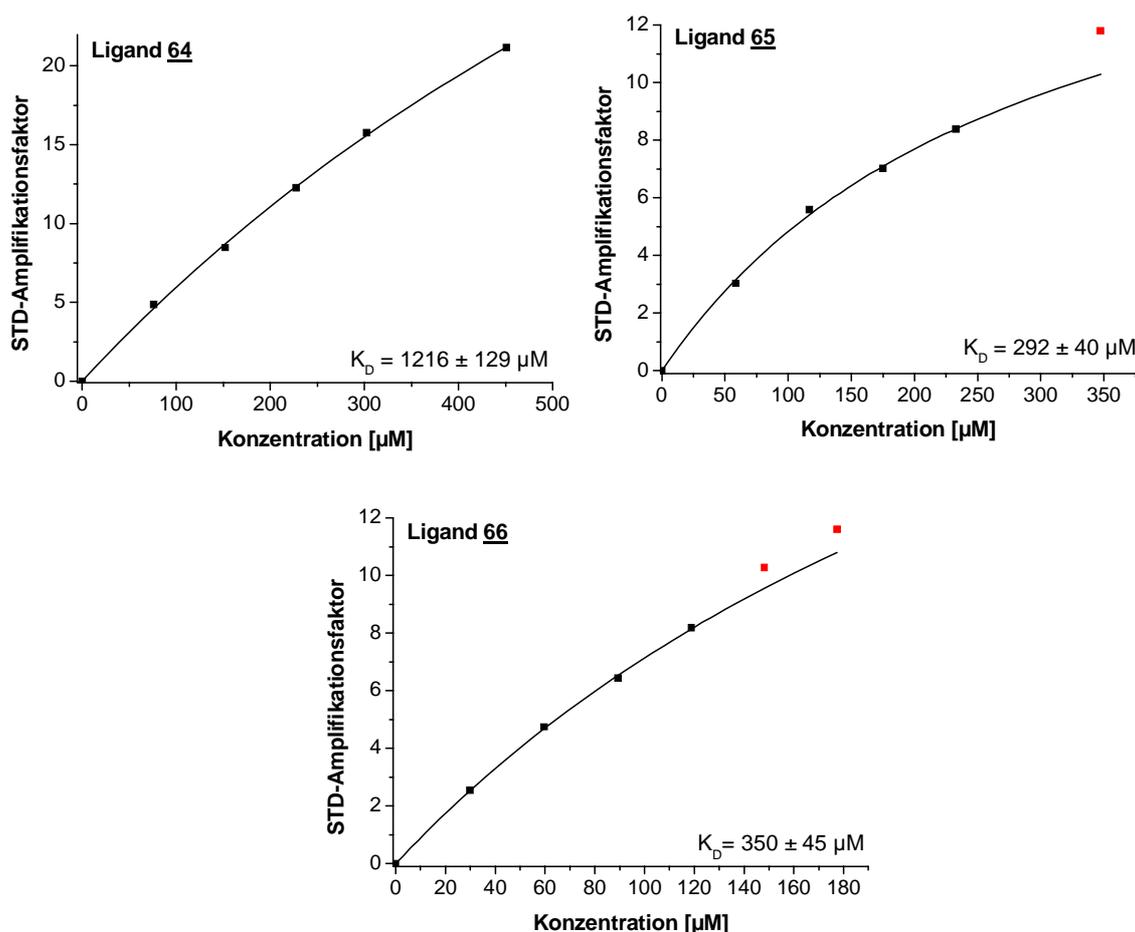


Abbildung 78: Bestimmung der K_D -Werte der Protonen der *N*-Acetylgruppe der Liganden **64-66** durch STD-Titration. Die rot markierten Datenpunkte passen nicht optimal in das *one-site-binding* Modell, was vermutlich ein Resultat unspezifischer Wechselwirkungen ist. Deswegen wurden diese bei der Kurvenanpassung nicht berücksichtigt.

Die Dissoziationskonstanten der Liganden stimmen nicht ganz mit denen aus den SPR-Messungen bestimmten Ergebnissen überein. Die Verbindung **65** zeigt auch hier den relativ besten $K_D = 292 \pm 40$ µM. Die Dissoziationskonstante ist jedoch im Gegensatz zu den SPR-Messungen im Vergleich zu der Leitstruktur **43** nur unwesentlich besser. Die bestimmten Dissoziationskonstanten des Liganden **66** und besonders des Liganden **64** sind demgegenüber sogar schlechter als die Leitstruktur **43**. In den SPR-Studien zeigten diese eine

leichte Verbesserung zur Verbindung **43** auf. Um genauere Informationen über die Interaktionen der drei Liganden mit dem H5-Protein zu erhalten, wurde deren Bindungsepitop aufgestellt.

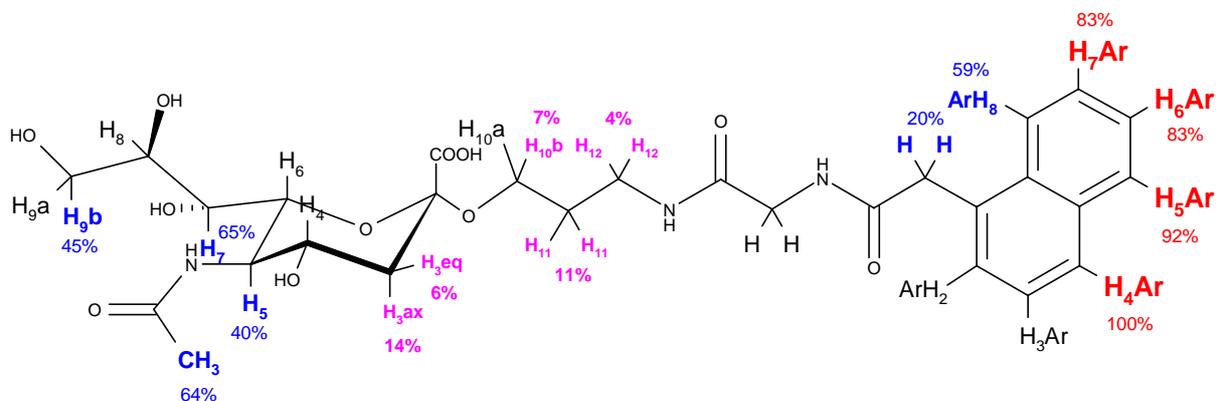


Abbildung 79: Bindungsepitop des Liganden **64**. Die relativen STD-Prozente sind farblich abgegrenzt in 0-20% (magenta), 20-70% (blau) und 70-100% (rot). Es konnten nicht alle relativen STD-Prozente der Protonen aufgrund der Überlagerung ihrer Integrale bestimmt werden. $c(\text{H5}) = 2.05 \mu\text{M}$, $c(\text{Ligand } \mathbf{64}) = 451 \mu\text{M}$, 700 MHz, $T = 298 \text{ K}$, $\text{sp13} = 30 \text{ dB}$, Sättigungsdauer = 2 s, Einstrahlpunkt des Sättigungspulses = -1.5 ppm.

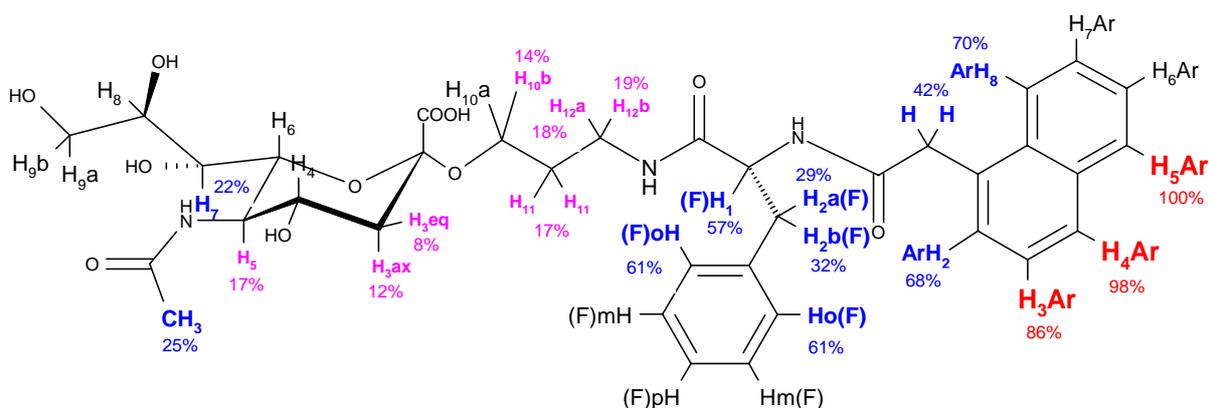


Abbildung 80: Bindungsepitop des Liganden **66**. Die relativen STD-Prozente sind farblich abgegrenzt in 0-20% (magenta), 20-80% (blau) und 80-100% (rot). Es konnten nicht alle relativen STD-Prozente der Protonen aufgrund der Überlagerung ihrer Integrale bestimmt werden. $c(\text{H5}) = 1.96 \mu\text{M}$, $c(\text{Ligand } \mathbf{66}) = 177 \mu\text{M}$, 700 MHz, $T = 298 \text{ K}$, $\text{sp13} = 30 \text{ dB}$, Sättigungsdauer = 2 s, Einstrahlpunkt des Sättigungspulses = -1.5 ppm.

Sowohl das Bindungsepitop des Liganden **64**, als auch das des Liganden **66** sind ähnlich zu der flexibleren Leitstruktur **43**. Beide zeigen die höchsten STD-Prozente im äußeren aromatischen Bereich des 1-Naphtylacetamidrestes. Die rel. STD-Prozente der Kohlenhydratprotonen sind demgegenüber geringer. Dies lässt auf einen ähnlichen Bindungsmodus wie der des Liganden **43** schließen. Allerdings sind die relativen STD-Prozente des Kohlenhydrates im direkten Vergleich bei Ligand **64** deutlich größer als bei **66**.

Ein Grund hierfür könnte das Phenylalanin in **66** sein, indem es durch zusätzliche Wechselwirkungen mit dem Protein das Kohlenhydrat etwas aus der Bindungstasche herauszieht. Diese Annahme wird durch die hohen STD-Prozente an den Protonen des Phenylalanins von Ligand **66** bekräftigt. Die zusätzlichen Wechselwirkungen des Phenylalanins scheinen jedoch teilweise durch den Verlust an bindenden Kontakten des Kohlenhydrates kompensiert zu werden, da die Bindungsaffinität von Ligand **66** gegenüber **64** nicht sehr stark verbessert ist.

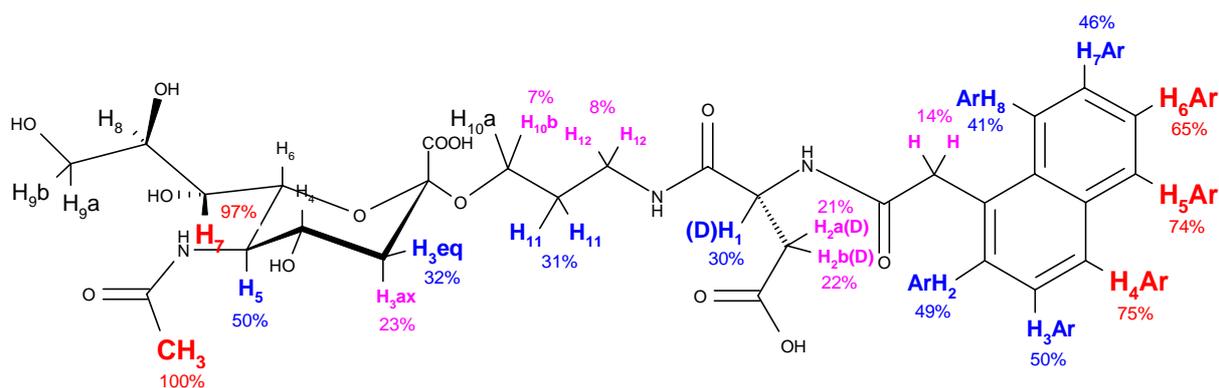


Abbildung 81: Bindungsepitop des Liganden **65.** Die relativen STD-Prozente sind farblich abgegrenzt in 0-30% (magenta), 30-60% (blau) und 60-100% (rot). Es konnten nicht alle relativen STD-Prozente der Protonen aufgrund der Überlagerung ihrer Integrale bestimmt werden. $c(\text{H5}) = 1.96 \mu\text{M}$, $c(\text{Ligand } \mathbf{65}) = 347 \mu\text{M}$, 700 MHz, $T = 298 \text{ K}$, $sp13 = 30 \text{ dB}$, Sättigungsdauer = 2 s, Einstrahlpunkt des Sättigungspulses = -1.5 ppm.

Das Bindungsepitop des Liganden **65** unterscheidet sich demgegenüber von **64**, **66** und der Leitstruktur **43**. Hier liegen die höchsten rel. STD-Prozente auf der Seite der Kohlenhydratprotonen und nicht bei den Protonen des 1-Naphtylacetamidrestes. Wie auch schon beim Liganden **66** zeigt der Ligand Aminosäurekontakte mit dem Protein, welche in diesem Fall durch die L-Asparaginsäure zustande kommen. Dies könnte auf eine starke Interaktion der Asparaginsäure zum Protein hinweisen (durch die Salzbrücke der Carboxylgruppe mit der Aminogruppe vom Lys 218 des Proteins), durch die die bindende Konformation des Liganden **65** im Gegensatz zur Leitstruktur **43** verändert würde und in diesem Fall zu einem größeren Abstand des Naphtylacetamidrestes zum Protein führen könnte. Wie schon bei Ligand **66** könnten zusätzliche Wechselwirkungen der Aminosäure in **65** teilweise durch den schlechteren Kontakt, in diesem Fall des Naphtylacetamidrestes, kompensiert werden.

4.5.3 Entwicklung von am Aglycon peptidisch modifizierter Sialinsäureglycoside (II)

4.5.3.1 Design der am Aglycon modifizierten peptidischen Sialinsäurestrukturen (II)

Die Ergebnisse der Bindungsstudien und Bindungsepitope der Liganden **65** führten zu einem zweiten Designzyklus peptidisch verlinkter Sialinsäureglycoside. Im Fokus standen dabei die Optimierung der wahrscheinlich gebildeten Salzbrücke zum Lysin 218, sowie der hydrophoben Wechselwirkung des Aromaten (Abbildung 82).

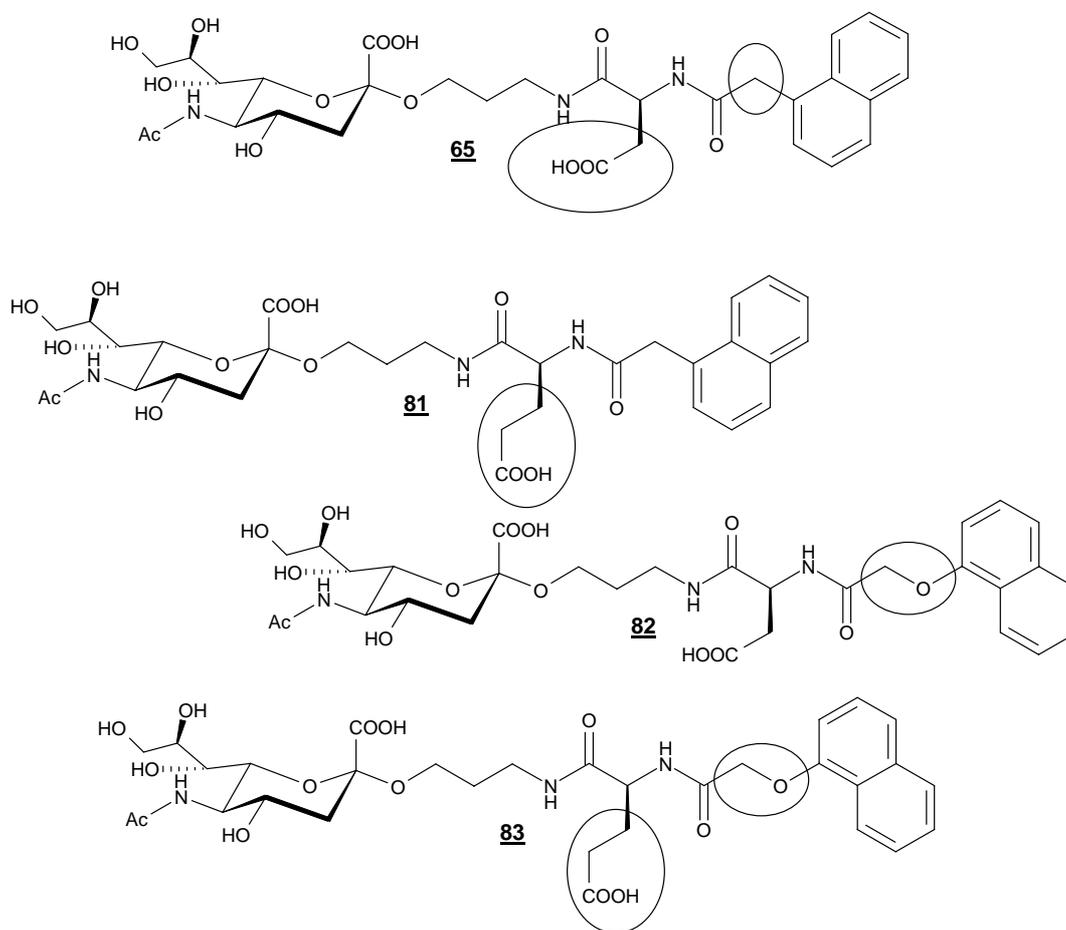


Abbildung 82: Im Fokus des zweiten Optimierungsschrittes der Aglycon-modifizierten peptidischen Sialinsäureanaloga stand die Verbesserung der potentiellen Salzbrücke der Carboxylfunktion der Aminosäureseitenkette sowie des Kontaktes zwischen dem 1-Naphtylacetamidrest zum Protein. Basierend auf der Struktur des Liganden **65** führt ein Austausch der L-Asparaginsäure durch L-Glutaminsäure zu Verbindung **81**. Der Ersatz des Naphtylacetamidrestes durch den längeren Naphtyloxyacetamidrest ergibt den Liganden **82**. Verbindung **83** resultiert aus der Kombination beider Modifizierungen.

Durch den Austausch der L-Asparaginsäure des Liganden **65** durch L-Glutaminsäure sollte der Abstand der Salzbrücke zum Lys 218 verbessert werden. Darüber hinaus käme es hierdurch

vermutlich zu einer größeren Flexibilität in der Konformation des entworfenen Liganden **81**. Dies könnte zu einem besseren Kontakt des Naphtylacetamidrestes mit dem Protein führen. Eine andere Option der Optimierung des aromatischen Kontaktes mit dem Protein, stellt den Austausch des 1-Naphtylacetamidrestes des Liganden **65** durch den um eine Bindungslänge erweiterten 1-Naphtyloxyacetamidrest dar (Ligand **82**). Die entworfenene Verbindung **83** ergibt sich aus der Kombination beider Verbesserungen. Die modifizierten Liganden **81-83** zeigten alle eine relativ zur Originalstruktur **65** verbesserte berechnete Bindungsenergie in den *docking*-Studien, wobei sich besonders der Liganden **81** hervorhob (Tabelle 7).

Tabelle 7: Die mit dem Programm Sybyl 8.0 berechneten theoretischen Bindungsenergien der aus der Verbindung **65** abgeleiteten peptidischen Sialinsäureglycoside (**81-83**). Im Vergleich dazu ist die Leitstruktur **65** und der Referenzligand **5** (Neu5AcαMe) aufgeführt.

Ligand	berechnete Bindungsenergie [kcal/mol]
5	-28.6
65	-39.4
81	-45.6
82	-40.4
83	-42.7

4.5.3.2 Synthese der Liganden

Vorbereitend für die Festphasensynthese wurde die 1-Naphtyloxyessigsäure **86** dargestellt. Hierfür wurde 1-Naphtol **85** mit Bromessigsäure **84** und KOH in Ethanol nach Williamson verethert.⁸²

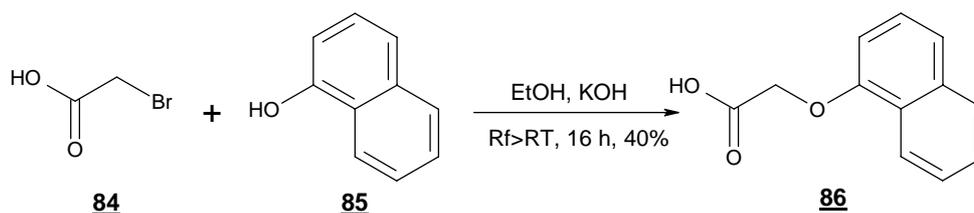


Abbildung 83: Synthese der 1-Naphtyloxyessigsäure **86**⁸²

Im Anschluss daran wurden die Liganden **82** und **83** nach der etablierten Methode (siehe Abbildung 75) erfolgreich dargestellt.

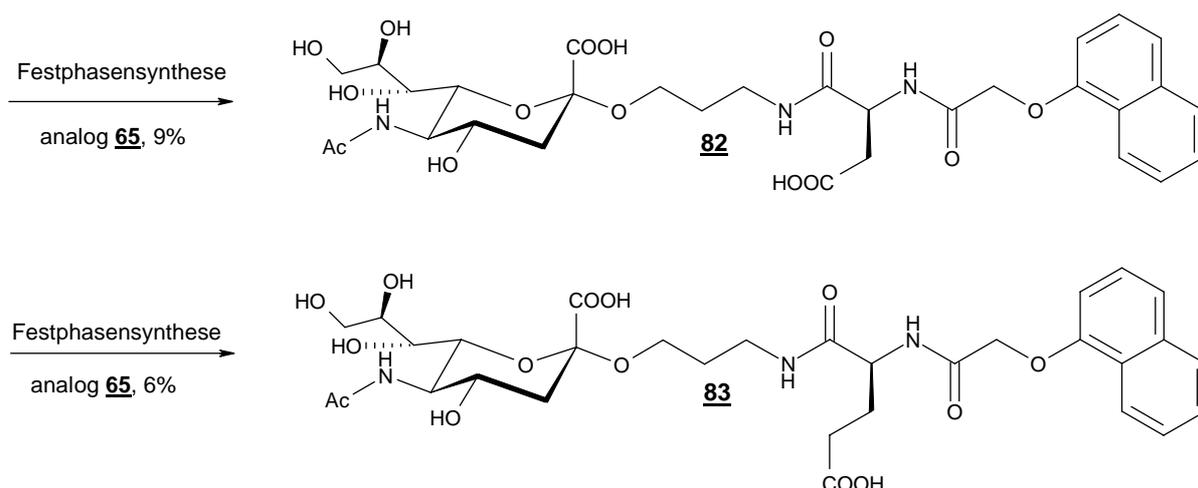


Abbildung 84: Die Synthese der Liganden **82** und **83** erfolgte nach der gleichen Methode wie die des Liganden **65** (siehe Abbildung 75).

Für die Synthese des Liganden **81** wurde eine andere Abspaltungsmethode verwendet. Die *O*-Acetylschutzgruppen wurden mit Hydrazinhydrat:Methanol 1:4 direkt am Harz entfernt und das Produkt anschließend mit HFIP:DCM (2:1) vom Harz abgespalten.

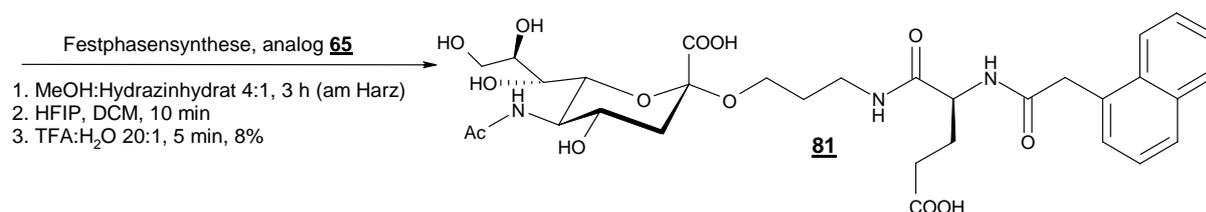


Abbildung 85: Synthese des Liganden **81**.

Diese Methode ist durch die kurze Abspaltungszeit vom Harz (10 min) schneller als mit TFE:AcOH:DCM (3 h), führte jedoch zu den gleichen, niedrigen Ausbeuten. Dies bestärkt die Vermutung, dass ein erheblicher Ausbeuteverlust durch die notwendige, nachträgliche Behandlung des Rohproduktes mittels TFA:H₂O (20:1) begründet ist. Eine noch kürzere Abspaltungszeit oder eine andere Entschützungs-methode der *tert*-Butylgruppen könnte hier zu höheren Ausbeuten führen.

4.5.3.3 STD-NMR-Bindungsstudien

Die Bindungsanalysen der Liganden **81**, **82** und **83** wurden nur mittels STD-NMR vorgenommen. Die Ergebnisse der Titrationsexperimente sind in Abbildung 86 dargestellt.

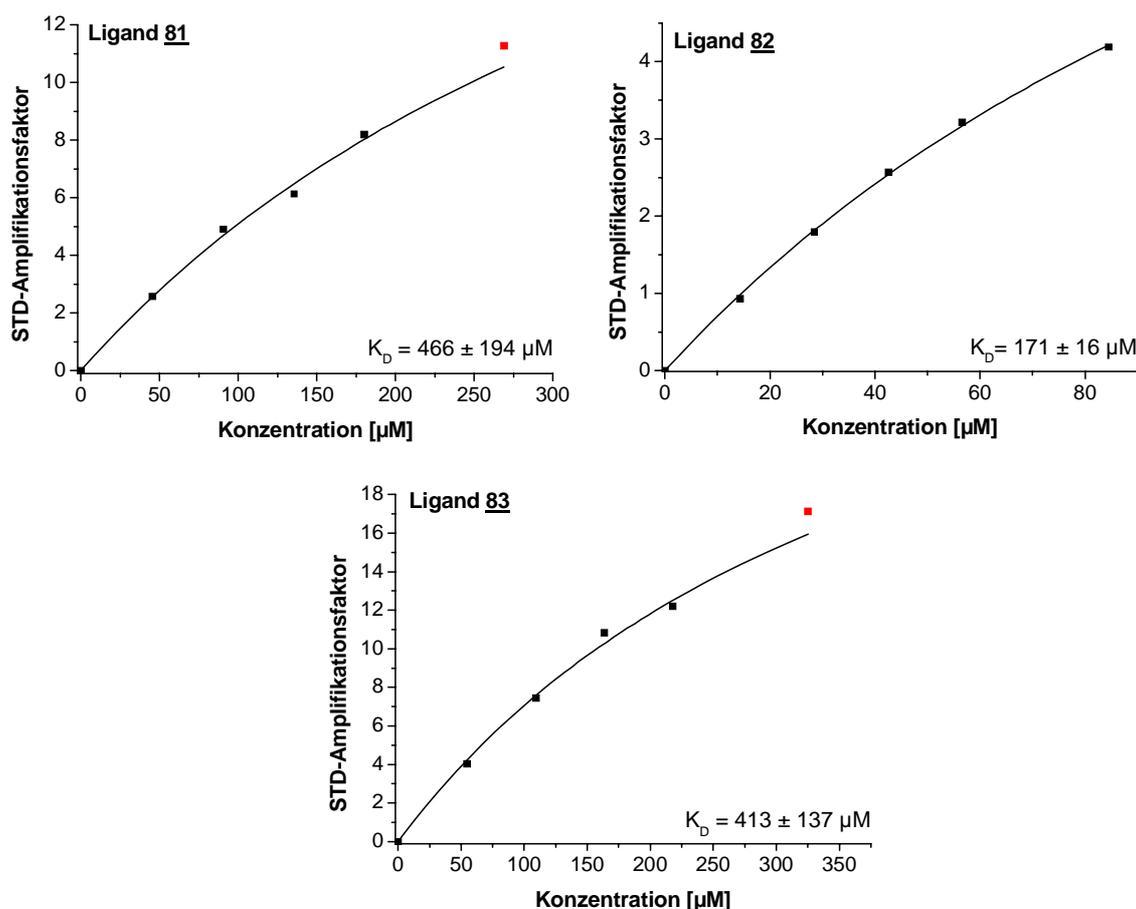


Abbildung 86: Bestimmung der K_D -Werte der Protonen der *N*-Acetylgruppe der Liganden **81-83 durch STD-Titration. Der rot markierte Datenpunkt passt nicht optimal in das *one-site-binding* Modell, was vermutlich ein Resultat unspezifischer Wechselwirkungen ist. Deswegen wurden dieser bei der Kurvenanpassung nicht berücksichtigt.**

Die aus der Messung erhaltenen Dissoziationskonstanten der Liganden **81** und **83** zeigen mit $K_D = 466 \pm 194 \mu\text{M}$ und $K_D = 413 \pm 137 \mu\text{M}$ eine etwas schlechtere Bindungskonstante gegenüber dem Vorläuferliganden **65** mit einem $K_D = 292 \pm 40 \mu\text{M}$. Demgegenüber ist die Bindungsaffinität des Liganden **82** mit einem K_D von $171 \pm 16 \mu\text{M}$ etwa doppelt so stark. Zur detaillierteren Interpretation dieser Ergebnisse wurde wiederum das Bindungsepitop der Liganden aufgestellt. Das Epitop des Liganden **81** ist in Abbildung 87 dargestellt. Dieses Epitop ist dem des Vorläuferliganden **65** recht ähnlich. Dies betrifft zum einen die relativ höheren STD-Prozente des Glycans gegenüber dem Aromaten, als auch die Verteilung der rel. STD-Prozente der einzelnen aromatischen Naphtylacetamidprotonen. Der Ersatz der Asparaginsäure durch Glutaminsäure scheint demnach keinen großen Einfluss auf die bindende Konformation des Liganden **81** im Vergleich zum Liganden **65** zu haben.

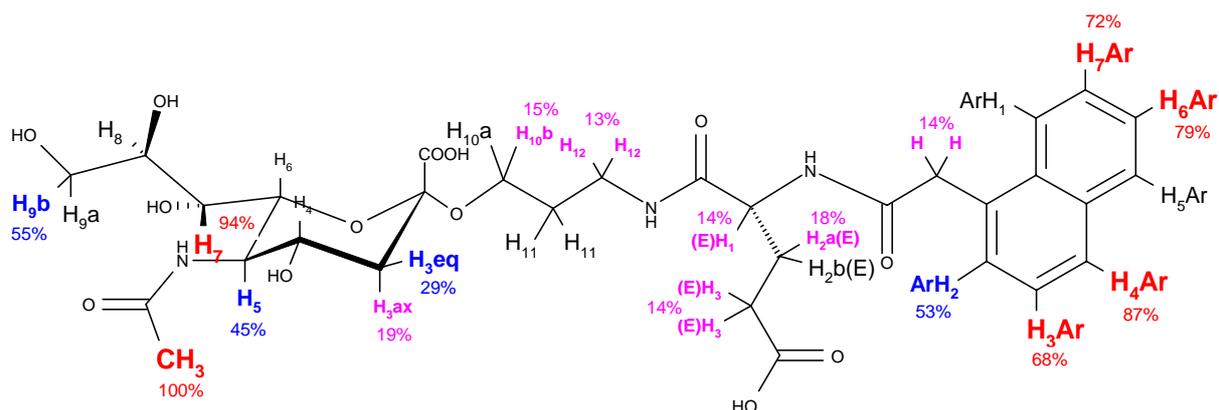


Abbildung 87: Bindungsepitop des Liganden **81**. Die relativen STD-Prozente sind farblich abgegrenzt in 0-20% (magenta), 20-70% (blau) und 70-100% (rot). Es konnten nicht alle relativen STD-Prozente der Protonen aufgrund der Überlagerung ihrer Integrale bestimmt werden. $c(\text{H5}) = 1.52 \mu\text{M}$, $c(\text{Ligand } \mathbf{81}) = 269 \mu\text{M}$, 700 MHz, $T = 298 \text{ K}$, $\text{sp13} = 30 \text{ dB}$, Sättigungsdauer = 2 s, Einstrahlpunkt des Sättigungspulses = -1.5 ppm.

Demgegenüber zeigen die Epitope der Liganden **83** und **82** (Abbildung 88 und Abbildung 89) eine Verschiebung der höchsten rel. STD-Prozente zum Aromaten, welcher in beiden Fällen durch den um eine Bindungslänge erweiterten 1-Naphtyloxyessigsäurerest repräsentiert wird. Dieser scheint einen besseren Kontakt zum Protein zu gewährleisten.

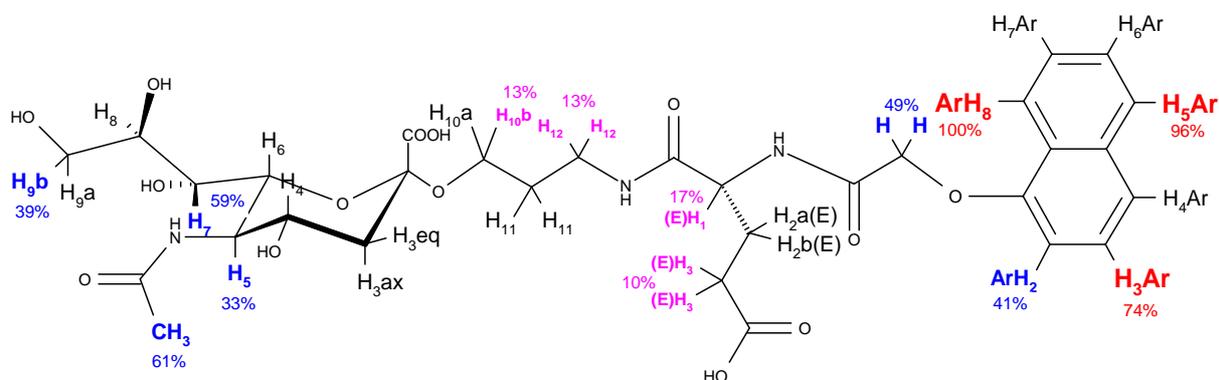


Abbildung 88: Bindungsepitop des Liganden **83**. Die relativen STD-Prozente sind farblich abgegrenzt in 0-20% (magenta), 20-70% (blau) und 70-100% (rot). Es konnten nicht alle relativen STD-Prozente der Protonen aufgrund der Überlagerung ihrer Integrale bestimmt werden. $c(\text{H5}) = 1.83 \mu\text{M}$, $c(\text{Ligand } \mathbf{83}) = 325 \mu\text{M}$, 700 MHz, $T = 298 \text{ K}$, $\text{sp13} = 30 \text{ dB}$, Sättigungsdauer = 2 s, Einstrahlpunkt des Sättigungspulses = -1.5 ppm.

