

**Design, Synthese & Analyse neuer Inhibitoren
der humanen β -Galactosid α -2,6-Sialyltransferase I
(ST6Gal-I)**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des

Doktors der Naturwissenschaften

der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

am Institut für Organische Chemie im Fachbereich Chemie

der Universität Hamburg

vorgelegt von

Maximilian Britz

aus Kiel

Hamburg 2023

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Bernd Meyer
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Ralph Holl

Tag der Disputation: 08. September 2023

Tag der Druckfreigabe: 17. Oktober 2023

Die praktischen Arbeiten wurden in der Zeit von Oktober 2016 bis Februar 2022 am Institut für Organische Chemie im Fachbereich Chemie der Universität Hamburg, Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. Christian B. W. Stark, durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Bernd Meyer danke ich für die interessante Themenstellung, sowie für die stets freundliche und motivierende Unterstützung und die gleichzeitig gewährten Freiheiten bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Ralph Holl danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

Für meine Familie.

“It always seems impossible until it’s done.”

(Nelson Mandela)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
Aminosäuren	VI
1 Zusammenfassung	1
2 Summary	4
3 Einleitung	6
3.1 Glycosyltransferasen	7
3.1.1 Strukturelle Eigenschaften von Glycosyltransferasen	8
3.1.2 Klassifizierung von Glycosyltransferasen	9
3.2 Sialinsäuren.....	12
3.2.1 Sialyltransferasen	12
3.2.2 β -Galactosid α -2,6-Sialyltransferase I (ST6Gal-I)	13
3.2.3 Inhibitoren der humanen Sialyltransferasen	17
3.3 Strukturbasiertes Wirkstoffdesign	22
4 Aufgabenstellung	24
5 Ergebnisse und Diskussion	26
5.1 Design von potentiellen Inhibitoren der ST6Gal-I	26
5.1.1 <i>de novo</i> Design von Inhibitoren der ST6Gal-I.....	28
5.2 Synthese der Inhibitoren 16 und 17 der ST6Gal-I	41
5.2.1 Retrosynthetische Analyse des Liganden 16.....	42
5.2.2 Synthetische Darstellung des Liganden 16	44
5.2.3 Retrosynthetische Analyse des Liganden 17.....	50
5.2.4 Synthetische Darstellung des Liganden 17	51
5.3 Analyse des inhibitorischen Potenzials der dargestellten Inhibitoren gegenüber der ST6Gal-I	57
5.3.1 Bindungsstudien mittels Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)	57

5.3.2	Progresskurvenanalyse der Inhibition von 16 und 17 gegenüber der ST6Gal-I	78
6	Experimenteller Teil	92
6.1	Verwendete Geräte und Materialien	92
6.2	Verwendete Software.....	93
6.3	Verwendete Chemikalien	94
6.4	Verwendete Puffer	95
6.5	Angewendete Methoden	96
6.5.1	<i>Molecular Modelling</i> und <i>Docking</i> -Studien	96
6.5.2	Oberflächenplasmonenresonanz (SPR).....	98
6.5.3	NMR-Progresskurvenanalyse	99
6.6	Synthesevorschriften.....	101
6.6.1	Vorschrift zur Reinigung der dargestellten Produkte mittels <i>RP</i> -HPLC	101
6.6.2	Durchgeführte Synthesen	102
7	Toxikologische Daten	124
8	Literaturverzeichnis	129
9	Danksagung	138
10	Eidesstattliche Erklärung	139

Abkürzungsverzeichnis

1D, 2D, 3D	ein-, zwei-, drei-dimensional
abs.	absolutes
AS	Aminosäure
ber.	berechnet
CDP	Cytidin-5'-diphosphat
CMP	Cytidin-5'-monophosphat
CMP-Neu5Ac	Cytidin-5'-monophosphat- <i>N</i> -acetyl- β -neuraminsäure
COSY	<i>correlated spectroscopy</i>
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
d	Dublett
Da	Dalton
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
dd	Dublett vom Dublett
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EE	Ethylacetat
EI	<i>electron ionisation</i>
eq	äquivalente Konzentration
ER	endoplasmatisches Retikulum
ESI	<i>electron spray ionisation</i>
FA	Ameisensäure

Abkürzungsverzeichnis

Gal	Galactose
gef.	Gefunden
GT	Glycosyltransferasen
HATU	2-(1H-7-Azabentotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HSQC	<i>heteronuclear single-quantum correlation</i>
HTS	<i>high-throughput-screening</i>
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
<i>J</i>	Kopplungskonstante
<i>K_D</i>	thermodynamische Dissoziationskonstante
<i>K_I</i>	inhibitorische konstante
<i>K_M</i>	Michaelis-Menten-Konstante
LacNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-lactosamin
<i>LE</i>	<i>ligand efficiency</i>
m	Multipllett
M	Molekulargewicht (mol/L)
<i>m/z</i>	Masse/Ladung
MD	Molekulardynamik
Me	Methyl
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
Neu5Ac	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure
Neu5Gc	<i>N</i> -Glycolylneuraminsäure
Pd/C	Palladium auf Aktivkohle (10 %)
PDB	<i>protein data bank</i>