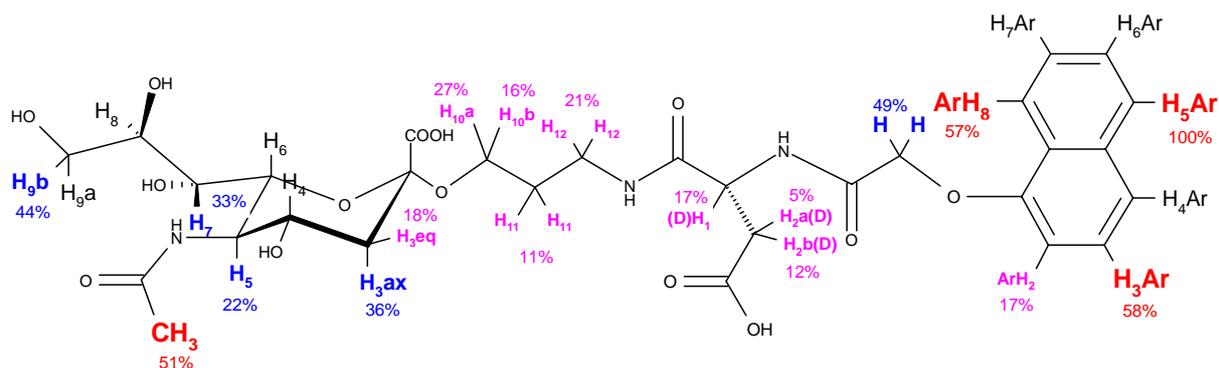


Abbildung 89: Bindungsepitop des Liganden 82. Die relativen STD-Prozente sind farblich abgegrenzt in 0-30% (magenta), 30-50% (blau) und 50-100% (rot). Es konnten nicht alle relativen STD-Prozente der Protonen aufgrund der Überlagerung ihrer Integrale bestimmt werden. $c(\text{H5}) = 1.19 \mu\text{M}$, $c(\text{Ligand } \underline{82}) = 85 \mu\text{M}$, 700 MHz, $T = 298 \text{ K}$, $\text{sp13} = 30 \text{ dB}$, Sättigungsdauer = 2 s, Einstrahlpunkt des Sättigungspulses = -1.5 ppm.

Dass der vermutlich nähere Kontakt des Aromaten nur in einem Fall zur Verbesserung der Bindungsaffinität führt, könnte an den Bindungsmodus des Naphtylaromaten selber liegen. Die Protonen der Aromaten zeigen im Bindungsepitop verglichen miteinander unterschiedliche rel. STD-Prozente. Während der Ligand 83 die höchsten rel. STD-Prozente am H-8 zeigt und 96% beim H-5, zeigt der Ligand 82 die höchsten am H-5 aber sehr viel geringere STD-Prozente mit 57% am H-8. Der Unterschied in den rel. STD-Prozenten der gleichen Naphtylaromaten muss in diesem Fall an der im Aglycon eingesetzten Aminosäure L-Asparaginsäure (Ligand 82) bzw. L-Glutaminsäure (Ligand 83) liegen.

4.5.4 Übersicht zu den Aglycon-Modifizierungen

In Tabelle 8 sind die Ergebnisse des *modelings* und der mittels SPR und STD-NMR bestimmten Bindungskonstanten der am Aglycon modifizierten Sialinsäureliganden zusammengefasst.

Tabelle 8: Zusammenstellung der berechneten Bindungsenergien der modifizierten Aglycone und deren mittels SPR oder STD-NMR ermittelten K_D -Werte.

	Ligand	berechnete Bindungsenergie [kcal/mol]	K_D (SPR) [μ M]	K_D (NMR) [μ M]
Referenz	5	-28.6	1430	2780
1. Cyclus	39	-31.6	2980	n.b.
	40	-35.3	2010	n.b.
	43	-40.6	302	341
	44	-38.4	541	n.b.
	45	-42.1	841	462
	46	-35.6	617	n.b.
2. Cyclus	64	-41.8	280	1216
	65	-39.4	130	292
	66	-46.2	283	350
3. Cyclus	81	-45.6	n.b.	466
	82	-40.4	n.b.	171
	83	-42.7	n.b.	413

Durch insgesamt drei Iterationsschritte konnte die Bindungsaffinität der Aglycon-modifizierten Sialinsäureglycoside gesteigert werden. Der beste Ligand **82** hat mit einem $K_D = 171 \pm 16 \mu\text{M}$ eine um den Faktor 16 verbesserte Bindungsaffinität zum Hämagglutinin H5 gegenüber den STD-NMR-Studien des Neu5Ac α 2Me **5** mit einem $K_D = 2780 \pm 980 \mu\text{M}$.

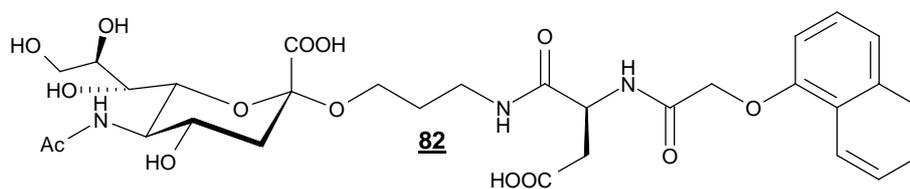


Abbildung 90: Ligand **82 mit einem aus den STD-Untersuchungen um den Faktor 16 besseren K_D -Wert im Vergleich zum Referenzliganden Neu5Ac α 2Me **5****

Trotz dessen bleibt die Steigerung der Bindungsaffinität hinter dem denkbaren Potenzial der zusätzlichen Wechselwirkung bzw. der erhöhten Rigidität zurück. Dies kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen kann es eine Unsicherheit in der Röntgenstruktur geben, wodurch der tatsächliche Abstand von Molekülfragmenten des jeweiligen Liganden und den

Aminosäuren des H5-Proteins nicht gut mit den modellierten Abständen übereinstimmen. Es kann auch sein, dass die gewonnene Energie durch zusätzliche ionischen Wechselwirkungen nur geringfügig stärker ist, als für die Dehydratisierungsenergie der Carboxylgruppen aufgewendet werden muss.

4.6 Vergleich der Ergebnisse des dockings mit den SPR-Studien

Um eine Aussage über den quantitativen Erfolg des *molecular modelings* zu treffen, wurden die Ergebnisse der *docking* Studien mit den aus den SPR-Bindungsstudien bestimmten K_D -Werte der Liganden verglichen. Hierfür wurden die berechneten Bindungsenergien gegen die Dissoziationskonstanten der Liganden aufgetragen (Abbildung 91).

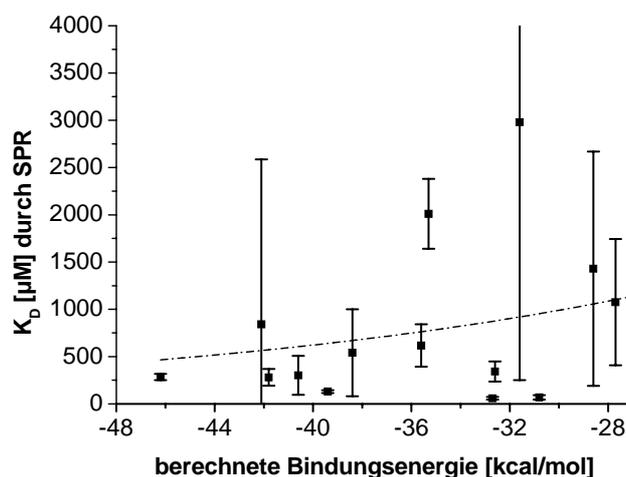


Abbildung 91: Vergleich der berechneten Bindungsenergie mit den durch die SPR-Experimente bestimmten Dissoziationskonstanten K_D [μ M]. Der Balken symbolisiert den jeweiligen Fehler, gestrichelt dargestellt ist eine sich aus den Datenpunkten ergebende exponentielle Trendlinie.

Die Gegenüberstellung zeigt nur einen tendenziellen Zusammenhang zwischen den durch die SPR-Studien bestimmten Bindungsaffinitäten und den berechneten Bindungsenergien auf. Allerdings ist das Verständnis der Protein-Ligand-Wechselwirkungen noch nicht so gut, dass allgemeingültige und in mathematische Formeln umsetzbare Regeln aufgestellt werden können, um Interaktionen von Bindungspartnern am Computer genau zu simulieren und zu berechnen. Das *molecular modeling* und *docking* von kleinen Liganden, welche in stark definierten Bindungstaschen interagieren ist wesentlich genauer, als es, wie in dieser Arbeit, bei Liganden mit größeren und nicht so stark definierten Bindungsarealen der Fall ist.

5 Zusammenfassung

Der erste Schritt einer Influenza-Infektion ist die Bindung des viralen Hämagglutinins an Sialinsäure-terminierte Glycoproteine der Wirtszelle. Die Inhibierung dieser Interaktion ist ein möglicher Ansatzpunkt eines Wirkstoffes gegen Influenza. Im Rahmen dieser Arbeit wurden durch rationales Wirkstoffdesign Inhibitoren des Hämagglutinins H5, des aviären Grippevirus H5N1, in Form von Analoga der Sialinsäure entwickelt.

Hierfür wurde zunächst eine geeignete Röntgenstruktur ausgewählt, verifiziert und bearbeitet, um potenzielle Liganden später durch *in silico docking* auf ihre Bindungsaffinität untersuchen zu können. Zur Bestimmung der Bindungsaffinität der Liganden konnten zwei Methoden, die Oberflächen-Plasmonen-Resonanz (SPR)- und Sättigungs-Transfer-Differenz (STD)-NMR-Spektroskopie an bekannten Bindern des Hämagglutinins validiert werden. Für die Verbesserungen der Bindungseigenschaften von Sialinsäurederivaten wurden Modifikationen an zwei Positionen des Kohlenhydrates vorgenommen: An der Glycerolseitenkette und am Aglycon der Sialinsäure.

Für das Design von an der Sialinsäure modifizierten Strukturen wurde vorbereitend die Relevanz der bindenden Kontakte der Glycerolseitenkette überprüft. Hierfür wurde die Glycerolseitenkette um ein bzw. zwei Kohlenstoffatome verkürzt und die daraus hervorgehenden Verbindungen mittels SPR vermessen. Aufgrund einer ähnlich starken Bindungsaffinität der dargestellten trunkierten Sialinsäureanaloga im Vergleich zum Referenzliganden Neu5Ac α 2Me 5 mit einem $K_D = 1430 \mu\text{M}$ wurden mit Hilfe des *molecular modelings* sowohl C-8 als auch C-7 Aminokonjugate und C-8 Amidokonjugate der trunkierten Sialinsäure entworfen. Diese sollten neue polare und unpolare Interaktionen mit Aminosäuren der Bindungstasche ausbilden. Die C-8 und C-7 Aminokonjugate der trunkierten Sialinsäure wurden erfolgreich synthetisiert. Anschließende SPR-Studien konnten eine Verbesserung der Dissoziationskonstante der C-7 Aminokonjugate 21 und 22 und der C-8 Aminokonjugate 18 und 20 aufzeigen. Die besten Liganden 18 und 20 mit Dissoziationskonstanten von $K_D = 58$ bzw. $69 \mu\text{M}$ waren um den Faktor 24 bzw. 21 höher als die des Referenzliganden Neu5Ac α 2Me 5.

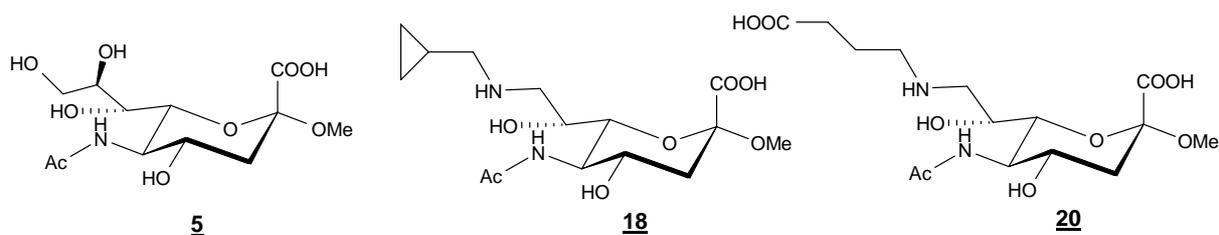


Abbildung 92: Der Referenzligand Neu5Aca2Me **5** und die beiden erfolgreichsten an der Glycerolseitenkette modifizierten Liganden mit durch SPR-Studien bestimmten Dissoziationskonstanten von $K_D = 58 \mu\text{M}$ (**18**) und $K_D = 69 \mu\text{M}$ (**20**).

Die anschließenden STD-Titrations der Aminokonjugate **18**, **19**, **20** und **22** führten allerdings zu keinen STD-Signalen der jeweiligen Liganden. Dies ist vermutlich mit einer erniedrigten *off-rate* der Verbindungen zu begründen. Die vorgenommene Konkurrenztitration des Liganden **20** gegen Neu5Aca2Me **5** konnte allerdings die durch die SPR-Studien bestimmte Dissoziationskonstante des Liganden **20** bestätigen. Somit gelang zum ersten Mal eine deutliche Verbesserung der Bindungseigenschaften von Sialinsäurederivate durch Modifikationen an der Glycerolseitenkette.

Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit wurden, basierend auf literaturbekannten Leitstrukturen, am Aglycon modifizierte Sialinsäureanaloge untersucht. Deren gemeinsames Strukturelement ist ein α -O-glycosidisch verknüpftes Alkylfragment an dessen Ende amidisch ein Aromat gebunden ist. In einem ersten Schritt wurden vier zur Literatur ähnliche O-Glycoside (**43-46**) dargestellt. Durch SPR- bzw. STD-NMR-Studien konnte eine Verbesserung der Bindungsaffinität aller vier Liganden gegenüber dem Referenzligand Neu5Aca2Me **5** festgestellt werden. Neben der Bestimmung der Bindungsaffinität konnte durch die STD-NMR Methode auch das Bindungsepitop der Verbindungen **43** und **45** aufgestellt werden. Hierdurch wurde die durch das *molecular modeling* eingepasste Position und Struktur der Liganden gestützt. Auf Basis des mit $K_D = 302 \mu\text{M}$ (SPR) bzw. $K_D = 342 \mu\text{M}$ (STD-NMR) besten Binders **43** wurden im Rahmen eines zweiten Designzyclus Strukturen entwickelt, die eine erhöhte Rigidität aufwiesen und zusätzliche Wechselwirkungen mit dem Protein ausbilden sollten, um deren Bindungsaffinität zum Hämagglutinin H5 weiter zu steigern. Hierfür boten sich Aminosäuren mit entsprechenden funktionellen Gruppen für das Einsetzen in die Alkylkette des Aglycons an. Eine Synthesestrategie wurde entwickelt, die es erlaubte, alle Zielverbindungen durch ein gemeinsames Vorläufermolekül an der Festphase sehr effizient zu synthetisieren. Die so dargestellten Verbindungen **64-66** zeigten in den anschließenden SPR-Bindungsstudien eine leichte Verbesserung der Bindungsaffinität, in den

STD-NMR Studien allerdings nur im Fall des Liganden **65** mit $K_D = 130 \mu\text{M}$ (SPR) und $K_D = 292 \mu\text{M}$ (STD-NMR). Das aufgestellte Bindungsepitop des Liganden **65** unterschied sich dabei von den anderen beiden, was ein Resultat zusätzlich ausgebildeter Wechselwirkungen sein könnte. Deswegen wurde in einem dritten Designzyklus versucht, diese Wechselwirkung durch weitere Modifizierung am Aglycon zu optimieren (Verbindung **81-83**). Dies führte im Fall des Liganden **82** mit $K_D = 171 \mu\text{M}$ zu einer weiteren Verbesserung der mittels STD-NMR bestimmten Bindungsaffinität.

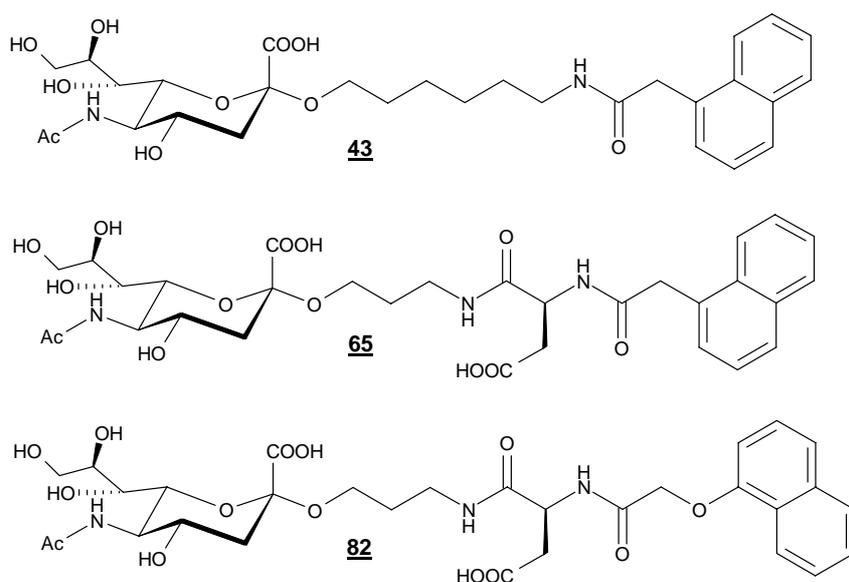


Abbildung 93: Zwei aus der Leitstruktur **43** entwickelte, peptidisch verlinkte Sialinsäureglycoside **65** und **82** mit einer verbesserten Bindungsaffinität. Die bestimmten Dissoziationskonstanten betragen für **42** $K_D = 302 \mu\text{M}$ (SPR) bzw. $K_D = 342 \mu\text{M}$ (STD-NMR), für **65** $K_D = 130 \mu\text{M}$ (SPR) bzw. $K_D = 292 \mu\text{M}$ (STD-NMR) und für **82** $K_D = 171 \mu\text{M}$ (STD-NMR).

Zusammengefasst ist diese Arbeit ein erfolgreiches Beispiel für das rationale Wirkstoffdesign. Sowohl die Modifikationen an der Glycerolseitenkette, als auch am Aglycon führten zu einer deutlichen Verbesserung der Bindungsaffinität zum Hämagglutinin H5 gegenüber dem Referenzliganden Neu5Ac α 2Me **5**.

6 Summary

The first step of the influenza infection is the binding of viral hemagglutinin to sialic acid terminating glycoproteins of the host cell. An inhibition of this interaction is one possibility to establish a drug against influenza. Inhibitors of hemagglutinin H5 of avian influenza virus H5N1 in kind of sialic acid analogues were developed by rational drug design in this dissertation.

Therefore, a suitable X-ray structure was chosen and optimized in order to study potential ligands by *in silico* docking for the investigation of their binding affinities. To determine the binding affinities of ligands, two methods, the surface-plasmon-resonance (SPR) and saturation-transfer-difference (STD) NMR-spectroscopy, were validated on known binders of hemagglutinin. In order to improve the binding properties of sialic acid derivatives modifications at two positions of the carbohydrate were performed: at the glycerol sidechain and at the aglycon of the sialic acid.

For the design of sialic acid modified structures, initially the relevance of binding contacts of the glycerol sidechain were studied. Therefore, the glycerol side chain was truncated by one or two carbon atoms and the resulting compounds were measured by SPR. Due to similar strong binding affinities of the synthesized truncated sialic acid analogues in comparison to the reference ligand Neu5Ac α 2Me **5** ($K_D = 1430 \mu\text{M}$) C-8 and C-7 amino conjugates as well as C-8 amido conjugates were designed by molecular modeling. These modifications should establish new polar and non-polar interactions with amino acids of the binding site. The C-8 and C-7 amino conjugates of the truncated sialic acid were synthesized successfully. Subsequent SPR-studies showed an improvement of the dissociation constant of the C-7 aminoconjugates **21** and **22** and the amino conjugates **18** and **20**. The best ligands **18** und **20** with dissociation constants of $K_D = 58$ or $69 \mu\text{M}$ have 21-fold or 24-fold tighter binding compared to the reference ligand Neu5Ac 2α Me **5**.

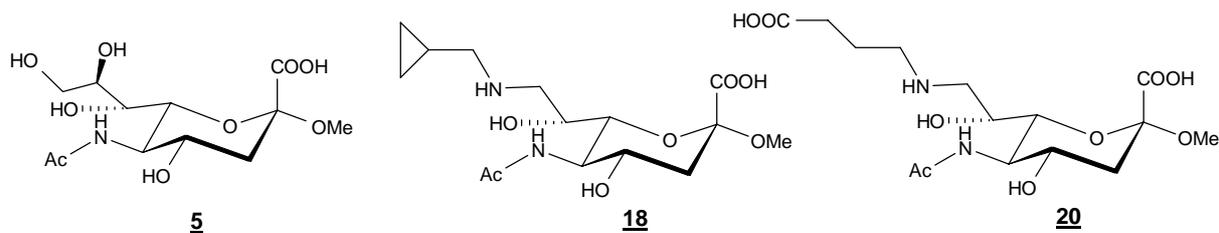


Figure 93: The reference ligand Neu5Ac α 2Me **5** and both most successful glycerol-side chain modified ligands with dissociation constants of $K_D = 58 \mu\text{M}$ (**18**) und $K_D = 69 \mu\text{M}$ (**20**) measured by SPR.

However in the following STD-titration of aminoconjugates **18**, **19**, **20** and **22** no STD-signals could be detected from the respective ligands. The reason could be given by the lower off-rates of the amino conjugates. Indeed, a competitive titration of the ligand **20** by STD-NMR against the reference ligand Neu5Ac α 2Me **5** confirmed the dissociation constant of **20** that was measured by SPR. As a result of these modifications at the glycerol sidechain a considerable improvement of the binding affinities could be achieved for the first time.

Based on published inhibitors of hemagglutinin, aglycon modified sialic acid analogues were investigated in the second part of this work. The common structural element of the analogues is a linked aglycon that consists of an aromatic ring spaced by an alkyl chain. In the first step four *O*-glycosides (**43-46**) were synthesized which were similar to those found in the literature. By SPR and/or STD-NMR studies improved binding affinities of all created ligands could be measured in comparison to the reference ligand Neu5Ac α 2Me **5**. The binding affinities and the binding epitopes of compound **43** and **45** were determined using STD-NMR. Those confirmed the results obtained by molecular modeling. Based on the best ligand with $K_D = 302 \mu\text{M}$ (SPR) bzw. $K_D = 342 \mu\text{M}$ (STD-NMR) structures with a higher rigidity and with the possibility of additional interactions were developed in a second design cycle to increase the binding affinity to hemagglutinin H5. For this purpose amino acids with corresponding functional groups at the alkyl chain could be used. A synthetic strategy was developed to very efficiently synthesize all target compounds from a common precursor at a solid phase. These compounds **64-66** showed a slight improvement of the binding affinity measured by SPR-binding studies, but NMR studies only indicated the improvement for ligand **65** with $K_D = 130 \mu\text{M}$ (SPR) and $K_D = 292 \mu\text{M}$ (STD-NMR). The binding epitope of ligand **65** was different compared to the binding epitopes of the other two ligands which could be a result of additional interactions. In a third design cycle it was therefore attempted to optimize these interactions by further modifying of the aglycon which resulted in the ligands

81-83. This led to a further improvement of the binding affinity of ligand **82** with $K_D = 171 \mu\text{M}$ measured by STD-NMR studies.

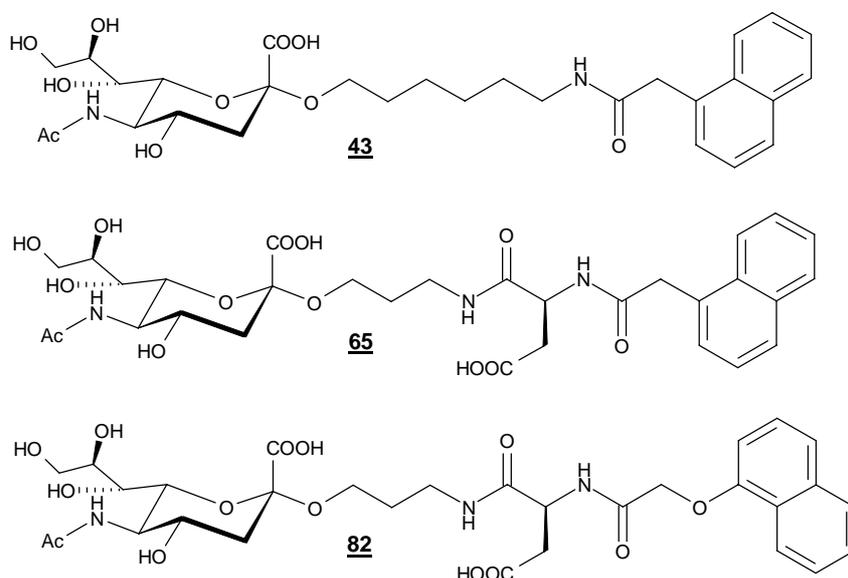


Figure 94: Two from the lead structure **43 developed peptidic linked sialic acid glycosides **65** and **82** with improved binding affinities. The determined dissoziation constants were in case of **42** $K_D = 302 \mu\text{M}$ (SPR) respectively $K_D = 342 \mu\text{M}$ (STD-NMR), in case of **65** $K_D = 130 \mu\text{M}$ (SPR) respectively $K_D = 292 \mu\text{M}$ (STD-NMR) and in case of **82** $K_D = 171 \mu\text{M}$ (STD-NMR).**

It can be summarized that this thesis is a successful example of the rational drug design. The modifications at the glycerol side chain as well as at the aglycon led to a considerable improvement of the binding affinity to the H5 compared to the reference ligand Neu5Aca2Me **5**.

7 Experimenteller Teil

7.1 *Geräte und Methoden*

NMR-Experimente

Alle NMR Spektren wurden an AMX 400, AV 400, DRX 500 oder DRX 700 (mit Cryo-Probenkopf) Spektrometern der Firma Bruker aufgenommen. Für die Prozessierung, Integration, Kalibrierung und Auswertung der Spektren wurde Topspin 1.3 verwendet.

SPR-Experimente

Die SPR-Experimente wurden am Biacore T100 der Firma Biacore (GE Health) durchgeführt. Zur Messung dienten CM5 Chips und als Laufpuffer HBS-P der Firma Biacore (GE Health).

Molecular modeling

Die *molecular modeling* Studien wurden mit dem Programm Sybyl 7.2 der Firma Tripos an Octane- und Octane 2- *workstations* der Firma Silicon Graphics vorgenommen. Zusätzlich wurde die Version Sybyl 8.0 auf HP xw6400 *workstations* der Firma Hewlet Packard verwendet.

MALDI-TOF Massenspektrometrie

Die MALDI-TOF Spektren wurden an einem Bruker Biflex III der Firma Bruker Daltonics gemessen. Nach einer externen Kalibrierung des Gerätes wurden alle Messungen im Reflexions-Modus mit DHB als Matrix durchgeführt.

Präparative und analytische HPLC

Alle präparativen und einzelne analytische HPLC-Läufe wurden an der Biocad 700E Perfusion Chromatography Workstation der Firma Perseptive Biosystems, Wiesbaden, durchgeführt. Als Säule für die präparativen Läufe diente eine VP ET250/21 Nucleodor C18 Pyramid (250 mm, 21 mm, 86.59 mL, 5 μ M, 20 mL/min) der Firma Marchery-Nagel, USA. Für die analytischen Läufe an dieser HPLC wurde eine EC250/4 Nucleodor C18 Pyramid (250 mm, 4 mm, 3.14 mL, 5 μ M, 1 mL/min) der Firm Marchery-Nagel, USA verwendet.

7 Experimenteller Teil

Weiterhin wurden analytische Läufe an einer Merck/Hitachi *LaChrom* L-7000-Serie, VWR International, Darmstadt, Deutschland mit einer *Vydac* 218TP510 C-18 *reverse phase*-Säule (250 mm, 20 mm, 19.653 mL, 5 µM, 5 mL/min) der Firma Grace Vydac, Anaheim, USA durchgeführt.

Dünnschichtchromatographie

Als stationäre Phase wurden mit Fluoreszenzmarker (F₂₅₄) durchsetzte Kieselgel(60)-Folien der Firma Merck KGaA, Darmstadt verwendet. Die Detektion erfolgte je nach chemischer Eigenschaft der Verbindung mittels UV-Licht oder durch 10%ige Schwefelsäure bzw. wässrigen 0.1%igen Ninhydrin-Lösung und anschließendem Erwärmen. Die *O*-acetylierten Verbindungen konnten auf den DC-Folien ohne Detektionsreagenz durch Erhitzen detektiert werden.

Photometrie

Die Konzentration der dialysierten Proteinlösung wurde bei 280 nm an einem Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer der Firma PEQLAB, Erlangen, bestimmt.

Schmelzpunktbestimmung

Die Schmelzpunkte sind auf einem Schmelzpunktbestimmungsgerät der Firma apotec vermessen worden und nicht korrigiert.

Drehwertbestimmung

Die Drehwertbestimmung wurden an einem Drehwertmessgerät der Firma A. Krüss OPTRONIC, Germany bei 25 °C und einer Wellenlänge von 598 nm (Natrium D-Linie) vorgenommen. Die angegebenen spezifischen Drehwerte sind nicht korrigiert.

7.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien sind von folgenden Herstellern bezogen worden:

Merck

5-Amino-1-pentanol, 3-Amino-1-propanol, 2-(Aminomethyl)-pyridin, Acetylchlorid,

7 Experimenteller Teil

tert-Butanol, Essigsäureanhydrid, Dicyclohexylcarbodiimid, 1-Naphtol, 1-Naphtylessigsäure, Natriumacetat, Natriumcyanoborhydrid, Natriumdihydrogen-phosphat Monohydrat, Natriumhydrogenphosphat, Natriumhydroxid, Natriumperiodat, Natriumthiosulfat, Molsieb 3 Å, Palladium/Aktivkohle (10% Pd), Phenylessigsäure, *n*-Propylamin, Salzsäure (37%), Wasserstoffperoxid 30%.

Fluka

Cäsiumcarbonat, Dichlormethan (abs.), Dimethylaminopyridin, *N,N*-Dimethylformamid, 9-Fluorenyl-methyl-*N*-succinimidyl-carbonat, Methanol (abs.), Pyridin (abs.), Toluol (abs.), Triethylamin.

Iris Biotech

Geschützte Aminosäuren: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH; TBTU, DIPEA, Piperidin.

Riedel de Haen

1,4-Dioxan, Natrium, Natriumcarbonat, Natriumhydrogencarbonat, Natriumsulfat, Trifluoressigsäure.

Biacore

Acetatpuffer pH = 5.5, Ethanolamin, 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid, HBS-P Laufpuffer, *N*-Hydroxysuccinimid.

Aldrich

Aminomethylcyclopropan, 2-Naphtylessigsäure, Silbercarbonat.

Roth

Essigsäure, Trifluorethanol.

J. T. Baker

Natriumchlorid, Kaliumhydroxid.

7 Experimenteller Teil

Acros

Silberperchlorat

Janssen Chimica

6-Amino-1-hexanol

Novabiochem

2-Chlorotriethylchlorid-Harz

INALCO SPA

Sialinsäure

VWR

Acetonitril

Apollo Scientific

Benzoessäure-3-methylamin

Deutero

D₂O, MeOH-*d*₄, CDCl₃.

Serva

Amberlite IR 120 H⁺

BIORAD

Dowex 50W-8X (H⁺)

Lehmann&Voss

Celite

Protein Sciences Corp.

H5-Proteinlösungen mit $c \sim 0.1$ mg/mL und $c \sim 1$ mg/mL

Lancaster

Bromessigsäure

7.3 Molecular modeling

Bearbeitung der Röntgenstruktur

Die Fehler in der Röntgenstruktur des H5 mit dem natürlichen Liganden (PDB: 1J5O) wurden mit dem *structure-preparation-tool* des Programmpaketes Sybyl 8.0 berichtigt, indem einige Aminosäureseitenketten und die Ladung der terminalen Aminosäuren korrigiert wurden. Die Seitenketten folgender Aminosäuren wurden berichtigt: HA1 (A): Glu 93, Lys 259, Gly 270, Lys 277, Glu 301, Lys 304; HA2 (B): Glu 11, Val 18, Glu 29, Lys 38, Glu 39, Lys 43, Lys 83, Leu 89, Leu 124, Asp 128, Lys 131, Glu 150, Thr 156, Asp 158, Tyr 159, Pro 160. Folgende terminale Aminosäuren wurden verbessert: HA1 (A): Asp 1, Pro 321; HA2 (B): Gly 1, Pro 160. Im Anschluss wurden alle H₂O-Moleküle aus der Struktur gelöscht. Die *N*-Acetylgruppen von Glycanen wurden nachfolgend auf ihren NH-CO-Torsionswinkel überprüft und gegebenenfalls in Richtung der Acetylgruppe auf 180° eingestellt. Anschließend wurden der Struktur Wasserstoffatome zugefügt und alle Atome mit Ladungen (Gasteiger-Marsili) versehen. Es folgte eine Minimierung über 500 Iterationen (Tripos-Kraftfeld, $\epsilon = 15$).

Docking der Liganden

Die Liganden wurden durch die Modifikation der Sialinsäure entwickelt, ohne dabei die Position des Kohlenhydrat-Sechsrings zu verändern. Die entworfenen Liganden wurden mit Wasserstoffatomen und Ladungen (Gasteiger-Marsili) versehen und über 100 Iterationen (Tripos-Kraftfeld, $\epsilon = 15$) minimiert. Die Differenz aus der Summe der Energien des separierten Proteins und des Liganden und der Energie des Gesamtkomplexes ergab die theoretische Bindungsenergie.

7.4 SPR-Experimente

Alle SPR-Experimente wurden auf dem Biacore T100 mit CM5 Chips und HBS-P Puffer vorgenommen. Für die Belegung und Messung wurde eine Flussrate von 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ gewählt. Die Messungen wurden an zwei Flusszellen durchgeführt, einer Referenzzelle und einer mit dem Protein belegten Flusszelle. Für die Immobilisierung des Hämagglutinins wurde die Proteinlösung ($\sim 100\mu\text{g}/\text{ml}$ in Phosphatpuffer + 0.005% Tween20) auf ein Fünftel mit Acetatpuffer ($\text{pH} = 5.5$) verdünnt. Nach der Aktivierung der Dextranmatrix des Chips mit EDC/NHS über 20 min, wurde die Proteinlösung ($\sim 20\mu\text{g}/\text{mL}$) mit unterschiedlichen Belegungszeiten über den Chip geleitet. Anschließend erfolgte ein *capping* mit einer 20%igen Ethanolamin-Lösung über 12 min. Die Referenzzelle wurde bis auf den Schritt der Proteinimmobilisierung identisch behandelt. Die SPR-Messungen musste jeweils an frisch belegten Chips vorgenommen werden, da die Proteinbelegung der jeweiligen Flusszellen bei Wiederverwendung des Chips stark abnahm.

Tabelle 9: Zusammenfassung der Belegungszeiten und der Immobilisierung des H5 für die verwendeten CM5-Chips.

CM5-Chip	Belegungsdauer [s]	Immobilisierung [RU]
1-1	1400	8221
1-2	1600	14867
2-1	1300	7692
2-2	800	9647
3-1	800	7450

Die einzelnen SPR-Experimente gliederten sich in Stabilisierung (60 s), Assoziation (120 s), Dissoziation (je nach Ligand 600-800 s), und wiederholter Stabilisierung (120 s). Die jeweiligen Messzyklen begannen und endeten mit einer Vermessung der reinen Pufferlösung (Nullmessung). Die Ligandlösungen wurden in ansteigender Konzentration über den Chip gegeben. Für die Auswertungen wurden die Messkurven der Liganden um die Antworten der Nullmessungen bereinigt. Die RU Werte für die jeweilige Konzentration wurden für die thermodynamischen *fits* 4 s vor Assoziationsende bestimmt.

Tabelle 10: Zusammenstellung der auf den jeweiligen Chips vermessenden Liganden und die gewählten Dissoziationszeiten.

CM5-Chip	Substanz	Dissoziationszeit [s]
1-1	5, 6, 39	600
1-2	7, 8, 21, 22, 43, 44, 45, 46	600
2-1	40	800
2-2	64, 65, 66	800
3-1	18, 19 20	600

7.5 STD-Experimente

Probenvorbereitung

Für jedes STD-Experiment wurden 50 μL des gelösten Hämagglutinins ($c = 1\text{mg/mL}$), verdünnt mit 50 μL deuteriertem PBS-Puffer, mittels einer Dialysemembran (MWCO = 3500) in deuteriertem PBS-Puffer überführt. Der hierfür vorbereitete PBS-Puffer enthielt D_2O , 0.05 M Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, 0.05 M Dinatriumhydrogenphosphat, 0.15 M Natriumchlorid und 0.1% Natriumazid und wurde mit NaOD bzw. DCl auf $\text{pH} = 7.0$ eingestellt. Die umgepufferte Lösung wurde auf 190-230 μL mit deuteriertem PBS-Puffer verdünnt und anschließend die Konzentration durch UV/VIS Photometrie mit der A280 Protein-Methode bestimmt ($M(\text{H}_5) = 64458\text{ g/mol}$, $E = 89420\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)⁸³. Anschließend wurde die jeweilige Proteinlösung (180, 200 oder 220 μL) in 3 mm *match*-Röhrchen überführt.

STD-Messungen

Alle STD-Experimente wurden am 700 MHz Spektrometer bei 298 K durchgeführt. Als Pulsprogramm wurde das `stddiffesgp2d.th` verwendet. Die STD-Spektren wurden mit einer spektralen Weite von 10021 ppm und einem TD von 32k aufgenommen. Als erstes wurden mögliche Einstrahlpunkte und -energien für den jeweiligen Liganden bei der höchsten zu vermessenden Konzentration ermittelt, um das Auftreten von Artefaktsignalen zu überprüfen. Hierbei konnte sich ein Einstrahlpunkt von -1.5 ppm und eine Einstrahlenergie (sp13) von 30 dB für alle Liganden als zufrieden stellend beweisen. Bei der Verbindung **5** wurden auch bei -0.5 ppm und 30 dB kaum Artefakte beobachtet. Die Liganden wurden in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen vermessen (Tabelle 11). Aufgrund der geringen

7 Experimenteller Teil

und deswegen ungenauen Einwaage der Substanz **81**, wurde dessen Konzentration nachträglich mit DSS durch Vergleich der Integrale in einem normalen ^1H -Spektrum überprüft und korrigiert. Die Scanzahl der STD-Titrationsexperimente wurde der Konzentration des Liganden angepasst (zwischen 512-4k scans).

Tabelle 11: Die für die STD-Experimente eingesetzten jeweiligen Volumina und Konzentrationen der gepufferten H5-Proteinlösung und der Konzentrationsbereich der vermessenden Liganden.

Ligand	V H5 [μL]	c(H5) [μM]	c(Ligand) μM
5	180	1.01	37-575
43	180	1.51	57-336
45	200	1.17	44-259
64	180	2.05	76-451
66	200	1.96	30-177
65	200	1.96	59-347
81	200	1.52	45-269
83	200	1.83	55-325
82	200	1.19	14-85
22	200	1.40	42-648
18	220	1.99	59-350
19	200	1.37	41-82
20	200	1.75	52-310
20(kompetitiv)	200	1.15	65-193

Auswertung

Für die Auswertung der STD-Experimente wurden die FIDs aus dem pseudo 2D-File in 1D-Datensätze separiert. Anschließend wurde das *on-resonance* FID vom *off-resonance* FID abgezogen, wodurch das FID des STD-Spektrums erhalten wurde. Dann wurden alle drei FIDs in eine 2D Matrix eingefügt und mit einem LB = 0.5-2 in F2 fouriertransformiert. Die jeweiligen Spektren wurden aus dem pseudo-2D-Spektrum extrahiert. Diese wurden einer automatischen Basislinienkorrektur unterzogen. Für die Bestimmung der absoluten STD-Prozente wurden die individuellen Integrale der Ligandprotonen des *on-resonance* Spektrums vom *off-resonance* Spektrum abgezogen, das Ergebnis durch die Integrale des *off-resonance* Spektrums dividiert.

7.6 Synthese und Charakterisierung

7.6.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften

AAV 1: Deacetylierung nach Zemplen⁶⁰

Zur Entschützung der *O*-Acetylgruppen wurde das entsprechende Edukt in MeOH (abs.) gelöst, mit einer Spatelspitze Molsieb 3 Å versetzt und mit einer frisch angesetzten Natriummethanolatlösung auf einen pH Wert von 8-9 eingestellt. Der pH Wert wurde während der Reaktion kontinuierlich überprüft und gegebenenfalls mit weiterer Natriummethanolatlösung korrigiert. Der Reaktionsverlauf wurde mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt. Nach vollständigem Umsatz des Eduktes wurde die Reaktionslösung mit Amberlite IR 120 H⁺ neutralisiert, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Kiesegel gereinigt. Das erhaltene Produkt wurde in demineralisiertem H₂O aufgenommen und gefriergetrocknet.

AAV 2: Periodatspaltung mit 0.6 oder 1 eq. NaIO₄

Es wurden 100 mg **13** in 10 mL demineralisiertem H₂O gelöst. Anschließend wurde unter Rühren 0.6 oder 1 eq NaIO₄, gelöst in 4 mL demineralisiertem H₂O, innerhalb von 10 min tropfenweise zugegeben und weitere zwei min gerührt. Anschließend wurden 200 mg Amberlite MB-3 Mixbedionenaustauscher zugegeben und bis zur vollständigen Orangefärbung weiter gerührt. Nach Filtration wurde die Lösung gefriergetrocknet und das Rohprodukt direkt für die nächste Reaktion bereitgestellt.

AAV 3: Periodatspaltung mit 2.2 oder 2.4 eq NaIO₄

Es wurden 1 eq **13** in 10 mL demineralisiertem H₂O gelöst. Anschließend wurden unter Rühren 2.2 oder 2.4 eq NaIO₄, gelöst in 2 mL demineralisiertem H₂O, innerhalb von 5 min tropfenweise zugegeben und weitere 30 min gerührt. Anschließend wurden 5 Spatelspitzen Amberlite MB-3 Mixbedionenaustauscher zugegeben und bis zur vollständigen Orangefärbung gerührt. Nach Filtration wurde die Lösung gefriergetrocknet und das Rohprodukt direkt für die nächste Reaktion bereitgestellt.

7 Experimenteller Teil

AAV 4: Esterverseifung

Zur Entschützung der Methylesterfunktion wurde 1 eq des Eduktes in 10 mL demineralisiertem H₂O aufgenommen. Anschließend wurde mit verd. NaOH ein pH-Wert von 12-13 eingestellt. Der pH-Wert wurde über die Reaktionsdauer hindurch überprüft und gegebenenfalls mit verd. NaOH korrigiert. Die Reaktion wurde ca. eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständiger Umsetzung des Eduktes wurde die Reaktionslösung mit verd. HCl neutralisiert. Die Lösung wurde filtriert und anschließend gefriergetrocknet.

AAV 5: Amidische Verknüpfung von Aminoalkoholen und aromatischen Säuren

Zu dem Aminoalkohol (1 eq), gelöst in DMF (und im Falle des Hydrochlorides mit zusätzlichen 1 eq DIPEA versetzt), wurde eine Lösung bestehend aus DMF, 1.1 eq der entsprechenden aromatischen Säure, 1.1 eq TBTU und 1.1 eq DIPEA bei 0 °C zugegeben und bei RT über Nacht rühren lassen. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Produkt, falls nicht anders angegeben, säulenchromatographisch (Eluent: EE:MeOH 20:1) gereinigt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

AAV 6: Glycosidische Verknüpfung verschiedener Alkoholen mit dem β -Sialylchlorid

Es wurden 1 eq des Alkohols in 10 mL DCM gelöst und 1-2 g Molsieb 3 Å zugegeben. Anschließend wurden unter Lichtausschluss 2-4 eq Silbercarbonat und das β -Sialylchlorid **12** zu der Reaktionslösung gegeben und unter Lichtausschluss 4 Tage lang gerührt. Die Lösung wurde anschließend filtriert und mit 1 M Natriumthiosulfat-Lösung sowie Wasser gewaschen. Die wässrige Phase wurde einmal mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Anschließend wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch vorgereinigt.

AAV 7: Kupplung an das 2-Chlortritylchloridharz

Die Verbindung **67** (1 eq) wurde in 1.5 mL trockenem DCM gelöst und 6 eq DIPEA zugegeben. Anschließend wurde die Lösung zu dem 2-Chlortritylchloridharz (0.3-0.5 mmol/g Harz) gegeben und zwischen 4-16 h geschüttelt. Das Harz wurde in eine Fritte überführt und dreimal mit DCM:MeOH:DIPEA 17:2:1, dreimal DCM, dreimal DMF und zweimal DCM

7 Experimenteller Teil

gewaschen und anschließend im Vakuum getrocknet.

AAV 8: Festphasensynthese

Zur Fmoc-Entschützung wurden zum Harz 2 mL Piperidin:DMF (1:4) gegeben und 15-30 min geschüttelt und anschließend viermal mit 2 mL DMF gewaschen. Das Harz wurde mit einer Lösung aus 2 mL DMF, der jeweiligen Aminosäure (4.1 eq bezogen auf **67**), TBTU und DIPEA⁸¹ (jeweils 5.1 eq bezogen auf **67**) versetzt und für 2-14 h geschüttelt. Dieser Vorgang wurde 2-3 mal wiederholt. Anschließend wurden unverknüpfte Aminogruppen mit 2 mL Essigsäureanhydrid:DMF (1:9) für 15 min blockiert und das Harz viermal mit 2 mL DMF gewaschen. Alle Vorgänge, bis auf das *capping* wurden für den nächsten Verknüpfungsschritt, der jeweiligen aromatischen Säure, wiederholt.

AAV 9: Abspaltung vom Harz und Entschützung

Das Harz wurde für 2 h mit 2 mL DCM:TFE:AcOH (3:1:1) geschüttelt. Dann wurde die Abspalllösung mit Toluol coevaporiert und das Rohprodukt im Vakuum getrocknet. Zur Entfernung der *O*-Acetylschutzgruppen wurde der Rückstand in 1.5 mL Hydrazinhydrat:MeOH (1:4) für 3 h gerührt und das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum bis zur Trockne entfernt. Im Falle *tert*-Butyl geschützter Aminosäuren wurde das Rohprodukt für 5 min mit 1 mL TFA:H₂O (20:1) geschüttelt und das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt.

AAV 10: Reinigung der peptidischen Glycoside per HPLC

Die Reinigung aller an der Festphase synthetisierten Glycoside erfolgte mit einer präparativen *reversed-phase* (C-18) Säule. Die Laufmittel wurden im Ultraschallbad entgast. Die Detektion erfolgte im UV-Spektralbereich bei 215 nm. Die Flussgeschwindigkeit der HPLC betrug 20 mL/min.

Für die Liganden **64** und **66** wurde folgendes Gradientenprogramm benutzt: [A = 95% H₂O, 5% MeCN, B = 95% MeCN, 5% H₂O]: 0.25 CV (A:B = 90:10), 3.00 CV (A:B = 90:10 nach 20:80), 0.75 CV (A:B = 20:80 nach 0:100).

Für die Liganden **65**, **81**, **82**, und **83** wurden TFA-haltige Laufmittel mit folgendem Gradientenprogramm verwendet: [C = 95% H₂O, 5% MeCN + 0.1% TFA, D = 95% MeCN,

7 Experimenteller Teil

5% H_2O + 0.1% TFA]: 0.25 CV (C:D = 90:10), 6.25 CV (C:D = 90:10 nach 70:30), 1 CV (C:D = 70:30 nach 50:50), 1.25 CV (C:D 50:50 nach 0:100).

Anschließend wurden die Fraktionen mittels MALDI-TOF-MS auf die zugehörigen Molekülmassen der Produkte überprüft und die entsprechenden, sauberen Fraktionen gesammelt und gefriergetrocknet.

Die analytischen Läufe wurden nach folgenden Methoden durchgeführt:

Methode 1: Nucleodur C18 *reverse phase*-Säule bei 1 mL/min unter Verwendung folgendes Gradientenprogrammes: [C = 95% H_2O , 5% MeCN + 0.1% TFA, D = 95% MeCN, 5% H_2O + 0.1% TFA]: 8 min (C:D = 100:0 nach 80:20), 5 min (C:D) = (80:20 nach 0:100).

Methode 2: Vydac C-18 *reverse phase*-Säule bei 5 mL/min unter Verwendung folgendes Gradientenprogrammes: 5 CV (C:D = 100:0 nach 50:50), 0.5 CV (C:D = 50:50), 1 CV (C:D 50:50 nach 0:100).

Methode 3: Vydac C-18 *reverse phase*-Säule bei 5 mL/min unter Verwendung folgendes Gradientenprogrammes: 8 CV (C:D = 100:0 nach 70:30), 0.75 CV (C:D 70:30 nach 50:50), 2.75 CV (C:D 50:50 nach 0:100).

7.6.2 Synthesevorschriften und Charakterisierung

7.6.2.1 Darstellung von Methyl-(5-acetamido-3,5-dideoxy- β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid)onat **10** ^{57,58}

Nach literaturbekannter Vorschrift⁵⁸ wurden 2.00 g (6.48 mmol) Sialinsäure **9** zum Methylester **10** in einer Auswaage von 1.80 g (5.57 mmol) umgesetzt. Das entspricht einer Ausbeute von 86 %.

Charakterisierung:

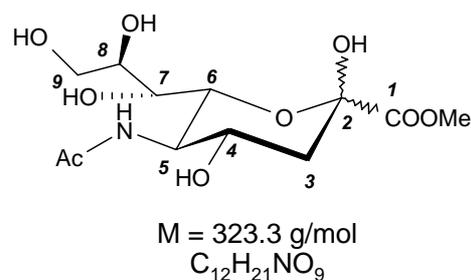
farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 192 °C

R_f -Wert (*tert*-Butanol:AcOH: H_2O = 5:2:2): 0.48

MALDI-TOF-MS: m/z (323.1) = 346.3 ($M+Na^+$),

362.2 ($M+K^+$).



7 Experimenteller Teil

β -Anomer:

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeOH- d_4): δ = 4.09-4.04 (m, 1H, H-4), 4.03 (dd, 1H, H-6), 3.88-3.80 (m, 2H, H-5, H-9a), 3.81 (s, 3H, COOCH₃), 3.73 (ddd, 1H, H-8), 3.65 (dd, 1H, H-9b), 3.51 (dd, 1H, H-7), 2.25 (dd, 1H, H-3_{eq}), 2.05 (s, 3H, CH₃-CO-NH), 1.93 (dd, 1H, H-3_{ax}) ppm.

$J_{9a,9b}$ = 11.4; $J_{9a,8}$ = 2.8, $J_{9b,8}$ = 5.7, $J_{8,7}$ = 9.2, $J_{7,6}$ = 1.3, $J_{6,5}$ = 10.6, $J_{5,4}$ = 10.3, $J_{4,3eq}$ = 4.9, $J_{4,3ax}$ = 11.4, $J_{3ax,3eq}$ = 12.8 Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, MeOH- d_4): δ = 175.9 (CH₃-CO-NH), 172.8 (C-1), 97.7 (C-2), 72.6 (C-6), 71.0 (C-7), 68.8 (C-4), 65.5 (C-9), 55.2 (C-5), 54.0 (COOCH₃), 41.2 (C-3), 23.0 (CH₃-CO-NH) ppm.

7.6.2.2 Darstellung von Methyl-(5-acetamido-2,4,7,8,9-penta-O-acetyl-3,5-dideoxy- β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid)onat **11**^{57,58}

Nach literaturbekannter Vorschrift⁵⁸ wurden 1.74 g (5.39 mmol) **10** zu 2.95 g eines farblosen Schaums **11** umgesetzt, welches direkt für die nachfolgende Reaktion bereitgestellt wurde.

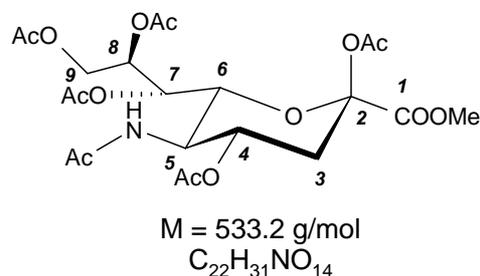
Charakterisierung:

farbloser Feststoff

R_f -Wert (CH₂Cl₂:MeOH = 10:1): 0.55

MALDI-TOF-MS: m/z (533.2) = 556.2 (M+Na⁺),

572.2 (M+K⁺).



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeOH- d_4): δ = 5.43 (dd, 1H, H-7), 5.22 (ddd, 1H, H-4), 5.11 (ddd, 1H, H-8), 4.49 (dd, 1H, H-9a), 4.22 (dd, 1H, H-6), 4.12 (dd, 1H, H-9b), 4.09-4.04 (m, 1H, H-5), 3.79 (s, 3H, -COOCH₃), 2.56 (dd, 1H, H-3_{eq}), 2.18, 2.14, 2.06, 2.03, 2.02 (s, 15H, CH₃-CO-O), 1.99 (dd, 1H, H-3_{ax}), 1.89 (s, 3H, CH₃-CO-NH) ppm.

$J_{9a,9b}$ = 12.4; $J_{9a,8}$ = 2.6, $J_{9b,8}$ = 5.9, $J_{8,7}$ = 6.6, $J_{7,6}$ = 2.2, $J_{6,5}$ = 10.7, $J_{5,4}$ = 10.4, $J_{4,3eq}$ = 4.8, $J_{4,3ax}$ = 11.5, $J_{3a,3b}$ = 13.4 Hz.

7 Experimenteller Teil

^{13}C -NMR (100 MHz, MeOH- d_4): δ = 173.9 (CH₃-CO-NH), 172.7, 172.3, 171.9, 171.8, 170.4 (5C, CH₃-CO-O), 168.7 (C-1), 99.2 (C-2), 73.9 (C-6), 72.5 (C-8), 70.8 (C-4), 69.5 (C-7), 64.0 (C-9), 54.3 (-COOCH₃), 50.6 (C-5), 38.0 (C-3), 23.4 (CH₃-CO-NH-), 21.6, 21.3, 21.0, 21.0, 20.9 (5C, CH₃-CO-O) ppm.

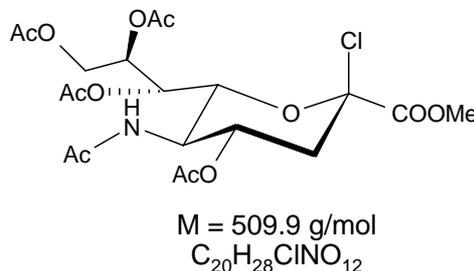
7.6.2.3 Darstellung von Methyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy- β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid)onat chlorid **12**⁵⁷

Abweichend von einer literaturbekannten Vorschrift⁵⁷ wurden 2.95 g (5.53 mmol) des Produktgemisches **11** bei 0 °C in 37.6 mL Acetylchlorid gelöst, mit 591 μL MeOH versetzt und das Reaktionsgefäß schnell verschlossen. Nach 48 h Rühren bei RT konnte das Reaktionsende mittels DC detektiert werden. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das erhaltene Rohprodukt dreimal mit Toluol codestilliert. Anschließend wurde es am Ölpumpenvakuum getrocknet. Es wurden 2.59 g (5.08 mmol) eines farblosen Schaums **12** mit einer Ausbeute von 94% bezogen auf **10** erhalten. Das Produkt wurde aufgrund dessen Empfindlichkeit nicht weiter charakterisiert und direkt für die nächste Reaktion bereitgestellt.

Charakterisierung:

farbloser Feststoff

R_f-Wert (Toluol:Aceton = 3:2): 0.42



7.6.2.4 Darstellung von Methyl-(methyl-5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid)onat **13**⁵⁹

Für die Etablierung des Methylesters mit der gleichzeitigen Entschützung der O-Acetylschutzgruppen wurde die Literaturvorschrift von Lubineau & Gallic⁵⁹ geringfügig variiert. Es wurden 1.00 g (1.96 mmol) **12** in 100 ml abs. MeOH gelöst. Nach Zugabe einer Spatelspitze Molsieb 3 Å wurde die Reaktionslösung mit einer frisch dargestellten Natriummethanolat-Lösung auf pH 9 eingestellt. Nach 3 h konnte das Reaktionsende per DC detektiert werden. Die Lösung wurde mit Amberlite IR 120 H⁺ neutralisiert, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Eluent: EE:MeOH 4:1) gereinigt. Es konnten 643.5 mg (1.89 mmol) eines farblosen

7 Experimenteller Teil

Feststoffes **13** isoliert werden. Das entspricht einer Ausbeute von 96%.

Charakterisierung:

farblosor Feststoff

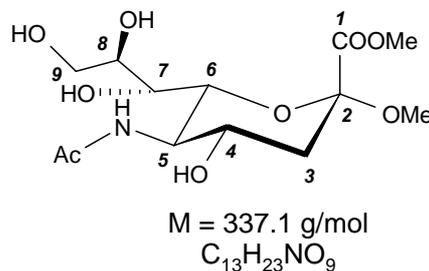
Schmelzpunkt: 182°C

R_F-Wert (EE:MeOH = 4:1): 0.25.

[α]_D²⁵ = -6.5° (c = 0.4, MeOH)

MALDI-TOF-MS: m/z (337.1) = 338.3 (M+H⁺), 360.3

(M+Na⁺), 376.2 (M+K⁺).



¹H-NMR (400 MHz, MeOH-*d*₄): δ = 3.92-3.84 (m, 5H, H-8, H-9a, COOCH₃), 3.79 (dd, 1H, H-5), 3.72-3.63 (m, 2H, H-9b, H-4), 3.60 (dd, 1H, H-6), 3.54 (dd, 1H, H-7), 3.38 (s, 3H, CH₃-O-C(2)), 2.69 (dd, 1H, H-3_{eq}), 2.03 (s, 3H, CH₃-CO-NH), 1.75 (dd, 1H, H-3_{ax}) ppm.

$J_{9a,9b} = 11.7$; $J_{9a,8} = 2.7$, $J_{9b,8} = 6.0$ $J_{8,7} = 9.1$, $J_{7,6} = 1.5$, $J_{6,5} = 10.3$, $J_{5,4} = 10.3$, $J_{4,3eq} = 4.6$, $J_{4,3ax} = 11.9$, $J_{3ax,3eq} = 12.8$ Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOH-*d*₄): δ = 176.1 (CH₃-CO-NH-), 171.8 (C-1), 101.2 (C-2), 75.8 (C-6), 73.3 (C8), 71.2 (C-7), 69.5 (C-4), 65.6 (C-9), 54.2 (C-5), 53.8 (CH₃-O-CO-), 52.9 (CH₃-O-C(2)), 42.4 (C-3), 23.5 (CH₃-CO-NH-) ppm.

7.6.2.5 Darstellung von Methyl-5-acetamido-3,5-dideoxy-α-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosidonsäure **5**

Nach AAV **4** wurden 50.0 mg (0.148 mmol) **13** mit 0.1 M NaOH verseift. Das Rohprodukt wurde zweimal durch Gelpermeationschromatographie gereinigt. Es wurden 39.7 mg (0.123 mmol) eines farblosen Feststoffes **5** erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 83%.

Charakterisierung:

farblosor Feststoff

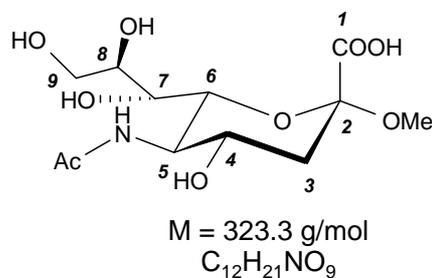
Schmelzpunkt: 118 °C (Zersetzung)

R_F-Wert (Isopropanol:H₂O:AcOH = 20:5:1): 0.45.

R_T-Wert (Methode 1): 2.83 min (99%)

[α]_D²⁵ = +14° (c = 0.13, H₂O)

MALDI-TOF-MS: m/z (323.1) = 346.5 (M+Na⁺), 362.3 (M+K⁺).



7 Experimenteller Teil

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): $\delta = 3.87\text{-}3.80$ (m, 2H, H-8, H-9a), 3.77 (dd, 1H, H-7), 3.67 (dd, 1H, H-6), 3.67-3.57 (m, 2H, H-4, H-9b), 3.54 (dd, 1H, H-7), 3.30 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-O-C(2)}$), 2.67 (dd, 1H, H-3_{eq}), 1.99 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-CO-NH-}$), 1.59 (dd, 1H, H-3_{ax}) ppm.

$J_{9a,9b} = 12.2$; $J_{9a,8} = 2.5$, $J_{9b,8} = 6.4$, $J_{8,7} = 9.1$, $J_{7,6} = 1.8$, $J_{6,5} = 10.3$, $J_{5,4} = 10.1$, $J_{4,3eq} = 4.7$, $J_{4,3ax} = 11.9$, $J_{3ax,3eq} = 12.5$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, D_2O): $\delta = 176.6$ ($\text{CH}_3\text{-CO-NH-}$), 175.0 (C-1), 102.2 (C-2), 74.2 (C-6), 73.1 (C-8), 69.7 (2C, C-7, C-4), 64.2 (C-9), 53.1 (C-5), 53.0 ($\text{CH}_3\text{-O-C(2)}$), 41.7 (C-3), 23.6 ($\text{CH}_3\text{-CO-NH-}$) ppm.

7.6.2.6 Darstellung von Benzyl-5-acetamido-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosidonsäure **39**

Nach **AAV 4** wurden 33 mg (0.080 mmol) Methyl-[Benzyl-5-acetamido-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid]onat **47** mit 0.1 M NaOH verseift. Das Rohprodukt wurde durch Gelpermeationschromatographie gereinigt. Es wurden 27 mg (0.068 mmol) eines farblosen Feststoffes **39** erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 85%.

Charakterisierung:

farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 155°C (Zersetzung)

R_f -Wert

(H_2O :Isopropanol:AcOH = 20:5:1): 0.60.

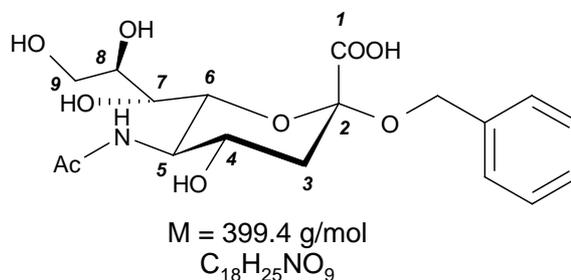
R_t -Wert (Methode 2): 8.24 min (94%)

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -6^\circ$ ($c = 0.14$, H_2O)

MALDI-TOF-MS: m/z (399.2) = 422.4 ($\text{M}+\text{Na}^+$), 438.3 ($\text{M}+\text{K}^+$).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): $\delta = 7.48\text{-}7.34$ (m, 5H, C_6H_5), 4.74 (d, 1H, $-\text{O-CH}_{2a}\text{-C}_6\text{H}_5$), 4.51 (d, 1H, $\text{O-CH}_{2b}\text{-C}_6\text{H}_5$), 3.87-3.76 (m, 3H, H-9a, H-5, H-8), 3.70-3.61 (m, 3H, H-6, H-4, H-9b), 3.58 (dd, 1H, H-7), 2.77 (dd, 1H, H-3_{eq}), 2.02 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-CO-NH-}$), 1.67 (dd, 1H, H-3_{ax}) ppm.

$J_{9a,9b} = 12.0$; $J_{9a,8} = 2.4$, $J_{9b,8} = 5.9$, $J_{8,7} = 9.2$, $J_{7,6} = 1.6$, $J_{6,5} = 10.2$, $J_{5,4} = 10.3$, $J_{4,3eq} = 4.8$, $J_{4,3ax} = 11.9$, $J_{3ax,3eq} = 12.4$, $J_{\text{Ph-CH}_{2a,b}} = 10.9$ Hz.



7 Experimenteller Teil

^{13}C -NMR (100 MHz, D_2O): δ = 176.6 ($\text{CH}_3\text{-CO-NH-}$), 175.0 (C-1), 138.6 (C(q) C_6H_5), 130.3, 130.2, 129.8 (5C, $\text{H-C}(\text{C}_6\text{H}_5)$), 102.5 (C-2), 74.3 (C-6), 73.3 (C-8), 69.8 (C-7), 69.7 (C-4), 68.7 ($\text{O-CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$), 64.1 (C-9), 53.5 (C-5), 42.1 (C-3), 23.5 ($\text{CH}_3\text{-CO-NH}$) ppm.

7.6.2.7 Darstellung von Methyl-(methyl-5-acetamido-3,5-didesoxy- α -L-arabino-2-heptulopyranosid)onat **17**⁶¹

Angelehnt an eine Vorschrift zur Darstellung von 4-Nitrophenyl-(5-acetamido-3,5-dideoxy-7-formyl- α -L-arabino-heptulopyranosidonsäure⁶¹ wurden 200 mg (0.593 mmol) **13** in 30 mL 0.1 M Natriumacetatpuffer pH = 4 gelöst und langsam (ca. 2 min) tropfenweise unter starkem Rühren mit 303.7 mg NaIO_4 (1.42 mmol), gelöst in 5 ml 0.1 M Natriumacetatpuffer, versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min gerührt. Anschließend wurden 111.2 mg (1.78 mmol) NaCNBH_3 , gelöst in 3 mL 0.1 M Natriumacetatpuffer, zugegeben und die Reaktionslösung über Nacht rühren lassen. Die Lösung wurde nachfolgend mit Na_2CO_3 neutralisiert, gefriergetrocknet und durch zweimalige Säulenchromatographie (Eluent: $\text{DCM}:\text{MeOH}$ 10:1) gereinigt. Es konnten 25 mg (0.090 mmol) eines farblosen Feststoffes **17** erhalten werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 15%.