Abkürzungsverzeichnis

PE	Petrolether
PMe ₃	Trimethylphosphin
ppm	<i>parts per million</i>
PPTS	Pyridinium- <i>p</i> -toluolsulfonat
q	Quartett
R _f	Retentionsfaktor
rmsd	<i>root mean square deviation</i>
RP	<i>reversed phase</i>
RU	<i>response unit</i>
s	Singulett
SOCl ₂	Thionylchlorid
SPR	<i>surface plasmon resonance</i>
ST	Sialyltransferase
ST6Gal-I	β-Galactosid α-(2,6)-Sialyltransferase I
STD	<i>saturation transfer difference</i>
t	Triplett
TBAI	Tetrabutylammoniumiodid
TBDMS-Cl	<i>tert</i> -Butyldimethylsilylchlorid
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
v/v	Volumen per Volumen
v _{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
δ	chemische Verschiebung

Aminosäuren

<i>Aminosäure</i>	<i>Dreibuchstabencode</i>	<i>Einbuchstabencode</i>
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Thr	Y
Valin	Val	V

1 Zusammenfassung

Während Primärtumore bei einer rechtzeitigen Entdeckung meist erfolgreich chirurgisch entfernt und mittels Chemo- oder Strahlentherapie behandelt werden können, besitzen metastasierende Tumore die Fähigkeit, dass sich Zellen aus dem Verband herauslösen, in gesundes Gewebe eindringen und Metastasen ausbilden. Eine metastasierende Krebserkrankung ist vom Beginn ihrer Entstehung bis hin zu ihren molekularen Mechanismen einzigartig und meistens unheilbar. Die Bildung von Metastasen ist hauptsächlich für die Letalität von Krebserkrankungen verantwortlich. Somit ist das Verständnis der molekularen und zellulären Mechanismen bei der Entstehung von Krebserkrankungen weiterhin ein wichtiger Teil intensiver Forschungsanstrengungen, um diese frühzeitig identifizieren und gezielt heilen zu können.

Sowohl klinische Studien als auch *in vitro* Experimente zeigten, dass eine erhöhte Sialyltransferasenaktivität zu einer Überexpression von Sialinsäuren auf der Zelloberfläche von Proteinen und Lipiden führt und diese Art der Hypersialylierung im Zusammenhang mit der Inversions- und Metastasierungsfähigkeit von Tumorzellen steht. Die dabei beteiligten biomolekularen Mechanismen, mit denen sialylierte Strukturen das Zellverhalten modulieren, sind bisher nicht ausreichend verstanden. Somit sind die Sialyltransferasen von hohem medizinischen Interesse, da sie als potentielle Wirkstofftargets z.B. in der Krebstherapie eingesetzt werden könnten. Hierzu wurden in den letzten 30 Jahren eine Vielzahl von möglichen Inhibitoren für Sialyltransferasen entwickelt, um deren Struktur-Funktions-Beziehungen *in vivo* untersuchen zu können. Eine große Herausforderung besteht dabei in der notwendigen Zellpermeabilität der entwickelten Inhibitoren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue Inhibitoren der humanen β -Galactosid α -2,6-Sialyltransferase I (ST6Gal-I) *in silico* entwickelt, synthetisch dargestellt und anschließend hinsichtlich ihrer Bindungsaffinität analysiert. Die ST6Gal-I katalysiert den Transfer einer Sialinsäure vom Donorsubstrat CMP-Neu5Ac auf eine endständige Hydroxylgruppe des Akzeptersubstrats LacNAc und bietet sich auf der Suche nach neuen Inhibitoren als ideales Modellsystem an, da ihre dreidimensionale Struktur hervorragend charakterisiert ist. Die *in silico* entwickelten, nicht-ionischen Liganden orientierten sich im Kern an der Struktur des Donors CMP-Neu5Ac, deren Affinität durch verschiedene Modifikationen erheblich gesteigert werden konnte.

Zunächst wurde ein nicht-substratbasierter Ansatz verfolgt, um eine bessere Kontrolle über die benötigten Eigenschaften eines Inhibitors zu erhalten. Hierzu wurde eine Menge (*subset*) von mehr als 700.000 Strukturen in die Donorbindungstasche der ST6Gal-I gedockt. Als Ergebnis des *de novo* Designs konnte die vielversprechende Core-Struktur 1,4-Dihydrochinoxalin-2,3-dion (**15**) mit einer zusätzlichen Benzylgruppe ermittelt werden, welche die zentrale Lage des Donors in der Bindungstasche gut imitiert. Die Core-Struktur wurde *in silico* weiter analysiert und um eine neutrale Carbamat- bzw. Triazol-Einheit als isosterer Ersatz für den geladenen Phosphordiester erweitert. Diese sind über eine Ethylgruppe miteinander verknüpft. Abschließend wurde noch ein Benzylalkohol für die im Donorsubstrat vorliegende *N*-Acetylneuraminsäure eingeführt und die neuen Liganden **16** und **17** erhalten, die gegenüber dem Donorsubstrat CMP eine deutliche Verbesserung der theoretisch berechneten Bindungsenergie aufzeigen.