Charakterisierung:

farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 200 °C (Zersetzung)

R_f -Wert ($\text{DCM}:\text{MeOH} = 4:1$): 0.52

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -32^\circ$ ($c = 0.29$, MeOH)

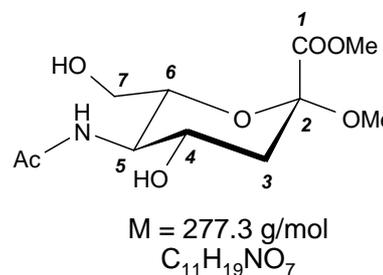
MALDI-TOF-MS: m/z (277.1) = 278.2 ($\text{M}+\text{H}^+$),

300.2 ($\text{M}+\text{Na}^+$), 316.2 ($\text{M}+\text{K}^+$).

^1H -NMR (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$): δ = 3.86 (s, 3H, $-\text{COOCH}_3$), 3.76-3.59 (m, 5H, H-7a, H-4, H-6, H-5, H-7b), 3.38 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-O-C}(2)$), 2.64 (dd, 1H, H-3_{eq}), 2.01 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-CO-NH}$), 1.81 (dd, 1H, H-3_{ax}) ppm.

$J_{4,3\text{eq}} = 4.2$, $J_{4,3\text{ax}} = 11.2$, $J_{3\text{ax},3\text{eq}} = 12.8$ Hz.

^{13}C -NMR (100 MHz, $\text{MeOH-}d_4$): δ = 176.4 ($\text{CH}_3\text{-CO-NH-}$), 171.3 (C-1), 100.8 (C-2), 76.5 (C-5), 68.0 (C-4), 62.2 (C-7), 54.6 ($-\text{COOCH}_3$), 53.0 (C-6), 52.8 ($\text{CH}_3\text{-O-C}(2)$), 39.6 (C-3), 23.5 ($\text{CH}_3\text{-CO-NH}$) ppm.



7 Experimenteller Teil

7.6.2.8 Darstellung von Methyl-5-acetamido-3,5-dideoxy- α -L-arabino-2-heptulo-pyranosidonsäure **8**

Nach AAV 4 wurden 15 mg (0.054 mmol) **17** mit 0.1 M NaOH verseift. Das Rohprodukt wurde durch Gelpermeationschromatographie gereinigt. Es wurden 12.5 mg (0.048 mmol) eines farblosen Feststoffes **8** erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 83%.

Charakterisierung:

farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 199 °C

R_f-Wert (Isopropanol:H₂O:AcOH = 20:5:1): 0.42

R_t-Wert (Methode 1): 2.40 min (97%)

$[\alpha]_D^{25} = -17^\circ$ (c = 0.34, H₂O)

MALDI-TOF-MS: m/z (263.1) = 286.2 (M+Na⁺), 302.2 (M+K⁺).

¹H-NMR (500 MHz, D₂O): $\delta = 3.78$ - 3.73 (m, 2H, H-6, H-7a), 3.67 (dd, 1H, H-5), 3.65-3.58 (m, 2H, H-4, H-7b), 3.34 (s, 3H, CH₃-O-C(2)), 2.64 (dd, 1H, H-3_{eq}), 2.02 (s, 3H, CH₃-CO-NH), 1.59, (dd, 1H, H-3_{ax}) ppm.

$J_{5,4} = 9.8$, $J_{4,3eq} = 4.3$, $J_{4,3ax} = 11.7$, $J_{3ax,3eq} = 12.4$ Hz.

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O): $\delta = 176.2$ (CH₃-CO-NH), 174.9 (C-1), 102.6 (C-2), 76.2 (C-6), 69.2 (C-4), 62.6 (C-7), 53.6 (C-5) 53.1 (CH₃-CO-C(2)), 41.8 (C-3), 23.5 (CH₃-CO-NH) ppm.

7.6.2.9 Darstellung von Methyl-(methyl-5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-galacto-2-octulo-pyranosid)onat **16**

Nach literaturbekannter Vorschrift⁶¹ wurden 200 mg (0.593 mmol) **13** zu 16 mg (0.052 mmol) eines farblosen Feststoffes **16** umgesetzt. Dies entspricht einer Ausbeute von 10%.

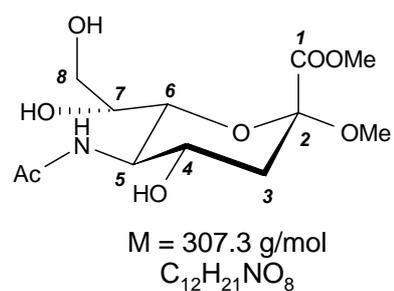
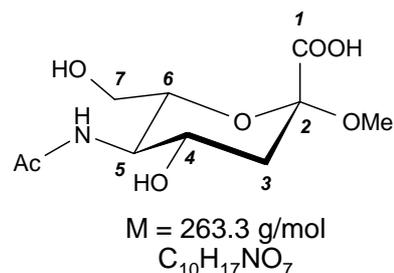
Charakterisierung:

farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 199 °C

R_f-Wert (EE:MeOH = 4:1): 0.34

$[\alpha]_D^{25} = +8^\circ$ (c = 0.1, MeOH)



7 Experimenteller Teil

MALDI-TOF-MS: m/z (307.1) = 330.4 (M+Na⁺), 346.2 (M+K⁺).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ = 3.87-3.81 (m, 4H, -COOCH₃, H-5), 3.75-3.67 (m, 4H, H-7, H-4, H-8a,b), 3.63 (dd, 1H, H-6), 3.35 (s, 3H, CH₃-O-C(2)), 2.65 (dd, 1H, H-3_{eq}), 2.02 (s, 3H, CH₃-CO-NH), 1.77 (dd, 1H, H-3_{ax}) ppm.

$J_{6,5} = 10.5$, $J_{5,4} = 10.1$, $J_{4,3eq} = 4.7$, $J_{4,3ax} = 11.9$, $J_{3ax,3eq} = 12.8$ Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O): δ = 176.5 (CH₃-CO-NH-), 171.3 (C-1), 100.7 (C-2), 75.2 (C-6), 70.6 (C-7), 68.6 (C-4), 64.3 (C-8), 54.7 (COOCH₃), 53.2 (CH₃-O-C(2)), 53.0 (C-5), 40.3 (C-3), 23.5 (CH₃-CO-NH) ppm.

7.6.2.10 Darstellung von Methyl-5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-galacto-2-octulo-pyranosidonsäure **7**

Nach **AAV 4** wurden 10 mg (0.033mmol) **16** mit 0.1 M NaOH verseift. Das Rohprodukt wurde durch Gelpermeationschromatographie gereinigt. Es wurden 8.0 mg (0.027 mmol) eines farblosen Feststoffes **7** erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 82%.

Charakterisierung:

farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 215 °C (Zersetzung)

R_f-Wert (Isopropanol:H₂O:AcOH = 20:5:1): 0.35

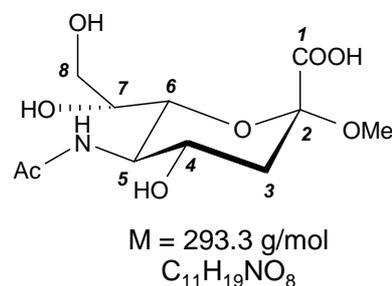
R_t-Wert (Methode 1): 2.40 min (99 %)

$[\alpha]_D^{25} = -7^\circ$ (c = 0.2, H₂O)

MALDI-TOF-MS: m/z (293.1) 316.5 (M+Na⁺), 332.5 (M+K⁺).

¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 3.81 (dd, 1H, H-5), 3.77-3.71 (m, 3H, H-7, H-8a,b), 3.70 (dd, 1H, H-6), 3.65 (ddd, 1H, H-4), 3.32 (s, 3H, CH₃-O-C(2)), 2.66 (dd, 1H, H-3_{eq}), 2.03 (s, 1H, CH₃-CO-NH), 1.60 (dd, 1H, H-3_{ax}) ppm.

$J_{7,6} = 1.0$, $J_{6,5} = 10.4$, $J_{5,4} = 10.0$, $J_{4,3eq} = 4.6$, $J_{4,3ax} = 11.9$, $J_{3ax,3eq} = 12.3$ Hz.



7 Experimenteller Teil

^{13}C -NMR (100 MHz, D_2O): $\delta = 176.6$ ($\text{CH}_3\text{-CO-NH}$), 175.1 (C-1), 102.31 (C-2), 74.68 (C-6), 70.51 (C-7), 69.51 (C-4), 64.24 (C-8), 53.58 (C-5), 53.02 ($\text{CH}_3\text{-O-C}(2)$), 41.76 (C-3), 23.57 ($\text{CH}_3\text{-CO-NH}$) ppm.

7.6.2.11 Darstellung von Methyl-(methyl-5-acetamido-7-benzylamino-3,5,7-tridesoxy- α -L-arabino-hept-2-ulopyranosid)onat 27

Nach **AAV 3** wurden 100 mg (0.296 mmol) **13** mit 156 mg (0.712 mmol) NaIO_4 (2.4eq) oxidativ gespalten. Der erhaltene Feststoff wurde in 5 mL 0.1 M methanolischem Acetatpuffer gelöst und mit $32.3 \mu\text{L}$ (0.296 mmol) Benzylamin versetzt. Anschließend wurden 18.6 mg (0.296 mmol) NaCNBH_3 , gelöst in 2 mL MeOH, zum Reaktionsgemisch gegeben. Nach 2 d Rühren bei RT wurde das Produkt zweimal säulenchromatographisch (Eluent: I: DCM:MeOH 4:1, II: DCM:MeOH 10:1) gereinigt. Die das Produkt enthaltenden Fraktionen wurden im Vakuum eingengt. Nach Trocknung an der Ölpumpe wurden 59.0 mg (0.161 mmol) eines farblosen Feststoffs **27** mit einer Ausbeute von 54% erhalten.

Charakterisierung:

farbloser Feststoff

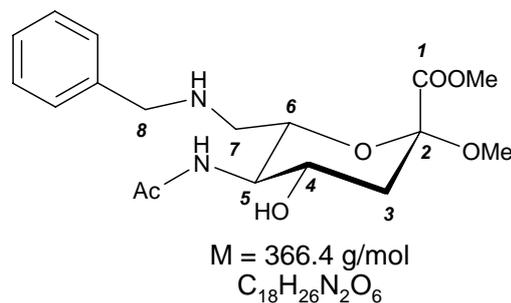
Schmelzpunkt: $173 \text{ }^\circ\text{C}$ (Zersetzung)

R_f -Wert (DCM:MeOH = 4:1): 0.43.

$[\alpha]^{25} = -16^\circ$ ($c=0.1$, MeOH)

MALDI-TOF-MS: m/z (366.2) = 367.4 ($\text{M}+\text{H}^+$),

389.3 ($\text{M}+\text{Na}^+$).



^1H -NMR (500 MHz, $\text{MeOH-}d_4$): $\delta = 7.57\text{-}7.47$ (m, 5H, C_6H_5), 4.38 (d, 1H, H-8a), 4.26 (d, 1H, H-8b), 3.95 (ddd, 1H, H-6), 3.90 (s, 3H, $-\text{COOCH}_3$), 3.67 (ddd, 1H, H-4), 3.58 (dd, 1H, H-5), 3.41 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-O-C}(2)$), 3.26 (dd, 1H, H-7a), 3.17 (dd, 1H, H-7b), 2.67 (dd, 1H, H-3_{eq}), 2.01 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-CO-NH}$), 1.79 (dd, 1H, H-3_{ax}) ppm.

$J_{7a,7b} = 13.6$, $J_{7a,6} = 2.5$, $J_{7b,6} = 7.8$, $J_{6,5} = 10.0$, $J_{5,4} = 10.0$, $J_{4,3eq} = 4.4$, $J_{4,3ax} = 11.9$, $J_{3ax,3eq} = 12.9$, $J_{8a,b} = 12.7$ Hz.

^{13}C -NMR (100 MHz, $\text{MeOH-}d_4$): $\delta = 175.8$ ($\text{CH}_3\text{-CO-NH-}$), 170.9 (C-1), 134.0 (C(q), C_6H_5), 131.9 , 131.4 , 131.1 (5C, H-C, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-}$), 101.8 (C-2), 73.1 (C-6), 68.4 (C-4), 56.1 (C-5), 54.3 (COOCH_3), 53.4 ($\text{CH}_3\text{-O-C}(2)$), 52.8 (C-8), 50.2 (C-7), 42.3 (C-3), 23.7 ($\text{CH}_3\text{-CO-NH}$) ppm.

7 Experimenteller Teil

7.6.2.12 Darstellung von Methyl-5-acetamido-7-benzylamino-3,5,7-tridesoxy- α -L-arabino-hept-2-ulopyranosidonsäure 21

Nach AAV 4 wurden 20 mg (0.055 mmol) 27 mit 0.1 M NaOH verseift. Das Rohprodukt wurde zweimal durch Gelpermeationschromatographie gereinigt. Es wurden 19 mg (0.054 mmol) eines farblosen Feststoffes 21 erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 98%.

Charakterisierung:

farbloser Feststoff

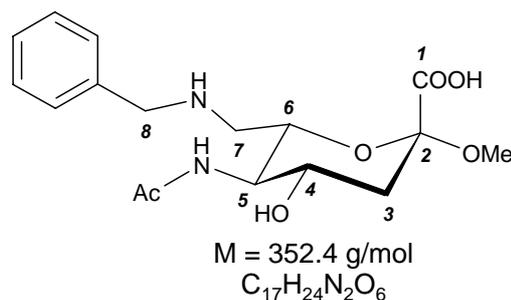
Smp.: 167 °C (Zersetzung)

R_F-Wert (Isopropanol:H₂O:AcOH = 20:5:1): 0.40

R_T-Wert (Methode 3): 9.17 min (95%)

[α]_D²⁵ = 65° (c = 0.1, H₂O)

MALDI-TOF-MS: m/z (352.2) = 353.7 (M+H⁺), 375.6 (M+Na⁺).



¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 7.51-7.46 (m, 5H, C₆H₅), 4.34 (d, 1H, H-8a), 4.28 (d, 1H, H-8b), 4.02 (ddd, 1H, H-6), 3.65 (ddd, 1H, H-4), 3.55 (dd, 1H, H-5), 3.33 (s, 3H, CH₃-O-C(2)), 3.20 (dd, 1H, H-7a), 3.15 (dd, 1H, H-7b), 2.65 (dd, 1H, H-3_{eq}), 1.95 (s, 3H, CH₃-CO-NH), 1.63 (dd, 1H, H-3_{ax}) ppm.

$J_{7a,7b} = 13.4$, $J_{7a,6} = 2.9$, $J_{7b,6} = 8.0$, $J_{6,5} = 10.1$, $J_{5,4} = 10.1$, $J_{4,3eq} = 4.4$, $J_{4,3ax} = 11.8$, $J_{3ax,3eq} = 12.5$, $J_{8a,b} = 13.3$ Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O): δ = 176.7 (CH₃-CO-NH), 174.7 (C-1), 132.3 (C(q), C₆H₅), 131.5, 131.3, 130.9 (5C, H-C (C₆H₅-)), 103.0 (C-2), 72.00 (C-6), 68.4 (C-4), 55.3 (C-5), 53.4 (CH₃-O-C(2)), 52.6 (C-8), 49.4 (C-7), 41.7 (C-3), 23.5 (CH₃-CO-NH) ppm.

7.6.2.13 Darstellung von Methyl-[methyl-5-acetamido-7-(3-carboxy-benzylamino)-3,5,7-tridesoxy- α -L-arabino-hept-2-ulopyranosid]onat 29

Nach AAV 3 wurden 100 mg (0.296 mmol) 13 mit 143 mg (0.652 mmol) NaIO₄ (2.2eq) oxidativ gespalten. Der erhaltene Feststoff wurde in 20 mL eines 0.1 M Natriumacetatpuffer gelöst und mit 59.3 mg (0.296 mmol) Benzoesäure-3-methylamin, gelöst in 2 mL 0.1 M Natriumacetatpuffer, versetzt. Anschließend wurden 18.6 mg (0.296 mmol) NaCNBH₃, gelöst in 2 mL 0.1 M Natriumacetatpuffer, zum Reaktionsgemisch gegeben. Nach 24 h Rühren bei

7 Experimenteller Teil

RT wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (Eluent: DCM:MeOH 10:1) gereinigt und im Vakuum eingengt. Nach Trocknung im Ölpumpenvakuum konnten 31 mg (0.073 mmol) eines farblosen Feststoffs **29** mit einer Ausbeute von 25% erhalten werden.

Charakterisierung:

farbloser Feststoff

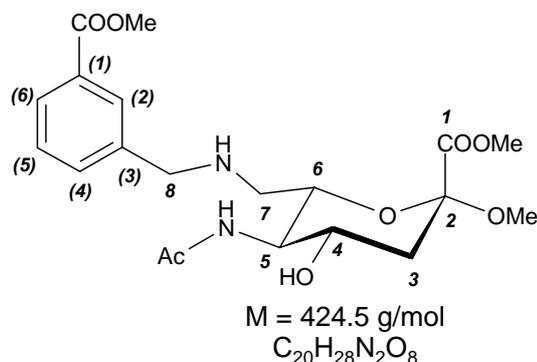
Schmelzpunkt: 116 °C

R_f-Wert (DCM:MeOH = 4:1): 0.47

[α]_D²⁵ = -10° (c = 0.25, H₂O)

MALDI-TOF-MS: m/z (424.2) =

425.3 (M+H⁺), 447.3 (M+Na⁺), 463.2 (M+K⁺).



¹H-NMR (500 MHz, MeOH-*d*₄): δ= 8.09-8.06 (m, 1H, H-2(Ar)), 7.98-7.94 (m, 1H, H-6(Ar)), 7.67-7.63 (m, 1H, H-4(Ar)), 7.52-7.47 (m, 1H, H-5(Ar)), 4.00 (d, 1H, H-8a), 3.86 (d, 1H, H-8b), 3.93 (s, 3H, C(Ar)-COOCH₃), 3.86 (s, 3H, C(2)-COOCH₃), 3.75-3.70 (m, 1H, H-4), 3.62-3.53 (m, 2H, H-6, H-5), 3.39 (s, 3H, C(2)-O-CH₃), 2.82 (dd, 1H, H-7a), 2.77 (dd, 1H, H-7b), 2.64 (dd, 1H, H-3_{eq}), 1.95 (s, 3H, CH₃-NH-CO-), 1.72 (dd, 1H, H-3_{ax}) ppm.

$J_{7a,7b} = 13.1$, $J_{7a,6} = 2.7$, $J_{7b,6} = 7.6$, $J_{4,3eq} = 4.1$, $J_{4,3ax} = 11.5$, $J_{3ax,3eq} = 12.6$, $J_{8a,b} = 13.3$ Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOH-*d*₄): δ= 175.4 (CH₃-CO-NH), 171.1 (C-1), 169.5 (C(Ar)-COOCH₃), 142.1 (C-1(Ar)), 132.6 (C-3(Ar)), 135.4 (C-4(Ar)), 131.5 (C-2(Ar)), 130.6 (C-5(Ar)), 130.3 (C-6(Ar)), 101.3 (C-2), 75.6 (C-4), 69.5 (C-6), 56.4 (C-5), 54.1 (C-8), 53.5 (C(2)-COOCH₃), 52.9 (C(Ar)-COOCH₃), 51.8 (C-4), 51.8 (C(2)-O-CH₃), 42.2 (C-3), 23.7 (CH₃-CO-NH) ppm.

7.6.2.14 Darstellung von Methyl-5-acetamido-7-(3-carboxy-benzylamino)-3,5,7-trideoxy-α-L-arabino-hept-2-ulopyranosidonsäure **22**

Nach AAV 4 wurden 27 mg (0.064 mmol) **29** mit 0.1 M NaOH verseift. Das Rohprodukt wurde durch Gelpermeationschromatographie gereinigt. Es wurden 19 mg (0.048 mmol) eines farblosen Feststoffes **22** erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 75%.

7 Experimenteller Teil

Charakterisierung:

farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 195 °C (Zersetzung)

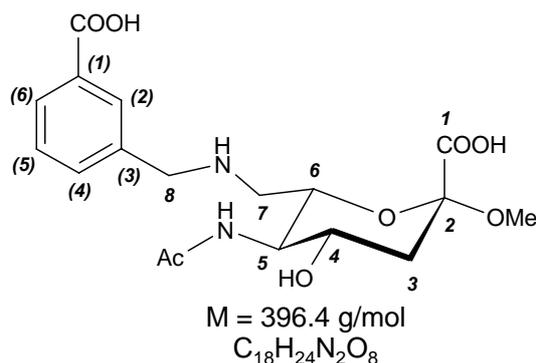
R_f-Wert (Isopropanol:H₂O:AcOH 40:10:1): 0.30

R_t-Wert (Methode 2): 6.35 min (99%)

[α]_D²⁵ = +1° (c = 0.22, H₂O)

MALDI-TOF-MS: m/z (396.2) = 397.1 (M+H⁺),

419.1 (M+Na⁺), 435.1 (M+K⁺).



¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ= 7.93-7.87 (m, 2H, H-6(Ar), H-2(Ar)), 7.61-7.56 (m, 1H, H-4(Ar)), 7.55-7.50 (m, 1H, H-5(Ar)), 4.36 (d, 1H, H-8a), 4.30 (d, 1H, H-8b), 4.06-3.99 (m, 1H, H-6), 3.63 (ddd, 1H, H-4), 3.54 (dd, 1H, H-5), 3.33 (s, 3H, C(2)-O-CH₃), 3.21-3.10 (m, 2H, H-8), 2.64 (dd, 1H, H-3_{eq}), 1.93 (s, 3H, CH₃-CO-NH-), 1.63 (dd, 1H, H-3_{ax}) ppm.

$J_{7a,6} = 3.6$, $J_{7b,6} = 7.1$, $J_{6,5} = 10.3$, $J_{5,4} = 10.1$, $J_{4,3eq} = 4.4$, $J_{4,3ax} = 11.5$, $J_{3ax,3eq} = 12.4$,
 $J_{8a,b} = 13.2$ Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O): δ= 176.7 (CH₃-CO-NH), 176.7 (C(Ar)-COOH), 174.8 (C-1), 138.9 (C-1(Ar)), 134.1 (C-4(Ar)), 132.2 (C-3(Ar)), 131.8 (C-2(Ar)), 131.5 (C-6(Ar)), 130.8 (C-5(Ar)), 103.1 (C-2), 72.1 (C-6), 68.5 (C-4), 55.3 (C-5), 53.5 (C(2)-O-CH₃), 52.5 (C-8), 49.5 (C-7), 41.8 (C-3), 23.5 (CH₃-CO-NH-) ppm.

7.6.2.15 Darstellung von Methyl-[methyl-5-acetamido-8-(cyclopropyl-methylamino)-3,5,8-trideoxy-α-D-galacto-oct-2-ulopyranosid]onate **31**

Es wurden 100 mg (0.297 mmol) **13** mit 64 mg (0.30 mmol) NaIO₄ nach **AAV 2** oxidativ gespalten. Das erhaltene Rohprodukt wurde unter N₂-Atmosphäre in 4 mL MeOH gelöst und 2 Spatelspitzen Molsieb 3 Å zugegeben. Zu dieser Lösung wurden 48 mg (0.446 mmol) Aminomethylcyclopropan x HCl gegeben und nach 5 min Rühren 11.3 mg (0.180 mmol) NaCNBH₃, gelöst in 1 mL MeOH, zugeben. Der pH-Wert wurde während der ersten 3 h, wenn nötig, mit Essigsäure oder Triethylamin auf pH = 7 korrigiert. Nach 20 h wurde das Lösungsmittel entfernt und das Produkt durch zweimalige Säulenchromatographie (Eluent: I: DCM:MeOH 6:1 + 1% NEt₃, II: DCM:MeOH 8:1 + 0.5% NEt₃) gereinigt. Es konnten 18 mg eines leicht mit Triethylamin verunreinigten Produktes **31** erhalten werden, welches direkt für die nächste Reaktion bereitgestellt wurde.

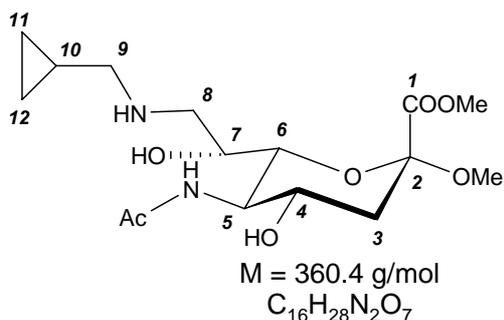
7 Experimenteller Teil

Charakterisierung:

farbloser Feststoff

R_F-Wert (DCM:MeOH 5:1 + 1%Et₃N): 0.10

MALDI-TOF-MS: m/z (360.2) = 361.0 (M+H⁺).



¹H-NMR (500 MHz, MeOH-*d*₄): δ= 3.89-3.85 (m, 4H, H-7, -COOCH₃), 3.75 (dd, 1H, H-5), 3.69-3.64 (m, 1H, H-4), 3.41 (dd, 1H, H-6), 3.35 (s, 3H, CH₃-O-C(2)), 3.10 (dd, 1H, H-8a), 3.02 (dd, 1H, H-8b), 2.75 (dd, 1H, H-9a), 2.72-2.65 (m, 2H, H-9b, H-3_{eq}), 2.04 (s, 3H, CH₃-CO-NH-), 1.72 (dd, 1H, H-3_{ax}), 1.11-1.02 (m, 1H, H-10), 0.66-0.59 (m, 2H, H-11a, H-12a), 0.32-0.28 (m, 2H, H-11b, H-12b) ppm.

$J_{10,9a} = 7.1$, $J_{9a,9b} = 12.6$, $J_{8a,8b} = 12.5$, $J_{8a,7} = 8.5$, $J_{8b,7} = 5.0$, $J_{7,6} = 1.8$, $J_{6,5} = 10.2$, $J_{5,4} = 10.0$, $J_{4,3eq} = 4.6$, $J_{4,3ax} = 12.0$, $J_{3ax,3eq} = 12.8$ Hz.

¹³C-NMR (125 MHz, MeOH-*d*₄): δ= 76.7 (C-6), 68.6 (C-4), 68.4 (C-7), 55.6 (C-9), 54.6 (C-5), 53.7 (COOCH₃), 52.7 (CH₃-O-C(2)), 51.7 (C-8), 42.3 (C-3), 23.5 (CH₃-CO-NH), 10.8 (C-10), 5.1 (2C, C-11, C-12) ppm. (Quartäre C-Atome wurden unter diesen Messbedingungen nicht erfasst.)

7.6.2.16 Darstellung von Methyl-5-acetamido-8-(cyclopropyl-methylamino)-3,5,8-trideoxy-α-D-galacto-oct-2-ulopyranosidonsäure **18**

Nach AAV **4** wurden 14.4 mg der verunreinigten Substanz **31** mit 0.1 M NaOH verseift. Das Rohprodukt wurde durch Gelpermeationschromatographie gereinigt. Es wurden 9.4 mg (0.027 mmol) eines farblosen Produktes **18** erhalten. Dies entspricht einer Gesamtausbeute von 18% über zwei Stufen, bezogen auf das Edukt **13**.

Charakterisierung:

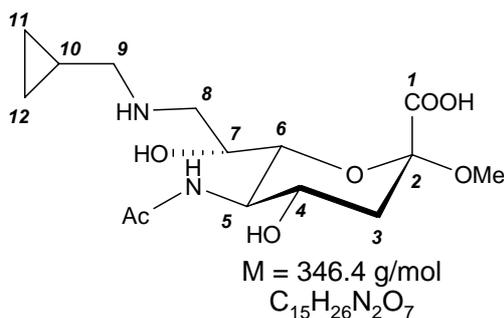
farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 177 °C (Zersetzung)

R_F-Wert (Isopropanol:H₂O:AcOH = 20:5:1): 0.42

R_t-Wert (Methode 1): 2.51 min (95%)

[α]_D²⁵ = -10° (c = 0.12, H₂O)



7 Experimenteller Teil

MALDI-TOF-MS: m/z (346.2) = 347.0 ($M+H^+$), 368.9 ($M+Na^+$).

1H -NMR (500 MHz, D_2O): δ = 4.04-3.99 (m, 1H, H-7), 3.77 (dd, 1H, H-5), 3.64(ddd, 1H, H-4), 3.60 (dd, 1H, H-6), 3.32 (s, 3H, CH_3 -O-C(2)), 3.29 (dd, 1H, H-8a), 3.23 (dd, 1H, H-8b), 2.97-2.88 (m, 2H, H-9), 2.67 (dd, 1H, H-3_{eq}), 2.01 (s, 3H, CH_3 -CO-NH), 1.62 (dd, 1H, H-3_{ax}), 1.12-1.03 (m, 1H, H-10), 0.69-0.60 (m, 2H, H-11a, H-12a), 0.36-0.30 (m, 2H, H-11b, H-12b) ppm.

$J_{8a,8b} = 12.8$, $J_{8a,7} = 6.8$, $J_{8b,7} = 5.0$, $J_{7,6} = 1.3$, $J_{6,5} = 10.4$, $J_{5,4} = 10.1$, $J_{4,3eq} = 4.7$, $J_{4,3ax} = 12.0$, $J_{3ax,3eq} = 12.5$ Hz.

^{13}C -NMR (125 MHz, D_2O): δ = 176.8 (CH_3 -CO-NH), 174.8 (C-1), 102.9 (C-2), 75.4 (C-6), 69.3 (C-4), 65.8 (C-7), 54.7 (C-9), 53.6 (C-5), 53.3 (CH_3 -O-C(2)), 51.9 (C-8), 41.7 (C-3), 23.5 (CH_3 -CO-NH), 8.2 (C-10), 5.0 (2C, C-11, C-12) ppm.

7.6.2.17 Darstellung von Methyl-[methyl-5-acetamido-8-(n-propyl-amino)-3,5,8-tridesoxy- α -D-galacto-oct-2-ulopyranosid]onat 33

Es wurden 100 mg (0.297 mmol) **13** wurden mit 64 mg (0.30 mmol) $NaIO_4$ nach **AAV 2** oxidativ gespalten. Das erhaltene Rohprodukt wurde unter N_2 -Atmosphäre in 4 mL MeOH gelöst und zwei Spatelspitzen Molsieb 3 Å zugegeben. Zu dieser Lösung wurden 89 μ L (1.5 mmol) *n*-Propylamin gegeben und der pH-Wert mit Essigsäure auf pH = 5 eingestellt. Anschließend wurden 11.3 mg (0.180 mmol) $NaCNBH_3$, gelöst in 1 mL MeOH, zugeben. Der pH-Wert wurde während der ersten 3 h, wenn nötig, mit Essigsäure oder Triethylamin auf pH = 7 korrigiert. Nach 20 h wurde das Lösungsmittel entfernt und das Produkt mittels zweimaliger Säulenchromatographie (Eluent: I: DCM:MeOH 6:1 + 0.5% NEt_3 , II: DCM/MeOH 7:1 + 0.5% NEt_3) gereinigt. Nach Trocknung im Vakuum wurden 29 mg eines leicht mit Triethylamin verunreinigten Produktes **33** erhalten werden, welches direkt für die nächste Reaktion bereitgestellt wurde.

7 Experimenteller Teil

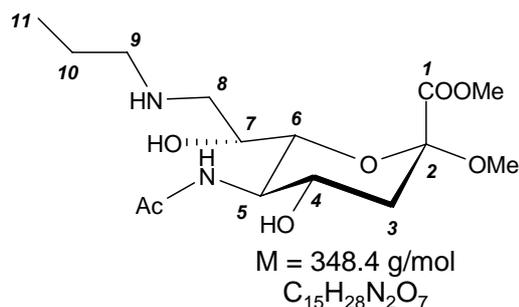
Charakterisierung:

farbloser Feststoff

R_f-Wert (DCM:MeOH): 0.08

MALDI-TOF-MS: m/z (348.2) = 349.1 (M+H⁺),

371.1 (M+Na⁺).



¹H-NMR (400 MHz, MeOH-*d*₄): δ = 3.97-3.91 (m, 1H, H-7), 3.86 (s, 3H, COOCH₃), 3.73 (dd, 1H, H-5), 3.70-3.63 (m, 1H, H-4), 3.45-3.40 (m, 1H, H-6), 3.36 (s, 3H, C(2)-O-CH₃), 3.32-3.27 (m, 1H, H-8a), 3.13 (dd, 1H, H-8b), 3.03-2.95 (m, 2H, H-9), 2.67 (dd, 1H, H-3_{eq}), 2.05 (s, 3H, CH₃-CO-NH), 1.80-1.69 (m, 3H, H-10, H-3_{ax}), 1.05 (t, 3H, H-11) ppm.

$J_{8a,8b} = 12.7$, $J_{8b,7} = 2.9$, $J_{6,5} = 10.0$, $J_{5,4} = 10.2$, $J_{4,3eq} = 4.5$, $J_{3ax,3eq} = 13.0$, $J_{10,11} = 7.5$ Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOH-*d*₄): δ = 175.9 (CH₃-CO-NH), 170.8 (C-1), 101.5 (C-2), 77.2 (C-6), 68.7 (C-4), 67.9 (C-7), 55.0 (C-5), 54.0 (COOCH₃), 53.0 (C(2)-O-CH₃), 51.9 (C-9), 51.8 (C-8), 42.3 (C-3), 23.5 (CH₃-CO-NH), 21.9 (C-10), 12.2 (C-11) ppm.

7.6.2.18 Darstellung von Methyl-5-acetamido-8-(n-propyl-amino)-3,5,8-trideoxy-α-D-galacto-oct-2-ulopyranosidonsäure 19

Nach AAV 4 wurden 16.5 mg **33** mit 0.1 M NaOH verseift. Das Rohprodukt wurde durch Gelpermeationschromatographie gereinigt. Es wurden 8.4 mg (0.025 mmol) eines farblosen Feststoffes **19** erhalten. Dies entspricht einer Gesamtausbeute von 14% über zwei Stufen, bezogen auf das Edukt **13**.

Charakterisierung:

farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 202 °C (Zersetzung)

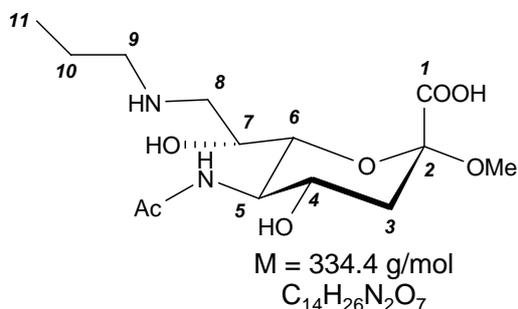
R_f-Wert (Isopropanol:H₂O:AcOH = 20:5:1): 0.36

R_t-Wert (Methode 1): 2.46 min (99%)

[α]_D²⁵ = -34 (c = 0.08, H₂O)

MALDI-TOF-MS: m/z (334.2) = 335.1 (M+H⁺),

357.0 (M+Na⁺), 373.0 (M+K⁺).



7 Experimenteller Teil

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): $\delta = 3.96\text{-}3.91$ (m, 1H, H-7), 3.68 (dd, 1H, H-5), 3.55 (ddd, 1H, H-4), 3.50 (dd, 1H, H-6), 3.24-3.18 (m, 4H, H-8a,C(2)-O-CH₃), 3.14 (dd, 1H, H-8b), 2.96-2.90 (m, 2H, H-9), 2.58 (dd, 1H, H-3_{eq}), 1.93 (s, 3H, CH₃-CO-NH), 1.66-1.56 (m, 2H, H-10), 1.53 (dd, 1H, H-3_{ax}), 0.86 (t, 3H, H-11) ppm.

$J_{8a,8b} = 13.0$, $J_{8a,7} = 7.0$, $J_{8b,7} = 4.8$, $J_{7,6} = 1.1$, $J_{6,5} = 10.4$, $J_{5,4} = 10.0$, $J_{4,3eq} = 4.7$, $J_{4,3ax} = 11.8$, $J_{3ax,3eq} = 12.5$, $J_{10,11} = 7.4$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, D_2O): $\delta = 176.7$ (CH₃-CO-NH), 174.8 (C-1), 102.9 (C-2), 75.4 (C-6), 69.5 (C-4), 65.9 (C-7), 53.6 (C-5), 53.2 (C(2)-O-CH₃), 52.0 (C-8), 51.4 (C-9), 41.6 (C-3), 23.5 (CH₃-CO-NH), 20.9 (C10), 11.8 (C-11) ppm.

7.6.2.19 Darstellung von Methyl-[methyl-5-acetamido-8-(butansäure-4-yl-amino)-3,5,8-tridesoxy- α -D-galacto-oct-2-ulopyranosid]onat 35

Es wurden 100 mg (0.297 mmol) **13** wurden mit 64 mg (0.30 mmol) NaIO_4 nach **AAV 2** oxidativ gespalten. Das erhaltene Rohprodukt wurde unter N_2 -Atmosphäre in 4 mL MeOH gelöst und etwas Molsieb 3 Å zugegeben. Zu dieser Lösung wurden anschließend 153 mg (1.48 mmol) γ -Aminobuttersäure gegeben und der pH-Wert mit Essigsäure auf pH = 5 eingestellt. Nach 5 min Rühren wurden 11.3 mg (0.180 mmol) NaCNBH_3 , gelöst in 1 mL MeOH, zugeben. Der pH-Wert wurde während der ersten 3 h alle 30 min kontrolliert und wenn nötig mit Essigsäure oder Triethylamin auf pH = 7 korrigiert. Danach wurden erneut 11.3 mg (0.180 mmol) NaCNBH_3 zugegeben, der pH-Wert kontrolliert und weitere 16 h rühren lassen. Zur Aufarbeitung wurde das Lösungsmittel entfernt und das Produkt mittels Säulenchromatographie (Eluent: Gradient von DCM:MeOH 6:1 + 0.5% NEt_3 nach DCM:MeOH 1:1 + 0.5% NEt_3) gereinigt. Nach Entfernung des Lösungsmittels wurde das erhaltene Rohprodukt durch Gelpermeationschromatographie an Biogel P2 gereinigt. Es wurden 20 mg (0.051 mmol) des Produkts **35** erhalten. Dies entspricht, bezogen auf die Menge des Eduktes **13** einer Ausbeute von 17%.

7 Experimenteller Teil

Charakterisierung:

farblosler Feststoff

Schmelzpunkt: 155° C (Zersetzung)

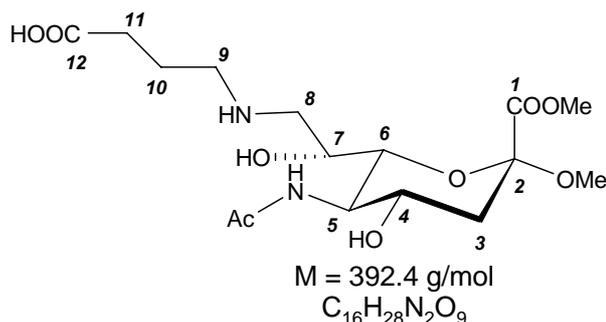
R_f-Wert

(Isopropanol:H₂O:AcOH = 20:5:1): 0.27

[α]_D²⁵ = +9° (c = 0.18, H₂O)

MALDI-TOF-MS: m/z (392.2) = 393.5

(M+H⁺), 415.4 (M+Na⁺), 431.4 (M+K⁺).



¹H-NMR (400 MHz, MeOH-*d*₄): δ= 3.97-3.92 (m, 1H, H-7), 3.85 (s, 3H, COOCH₃), 3.75 (dd, 1H, H-5), 3.66 (ddd, 1H, H-4), 3.44 (dd, 1H, H-6), 3.40-3.29 (m, 4H, CH₃-O-C(2)-, H-8a), 3.23-3.06 (m, 3H, H-8b, H-9a, H-9b), 2.66 (dd, 1H, H-3_{eq}), 2.46-2.39 (m, 2H, H-11), 2.05 (s, 3H, CH₃-CO-NH-), 1.97-1.88 (m, 2H, H-10), 1.73 (dd, 1H, H-3_{ax}) ppm.

$J_{7,6} = 1.7$, $J_{6,5} = 10.2$, $J_{5,4} = 10.1$, $J_{4,3eq} = 4.6$, $J_{4,3ax} = 11.7$, $J_{3ax,3eq} = 12.8$ Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOH-*d*₄): δ= 181.8 (C-12), 176.5 (CH₃-CO-NH), 170.9 (C-1), 101.4 (C-2), 77.3 (C-6), 68.9 (C-4), 67.8 (C-7), 55.1 (C-5), 54.2 (COOCH₃), 53.2 (CH₃-O-C(2)), 51.7 (C-8), 50.7 (C-9), 42.4 (C-3), 37.9 (C-11), 24.2 (C-10), 23.6 (CH₃-CO-NH) ppm.

7.6.2.20 Darstellung von Methyl-5-acetamido-8-(butansäure-4-yl-amino)-3,5,8-trideoxy-α-D-galacto-oct-2-ulopyranosidonsäure 20

Nach AAV 4 wurden 15 mg (0.038 mmol) 35 mit 0.1 M NaOH verseift. Das Rohprodukt wurde durch Gelpermeationschromatographie gereinigt. Es wurden 14 mg (0.037 mmol) eines farblosen Feststoffes 20 erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 99%.

Charakterisierung:

farblosler Feststoff

Schmelzpunkt: 164 °C (Zersetzung)

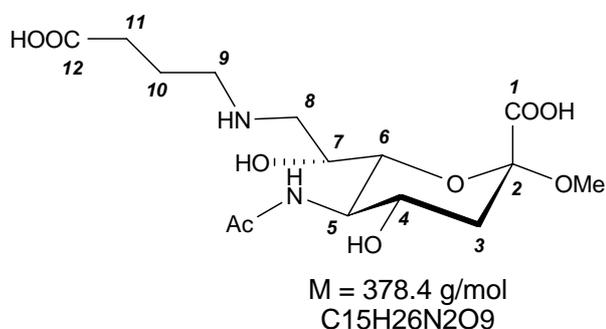
R_f-Wert

(Isopropanol:H₂O:AcOH = 20:5:1): 0.20

R_f-Wert (Methode 1): 2.36 min (99%)

[α]_D²⁰ = +13° (c = 0.12, H₂O)

MALDI-TOF-MS: m/z (378.2) = 379.4 (M+H⁺), 401.3 (M+Na⁺).



7 Experimenteller Teil

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): δ = 4.02-3.97 (m, 1H, H-7), 3.75 (dd, 1H, H-5), 3.66 (m, 1H, H-4), 3.60-3.55 (m, 1H, H-6), 3.34-3.26 (m, 4H, $\text{CH}_3\text{-O-C}(2)$, H-8a), 3.22 (dd, 1H, H-8b), 3.10-3.03 (m, 2H, H-9), 2.64 (dd, 1H, H-3_{eq}), 2.33-2.27 (m, 2H, H-11), 1.99 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-CO-NH}$), 1.95-1.86 (m, 2H, H-10), 1.59 (dd, 1H, H-3_{ax}) ppm.

$J_{8a,b} = 12.9$, $J_{8a,7} = 7.4$, $J_{8b,7} = 4.7$, $J_{6,5} = 10.0$, $J_{5,4} = 10.0$, $J_{4,3eq} = 4.6$, $J_{4,3ax} = 12.1$, $J_{3ax,3eq} = 12.6$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, D_2O): δ = 181.9 (C-12), 176.8 ($\text{CH}_3\text{-CO-NH}$), 174.7 (C-1), 102.9 (C-2), 75.3 (C-6), 69.3 (C-4), 65.7 (C-7), 53.6 (C-5), 53.3 (COOCH_3), 52.1 ($\text{CH}_3\text{-O-C}(2)$), 52.1 (C-8), 49.4 (C-9), 41.5 (C-3), 35.3 (C-11), 23.6 ($\text{CH}_3\text{-CO-NH}$), 23.5 (C10) ppm.

7.6.2.21 Darstellung von Methyl-5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-galacto-oct-2-ulopyranosidarsäure-1-methylester **36**

Es wurden 100 mg (0.297 mmol) **13** nach **AAV 2** mit 0.6 eq NaIO_4 umgesetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde in 1.5 mL demineralisiertem H_2O aufgenommen. Zu dieser Lösung wurden 15 mg (0.096 mmol) Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat in 161 μL Wasser und 45 μL 30%ige H_2O_2 -Lösung gegen. Der Ansatz wurde auf 0 °C gekühlt und in Intervallen von 10 min mit jeweils 50 μL einer Lösung aus 64.4 mg 80%igem Natriumchlorit in 570 μL Wasser unter Rühren versetzt. Nach der vollständigen Zugabe der Natriumchloritlösung wurde für weitere 30 min gerührt und anschließend Natriumthiosulfat zum Abbau der Peroxide zugegeben, welches mit Iod-Stärke-Papier auf Vollständigkeit überprüft wurde. Die Lösung wurde gefriergetrocknet und mittels Säulenchromatographie (Eluent: $\text{DCM}:\text{MeOH}$ 4:1 + 0.5% AcOH) gereinigt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der erhaltene Feststoff mittels Gelpermeationschromatographie über Biogel P2 gereinigt. Nach Gefriertrocknung konnten 49 mg (0.15 mmol) eines farblosen Produktes **36** erhalten werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 86% bezogen auf die Menge des eingesetzten NaIO_4 .

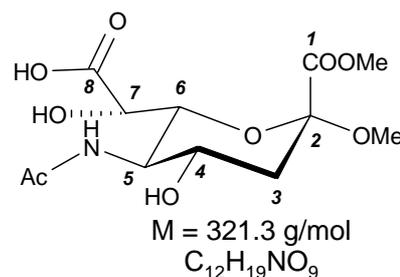
Charakterisierung:

farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 142° (Zersetzung)

R_f -Wert: (Isopropanol: $\text{H}_2\text{O}:\text{AcOH} = 20:5:1$): 0.20.

$[\alpha]_D^{25} = -18^\circ$ ($c = 0.14$, H_2O)



7 Experimenteller Teil

MALDI-TOF-MS: m/z (321.1) = 344.0 (M+Na⁺), 360.0 (M+K⁺).

¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 4.06-3.08 (m, 2H, H-6, H-7), 3.88 (dd, 1H, H-5), 3.83 (s, 3H, COOCH₃), 3.71 (ddd, 1H, H-4), 3.30 (s, 3H, C(2)-O-CH₃), 2.60 (dd, 1H, H-3_{eq}), 2.02 (s, 3H, CH₃-CO-NH), 1.75 (dd, 1H, H-3_{ax}) ppm.

$J_{6,5} = 10.0$, $J_{5,4} = 10.3$, $J_{4,3eq} = 4.8$, $J_{4,3ax} = 11.9$, $J_{3eq,3ax} = 12.9$ Hz.

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O): δ = 177.3 (C-8), 174.8 (CH₃-CO-NH), 170.0 (C-1), 99.1 (C-2), 75.6 (C-6), 69.8 (C-7), 67.1 (C-4), 53.2 (-COOCH₃), 52.0 (C(2)-O-CH₃), 51.7 (C-5), 38.9 (C-3), 22.2 (CH₃-CO-NH) ppm.

7.6.2.2 Darstellung von Methyl-5-acetamido-4,7-O-diacetyl-3,5-dideoxy- α -D-galacto-oct-2-ulopyranosidarsäure-1-methylester **37**

Es wurden 49 mg (0.15 mmol) **36** mit 1.3 mL Essigsäureanhydrid und 2 mL Pyridin gelöst und für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Der Ansatz wurde im Vakuum bis zur Trockne eingengt und das Produkt mittels Säulenchromatographie (Eluent: DCM:MeOH 3:1 + 0.5% AcOH) gereinigt. Nach Trocknung im Vakuum wurden 30 mg (0.074 mmol) des Produkts **37** erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 49% bezogen auf die Menge des eingesetzten **36**.

Charakterisierung:

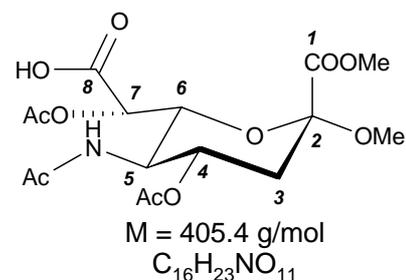
farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 149° (Zersetzung)

R_F-Wert: (DCM:MeOH 3:1 + 0.5% AcOH): 0.26

$[\alpha]_D^{25} = -44^\circ$ (c = 0.13, H₂O)

MALDI-TOF-MS: m/z (405.1) = 427.9 (M+Na⁺), 443.9 (M+K⁺).



¹H-NMR (400 MHz, MeOH-*d*₄): δ = 5.02 (d, 1H, H-7), 5.02-4.95 (m, 1H, H-4), 4.28 (dd, 1H, H-6), 4.14 (dd, 1H, H-5), 3.85 (s, 3H, COOCH₃), 3.38 (s, 3H, C(2)-O-CH₃), 2.62 (dd, 1H, H-3_{eq}), 2.18 (s, 3H, CH₃-CO-O-(C-7)), 2.03 (s, 3H, CH₃-CO-O-(C4)), 1.89 (s, 3H, CH₃-CO-NH-), 1.78 (dd, 1H, H-3_{ax}) ppm.

$J_{7,6} = 2.0$, $J_{6,5} = 10.7$, $J_{5,4} = 10.3$, $J_{4,3eq} = 4.9$, $J_{4,3ax} = 12.0$, $J_{3eq,3ax} = 12.7$ Hz.

7 Experimenteller Teil

^{13}C -NMR (100 MHz, $\text{MeOH-}d_4$): $\delta = 174.6$ (C-8), 174.2 ($\text{CH}_3\text{-CO-NH}$), 173.5 ($\text{CH}_3\text{-CO-O-}$ (C-7)), 172.8 ($\text{CH}_3\text{-CO-O-}$ (C-4)), 170.8 (C-1), 101.0 (C-2), 76.5 (C-6), 73.8 (C-7), 71.7 (C-4), 53.7 (COOCH_3), 53.2 (C(2)-O- CH_3), 52.0 (C-5), 39.5 (C-3), 23.5 ($\text{CH}_3\text{-CO-NH-}$), 21.9 ($\text{CH}_3\text{-CO-O-}$ (C7)), 21.6 ($\text{CH}_3\text{-CO-O-}$ (C4)) ppm.

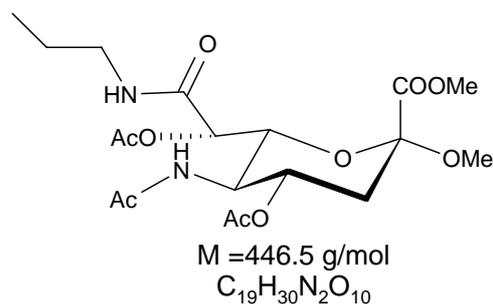
7.6.2.23 Versuch der Darstellung von Methyl-5-acetamido-4,7-O-diacetyl-3,5-didesoxy- α -D-galacto-oct-2-ulopyranosidarsäure-1-methylester-8-n-propylamid 38

Es wurden 62 mg (0.15 mmol) **37** in 5 mL DCM und 6 mL DMF gelöst. Zu dieser Lösung wurden dann bei 0 °C 47 mg (0.23 mmol) DCC und 1 mg (0.008 mmol) DMAP gegeben. Der Ansatz wurde 5 min durch Rühren vermengt und anschließend mit 25 μL (18 mg; 0.30 mmol) *n*-Propylamin versetzt. Nachdem für 30 min bei 0 °C gerührt wurde, wurde das Kühlbad entfernt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde das Produkt mittels Säulenchromatographie (Eluent: DCM/MeOH 8:1) gereinigt. Das Produkt **38** konnte nicht isoliert werden.

Charakterisierung:

farbloser Feststoff

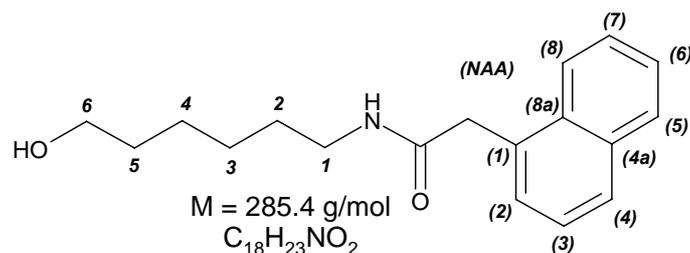
MALDI-TOF-MS: m/z (446.2) = 469.0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$,
485.0 $[\text{M}+\text{K}]^+$.



7.6.2.24 Darstellung von N-(6-Hydroxy-hexyl)-2-naphth-1-yl-acetamid 53

Für die nach **AAV 5** durchgeführte Reaktion wurden 500 mg (3.27 mmol) 6-Amino-hexan-1-ol x HCl und 0.620 mL (465 mg, 3.60 mmol) DIPEA in 6 mL DMF gelöst. Zu diesem Ansatz wurde eine Lösung, bestehend aus 0.670 g (3.60 mmol) Naphthalen-1-yl-essigsäure, 1.155 g (3.597 mmol) TBTU und 0.620 mL (465 mg, 3.60 mmol) DIPEA, gelöst in 6 mL DMF, gegeben. Nach Aufarbeitung wurde das Produkt säulenchromatographisch (Eluent: TCM:MeOH 20:1) gereinigt. Es wurden 918 mg (3.22 mmol) eines farblosen Feststoffes **53** erhalten. Das entspricht eine Ausbeute von 99% bezogen auf das eingesetzte 6-Amino-hexan-1-ol x HCl.

7 Experimenteller Teil



Charakterisierung:

farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 98 °C

R_F-Wert (TCM:MeOH 10:1): 0.11.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.97-7.94 (m, 1H, H-8(NAA)), 7.90-7.87 (m, 1H, H-5(NAA)), 7.85-7.82 (m, 1H, H-4(NAA)), 7.57-7.50 (m, 2H, H-7(NAA), H-6(NAA)), 7.48-7.44 (m, 1H, H-3(NAA)), 7.42-7.38 (m, 1H, H-2(NAA)), 4.02 (s, 2H, CH₂(NAA)), 3.52 (t, 2H, H-6), 3.12 (t, 2H, H-1), 1.45-1.37 (m, 2H, H-5), 1.33-1.16 (m, 4H, H-2, H-4), 1.11-1.01 (m, 2H, H-3) ppm.

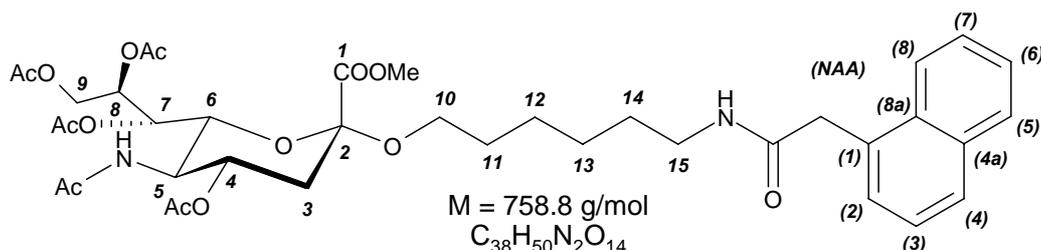
$J_{1,2} = 7.0$, $J_{5,6} = 6.5$ Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 171.2 (CO-NH), 134.4 (C-4a(NAA)), 132.5 (C-8a(NAA)), 131.6 (C-1(NAA)), 129.1 (C-5(NAA)), 128.9 (C-4(NAA)), 128.7 (C-2(NAA)), 127.2 (C-7(NAA)), 126.6 (C-6(NAA)), 126.0 (C-3(NAA)), 124.2 (C-8(NAA)), 62.9 (C-6), 42.2 (CH₂(NAA)), 39.6 (C-1), 32.8 (C-5), 29.6 (C-2), 26.6 (C-3), 25.6 (C-4) ppm.

7.6.2.25 Darstellung von Methyl-[(6-(2-napht-1-yl-acetylamino)-hexyl)-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy-α-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid]onat 57⁶⁹

Nach AAV 6 wurden 400 mg (1.25 mmol) 53 in 10 mL DCM mit 687 mg (2.49 mmol) Silbercarbonat und 317 mg (0.622 mmol) 12 vier Tage lang umgesetzt. Nach Aufarbeitung wurde der Feststoff säulenchromatographisch gereinigt (Eluent: I: EE, II: TCM:MeOH 40:1). Nach der Entfernung des Lösungsmittels wurden 54 mg eines farblosen Feststoffes 57 erhalten, der geringe Verunreinigungen enthielt und direkt für die nächste Reaktion bereitgestellt wurde.

7 Experimenteller Teil



Charakterisierung:

farbloser Feststoff

R_f -Wert (TCM:MeOH 10:1): 0.46.

MALDI-TOF-MS: m/z (758.3) = 759.2 ($M+H^+$), 781.3 ($M+Na^+$), 797.2 ($M+K^+$).

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7.99$ - 7.93 (m, 1H, H-8(NAA)), 7.91 - 7.86 (m, 1H, H-5(NAA)), 7.85 - 7.80 (m, 1H, H-4(NAA)), 7.58 - 7.49 (m, 2H, H-7(NAA), H-6(NAA)), 7.49 - 7.42 (m, 1H, H-3(NAA)), 7.42 - 7.39 (m, 1H, H-2(NAA)), 5.38 - 5.33 (m, 1H, H-8), 5.30 (dd, 1H, H-7), 4.87 - 4.79 (m, 1H, H-4), 4.29 (dd, 1H, H-9a), 4.13 - 4.02 (m, 3H, H-6, H-9b, H-5), 4.02 (s, 2H, CH_2 (NAA)), 3.77 (s, 3H, $COOCH_3$), 3.70 - 3.64 (m, 1H, H-10a), 3.17 - 3.08 (m, 3H, H-10b, H-15), 2.55 (dd, 1H, H-3_{eq}), 2.13 , 2.12 , 2.02 , 2.00 (4xs, 12H, CH_3 -CO-O-), 1.88 (s, 3H, CH_3 -CO-NH), 1.95 - 1.89 (m, 1H, H-3_{ax}), 1.44 - 1.36 (m, 2H, H-11), 1.33 - 1.23 (m, 2H, H-14), 1.23 - 1.14 (m, 2H, H-12), 1.11 - 1.02 (m, 2H, H-13) ppm.

$J_{9a,9b} = 12.5$, $J_{9a,8} = 2.6$, $J_{8,7} = 8.3$, $J_{7,6} = 1.8$, $J_{4,3eq} = 4.6$, $J_{3ax,3eq} = 12.7$ Hz.

^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 129.4$ (C-5(NAA)), 129.0 (C-4(NAA)), 128.8 (C-2(NAA)), 127.1 , 126.8 (C-7(NAA), C-6(NAA)), 126.1 (C-3(NAA)), 124.4 (C-8(NAA)), 72.8 (C-6), 69.5 (C-4), 68.9 (C-8), 67.8 (C-7), 65.2 (C-10), 62.8 (C-9), 53.1 ($COOCH_3$), 49.9 (C-5), 42.8 (CH_2 (NAA)), 40.1 (C-15), 38.5 (C-3), 29.7 (2C, C-11, C-14), 26.7 (C-13), 25.8 (C-12), 23.6 (CH_3 -CO-NH), 22.0 , 21.5 , 21.4 , 21.2 (4C, CH_3 -CO-O) ppm. (Quartäre C-Atome wurden unter diesen Messbedingungen nicht erfasst.)

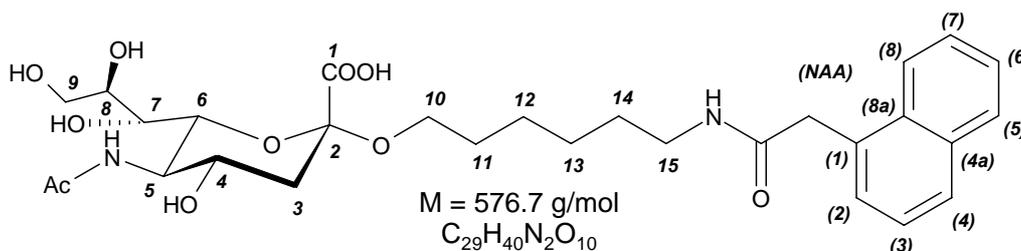
7.6.2.26 Darstellung von Methyl-[(6-(2-naphth-1-yl-acetylamino)-hexyl)-5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid]onat 59

Nach AAV **1** wurden 38 mg des Rohproduktes **57** in 6 mL MeOH deacetyliert. Das Produkt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Eluent: TCM:MeOH 4:1). Nach der Entfernung des Lösungsmittels wurden 18 mg (0.031 mmol) eines farblosen Feststoffes **59** erhalten. Dies entspricht einer Gesamtausbeute von 7% über zwei Stufen, bezogen auf das Edukt **12**.

7 Experimenteller Teil

7.6.2.27 Darstellung von (6-(2-Naphth-1-yl-acetylamino)-hexyl)-5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosidonsäure 43

Nach AAV 4 wurden 20 mg (0.039 mmol) 59 mit 0.1 M NaOH verseift. Das Rohprodukt wurde durch Gelpermeationschromatographie gereinigt. Es wurden 15 mg (0.026) eines farblosen Feststoffes 43 erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 77%.



Charakterisierung:

farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 150 °C (Zersetzung)

R_f-Wert (Isopropanol): 0.26

R_t-Wert (Methode 2): 14.11 min (95%)

[α]_D²⁵ = +3° (c = 0.13, H₂O)

MALDI-TOF-MS: m/z (576.3) = (M+H⁺), 599.2 (M+Na⁺), 615.2 (M+K⁺).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ = 7.99-7.84 (m, 3H, H-5(NAA), H-8(NAA), H-4(NAA)), 7.62-7.53 (m, 2H, H-7(NAA), H-6(NAA)), 7.52-7.47 (m, 1H, H-3(NAA)), 7.47-7.43 (m, 1H, H-2(NAA)), 4.03 (s, 2H, CH₂(NAA)), 3.85-3.72 (m, 3H, H-8, H-9a, H-5), 3.66-3.52 (m, 5H, H-6, H-4, H-10a, H-9b, H-7), 3.37-3.30 (m, 1H, H-10b), 3.01 (t, 2H, H-15), 2.69 (dd, 1H, H-3_{eq}), 1.99 (s, 3H, CH₃-CO-NH), 1.58 (dd, 1H, H-3_{ax}), 1.41-1.29 (m, 4H, H-11, H-14), 1.18-1.00 (m, 4H, H-12, H-13) ppm.

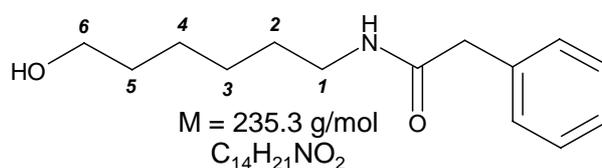
$J_{4,3eq} = 4.7$, $J_{4,3ax} = 12.1$, $J_{3eq,3ax} = 12.7$, $J_{15,14} = 6.5$ Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O): δ = 176.6 (CH₃-CO-NH), 176.0 (CO-CH₂(NAA)), 175.1 (C-1), 135.1 (C-4a(NAA)), 132.6 (C-8a(NAA)), 130.4 (C-5(NAA)), 130.2 (C-2(NAA)), 130.1 (C-1(NAA)), 129.8 (C-4(NAA)), 128.3 (C-7(NAA)), 127.9 (C-6(NAA)), 127.4 (C-3(NAA)), 124.9 (C-8(NAA)), 102.2 (C-2), 74.2 (C-6), 73.4 (C-8), 69.8 (C-4), 69.7 (C-7), 66.5 (C-10), 64.1 (C-9), 53.4 (C-5), 42.0 (C-3), 41.8 (CH₂(NAA)), 40.9 (C-15), 30.4 (C-11), 29.6 (C-14), 27.1 (C-13), 26.3 (C-12), 23.5 (CH₃-CO-NH) ppm.

7 Experimenteller Teil

7.6.2.28 Darstellung von *N*-(6-Hydroxy-hexyl)-phenyl-acetamid **54**

Für die nach **AAV 5** durchgeführte Reaktion wurden 200 mg (1.31 mmol) 6-Amino-hexan-1-ol x HCl und 0.248 mL (331 mg, 1.44 mmol) DIPEA in 5 mL DMF gelöst. Zu diesem Ansatz wurde eine Lösung, bestehend aus 196 mg (1.44 mmol) Phenylelessigsäure, 462 mg (1.44 mmol) TBTU und 0.248 mL (331 mg, 1.44 mmol) DIPEA, gelöst in 5 mL DMF, gegeben. Nach Aufarbeitung und Reinigung wurden 300 mg (1.28 mmol) eines farblosen Feststoffes **54** erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 97% bezogen auf das eingesetzte 6-Amino-hexan-1-ol x HCl.



Charakterisierung:

farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 73 °C

R_f-Wert (EE:MeOH 20:1): 0.33

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.38-7.32 (m, 2H, C₆H₅-meta), 7.32-7.27 (m, 1H, C₆H₅-para), 7.27-7.23 (m, 2H, C₆H₅-ortho), 5.51-5.39 (m, 1H, CO-NH), 3.6 (t, 2H, H-6), 3.57 (s, 2H, CH₂-C₆H₅), 3.24-3.16 (m, 2H, H-1), 1.56-1.48 (m, 2H, H-5), 1.46-1.39 (m, 2H, H-2), 1.37-1.29 (m, 2H, H-4), 1.29-1.21 (m, 2H, H-3) ppm.

$J_{5,6} = 6.3 \text{ Hz}$.

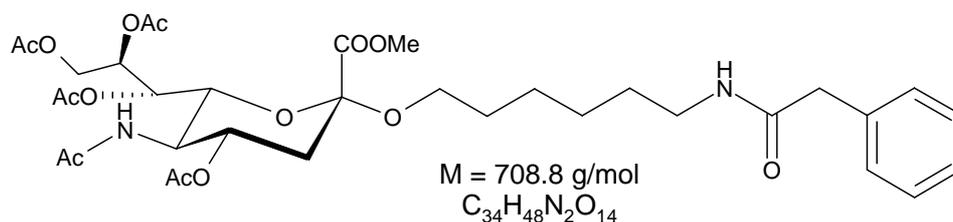
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 171.5 (CO-NH), 135.4 (C₆H₅-C(q)), 129.8 (2C, C₆H₅(C_{ortho})), 129.4 (2C, C₆H₅(C_{meta})), 127.7 (C₆H₅(C_{para})), 63.1 (C-6), 44.3 (CH₂-C₆H₅), 39.9 (C-1), 32.8 (C-5), 29.7 (C-2), 26.7 (C-3), 25.5 (C-4) ppm.

7.6.2.29 Darstellung von Methyl-[(6-phenylacetyl-amino-hexyl)-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy-α-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid]onat **58**⁶⁹

Nach **AAV 6** wurden 150 mg (0.637 mmol) **54** in 6 mL DCM mit 705 mg (2.55 mmol) Silbercarbonat und 390 mg (0.765 mmol) **12** vier Tage lang umgesetzt. Nach Aufarbeitung wurde der Feststoff säulenchromatographisch vorgereinigt (Eluent: I: DCM:MeOH 20:1, II: DCM:MeOH 30:1). Nach der Entfernung des Lösungsmittels wurden 100 mg eines

7 Experimenteller Teil

verunreinigten Feststoffes **58** erhalten, welcher direkt für die nächste Reaktion bereitgestellt wurde.



Charakterisierung:

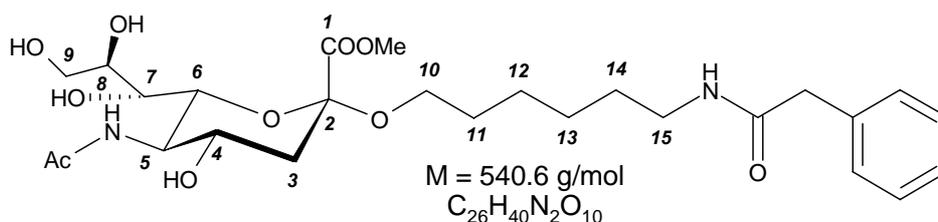
farbloser Feststoff

R_f-Wert (TCM:MeOH 10:1): 0.35

MALDI-TOF-MS: m/z (708.3) = 731.4 (M+Na⁺), 747.3 (M+K⁺).

7.6.2.30 Darstellung von Methyl-[(6-phenylacetamino-hexyl)-5-acetamido-3,5-dideoxy-α-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid]onate **60**

Nach AAV **1** wurden 95 mg des Rohproduktes **58** in 10 mL MeOH und mit einer Spatelspitze Molsieb 3 Å versetzt, deacetyliert. Das Produkt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Laufmittel: DCM:MeOH = 10:1). Nach der Entfernung des Lösungsmittels wurden 34 mg (0.063 mmol) eines farblosen Feststoffes **60** erhalten. Dies entspricht einer Gesamtausbeute von 9% über zwei Stufen, bezogen auf das Edukt **12**.



Charakterisierung:

farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 106 °C (Zersetzung)

R_f-Wert (TCM:MeOH 4:1): 0.17

[α]_D²⁵ = +6° (c = 0.1, MeOH)

MALDI-TOF-MS: m/z (540.3) = 463.4 (M+Na⁺), 479.4 (M+K⁺).

7 Experimenteller Teil

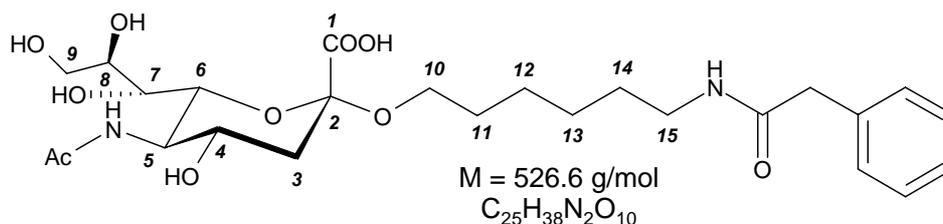
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{MeOH-}d_4$): $\delta = 7.36\text{-}7.29$ (m, 4H, $\text{C}_6\text{H}_{5\text{meta}}$, $\text{C}_6\text{H}_{5\text{ortho}}$), $7.28\text{-}7.24$ (m, H-1, $\text{C}_6\text{H}_{5\text{para}}$), $3.90\text{-}3.84$ (m, 5H, H-8, H-9a, COOCH_3), $3.83\text{-}3.75$ (m, 2H, H-10a, H-5), $3.69\text{-}3.63$ (m, 2H, H-9b, H-4), 3.58 (dd, 1H, H-6), 3.54 (dd, 1H, H-7), 3.51 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$), $3.41\text{-}3.36$ (m, 1H, H-10b), 3.19 (t, 2H, H-15), 2.70 (dd, 1H, H-3_{eq}), 2.03 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-CO-NH}$), 1.75 (dd, 1H, H-3_{ax}), $1.58\text{-}1.47$ (m, 4H, H-11, H-14), $1.42\text{-}1.28$ (m, 4H, H-12, H-13) ppm.

$J_{8,7} = 8.8$, $J_{7,6} = 1.7$, $J_{6,5} = 10.4$, $J_{4,3\text{eq}} = 4.6$, $J_{4,3\text{ax}} = 12.0$, $J_{3\text{ax},3\text{eq}} = 12.7$, $J_{14,15} = 7.0$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{MeOH-}d_4$): $\delta = 176.2$ ($\text{CH}_3\text{-CO-NH}$), 175.0 ($\text{CO-CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$), 172.1 (C-1), 138.1 (C(q) C_6H_5), 130.9 ($\text{C}_6\text{H}_{5\text{ortho}}$), 130.4 ($\text{C}_6\text{H}_{5\text{meta}}$), 128.7 ($\text{C}_6\text{H}_{5\text{para}}$), 101.1 (C-2), 75.8 (C-6), 73.5 (C-8), 71.1 (C-7), 69.5 (C-4), 66.0 (C-10), 65.6 (C-9), 54.8 (C-5), 54.2 (COOCH_3), 44.8 ($\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2$), 42.7 (C-3), 41.4 (C-15), 31.5 (C-11), 31.1 (C-14), 28.5 (C-13), 27.6 (C-12), 23.5 ($\text{CH}_3\text{-CO-NH}$) ppm.

7.6.2.31 Darstellung von (6-Phenylacetyl-amino-hexyl)-5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosidonsäure 44

Nach AAV 4 wurden 15 mg (0.028 mmol) 60 mit 0.1 M NaOH verseift. Das Rohprodukt wurde durch Gelpermeationschromatographie gereinigt. Es wurden 14 mg (0.027) 44 erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 96%.



Charakterisierung:

farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: $158.7\text{ }^\circ\text{C}$ (Zersetzung)

R_f -Wert (Isopropanol: H_2O :AcOH 40:10:1): 0.68

R_t -Wert (Methode 2): 10.88 min (97%)

$[\alpha]_D^{25} = -6^\circ$ (c = 0.13, H_2O)

MALDI-TOF-MS: m/z (526.3) = 549.4 ($\text{M}+\text{Na}^+$), 565.5 ($\text{M}+\text{K}^+$).

7 Experimenteller Teil

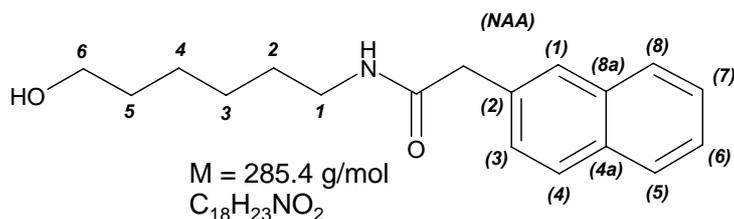
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): $\delta = 7.40\text{-}7.25$ (m, 5H, C_6H_5), 3.85-3.79 (m, 2H, H-8, H-9b), 3.76 (dd, 1H, H-5), 3.70-3.57 (m, 4H, H-10a, H-4, H-6, H-9b), 3.56-3.52 (m, 3H, H-7, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2$), 3.42-3.35 (m, 1H, H-10b), 3.13 (t, 2H, H-15), 2.69 (dd, 1H, H-3_{eq}), 1.99 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-CO-NH}$), 1.59 (dd, 1H, H-3_{ax}), 1.52-1.39 (m, 4H, H-11, H-14), 1.31-1.16 (m, 4H, H-12, H-13) ppm.

$J_{6,5} = 10.1$, $J_{5,4} = 10.1$, $J_{4,3\text{eq}} = 4.7$, $J_{4,3\text{ax}} = 12.0$, $J_{3\text{ax},3\text{eq}} = 12.5$, $J_{14,15} = 6.8$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, D_2O): $\delta = 176.6$ ($\text{CH}_3\text{-CO-NH}$), 176.1 ($\text{CO-CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$), 175.2 (C-1), 136.9 (C(q) C_6H_5), 130.5, 130.4 (4C, $\text{C}_6\text{H}_5\text{meta}$, $\text{C}_6\text{H}_5\text{ortho}$), 128.8 ($\text{C}_6\text{H}_5\text{para}$), 102.2 (C-2), 74.1 (C-4), 73.3 (C-8), 69.8 (C-7), 69.7 (C-6), 66.5 (C-10), 64.1 (C-9), 53.5 (C-5), 44.0 ($\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2$), 42.0 (C-3), 40.9 (C-15), 30.4 (C-11), 29.6 (C-14), 27.2 (C-13), 26.3 (C-12), 23.5 ($\text{CH}_3\text{-CO-NH}$) ppm.

7.6.2.32 Darstellung von *N*-(6-Hydroxy-hexyl)-2-napht-2-yl-acetamid **55**

Für die nach **AAV 5** durchgeführte Reaktion wurden 200 mg (1.31 mmol) 6-Amino-hexan-1-ol x HCl und 0.248 mL (331 mg, 1.44 mmol) DIPEA in 5 mL DMF gelöst. Zu diesem Ansatz wurde eine Lösung, bestehend aus 268 mg (1.44 mmol) Naphtalen-2-yl-essigsäure, 461.7 mg (1.44 mmol) TBTU und 0.248 mL (331 mg, 1.44 mmol) DIPEA, gelöst in 5 mL DMF, gegeben. Nach Aufarbeitung und Reinigung wurden 281 mg (0.99 mmol) eines farblosen Feststoffes **55** erhalten. Das entspricht einer Ausbeute von 75% bezogen auf das eingesetzte 6-Amino-hexan-1-ol x HCl.



Charakterisierung:

farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 111 °C

R_f -Wert (EE:MeOH 20:1): 0.33.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.88\text{-}7.79$ (m, 3H, H-8(NAA), H-5(NAA), H-4(NAA)), 7.74-7.69 (m, 1H, H-1(NAA)), 7.55-7.47 (m, 2H, H-7(NAA), H-6(NAA)), 7.39-7.35 (m, 1H,

7 Experimenteller Teil

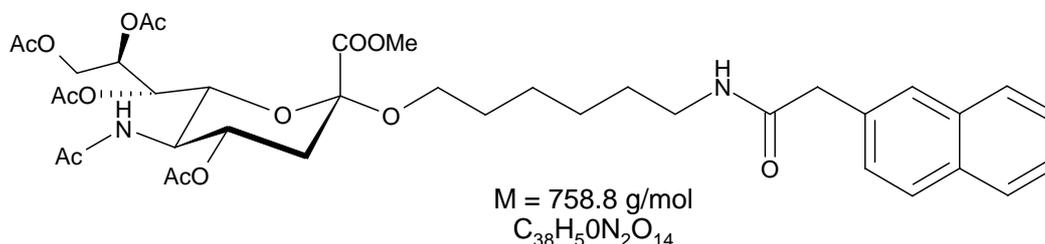
H-3(NAA)), 3.74 (s, 2H, CH₂(NAA)), 3.56 (t, 2H, H-6), 3.23-3.18 (m, 2H, H-1), 1.52-1.45 (m, 2H, H-5), 1.45-1.37 (m, 2H, H-2), 1.34-1.27 (m, 2H, H-4), 1.27-1.19 (m, 2H, H-3) ppm.

$J_{5,6} = 6.5$ Hz.

¹³C-NMR (125MHz, CDCl₃): $\delta = 171.3$ (CO-NH), 133.9 (C-8a(NAA)), 132.8 (C-2(NAA)), 132.8 (C-4a(NAA)), 129.2 (C-4(NAA)), 128.7 (C-1(NAA)), 128.1, 128.0 (C-8(NAA), C-5(NAA)), 127.7 (C-3(NAA)), 126.8 (C-7(NAA)), 126.5 (C-6(NAA)), 63.0 (C-6), 44.5 (CH₂(NAA)), 39.8 (C-1), 32.8 (C-5), 29.8 (C-2), 26.7 (C-3), 25.5 (C-4) ppm.

7.6.2.33 Darstellung von Methyl-[(6-(2-napht-2-yl-acetylamino)-hexyl)-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid]onat **61**⁶⁹

Nach AAV 6 wurden 150 mg (0.526 mmol) **55** in 10 mL DCM mit 610 mg (2.21 mmol) Silbercarbonat und 338 mg (0.663 mmol) **12** umgesetzt. Nach einer Reaktionsdauer von fünf Tagen wurde das Produkt aufgearbeitet und säulenchromatographisch (Eluent: TCM:MeOH 20:1) vorgereinigt. Es wurden 126 mg (0.166 mmol) eines Rohproduktes **61** erhalten. Dieses wurde direkt für die nächste Reaktion bereitgestellt.



Charakterisierung:

farbloser Feststoff

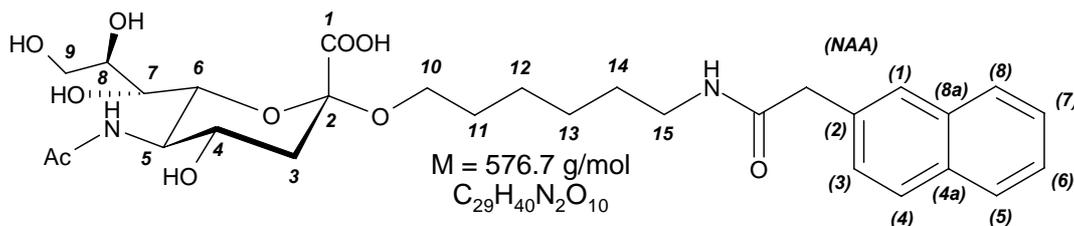
R_F-Wert (TCM:MeOH 10:1): 0.36.

MALDI-TOF-MS: m/z (758.3) = (759.7 (M+H⁺), 781.7 (M+Na⁺)).

7.6.2.34 Darstellung von (6-(2-Napht-2-yl-acetylamino)-hexyl)-5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosidonsäure **45**

Es wurden 126 mg des Rohproduktes **61** in 5 mL MeOH gelöst und nach AAV 4 mit 10 mL 0.1 M NaOH verseift. Der Rückstand wurde anschließend dreimal durch Gelpermeationschromatographie gereinigt. Es wurden 10.2 mg (0.0177 mmol) **45** erhalten. Dies entspricht einer Gesamtausbeute von 3% über zwei Stufen, bezogen auf das Edukt **12**.

7 Experimenteller Teil



Charakterisierung:

farbloser Feststoff

R_F-Wert (Isopropanol:H₂O:AcOH 40:10:1): 0.61

R_t-Wert (Methode 3): 28.40 min (96%)

[α]_D²⁷ = +1° (c = 0.39, H₂O)

MALDI-TOF-MS: m/z (576.3) = 599.3 (M+Na⁺), 621.4 (M+K⁺).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ = 7.94-7.86 (m, 3H, H-8(NAA), H-5(NAA), H-4(NAA)), 7.80-7.77 (m, 1H, H-1(NAA)), 7.58-7.50 (m, 2H, H-6(NAA), H-7(NAA)), 7.45-7.40 (m, 1H, H-3(NAA)), 3.86-3.80 (m, 2H, H-8, H-9a), 3.80-3.73 (m, 1H, H-5), 3.71 (s, 2H, CH₂(NAA)), 3.67-3.57 (m, 4H, H-10a, H-4, H-6, H-9b), 3.55 (dd, 1H, H-7), 3.38-3.32 (m, 1H, H-10b), 3.15 (t, 2H, H-15), 3.70 (dd, 1H, H-3_{eq}), 2.00 (s, 3H, CH₃-CO-NH), 1.59 (dd, 1H, H-3_{ax}), 1.50-1.35 (m, 4H, H-11, H-14), 1.27-1.14 (m, 4H, H-12, H-13) ppm.

$J_{8,7} = 8.9$, $J_{7,6} = 1.6$, $J_{4,3eq} = 4.9$, $J_{3eq,3ax} = 12.4$, $J_{14,15} = 6.7$ Hz.

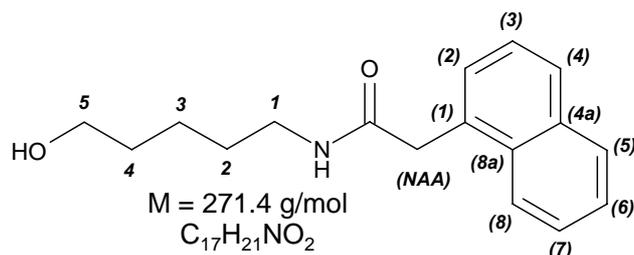
¹³C-NMR (100 MHz, D₂O): δ = 176.6 (CH₃-CO-NH), 176.0 (CO-CH₂-(NAA)), 175.2 (C-1), 134.7, 134.6 (C-2(NAA), C-8a(NAA)), 133.7 (C-4a(NAA)), 130.0 (C-4(NAA)), 129.2, 129.1, 129.1 (C-8(NAA), C-5(NAA), C-1(NAA)), 128.7 (C-3(NAA)), 128.1 (C-7(NAA)), 128.7 (C-6(NAA)), 102.2 (C-2), 74.1 (C-6), 73.3 (C-8), 69.9, 69.7 (C-4, C-7), 66.4 (C-10), 64.1 (C-9), 53.4 (C-5), 44.3 (CH₂(NAA)), 42.2 (C-3), 41.1 (C-15), 30.4 (C-11), 29.6 (C-14), 27.1 (C-13), 26.3 (C-12), 23.5 (CH₃-CO-NH) ppm

7.6.2.35 Darstellung von *N*-(5-Hydroxy-pentyl)-2-naphth-1-yl-acetamid **56**

Für die nach **AAV 5** durchgeführte Reaktion wurden 200 mg (1.94 mmol) 5-Amino-pentan-1-ol in 5 mL DMF gelöst. Zu diesem Ansatz wurde eine Lösung, bestehend aus 379 mg (2.13 mmol) Naphthalen-1-yl-essigsäure, 684 mg (2.13 mmol) TBTU und 0.367 mL (275 mg, 2.13 mmol) DIPEA, gelöst in 5 mL DMF, gegeben. Nach Aufarbeitung und Reinigung wurden 462 mg (1.70 mmol) eines farblosen Feststoffes **56** erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von

7 Experimenteller Teil

88% bezogen auf das eingesetzte 5-Amino-pentan-1-ol.



Charakterisierung:

farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 98 °C

R_f-Wert (EE:MeOH 20:1): 0.31.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.10-8.02 (m, 1H, H-8(NAA)), 7.93-7.88 (m, 1H, H-5(NAA)), 7.86-7.80 (m, 1H, H-4(NAA)), 7.59-7.48 (m, 2H, H-7(NAA), H-6(NAA)), 7.48-7.42 (m, 2H, H-3(NAA), H-2(NAA)), 4.00 (s, 2H, CH₂(NAA)), 3.51 (t, 2H, H-5), 3.21 (t, 2H, H-1), 1.56-1.46 (m, 4H, H-4, H-2), 1.37-1.28 (m, 2H, H-3) ppm.

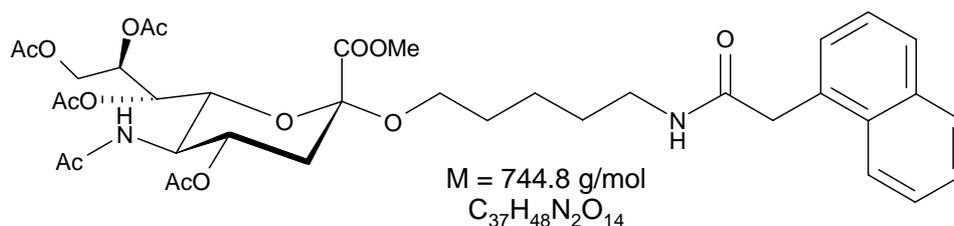
$J_{5,4} = 7.0$ Hz, $J_{2,1} = 6.6$ Hz

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 174.8 (CO-NH), 136.3 (C-4a(NAA)), 134.5 (C-8a(NAA)), 133.9 (C-1(NAA)), 130.6 (C-5(NAA)), 130.0 (C-4(NAA)), 129.8 (C-2(NAA)), 128.1 (C-7(NAA)), 127.7 (C-6(NAA)), 127.5 (C-3(NAA)), 125.7 (C-8(NAA)), 63.7 (C-5), 42.4 (CH₂(NAA)), 41.4 (C-1), 34.0 (C-4), 31.0 (C-2), 25.0 (C-3) ppm.

7.6.2.36 Darstellung von Methyl-[(6-(2-Naphth-1-yl-acetylamino)-pentyl)-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy-α-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid]onat **62**⁶⁹

Nach AAV **6** wurden zu 150 mg (0.553 mmol) **56** in 10 mL DCM 610 mg (2.21 mmol) Silbercarbonat sowie 338 mg (0.663 mmol) **12** gegeben und 5 Tage lang gerührt. Nach der Aufarbeitung wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (Eluent TCM:MeOH 20:1) gereinigt. Nach der Entfernung des Lösungsmittels wurden 131 mg eines farblosen Rohproduktes **62** erhalten, welches direkt für die nächste Reaktion bereitgestellt wurde.

7 Experimenteller Teil



Charakterisierung:

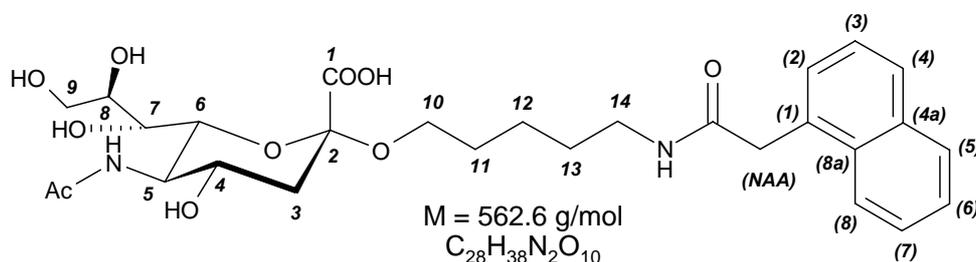
farbloser Feststoff

R_F-Wert (TCM:MeOH 10:1): 0.38.

MALDI-TOF-MS: m/z (744.3) = 745.8 (M+H⁺), 767.8 (M+Na⁺), 783.8 (M+K⁺).

7.6.2.37 Darstellung von (6-(2-Naphth-1-yl-acetylamino)-pentyl)-5-acetamido-3,5-dideoxy-α-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosidonsäure **46**

Es wurden 126 mg des Rohproduktes **62** in 5 mL MeOH gelöst und nach **AAV 4** mit 10 mL 0.1 M NaOH verseift. Der Rückstand wurde anschließend viermal durch Gelpermeationschromatographie gereinigt. Es wurden 9.3 mg (0.017 mmol) **46** erhalten. Dies entspricht einer Gesamtausbeute von 3% über zwei Stufen, bezogen auf das Edukt **12**.



Charakterisierung:

farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 98°C (Zersetzung)

R_F-Wert (Isopropanol:H₂O:AcOH 40:10:1): 0.59.

R_t-Wert (Methode 3): 23.97 min (93%)

[α]_D²⁵ = -2° (c = 0.11, H₂O)

MALDI-TOF-MS: m/z (562.3) = 563.3 (M+H⁺), 585.4 (M+Na⁺), 601.4 (M+K⁺).

¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 8.01-7.88 (m, 3H, H-5(NAA), H-8(NAA), H-4(NAA)), 7.65-7.56 (m, 2H, H-7(NAA), H-6(NAA)), 7.54-7.49 (m, 1H, H-3(NAA)), 7.49-7.44 (m, 1H, H-2(NAA)), 4.05 (s, 2H, CH₂(NAA)), 3.85-3.79 (m, 2H, H-8, H-9a), 3.77 (dd, 1H, H-5), 3.67-3.57 (m, 4H, H-6, H-4, H-9b, H-10a), 3.56 (dd, 1H, H-7), 3.34-3.27 (m, 1H, H-10b),

7 Experimenteller Teil

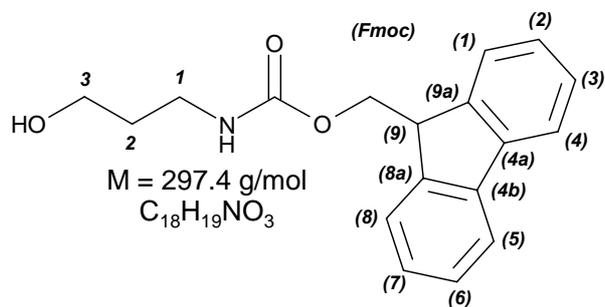
3.12 (t, 2H, H-14), 2.69 (dd, 1H, H-3_{eq}), 2.00 (s, 3H, CH₃-CO-NH), 1.58 (dd, 1H, H-3_{ax}), 1.44-1.33 (m, 4H, H-11, H-13), 1.15-1.06 (m, 2H, H-12) ppm.

$J_{8,7} = 8.9$, $J_{7,6} = 1.9$, $J_{6,5} = 10.0$, $J_{5,4} = 10.0$, $J_{4,3eq} = 4.8$, $J_{4,3ax} = 12.0$, $J_{3eq,3ax} = 12.5$, $J_{13,14} = 6.6$ Hz.

¹³C-NMR (500 MHz, D₂O): $\delta = 176.9$ (CH₃-CO-NH), 176.1 (CO-CH₂(NAA)), 175.1 (C-1), 129.7 (C-5(NAA)), 129.5 (C-2(NAA)), 129.1 (C-4(NAA)), 127.7 (C-7(NAA)), 127.3 (C-6(NAA)), 126.8 (C-3(NAA)), 127.3 (C-8(NAA)), 102.1 (C-2), 73.5 (C-6), 72.6 (C-8), 69.6 (C-4), 69.0 (C-7), 65.6 (C-10), 63.5 (C-9), 53.3 (C-5), 41.2 (C-3), 41.1 (CH₂(NAA)), 40.3 (C-14), 29.4 (C-11), 28.6 (C-13), 23.5 (CH₃-CO-NH), 23.5 (C-12) ppm. (Es konnten nicht alle quartären C-Atome erfasst werden.)

7.6.2.38 Darstellung von 3-N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-aminopropan-1-ol **69**^{76,77}

Abweichend von der Literaturvorschrift⁷⁷ wurden 0.50 mL (6.6 mmol) 3-Aminopropan-1-ol in 20 mL einer 10%iger Na₂CO₃-Lösung und 9 mL 1,4-Dioxan gelöst und auf 0 °C gekühlt. Die Lösung wurde tropfenweise mit 2.278 g (6.753 mmol) 9-Fluorenylmethyl-N-succimidylcarbonat, gelöst in 13.3 mL 1,4-Dioxan, versetzt. Es wurde 1 h bei 0 °C und weitere 20 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von halbkonzentrierter HCl wurde der erhaltene Feststoff filtriert und gefriergetrocknet. Nach säulenchromatographischer Reinigung über Kieselgel (Eluent: DCM:MeOH, 20:1) wurden 1.344 g (4.521 mmol) des Produktes **69** isoliert. Dies entspricht einer Ausbeute von 69 % bezogen auf das eingesetzte 3-Aminopropan-1-ol.



Charakterisierung:

farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 125.4 °C

R_f-Wert (EE): 0.56

7 Experimenteller Teil

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.80 - 7.75$ (m, 2H, H-4, H-5 (Fmoc)), 7.62-7.57 (m, 2H, H-1, H-8 (Fmoc)), 7.44-7.38 (m, 2 H, H-3, H-6 (Fmoc)), 7.35-7.29 (m, 2H, H-2, H-7 (Fmoc)), 5.05-4.95 (m, 1 H, NH), 4.44 (d, 2H, $-\text{CH}_2-$ (Fmoc)), 4.22 (t, 1 H, H-9 (Fmoc)), 3.71-3.57 (m, 2H, H-3), 3.41-3.32 (m, 2H, H-1), 1.76-1.66 (m, 2H, H-2) ppm.

$J_{\text{-CH}_2-, \text{H}_9 (\text{Fmoc})} = 6.7 \text{ Hz}$.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 157.5$ (CO-NH), 144.0 (C-8a, C-9a(Fmoc)), 141.7 (C-4a, C-4b (Fmoc)), 128.1 (C-3, C-6(Fmoc)), 127.4 (C-2, C-7(Fmoc)), 125.3 (C-1, C-8(Fmoc)), 120.3 (C-4, C-5(Fmoc)), 67.1 (CH_2 (Fmoc)), 59.9 (C-3), 47.6 (C-9(Fmoc)), 38.0 (C-1), 32.98 (C-2) ppm.

7.6.2.39 Darstellung von Benzyl-(5-acetamido-2,4,7,8,9-penta-O-acetyl-3,5-dideoxy- β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid)onat 72

Für die Synthese von 72⁷⁹ wurde nach einer Vorschrift nach Ogura *et. al.*⁷⁸ zur Umsetzung des ähnlichen 3-Desoxy-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosonsäure (KDN) gearbeitet. Es wurden 2.99 g (9.68 mmol) Sialinsäure 9 unter Zusatz von 150 mg (1.23 mmol) DMAP in 39 mL Pyridin gelöst und mit 39 mL Essigsäureanhydrid bei 0 °C für 44 h gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit 200 mL TCM verdünnt und bei 0 °C drei Mal mit halbkonzentrierter HCl gewaschen. Die wässrige Phase wurde anschließend sukzessiv mit konzentrierter HCl angesäuert und mit TCM extrahiert, bis kein Produkt mehr in der wässrigen Phase vorlag. Die gesammelten organischen Phase wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das organische Reaktionsprodukt wurde drei Mal mit Toluol coevaporiert.

Der farblose, schaumige Feststoff 71 wurde anschließend in 7 mL DMF gelöst und mit 1.62 g (4.97 mmol) Cäsiumcarbonat, gelöst in 7 mL Wasser, versetzt. Das Lösungsmittel wurde anschließend im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 22 mL DMF aufgenommen und mit 1.25 mL (10.5 mmol) Benzylbromid versetzt. Die Lösung wurde für 16 h gerührt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (Eluent: EE). Es wurden 2.09 g (3.43 mmol) eines farblosen Schaums 72 isoliert. Dies entspricht einer Ausbeute von 36 % bezogen auf die eingesetzte Menge von 9.

7 Experimenteller Teil

Charakterisierung:

farbloser Feststoff

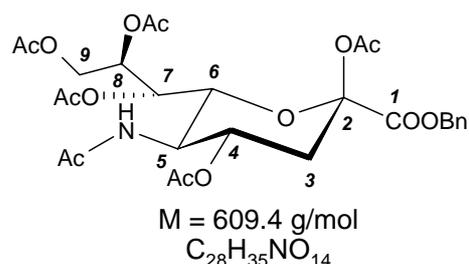
Schmelzpunkt: 87 °C

R_f-Wert (EE): 0.39

[α]_D²⁵ = -23° (c = 0.28, TCM)

MALDI-TOF-MS: m/z (609.2) = 632.4 (M+Na⁺),

648.4 (M+K⁺).



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= 7.41-7.30 (m, 5H, C₆H₅-), 5.37 (dd, 1H, H-7), 5.31-5.14 (m, 3H, H-4, CH_{2a,b}-C₆H₅), 5.09 (ddd, 1H, H-8), 4.44 (dd, 1H, H-9a), 4.20-4.05 (m, 3H, H-6, H-9b, H-5), 2.55 (dd, 1H, H-3_{eq}), 2.14-2.09 (m, 7H, 2 x CH₃-CO-O, H-3_{ax}), 2.03-2.01 (m, 9H, 3 x CH₃-CO-O), 1.89 (s, 3H, CH₃-CO-NH) ppm.

$J_{9a,9b} = 12.5$; $J_{9a,8} = 2.6$, $J_{9b,8} = 6.6$, $J_{8,7} = 5.3$, $J_{7,6} = 1.8$, $J_{4,3eq} = 5.0$, $J_{3a,3b} = 13.5$, $J_{CH2a,b-C6H5} = 12.2$ Hz.

¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃): δ= 171.3, 170.6, 170.6, 170.5, 168.6 (5C, CH₃-CO-O), 170.6 (CH₃-CO-NH), 165.9 (C-1), 135.3 (C₆H₅ (C(q))), 128.9, 128.8, 128.6 (5C, C₆H₅, H-C), 98.0 (C-2), 73.2 (C-6), 71.5 (C-8), 68.6 (C-4), 68.3 (CH₂-C₆H₅), 68.2 (C-7), 62.3 (C-9), 49.8 (C-5), 36.2 (C-3), 23.6 (CH₃-CO-NH-), 21.2, 21.2, 21.1, 21.1, 21.1 (5C, CH₃-CO-O) ppm.

7.6.2.40 Darstellung von Benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy-β-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid)onat chlorid **68**^{78,79}

Es wurden angelehnt an der literaturbekannten Vorschrift von Ogura *et. al.*⁷⁸ 2.08 g (3.41 mmol) **72** bei 0 °C in 30 mL Acetylchlorid gelöst und vorsichtig mit 0.6 mL MeOH versetzt. Der Kolben wurde verschlossen und die Reaktionslösung für 40 h gerührt. Nach einer DC-Kontrolle wurde die Reaktion durch Entfernung des Lösungsmittels beendet und das Produkt vier Mal mit Toluol coevaporiert. Es wurden 1.84 g (3.14 mmol) eines farblosen Feststoffs **68** isoliert. Das entspricht einer Ausbeute von 92%.

7 Experimenteller Teil

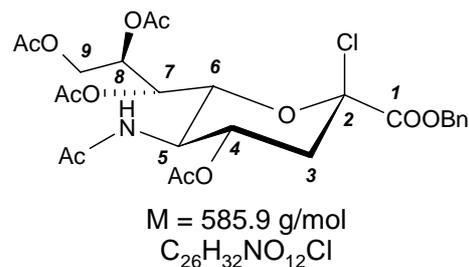
Charakterisierung:

farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 57 °C

R_f-Wert (EE): 0.39

[α]_D²⁵ = -7° (c = 0.26, TCM)



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= 7.46 -7.30 (m, 5H, C₆H₅-), 5.47 (dd, 1H, H-7), 5.44-5.31 (m, 2H, H-4, C₆H₅-CH_{2a}), 5.25-5.21 (m, 1H, C₆H₅-CH_{2b}), 5.18 (ddd, 1H, H-8), 4.35-4.33 (m, 2H, H-9a, H-6), 4.25-4.16 (m, 1H, H5), 4.08 (dd, 1H, H-9b), 2.78 (dd, 1H, H-3_{eq}), 2.29 (dd, 1H, H-3_{ax}), 2.12, 2.04, 2.03, 2.02, (s, 12H, CH₃-CO-O), 1.91 (s, 3H, CH₃-CO-NH) ppm.

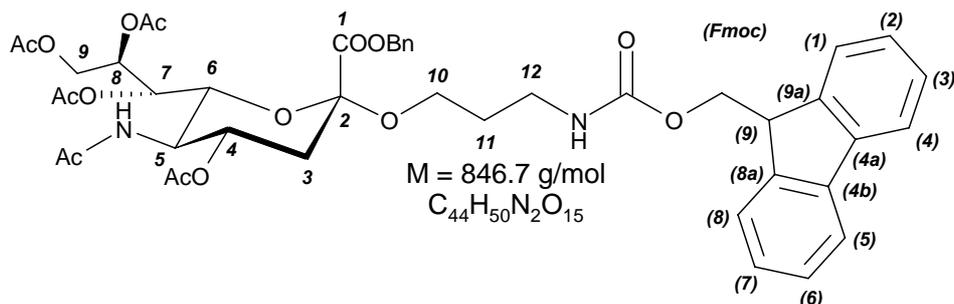
$J_{9a,9b} = 12.5$; $J_{9a,8} = 2.8$, $J_{9b,8} = 5.8$, $J_{8,7} = 7.1$, $J_{7,6} = 2.4$, $J_{6,5} = 10.8$, $J_{4,3eq} = 4.8$, $J_{3a,3b} = 13.8$,
 $J_{CH2a,b-C6H5} = 12.3$ Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ= 171.3, 170.6, 170.3, 169.9 (4C, CH₃-CO-O), 170.9 (CH₃-CO-NH), 165.1 (C-1), 135.0 (C₆H₅-(C(q))), 129.0, 128.9, 128.6 (5C, C₆H₅ (C-H)), 97.1 (C-2), 74.3 (C-6), 70.3 (C-8), 69.1 (C-4), 68.7 (C₆H₅-CH₂), 67.2 (C-7), 62.4 (C-9), 49.2 (C-5), 41.0 (C-3), 23.4 (CH₃-CO-NH), 21.2, 21.1, 21.1, 21.1 (4C, CH₃-CO-O-)ppm.

7.6.2.41 Darstellung von Benzyl-[[3-(9H-fluoren-9-ylmethoxy-carbonylamino)-propyl]-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-didesoxy-α-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid]onat **73**⁸⁰

Eine Suspension bestehend aus 0.405 g (1.36 mmol) **69**, 1.26 g trockenem Calciumsulfat (Drierite), 1.35g Molsieb 3 Å und 0.478 g (1.73 mmol) Silbercarbonat in 4.0 mL Toluol und 6.8 mL DCM wurde für 30 min bei -5 °C im Dunkeln gerührt und anschließend mit 0.052 g (0.23 mmol) Silberperchlorat in 2 mL Toluol versetzt. Die Lösung wurde 20 min ohne Eisbad gerührt und nach Zugabe von 0.801 g (1.36 mmol) **68** in 12.2 mL Toluol:DCM (1:1) für 60 h im Dunkeln gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit 40 mL DCM verdünnt und über Celite filtriert und mit gesättigter NaHCO₃-Lösung sowie zwei Mal mit Wasser gewaschen. Die wässrige Phase wurde zwei Mal mit DCM extrahiert, alle organischen Phasen vereinigt, über Na₂SO₄ getrocknet und unter vermindertem Druck zur Trockne eingengt. Es wurde versucht das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch zu reinigen (Eluent: PE:EE 2:1 bis PE:EE 1:2), wobei 0.537 g eines leicht verunreinigten Produkts **73** isoliert werden konnten. Dieses wurde direkt für die nächste Reaktion bereitgestellt.

7 Experimenteller Teil



Charakterisierung:

farbloser Feststoff

R_f-Wert (EE): 0.48

MALDI-TOF-MS: m/z (846.3) = 869.5 (M+Na⁺), 885.5 (M+K⁺).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= 7.79-7.73 (m, 2H, H-4, H-5 (Fmoc)), 7.63-7.58 (m, 2H, H-1, H-8 (Fmoc)), 7.43-7.28 (m, 9H, H-3 H-6 (Fmoc), C₆H₅-, H-2, H-7 (Fmoc)), 5.44-5.06 (m, 4H, H-8, H-7, C₆H₅-CH_{2a,b}), 4.88-4.79 (m, 1H, H-4), 4.46-4.29 (m, 3H, -CH₂-(Fmoc), H-9a), 4.26-4.17 (m, 1H, H-9 (Fmoc)), 4.16-3.97 (m, 3H, H-6, H-9b, H-5), 3.84-3.75 (m, 1H, H-10a), 3.29-3.09 (m, 3H, H-10b, H-12), 2.62 (dd, 1H, H-3_{eq}), 2.15, 2.12, (s, 6H, CH₃-CO-O), 2.05-1.81 (m, 10H, 2 x CH₃-CO-O, CH₃-CO-NH, H-3_{ax}), 1.74-1.66 (m, 2H, H-11) ppm.

$J_{4,3eq} = 4.4$, $J_{3ax,3eq} = 12.9$ Hz.

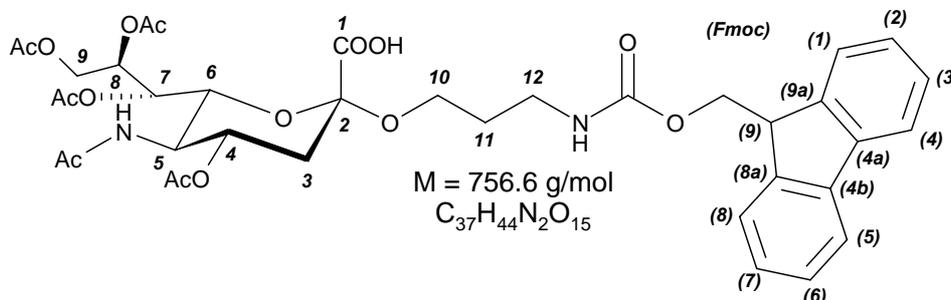
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ= 171.2, 171.1, 170.6, 170.6 (4C, CH₃-CO-O), 170.6 (CH₃-CO-NH), 168.2 (C-1), 144.4 (C-8a, C-9a(Fmoc)), 141.7 (C-4a, C-4b(Fmoc)), 129.2, 129.1, 128.9 (5C, C₆H₅ (H-C)), 128.0 (C-3, C-6 (Fmoc)), 127.4 (C-2, C-7 (Fmoc)), 125.5 (C-1, C-8 (Fmoc)), 120.3 (C-4, C-5 (Fmoc)), 99.1 (C-2), 73.0 (C-6), 69.3 (C-4), 68.9 (C-8), 68.1 (C₆H₅-CH₂), 67.6 (C-7), 66.9 (CH₂-(Fmoc)), 63.5 (C-10), 62.8 (C-9), 49.8 (C-5), 47.7 (C-9 (Fmoc)), 38.5 (C-12), 37.6 (C-3), 29.7 (C-11), 23.6 (CH₃-CO-NH), 21.5, 21.2, 21.2, 21.1 (4C, CH₃-CO-O) ppm. (Es konnten nicht alle quartären C-Atome erfasst werden.)

7.6.2.42 Darstellung von [3-(9H-Fluoren-9-ylmethoxy-carbonylamino)-propyl]-5-acetamido-2,4,7,8,9-penta-O-acetyl-3,5-dideoxy-α-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosidonsäure 67

Eine Lösung von 0.524 g (0.619 mmol) 73 in 15 mL MeOH wurden mit 10.4 mg Pd/C (10%) versetzt. Anschließend wurde unter Wasserstoffatmosphäre die Reaktionslösung 20 h gerührt, daraufhin filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene

7 Experimenteller Teil

Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Eluent: EE:MeOH 5:1). Es konnten 0.180 g (0.238 mmol) des Produkts **67** isoliert werden. Das entspricht einer Gesamtausbeute von 18 % über zwei Stufen, bezogen auf das Edukt **68**.



Charakterisierung:

farblos Feststoff

Schmelzpunkt: 129 °C

R_F-Wert (EE:MeOH (5:1)): 0.15

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -5^{\circ}$ (c = 0.12, H₂O)

MALDI-TOF-MS: m/z (756.3) = 779.3 (M+Na⁺).

¹H-NMR (400 MHz, MeOH-*d*₄): $\delta = 7.86\text{-}7.80$ (m, 2H, H-4, H-5 (Fmoc)), $7.71\text{-}7.65$ (m, 2H, H-1, H-8 (Fmoc)), $7.45\text{-}7.39$ (m, 2H, H-3, H-6 (Fmoc)), $7.39\text{-}7.32$ (m, 2H, H-2, H-4 (Fmoc)), 5.44 (ddd, 1H, H-8), 5.36 (dd, 1H, H-7), 4.97 (ddd, 1H, H-4), 4.49 (dd, 1H, H-6), 4.42 (dd, 1H, H-9a), 4.36 (d, 2H, -CH₂-(Fmoc)), 4.24 (t, 1H, H-9 (Fmoc)), $4.16\text{-}4.08$ (m, 1H, H-9b), 3.95 (dd, 1H, H-5), $3.89\text{-}3.81$ (m, 1H, H-10a), $3.57\text{-}3.48$ (m, 1H, H-10b), $3.30\text{-}3.22$ (m, 2H, H-12), 2.70 (dd, 1H, H-3_{eq}), $2.12, 2.11, 2.01, 1.99$ (s, 12H, CH₃-CO-O), 1.86 (s, 3H, CH₃-CO-NH) $1.81\text{-}1.68$ (m, 3H, H-10, H-3_{ax}) ppm.

$J_{9a,9b} = 12.3$; $J_{9a,8} = 2.5$, $J_{9b,8} = 6.0$, $J_{8,7} = 8.0$, $J_{7,6} = 2.0$, $J_{6,5} = 10.5$, $J_{5,4} = 10.5$, $J_{4,3eq} = 4.4$, $J_{4,3ax} = 12.2$, $J_{3a,3b} = 12.1$, $J_{\text{CH}_2\text{-H}_9(\text{Fmoc})} = 7.0$ Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOH-*d*₄): $\delta = 174.4$ (CH₃-CO-NH), 174.2 (C-1), $173.4, 172.9, 172.8, 172.6$ (4 x CH₃-CO-O), 159.6 (NH-CO-O), 146.3 (C-8a, C-9a(Fmoc)), 143.5 (C-4a, C-4b(Fmoc)), 129.7 (C-3, C-6 (Fmoc)), 129.0 (C-2, C-7 (Fmoc)), 127.2 (C-1, C-8 (Fmoc)), 121.9 (C-4, C-5 (Fmoc)), 102.1 (C-2), 73.8 (C-6), 72.5 (C-4), 71.2 (C-8), 70.1 (C-7), 67.9 (-CH₂-(Fmoc)), 64.6 (C-9), 64.4 (C-10), 51.6 (C-5), 48.9 (C-9 (Fmoc)), 40.7 (C-3), 40.2 (C-12), 31.9 (C-11), 23.5 (CH₃-CO-NH-), $22.2, 21.8, 21.7, 21.5$ (4C, CH₃-CO-O-) ppm.

7 Experimenteller Teil

7.6.2.43 Darstellung von 1-Naphtyloxyessigsäure (NOES) **86**⁸²

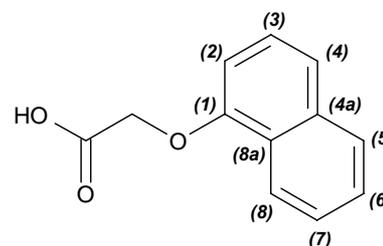
Es wurden 2.03 g (14.1 mmol) 1-Naphtol nach literaturbekannter Vorschrift⁸² zu 1.13 g (5.60 mmol) des Produkts **86** umgesetzt. Dies entspricht einer Ausbeute von 40%.

Charakterisierung:

farbloser Feststoff

R_F-Wert (Isopropanol:H₂O:AcOH 40:10:1): 0.67

Schmelzpunkt: 193 °C



M = 202.2 g/mol
C₁₂H₁₀O₃

¹H-NMR (400 MHz, MeOH-*d*₄): δ = 8.3-8.32 (m, 1H, H-8), 7.85-7.80 (m, 1H, H-5), 7.54-7.56 (m, 3H, H-6, H-7, H-4), 7.41-7.35 (m, 1H, H-3), 6.87-6.83 (m, 1H, H-2), 4.88 (s, 2H, CH₂) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOH-*d*₄): δ = 173.5 (COOH), 155.9 (C-1), 137.2 (C-4a), 129.3 (C-5), 128.4 (C-6), 127.8 (C-8a), 127.6 (C-3), 127.1 (C-7), 123.9 (C-8), 122.9 (C-4), 107.1 (C-2), 67.2 (CH₂) ppm.

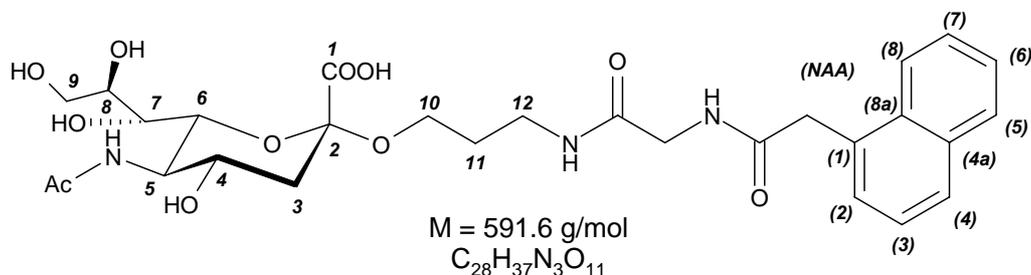
7.6.2.44 Darstellung von {3-[2-(2-Napht-1-yl-acetylamino)-acetylamino]-propyl}-5-acetamido-3,5-dideoxy-α-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosidonsäure **64**

Nach AAV 7 wurden 25 mg (33 μmol) **67** in 1.5 mL DCM mit 35 μL (200 μmol) DIPEA versetzt und über Nacht zu 67 mg 2-Chlortritylharzchlorid gegeben. Nach AAV 8 wurde eine Zweifachkupplung von je 4 h unter Verwendung folgender Substanzmengen je Kupplungsschritt durchgeführt:

Substanz	Äquivalente	N [μmol]	m [mg]
1. Fmoc-Gly-OH	4.1	136	40.4
2. NES	4.1	136	25.3
TBTU	5.2	170	54.6
DIPEA	5.2	170	22.0 (29.0 μL)

7 Experimenteller Teil

Die Abspaltung und Entschützung des Rohproduktes erfolgte nach **AAV 9**. Der erhaltene Feststoff wurde anschließend per HPLC nach **AAV 10** gereinigt. Es konnten 2.9 mg (4.9 μmol) eines farblosen Feststoffes **64** erhalten werden. Die entspricht einer Ausbeute von 15% bezogen auf **67**.



Charakterisierung:

farbloser Feststoff

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +14^{\circ}$ ($c = 0.10$, H_2O)

R_{t} -Wert (Methode 2): 11.25 min (96%)

MALDI-TOF-MS: m/z (591.2) = 614.4 ($\text{M}+\text{Na}^+$), 630.4 ($\text{M}+\text{K}^+$).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): $\delta = 8.02\text{-}7.95$ (m, 2H, H-5(NAA), H-8(NAA)), 7.95-7.90 (m, 1H, H-4(NAA)), 7.66-7.56 (m, 2H, H-7(NAA), H-6(NAA)), 7.56-7.49 (m, 2H, H-3(NAA), H-2(NAA)), 4.16 (s, 2H, $\text{CH}_2(\text{NAA})$), 3.87-3.75 (m, 5H, $\text{CH}_2(\text{Gly})$, H-9a, H-8, H-5), 3.72-3.63 (m, 3H, H-10a, H-4, H-6), 3.56 (dd, 1H, H-9b), 3.55 (dd, 1H, H-7), 3.44-3.38 (m, 1H, H-10b), 3.21-3.16 (m, 2H, H-12), 2.70 (dd, 1H, H-3_{eq}), 2.01 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-CO-NH}$), 1.69-1.58 (m, 3H, H-11, H-3_{ax}) ppm.

$J_{9a,9b} = 6.8 \text{ Hz}$, $J_{9b,8} = 12.5 \text{ Hz}$, $J_{8,7} = 8.9 \text{ Hz}$, $J_{7,6} = 1.8 \text{ Hz}$, $J_{4,3\text{eq}} = 4.8 \text{ Hz}$, $J_{3\text{eq},3\text{ax}} = 12.5 \text{ Hz}$.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, D_2O): $\delta = 176.7$ ($\text{CO-CH}_2(\text{NAA})$), 176.6 ($\text{CH}_3\text{-CO-NH}$), 175.2 (C-1), 172.7 ($\text{CO}(\text{Gly})$), 135.1 (C-4a(NAA)), 133.2 (C-8a(NAA)), 130.4 (C-5(NAA)), 130.2 (C-2(NAA)), 129.8 (C-4(NAA)), 128.4 (C-7(NAA)), 127.8 (C-6(NAA)), 127.5 (C-3(NAA)), 124.9 (C-8(NAA)), 102.2 (C-2), 74.1 (C-6), 73.3 (C-8), 69.8 (C-7), 69.8 (C-4), 64.2 (C-9), 63.6 (C-10), 53.4 (C-5), 44.3 ($\text{CH}_2(\text{Gly})$), 41.8 (C-3), 41.3 ($\text{CH}_2(\text{NAA})$), 38.0 (C-12), 30.0 (C-11), 23.5 ($\text{CH}_3\text{-CO-NH}$) ppm. (Es konnten nicht alle quartären C-Atome detektiert werden.)

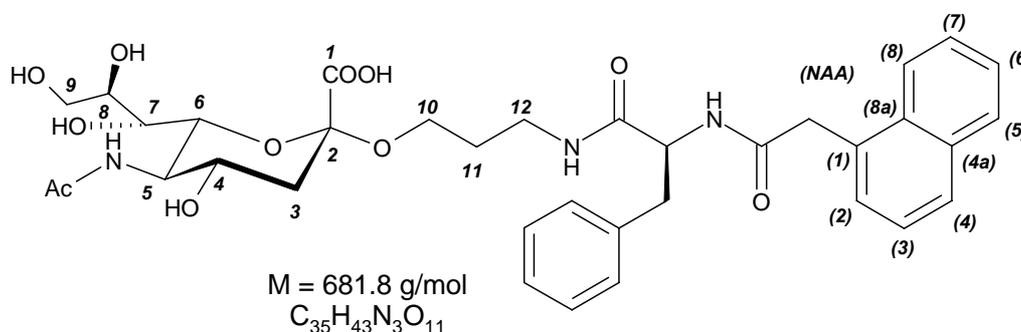
7 Experimenteller Teil

7.6.2.45 Darstellung von {3-[2(S)-(2-Napht-1-yl-acetylamino)-3-phenyl-propionylamino]-propyl}-5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosidonsäure **66**

Nach AAV 7 wurden 25 mg (33 μ mol) **67** in 1.5 mL DCM mit 35 μ L (200 μ mol) DIPEA versetzt und über Nacht zu 67 mg 2-Chlortritylchloridharz gegeben. Nach AAV 8 wurde eine Zweifachkupplung von je 4 h unter Verwendung folgender Substanzmengen je Kupplungsschritt durchgeführt:

Substanz	Äquivalente	N [mmol]	m [mg]
1. Fmoc-Phe-OH	4.1	135	52.3
2. NES	4.1	136	25.3
TBTU	5.2	170	54.6
DIPEA	5.2	170	22.0 (29.0 μ L)

Die Abspaltung und Entschützung des Rohproduktes erfolgte nach AAV 9. Der erhaltene Feststoff wurde anschließend per HPLC nach AAV 10 gereinigt. Es konnten 2.7 mg (4.0 μ mol) eines farblosen Feststoffes **66** erhalten werden. Die entspricht einer Ausbeute von 12% bezogen auf **67**.



Charakterisierung:

farbloser Feststoff

$[\alpha]_D^{25} = +41^\circ$ (c = 0.04, H₂O)

R_t-Wert (Methode 2): 16.40 min (99%)

MALDI-TOF-MS: m/z (681.3) = 704.3 (M+Na⁺), 720.3 (M+K⁺).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ = 8.01-7.96 (m, 1H, H-5(NAA)), 7.94-7.90 (m, 1H, H-4(NAA)), 7.79-7.76 (m, 1H, H-8(NAA)), 7.61-7.53 (m, 2H, H-6(NAA), H-7(NAA)), 7.53-7.47 (m, 1H, H-3(NAA)), 7.40-7.36 (m, 1H, H-2(NAA)), 7.27-7.21 (m, 3H, C₆H_{5para}(Phe), C₆H_{5meta}(Phe)), 7.10-7.05 (m, 2H, C₆H_{5ortho}(Phe)), 4.54 (dd, 1H, H- α (Phe)), 4.06 (s, 2H, CH₂(NAA)), 3.85-

7 Experimenteller Teil

3.76 (m, 3H, H-8, H-9a, H-5), 3.70-3.63 (m, 3H, H-6, H-4, H-10a), 3.63-3.59 (m, 1H, H-9b), 3.57 (dd, 1H, H-7), 3.31-3.18 (m, 2H, H-10b, H-12a), 3.15-3.09 (m, 1H, H-12b), 3.04 (dd, 1H, H- β a(Phe)), 2.92 (dd, 1H, H- β b(Phe)), 2.70 (dd, 1H, H-3_{eq}), 2.03 (s, 3H, CH₃-CO-NH), 1.67-1.53 (m, 3H, H-3_{ax}, H-11) ppm.

$J_{8,7} = 8.6$ Hz, $J_{7,6} = 1.8$ Hz, $J_{4,3eq} = 4.5$ Hz, $J_{3eq,3ax} = 12.6$ Hz, $J_{\alpha(\text{Phe}), \beta\text{a}(\text{Phe})} = 6.3$ Hz, $J_{\alpha(\text{Phe}), \beta\text{b}(\text{Phe})} = 8.4$ Hz, $J_{\beta\text{a}(\text{Phe}), \beta\text{b}(\text{Phe})} = 13.7$ Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O): $\delta = 176.4$ (CH₃-CO-NH), 175.4 (CO-CH₂-(NAA)), 174.9 (C-1), 137.3 (C(q)C₆H₅(Phe)), 129.87 (2 x C, C₆H_{5ortho}(Phe)), 129.54 (C-2(NAA)), 129.53 (C-5(NAA)), 129.10 (3 x C, C₆H_{5para}(Phe), C₆H_{5meta}(Phe)), 129.08 (C-4(NAA)), 128.17 (C-7(NAA)), 127.17 (C-6(NAA)), 126.80 (C-3(NAA)), 124.25 (C-8(NAA)), 101.9 (C-2), 73.49 (C-4), 72.55 (C-8), 69.38 (C-6), 69.05 (C-7), 63.65 (C-9), 62.84 (C-10), 56.24 (C- α (Phe)), 52.77 (C-5), 41.19 (C-3), 40.75 (CH₂(NAA)), 37.93 (C- β (Phe)), 37.81 (C-12), 29.39 (C-11), 23.52 (CH₃-CO-NH) ppm. (Es konnten nicht alle quartären C-Atome detektiert werden.)

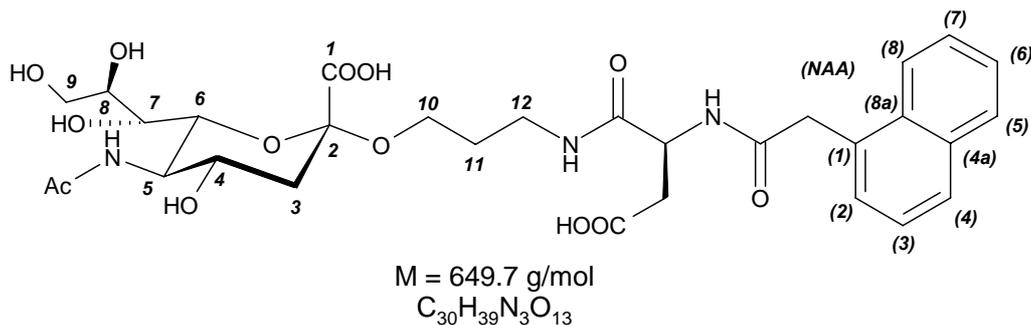
7.6.2.46 Darstellung von *{3-[3-Carboxy-2(S)-(2-napht-1-yl-acetylamino)-propionylamino]-propyl}-5-acetamido-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosidon-säure **65***

Nach **AAV 7** wurden 25 mg (33 μ mol) **67** gelöst in 1.5 mL DCM mit 35 μ L (200 μ mol) DIPEA versetzt und für 4 h zu 107 mg 2-Chlortritylchloridharz gegeben. Nach **AAV 8** wurde eine Zweifachkupplung (Fmoc-Asp-(OtBu)-OH zweimal 3 h, Naphtylelessigsäure (NES) einmal über Nacht, einmal 3 h) unter Verwendung folgender Substanzmengen je Kupplungsschritt durchgeführt:

Substanz	Äquivalente	N [mmol]	m [mg]
1. Fmoc-Asp(OtBu)-OH	4.1	136	56.0
2. NES	4.1	136	25.3
TBTU	5.2	170	54.6
DIPEA	5.2	170	22.0 (29.0 μ L)

Die Abspaltung und Entschützung des Rohproduktes erfolgte nach **AAV 9**. Der erhaltene Feststoff wurde anschließend per HPLC nach **AAV 10** gereinigt. Es konnten 1.24 mg (1.91 μ mol) eines farblosen Feststoffes **65** erhalten werden. Die entspricht einer Ausbeute von 6% ausgehend von **67**.

7 Experimenteller Teil



Charakterisierung:

farbloser Feststoff

$[\alpha]_D^{25} = +36^\circ$ (c = 0.054, H₂O)

R_t-Wert (Methode 2): 11.23 min (97%)

MALDI-TOF-MS: m/z (649.3) = 672.3 (M+Na⁺), 688.2 (M+K⁺).

¹H-NMR (700 MHz, D₂O): $\delta = 7.99-7.96$ (m, 1H, H-5(NAA)), 7.94-7.90 (m, 2H, H-8(NAA)), H-4(NAA)), 7.63-7.56 (m, 2H, H-7(NAA), H-6(NAA)), 7.54-7.50 (m, 1H, H-3(NAA)), 7.50-7.47 (m, 1H, H-2(NAA)), 4.67-4.63 (m, 1H, H- α (Asp)), 4.13 (s, 2H, CH₂(NAA)), 3.85-3.78 (m, 3H, H-8, H-9a, H-5), 3.71-3.64 (m, 3H, H-6, H-4, H-10a), 3.60 (dd, 1H, H-9b), 3.56-3.53 (m, 1H, H-7), 3.42-3.35 (m, 1H, H-10b), 3.22-3.12 (m, 2H, H-12), 2.83 (dd, 1H, H- β a(Asp)), 2.74 (dd, 1H, H- β b(Asp)), 2.68 (dd, 1H, H-3_{eq}), 2.01 (s, 3H, CH₃-CO-NH), 1.68-1.59 (m, 3H, H-3_{ax}, H-11) ppm.

$J_{9a,9b} = 12.0$, $J_{9b,8} = 6.1$, $J_{4,3eq} = 4.6$, $J_{3eq,3ax} = 12.6$, $J_{\alpha(Asp), \beta a(Asp)} = 5.4$, $J_{\alpha(Asp), \beta b(Asp)} = 7.8$,
 $J_{\beta a(Asp), \beta b(Asp)} = 16.9$ Hz.

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O): $\delta = 176.1$ (CH₃-CO-NH), 175.6 (CO-CH₂(NAA)), 174.9 (COOH(Asp)), 174.1 (C-1), 173.1 (CH-CO(Asp)), 129.8 (C-2(NAA)), 129.7 (C-5(NAA)), 129.2 (C-4(NAA)), 127.6 (C-7(NAA)), 127.0 (C-3(NAA)), 126.9 (C-6(NAA)), 124.5 (C-8(NAA)), 101.3 (C-2), 73.7 (C-6), 72.8 (C-8), 69.4 (C-7), 69.1 (C-4), 63.8 (C-9), 62.9 (C-10), 53.2 (C-5), 51.3 (C- α (Asp)), 42.3 (CH₂(NAA)), 41.2 (C-3), 37.7 (C-12), 36.6 (C- β (Asp)), 29.8 (C-11), 23.5 (CH₃-CO-NH) ppm. (Es konnten nicht alle quartären C-Atome detektiert werden.)

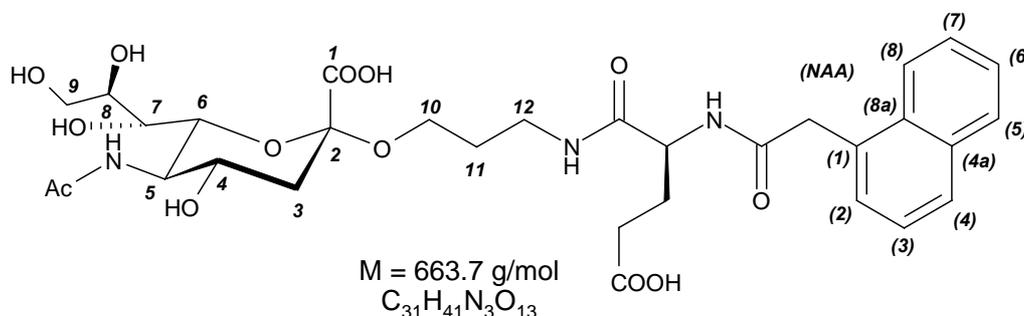
7 Experimenteller Teil

7.6.2.47 Darstellung von {3-[4-Carboxy-2(S)-(2-napht-1-yl-acetylamino)-butyrylamino]-propyl}-5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosidonsäure **81**

Nach AAV 7 wurden 25 mg (33 μ mol) **67** in 1.5 mL DCM mit 35 μ L (200 μ mol) DIPEA versetzt und für 3 h zu 67 mg 2-Chlortritylchloridharz gegeben. Nach AAV 8 wurden die einzelnen Kupplungsschritte (Fmoc-Glu(OtBu)-OH dreimal 3 h, Naphtylelessigsäure (NES) zweimal 3 h) unter Verwendung folgender Substanzmengen durchgeführt:

Substanz	Äquivalente	N [mmol]	m [mg]
1. Fmoc-Glu(OtBu)-OH	4.1	136	57.9
2. NES	4.1	136	25.3
TBTU	5.2	170	54.6
DIPEA	5.2	170	22.0 (29 μ L)

Das Harz wurde anschließend für 3 h mit Hydrazinhydrat:MeOH (1:4) geschüttelt, um die O-Acetyl-Schutzgruppen direkt zu entfernen. Anschließend erfolgte die Abspaltung des Rohproduktes mit HFIP:DCM 2:1 für 10 min. Der erhaltene Feststoff wurde nach AAV 10 mittels HPLC gereinigt. Es konnten 1.64 mg (2.47 μ mol) eines farblosen Feststoffes **81** erhalten werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 8% ausgehend von **67**.



Charakterisierung:

farbloser Feststoff

$[\alpha]_D^{25} = +15^\circ$ (c = 0.033, H₂O)

R_t-Wert (Methode 2): 11.63 min (97%)

MALDI-TOF-MS: m/z (363.3) = 686.5 (M+Na⁺), 702.6 (M+K⁺).

¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 8.03-7.93 (m, 3H, H-5(NAA), H-8(NAA), H-4(NAA)), 7.67-7.59 (m, 2H, H-7(NAA), H-6(NAA)), 7.58-7.54 (m, 1H, H-3(NAA)), 7.53-7.50 (m, 1H, H-2(NAA)), 4.31 (dd, 1H, H- α (Glu)), 4.17 (s, 2H, CH₂(NAA)), 3.88-3.79 (m, 3H, H-8, H-9a,

7 Experimenteller Teil

H-5), 3.74-3.60 (m, 4H, H-10a, H-6, H-4, H-9b), 3.59 (dd, 1H, H-7), 3.47-3.41 (m, 1H, H-10b), 3.27-3.15 (m, 2H, H-12), 2.73 (dd, 1H, H-3_{eq}), 2.35 (m, 2H, H-γ(Glu)), 2.11-2.03 (m, 4H, H-βa(Glu), CH₃-CO-NH), 1.97-1.88 (m, 1H, H-βb(Glu)), 1.71-1.62 (m, 3H, H-3_{ax}, H-11) ppm.

$J_{8,7} = 9.0$, $J_{7,6} = 1.5$, $J_{4,3eq} = 4.7$, $J_{3eq,3ax} = 12.5$.

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O): $\delta = 178.6$ (COOH(Glu)), 176.5 (CH₃-CO-NH), 176.2 (CO-CH₂(NAA)), 175.1 (C-1), 130.3 (C-2(NAA)), 130.0 (C-5(NAA)), 129.7 (C-4(NAA)), 128.3 (C-7(NAA)), 127.7 (C-6(NAA)), 127.4 (C-3(NAA)), 125.0 (C-8(NAA)), 74.1 (C-6), 73.2 (C-8), 69.8 (C-4), 69.6 (C-7), 64.0 (C-9), 63.6 (C-10), 54.9 (C-α(Glu)), 53.4 (C-5), 41.7 (C-3), 41.4 (CH₂(NAA)), 38.0 (C-12), 31.7 (C-γ(Glu)), 29.8 (C-11), 27.6 (C-β(Glu)), 23.5 (CH₃-CO-NH) ppm. (E konnten nicht alle quartären C-Atome detektiert werden.)

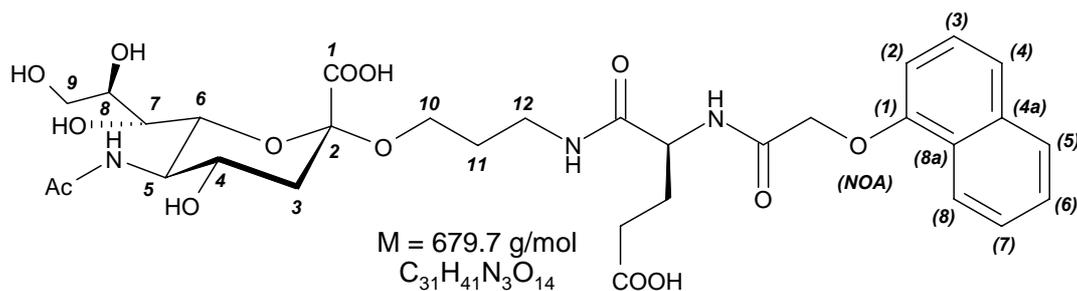
7.6.2.48 Darstellung von *{3-[4-Carboxy-2(S)-(2-napht-1-yl-oxy-acetylamino)-butyrylamino]-propyl}-5-acetamido-3,5-dideoxy-α-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosidonsäure **83***

Nach AAV 7 wurden 25 mg (33 μmol) **67** in 1.5 mL DCM mit 35 μL (200 μmol) DIPEA versetzt und für 4 h zu 107 mg 2-Chlortritylchloridharz gegeben. Nach AAV 8 wurde eine Zweifachkupplung (Fmoc-Glu-(OtBu)-OH zweimal 3 h, Naphtyloxyessigsäure (NOES) einmal über Nacht, einmal 3 h) unter Verwendung folgender Substanzmengen je Kupplungsschritt durchgeführt:

Substanz	Äquivalente	N [mmol]	m [mg]
1. Fmoc-Glu(OtBu)-OH	4.1	136	57.9
2. NOES	4.1	136	27.5
TBTU	5.2	170	54.6
DIPEA	5.2	170	22.0 (29 μL)

Die Abspaltung und Entschützung des Rohproduktes erfolgte nach AAV 9. Der erhaltene Feststoff wurde anschließend per HPLC nach AAV 10 gereinigt. Es konnten 1.24 mg (1.82 μmol) eines farblosen Feststoffes **83** erhalten werden. Die entspricht einer Ausbeute von 6% ausgehend von **67**.

7 Experimenteller Teil



Charakterisierung:

farbloser Feststoff

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +36^{\circ}$ (c = 0.027, H₂O)

R_t-Wert (Methode 2): 13.31 min (99%)

MALDI-TOF-MS: m/z (679.3) = 702.1 (M+Na⁺), 718.0 (M+K⁺).

¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 8.36-8.29 (m, 1H, H-8(NO_A)), 7.85-7.89 (m, 1H, H-5(NO_A)), 7.63-7.56 (m, 3H, H-4(NO_A), H-7(NO_A), H-6(NO_A)), 7.48-7.42 (m, 1H, H-3(NO_A)), 6.93-6.87 (m, 1H, H-2(NO_A)), 4.90 (d, 1H, CH_{2a}(NO_A)), 4.86 (d, 1H, CH_{2b}(NO_A)), 4.39 (dd, 1H, H- α (Glu)), 3.85-3.75 (m, 3H, H-8, H-9_a, H-5), 3.75-3.62 (m, 3H, H-10_a, H-6, H-4), 3.59 (dd, 1H, H-9_b), 3.54 (dd, 1H, H-7), 3.47-3.40 (m, 1H, H-10_b), 3.27-3.16 (m, 2H, H-12), 2.68 (dd, 1H, H-3_{eq}), 2.30-2.25 (m, 2H, H- γ (Glu)), 2.12-1.98 (m, 4H, H- β _a(Glu), CH₃-CO-NH), 1.95-1.85 (m, 1H, H- β _b(Glu)), 1.72-1.62 (m, 3H, H-3_{ax}, H-11) ppm.

$J_{9a,9b} = 12.3$, $J_{9b,8} = 6.5$, $J_{8,7} = 9.0$, $J_{7,6} = 1.4$, $J_{4,3eq} = 4.8$, $J_{3eq,3ax} = 12.7$, $J_{\alpha(\text{Glu}), \beta 1(\text{Glu})} = 5.1$, $J_{\alpha(\text{Glu}), \beta 2(\text{Glu})} = 9.0$, $J_{\text{CH}2a\text{-NOA}, \text{CH}2b\text{-NOA}} = 15.3$ Hz.

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O): δ = 177.9 (COOH(Glu)), 176.0 (CH₃-CO-NH), 174.0 (C-1), 173.6 (CO-CH(Glu)), 172.5 (CO-CH₂-O(NO_A)), 153.7 (C-1(NO_A)), 128.4 (C-5(NO_A)), 127.7 (2C, C-7(NO_A), C-6(NO_A)), 127.0 (C-3(NO_A)), 122.5 (C-4(NO_A)), 122.3 (C-8(NO_A)), 106.9 (C-2(NO_A)), 101.2 (C-2), 73.6 (C-6), 72.6 (C-8), 69.3 (C-4), 68.9 (C-7), 67.9 (CH₂(NO_A)), 63.8 (C-9), 62.9 (C-10), 53.5 (C- α (Glu)), 52.8 (C-5), 40.6 (C-3), 37.8 (C-12), 29.2 (C-11), 27.0 (C- β (Glu)), 23.5 (CH₃-CO-NH) ppm. (Es konnten nicht alle quartären C-Atome detektiert werden.)

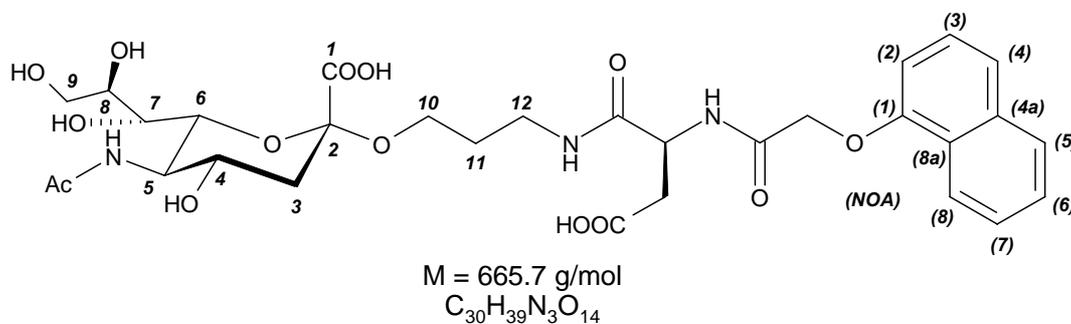
7 Experimenteller Teil

7.6.2.49 Darstellung von *{3-[3-Carboxy-2(S)-(2-napht-1-yloxy-acetyl-amino)-propionyl-amino]-propyl}-5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosidonsäure 82*

Nach AAV 7 wurden 25 mg (33 μ mol) 67 gelöst in 1.5 mL DCM mit 35 μ L (200 μ mol) DIPEA versetzt und für 4 h zu 107 mg 2-Chlortritylchloridharz gegeben. Nach AAV 8 wurde eine Zweifachkupplung (Fmoc-Asp(OtBu)-OH zweimal 3 h, Naphtyloxyessigsäure (NOES) einmal über Nacht, einmal 3 h) unter Verwendung folgender Substanzmengen je Kupplungsschritt durchgeführt:

Substanz	Äquivalente	N [mmol]	m [mg]
1. Fmoc-Asp(OtBu)-OH	4.1	136	57.9
2. NOES	4.1	136	27.5
TBTU	5.2	170	54.6
DIPEA	5.2	170	22.0 (29.0 μ L)

Die Abspaltung und Entschützung des Rohproduktes erfolgte nach AAV 9. Der erhaltene Feststoff wurde anschließend per HPLC nach AAV 10 gereinigt. Es konnten 1.96 mg (2.94 μ mol) eines farblosen Feststoffes 82 erhalten werden. Die entspricht einer Ausbeute von 9% ausgehend von 67.



Charakterisierung:

farbloser Feststoff

$[\alpha]_D^{25} = 37^\circ$ ($c = 0.055$, H_2O)

Rt-Wert (Methode 2): 13.04 min (98%)

MALDI-TOF-MS: m/z (665.3) = 688.3 ($M+Na^+$), 704.2 ($M+K^+$).

1H -NMR (700 MHz, D_2O): $\delta = 8.31$ - 8.27 (m, 1H, H-8(NO_A)), 7.93-7.90 (m, 1H, H-5(NO_A)), 7.61-7.57 (m, 3H, H-6(NO_A), H-4(NO_A), H-7(NO_A)), 7.46-7.42 (m, 1H, H-3(NO_A)), 6.90-6.86 (m, 1H, H-2(NO_A)), 4.90 (d, 1H, CH_{2a} (NO_A)), 4.84 (d, 1H, CH_{2b} (NO_A)), 4.79-4.71 (m,

7 Experimenteller Teil

¹H, H- α (Asp) (unter dem HDO-Signal), 3.83-3.76 (m, 3H, H-8, H-9a, H-5), 3.72-3.64 (m, 3H, H-6, H-10a, H-4), 3.58 (dd, 1H, H-9b), 3.53 (dd, 1H, H-7), 3.45-3.41 (m, 1H, H-10b), 3.20 (t, 2H, H-12), 2.85 (dd, 1H, H- β a(Asp)), 2.80 (dd, 1H, H- β b(Asp)), 2.66 (dd, 1H, H-3_{eq}), 2.00 (s, 3H, CH₃-CO-NH), 1.69-1.63 (m, 3H, H-3_{ax}, H11) ppm.

$J_{9a,9b} = 12.2$, $J_{9b,8} = 6.3$, $J_{8,7} = 9.0$, $J_{7,6} = 1.3$, $J_{4,3eq} = 4.7$, $J_{3eq,3ax} = 12.6$, $J_{\alpha(Asp), \beta a(Asp)} = 5.3$,
 $J_{\alpha(Asp), \beta b(Asp)} = 7.4$, $J_{\beta a(Asp), \beta b(Asp)} = 16.9$, $J_{CH2a(NO A), CH2b(NO A)} = 15.4$ Hz.

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O): $\delta = 176.3$ (CH₃-CO-NH), 175.1 (COOH(Asp)), 174.0 (C-1), 172.9 (CO-CH(Asp)), 172.6 (CO-CH₂-O(NO A)), 153.8 (C-1(NO A)), 135.4 (C-4a(NO A)), 128.8 (C-5(NO A)), 128.1 (C-7(NO A)), 127.2, 127.1 (C-6(NO A), C-3(NO A)), 122.8 (C-4(NO A)), 122.4 (C-8(NO A)), 107.0 (C-2(NO A)), 101.3 (C-2), 73.7 (C-6), 72.4 (C-8), 69.2, 69.0 (C-4, C-7), 68.1 (CH₂(NO A)), 64.4 (C-9), 63.2 (C-10), 53.0 (C-5), 50.7 (C- α (Asp)), 40.9 (C-3), 37.7 (C-12), 36.7 (C- β (Asp)), 29.5 (C-11), 23.5 (CH₃-CO-NH) ppm. (Es konnten nicht alle quartären C-Atome detektiert werden.)

8 Literaturverzeichnis

1. Böhm, H. J.; Klebe, G.; Kubinyi, H. *Wirkstoffdesign*; Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg - Berlin - Oxford, **1996**.
2. Thomas G. *Medicinal Chemistry-An Introduction*, 1. Edition ed.; John Wiley & Sons, Ltd. Chichester **2000**; 539.
3. Greer, J.; Erickson, J. W.; Baldwin, J. J.; Varney, M. D. *J. Med. Chem.* **1994**, 37(8), 1035-54.
4. Suarez, D. L.; Senne, D. A.; Banks, J.; Brown, I. H.; Essen, S. C.; Lee, C. W.; Manvell, R. J.; Mathieu-Benson, C.; Moreno, V.; Pedersen, J. C.; Panigrahy, B.; Rojas, H.; Spackman, E.; Alexander, D. J. *Emerg. Infect. Dis.* **2004**, 10(4), 693-9.
5. Mase, M.; Kim, J. H.; Lee, Y. J.; Tsukamoto, K.; Imada, T.; Imai, K.; Yamaguchi, S. *Microbiol. Immunol.* **2005**, 49(9), 871-4.
6. Morens, D. M.; Taubenberger, J. K.; Fauci, A. S. *J. Infect. Dis.* **2008**, 198(7), 962-70.
7. Suzuki, Y. *Biol. Pharm. Bull.* **2005**, 28(3), 399-408.
8. Hampson, W.; Mackenzie, J. S. *MJA* **2006**, 185(10), 39-43.
9. Webster, R. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 1164-66.
10. WHO-Mediacentre. Influenza Fact sheet No. 211. Webseite: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/2003/fs211/en/print.html>, aufgerufen: **2008**
11. Guo, C. T.; Sun, X. L.; Kanie, O.; Shortridge, K. F.; Suzuki, T.; Miyamoto, D.; Hidari, K. I.; Wong, C. H.; Suzuki, Y. *Glycobiology* **2002**, 12(3), 183-90.
12. Abbildung eines Influenza-A-Virus. Webseite:

8 Literaturverzeichnis

http://www.fsu.com/pages/2006/11/09/flu_virus.html, aufgerufen **2008**.

13. Zundorf, I.; Dingermann, T. *Pharm. Unserer Zeit* **2008**, 37(3), 190-1.
14. Hiromoto, Y.; Saito, T.; Lindstrom, S. E.; Li, Y.; Nerome, R.; Sugita, S.; Shinjoh, M.; Nerome, K. *J. Gen. Virol.* **2000**, 81(Pt 4), 929-37.
15. Itzstein, M. v. *Nature* **2007**, 6, 967-74.
16. Gürtler, L. Virology of Human Influenza. Webseite:
<http://www.influenzareport.com/ir/virol.htm>, aufgerufen **2008**.
17. Mammen, M.; Choi, S. K.; Whitesides G M. *Angew. Chem.* **1998**, 110, 2908-53.
18. Stevens, J.; Blixt, O.; Tumpey, T. M.; Taubenberger, J. K.; Paulson, J. C.; Wilson, I. A. *Science* **2006**, 312(5772), 404-10.
19. Skehel, J. J.; Wiley, D. C. *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, 69, 531-69.
20. Abdel-Ghafar, A. N.; Chotpitayasunondh, T.; Gao, Z.; Hayden, F. G.; Nguyen, D. H.; de Jong, M. D.; Naghdaliyev, A.; Peiris, J. S.; Shindo, N.; Soeroso, S.; Uyeki, T. M. *N. Engl. J. Med.* **2008**, 358(3), 261-73.
21. Stevens, J.; Blixt, O.; Glaser, L.; Taubenberger, J. K.; Palese, P.; Paulson, J. C.; Wilson, I. A. *J. Mol. Biol.* **2006**, 355(5), 1143-55.
22. Yamada, S.; Suzuki, Y.; Suzuki, T.; Le, M. Q.; Nidom, C. A.; Sakai-Tagawa, Y.; Muramoto, Y.; Ito, M.; Kiso, M.; Horimoto, T.; Shinya, K.; Sawada, T.; Kiso, M.; Usui, T.; Murata, T.; Lin, Y.; Hay, A.; Haire, L. F.; Stevens, D. J.; Russell, R. J.; Gamblin, S. J.; Skehel, J. J.; Kawaoka, Y. *Nature* **2006**, 444(7117), 378-82.
23. Stevens, J.; Blixt, O.; Chen, L. M.; Donis, R. O.; Paulson, J. C.; Wilson, I. A. *J. Mol. Biol.* **2008**, 381(5), 1382-94.
24. Ha, Y.; Stevens, D. J.; Skehel, J. J.; Wiley, D. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2001**, 98(20), 11181-6.

8 Literaturverzeichnis

25. Wood, J. M. *Philos Trans R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **2001**, 356(1416), 1953-60.
26. Cinatl, J.; Michaelis, M.; Doerr, H. W. *Med. Microbiol. Immunol.* **2007**.
27. Le, Q. M.; Kiso, M.; Someya, K.; Sakai, Y. T.; Nguyen, T. H.; Nguyen, K. H.; Pham, N. D.; Ngyen, H. H.; Yamada, S.; Muramoto, Y.; Horimoto, T.; Takada, A.; Goto, H.; Suzuki, T.; Suzuki, Y.; Kawaoka, Y. *Nature* **2005** , 437(7062), 1108.
28. Jones, J. C. ; Turpin, E. A.; Bulmann H. ; Brandt C. R. ; Schultz-Cherry, S. *J. Virol.* **2006**, 80(24), 11960-67.
29. Misono, T. S.; Kumar, P. K. *Anal. Biochem.* **2005**, 342(2), 312-7.
30. Toogood, P. L.; Galliker, P. K.; Glick, G. D.; Knowles, J. R. *J. Med. Chem.* **1991**, 34(10), 3138-40.
31. Sun, X. L. *Curr. Med. Chem.* **2007**, 14(21), 2304-13.
32. Mammen, M.; Dahmann, G.; Whitesides, G. M. *J. Med. Chem.* **1995**, 38(21), 4179-90.
33. Bovin, N. V.; Tuzikov, A. B.; Chinarev, A. A.; Gambaryan, A. S. *Glycoconj. J.* **2004**, 21(8-9), 471-8.
34. Sauter, N. K.; Bednarski, M. D.; Wurzburg, B. A.; Hanson, J. E.; Whitesides, G. M.; Skehel, J. J.; Wiley, D. C. *Biochemistry* **1989**, 28(21), 8388-96.
35. Sauter, N. K.; Hanson, J. E.; Glick, G. D.; Brown, J. H.; Crowther, R. L.; Park, S. J.; Skehel, J. J.; Wiley, D. C. *Biochemistry* **1992** , 31(40), 9609-21.
36. Kelm, S.; Paulson, J. C.; Rose, U.; Brossmer, R.; Schmid, W.; Bandgar, B. P.; Schreiner, E.; Hartmann, M.; Zbiral, E. *Eur. J. Biochem.* **1992**, 205(1), 147-53.
37. Pritchett, T. J.; Brossmer, R.; Rose, U.; Paulson, J. C. *Virology* **1987**, 160(2), 502-6.
38. Weinhold, E.; Knowles, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 9270-75.

8 Literaturverzeichnis

39. Watowich, S. J.; Skehel, J. J.; Wiley, D. C. *Structure* **1994**, 2(8), 719-31.
40. Books, B.; Bruccoleri, R.; Oladson, B.; States, D.; Swaminathan, S.; Karplus, M. *J. Comput. Chem.* **1983**, 4, 187-217.
41. Weiner P. K. ; Kollman P. A. *J. Comput. Chem.* **1981**, 2(3), 287-303.
42. Clark, M.; Cramer, R.; Van Opdenbosch, R. *J. Comput. Chem.* **1989**, 10, 982-1012.
43. Jonsson, U.; Fagerstam, L.; Ivarsson, B.; Johnsson, B.; Karlsson, R.; Lundh, K.; Lofas, S.; Persson, B.; Roos, H.; Ronnberg, I.; et, a. l. *BioTechniques* **1991**, 11(5), 620-7.
44. Weimar, T. *Angew. Chem.* **2000**, 112, 1271-1274.
45. Xing, L.; Tjarnlund, K.; Lindqvist, B.; Kaplan, G. G.; Feigelstock, D.; Cheng, R. H.; Casasnovas, J. M. *EMBO J.* **2000**, 19(6), 1207-16.
46. Medina, M. B. *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, 93(1), 63-72.
47. Quinn, J. G.; O'Neill, S.; Doyle, A.; McAtamney, C.; Diamond, D.; MacCraith, B. D.; O'Kennedy, R. *Anal. Biochem.* **2000**, 281(2), 135-143.
48. Karlsson, R.; Stahlberg, R. *Anal. Biochem.* **1995**, 228(2), 274-80.
49. Mayer, M. Doktorarbeit, Universität Hamburg, Institut für Organische Chemie Hamburg, **2001**.
50. Meyer, B.; Peters, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42(8), 864-890.
51. Meyer, B.; Klein, J.; Mayer, M.; Meinecke, R.; Möller, H.; Neffe, A.; Schuster, O.; Wülfsen, J.; Ding, Y.; Knaie, O.; Labbe, J.; Palcic, M. M.; Hindsgaul, O.; Wagner, B.; Ernst, B. 1 ed.; Hamann, A.; Schottelius, A.; Asadullah, K., Springer: Berlin, **2004**; 44, 149-168.
52. Kalk, A.; Berendsen, H. J. C. *J. Magn. Res.* **1976**, 24, 343-66.

8 Literaturverzeichnis

53. Meinecke, R.; Meyer, B. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*(19), 3059-65.
54. Meinecke, R. Doktorarbeit, Universität Hamburg, Institut für Organische Chemie Hamburg, **2003**.
55. Claasen, B.; Axmann, M.; Meinecke, R.; Meyer, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*(3), 916-9.
56. Takemoto, D. K.; Skehel, J. J.; Wiley, D. C. *Virology* **1996**, *217*(2), 452-8.
57. Kuhn, R.; Lutz, P.; MacDonald, D. L. *Chem. Ber.* **1966**, *99*(2), 611-7.
58. Malapelle, A.; Coslovi, A.; Doisneau, G.; Beau, J. M. *Eur. J. Org.Chem.* **2007**, (19), 3145-57.
59. Lubineau, A.; Gallic, J. *J. Carb. Chem* **1991**, *10*(2), 263-68.
60. Zemplén, G.; Pacsu, E. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1929**, *62b*, 1613-17.
61. Neubacher, B. Doktorarbeit, Universität Hamburg, Institut für Organische Chemie Hamburg, **2005**.
62. Borch, R. F.; Bernstein, I. M. D.; Durst, H. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *93*(12), 2897-2904.
63. Scheid, S. Doktorarbeit, Universität Hamburg, Institut für Organische Chemie, Hamburg, **2007**.
64. Juers, B. Persönliche Mitteilung **2007**.
65. Vollhardt, K.; Peter, C. *Organische Chemie*; VCH: Weinheim; Basel; Cambridge; New York, **1990**.
66. Meinke, S.; Thiem, J. *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*(10-11), 1824-9.
67. Meinke, S.; Thiem J., *Posterpräsentation: Cross Metathesis for Synthesis of Novel C-Sialosides and Affinity Measurements by SPR* **2008**.
68. Watowich, S. J. Persönliche Mitteilung **2007**.

8 Literaturverzeichnis

69. Ogura, H.; Furuhata, K. *Carb. Res.* **1986**, *158*, 37-51.
70. Koenigs, W.; Knorr, E. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1901**, *34*, 957-981.
71. Gregar, T. Q.; Gervay-Hague, J. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*(4), 1001-9.
72. Barlos, K.; Gatos, D.; Kaposos, S.; Papaphotiu, G.; Schäfer, W.; Wenqing, Y. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*(30), 3947-3950.
73. Athanassopoulos, P.; Barlos, K.; Gatos, D.; Hatzi, O.; Tzavara, C. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*(31), 5645-5648.
74. Carpino, L. A.; Han, G. Y. *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3404-9.
75. Green, T. W. ; Wuts P. G. M. *Protective Groups in Organic Synthesis*; Wiley-Interscience: New York, **1999**.
76. Wilhelm, D. Diplomarbeit, Universität Hamburg, Institut für Organische Chemie, Hamburg, **2004**.
77. Giordano, C.; Pedone, F.; Fattibene, P.; Cellai, L. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2000**, *19*(8), 1301-10.
78. Nakamura, M.; Furuhata, K.; Yamazaki, K.; Ogura, H.; Kamiya, H.; Ida, H. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1989**, *37*(8), 2204-6.
79. Shimizu, C.; Ikeda, K.; Achiwa, K. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1988**, *36*(5), 1772-8.
80. Kunz, H.; Birnbach, S.; Wernig, P. *Carbohydr. Res.* **1990**, *202*, 207-23.
81. Reid, G. E.; Simpson, R. J. *Anal. Biochem.* **1992**, *200*(2), 301-309.
82. Neffe, A. T.; Bilanz, M.; Meyer, B. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*(17), 3259-67.
83. *protein calculator*. Webseite:
www.basic.northwestern.edu/biotools/proteincalc.html), aufgerufen **2008**.

9 Toxikologische Daten

Chemikalie	Gefahrensymbol	R-Sätze	S-Sätze
Acetonitril	F, T	11-23/24/25	16-27-45
<i>N</i> -Acetylneuraminsäure	Achtung! Noch nicht vollständig geprüfter Stoff		
5-Amino-1-pentanol	C	22-34	26-36/37/39-45
3-Amino-1-propanol	C	20/21/22-34	26-36/37/39-45
Acetanhydrid	C	10-20/22-36	26-36/37/39-45
Acetylchlorid	F, C	11-14-34	9-16-26-45
<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium tetrafluoroborat	Xi	36/37/38	26-36
Benzylbromid	Xi	36/37/38	(2)-39
Butanol	Xn	10-22-37/38-41-67	(2)-7/9-13-26-37/39-46
Bromessigsäure	T, C, N	23/24/25-35-50	(1/2)-26-36/37/39-45-61
Cäsiumcarbonat	Xn	36/37/38-68	26-36/37/39
Dichlormethan	Xn	40	23.2-24/25-36/37
Dicyclohexycarbodiimid	T	24-22-41-43	(1/2)-24-26-37/39-45
4-(Dimethylamino)-pyridin	T	24/25-36/38	22-36/37-45
<i>N,N</i> -Dimethylformamid	T	61-E20/21-36	53-45
<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin	F, C	11-22-34-52/53	16-26-36/37/39-45-61
1,4-Dioxan	F, Xn	11-19-36/37-40-66	(2)-9-16-36/37-46
Essigsäure	C	10-35	23.2-26-45
Essigsäureanhydrid	C	10-20/22-34	26-36/37/39-45
Ethanolamin	C	20/21/22-34	(1/2)-26-36/37/39-45
Ethylacetat	F, Xi	11-36-66-67	(2)-16-26-33
Kaliumhydroxid	C	22-35	(1/2)-26-36/37/39-45
Methanol	F, T	11-23/24/25-39/23/24/25	7-16-36/37-45
1-Naphtol	Xn	21/22-37/38-41	(2)-22-26-37/39
1-Naphtylelessigsäure	Xn	22-37/38-41	22-26-36
Natrium	F, C	14/15-34	5.3-8-43.7-45
Natriumacetat			
Natriumazid	T ⁺ , N	28-32-50/53	(1/2)-28-45-60-61

Chemikalie	Gefahrensymbol	R-Sätze	S-Sätze
Natriumcarbonat	Xi	36	(2)-22-26
Natriumchlorid	-	-	-
Natriumcyanoborhydrid	F, T⁺, N	11-26/27/28-32-34-50/53	8-16-6-43.6-45
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	-	-	-
Natriumhydrogencarbonat	-	-	-
Dinatriumhydrogenphosphat	Xi	36/37/38	
Natriumhydroxid	C	35	(1/2-)26-37/39-45
Natriumperiodat	O	8	
Natriumsulfat	-	-	-
Natriumthiosulfat	-	-	-
Petrolether	F, Xn, N	11-38-65-67-51/53	9-16-29-33-60-61-62
Piperidin	F, T	11-23/24/34	16-26-27-45
Phenylelessigsäure	Xi	36/37	26
<i>n</i>-Propylamin	F, C	11-20/21/22-34	9-16-26-36/37/39-45
Pyridin	F, Xn	11-20/21/22	26-28.1
Salzsäure (konz.)	C	34-37	26-36/37/39-45
Silbercarbonat	Xi	41	20-26-39
Silberperchlorat	O, C	8-34	26-36/37/39-45
Toluol	F, Xn	11-38-48/20-63-65-67	36/37-46-62
Trichlormethan	Xn	22-38-40-48/20/22	(2-)36/37
Triethylamin	F, C	11-20/21/22-35	1/2-3-16-26-29-36/37/39-45
Trifluorethanol	Xn	10-20/21/22-38-41-48/20	26-36/37/39
Trifluoressigsäure	C	20-35-52/53	9-26-27-28.1-45-61
Wasserstoffperoxid (30%)	O, C	22-41	17-26-28.1-45-36/37/39

10 Danksagung

Ich danke

- meiner Mutter für die langjährige Unterstützung in allen meinen bisherigen Lebensabschnitten
- meinen Freunden, insbesondere Marco und Schmitti, für die jahrelange Unterstützung und die vielen aufmunternden Worte
- Winrich Scherres, Anna-Winona Struck und Thomas Hackl für die großartige Zusammenarbeit und Zeit in und außerhalb der Uni
- Weiterhin allen Mitgliedern und Ehemaligen des Arbeitskreises für die schöne Zeit mit euch in Wissenschaft und Freizeit. Vielen Dank! Insbesondere Ilona Grüneberg, die mich bei einer ganzen Reihe von Synthesen unterstützt und viel zur guten Stimmung in der 17 beigetragen hat. Es gehören oder gehörten dazu: Alex Buschke, Atilla Coksezen (NMR), Beatrice Jürs, Birgit Claasen (NMR), Boris Kröplin (*molecular modeling*), Britta Hünnefeld, Christian Flügge (HPLC), Dennis Wilhelm (Synthese), Dirk Rehders (NMR, Korrektur), Henning Behnken, Jan-Christoph Westermann (*molecular modeling*), Karolina Elsholz (HPLC), Katrin Althof (Biacore), Katrin Schäfer (Synthese, Korrektur, HPLC), Katharina Wallach (Organisation), Kolja Klein, Marco Axmann, Martin Wienke, Michael Bartels, Mirko Lindner (MALDI-TOF), Michael Goldflam (Synthese), Moritz Waldmann (Synthese, Korrektur), Robin Job (viel Spaß im Labor), Svenja Scheid (NMR, Synthese) und Thomas Kühnemund.
- Ein großer Dank gilt weiterhin meinen ehemaligen Praktikanten, insbesondere Karsten Winkel für sein Engagement im Schwerpunktpraktikum
- Brita Werner, Volker Sinnwell, Alexander Prenzel, Andreas Schroven, Sebastian Meinke, Lilia Marcinkiewicz und weiteren Mitgliedern und Ehemaligen des Departments Chemie, die mir mit Chemikalien, kompetenten Ratschlägen und vieles mehr geholfen haben.

11 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Martin Hollinger
Geburtsort/-datum: Güstrow, 28.09.1978

WISSENSCHAFTLICHE AUSBILDUNG UND TÄTIGKEITEN

- Seit 10/2005 Promotion im Arbeitskreis von Prof. Dr. Bernd Meyer,
Institut für organische Chemie, Universität Hamburg
*Thema: „Design, Synthese und Analyse von Inhibitoren
des Hämagglutinins des aviären Influenza Virus H5N1.“*
- 10/2005-09/2008 Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Institut für
organische Chemie, Universität Hamburg
Assistent im OC-Grundpraktikum
- 10/2004-08/2005 Diplomarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. Bernd Meyer,
Institut für organische Chemie, Universität Hamburg
*Titel: „Design, Synthese und Analyse glycosylierter,
peptidomimetischer Inhibitoren der GP120/CD4
Wechselwirkung.“ Gesamtnote: Sehr gut*
- 10/2000-08/2005 Chemiestudium (Diplom) an der Universität Hamburg
Zwischenprüfung: Vordiplom (07.2002); Gesamtnote: Sehr gut

AUSLANDSPRAKTIKUM

- 09/2003-11/2003 Garware Research Centre, Department of Chemistry,
Universität Pune, Indien
Thema: „Synthesis of Polyhydroxylated Piperidine Alkaloids“
Reisestipendium: “Emmy und Alfred B. Steffens Memorial Fund”

STUDIENBEGLEITENDE NEBENTÄTIGKEITEN

- 10/2006-09/2007 Assistent im chemischen Praktikum für Mediziner,
Universität Hamburg
Praktikumsbetreuung, Seminarleitung
- 04/2006-09/2006 Assistent im chemischen Praktikum für Zahnmediziner,
Universität Hamburg
Praktikumsbetreuung, Seminarleitung
- 08/2005-09/2005 eurofins GmbH / Wiertz-Eggert-Jörissen, Hamburg
Projektmitarbeiter
Methodenentwicklung in der chromatographischen Analytik
- 09/2001-12/2001 Klaus Stegmann GmbH & Co. KG, Hamburg
Sachbearbeiter
- 03/2001-03/2001 persona service GmbH & Co. KG, Hamburg
Sachbearbeiter

BERUFSAUSBILDUNG UND TÄTIGKEITEN

- 05/2000-09/2000 Franke-Kaufmännische Personaldienstleistung, Hamburg
Sachbearbeiter
- 03/1999-02/2000 Schacht & Lehmann GmbH, Hamburg
Kaufmännischer Mitarbeiter
- 08/1995-01/1998 METRO GmbH & Co. KG, Rostock
Berufsausbildung, Abschluss: Kaufmann im Groß- und Außenhandel

GRUNDWEHRDIENST

03/1998-12/1998 Jagdgeschwader 73, Laage

SCHULAUFBILDUNG

02/1999-06/2000 Abendgymnasium St. Georg, Hamburg
Abschluss: Abitur, Note: 2.0

08/1998-02/1999 Abendgymnasium der Hansestadt Rostock, Rostock

09/1985-06/1995 2. Grundschule mit Realschulenteil der Stadt Güstrow, Güstrow
Mittlere Reife

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Ich versichere weiterhin, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Hamburg, im Mai 2009