Für die *in silico* entwickelten Liganden **16** und **17** wurde eine Synthesestrategie entworfen. Diese sah vor, zunächst die gemeinsame Core-Struktur der Liganden in einer konvergenten Route zu synthetisieren und dann mit einem, zuvor synthetisierten Reaktanten umzusetzen, der sowohl die stereoselektive Einführung der Hydroxylgruppe, als auch den Aufbau der Carbamat- bzw. Triazol-Einheit ermöglicht. Ausgehend von einfachen Startmaterialien konnten sowohl die Core-Struktur als auch die individuellen Reaktanten in guten Ausbeuten dargestellt und anschließend erfolgreich miteinander verknüpft werden. Die Liganden (*S*)-**16** und (*R*)-**16**, die eine Triazol-Einheit als Linkerfragment aufweisen, konnten mittels *Click-Chemie* durch Umsetzung des Dioxo-chinoxalin-azids **34** mit dem jeweils, enantiomerenreinen Alkin (*S*)-**24** oder (*R*)-**24** und abschließender Amidkupplung mit Benzylamin (**25**) in guten bis sehr guten Ausbeuten dargestellt werden. Die selektive Einführung der Carbamat-Einheit zu den Liganden (*S*)-**17** und (*R*)-**17** führte zunächst zu unerwarteten Problemen, konnte jedoch letztendlich nach erheblichem, synthetischen Aufwand durch Umsetzung des Azids **38** mit einer Trimethylphosphin-Lösung und der Zugabe des jeweiligen Styrolcarbonats (*S*)-**37** bzw. (*R*)-**37** in einer *Staudinger*-ähnlichen Reaktion umgesetzt werden.

Abschließend wurden die synthetisierten Liganden auf ihr inhibitorisches Potential hin untersucht. Die Bindungseigenschaften von (*S*)-**16**, (*R*)-**16**, (*S*)-**17** und (*R*)-**17** gegenüber der ST6Gal-I wurden mittels SPR-Bindungsstudien analysiert, wobei alle Liganden in den untersuchten Konzentrationsbereichen Wechselwirkungen mit dem Protein aufzeigten. Die ermittelten Dissoziationskonstanten K_D liegen alle im niedrigen mikromolaren Bereich. Im direkten Vergleich mit dem Donorsubstrat CMP-Neu5Ac zeigen (*S*)-**16**, (*R*)-**16** und (*R*)-**17** mit K_D -Werten von 2.9 μ M bis 19 μ M eine deutlich bessere Bindungsaffinität. Lediglich der Ligand (*S*)-**17** weist mit einem K_D -Wert von 40 μ M eine ähnliche Bindungsaffinität wie das Donorsubstrat auf. Des Weiteren konnte das inhibitorische Potential von (*R*)-**16** gegenüber

der ST6Gal-I mittels Progresskurvenanalyse verifiziert werden. Die ermittelte Inhibitionskonstante K_i von 25.4 μM liegt ebenfalls im niedrigen mikromolaren Bereich und stimmt sehr gut mit dem in den SPR-Bindungsstudien bestimmten K_D -Wert von 19 μM für (R)-**16** überein.

Somit ist es gelungen Inhibitoren der humanen β -Galactosid α -2,6-Sialyltransferase I (ST6Gal-I) zu synthetisieren, die eine bessere Affinität als die natürlichen Derivate haben und die aufgrund ihrer wenig polaren und nicht ionischen Natur auch durch die Zellwände zu dem Ort der Biosynthese der sialylierten Glycane transportiert werden können.

2 Summary

While primary tumors can usually be successfully removed surgically and treated with chemotherapy or radiotherapy if detected in time, metastatic tumors have the ability that cells detach from the association, infiltrate healthy tissue and form metastases. A metastatic cancer is unique from the beginning of its development up to their molecular mechanisms and is normally incurable. The formation of metastases is mainly responsible for the lethality of cancer. Therefore, the understanding of the molecular and cellular mechanisms in the development of cancer continues to be an important part of intensive research efforts in order to identify them at an early stage and to be able to cure them in a targeted manner.

Both clinical studies and *in vitro* experiments showed that increased sialyltransferase activity leads to overexpression of sialic acids on the surface of proteins and lipids and this type of hypersialylation is related to the invasion and metastatic ability of tumor cells. The involved biomolecular mechanisms for the formation of sialylated structures are not sufficiently investigated so far. Consequently, sialyltransferases are of high medical interest because they can be used as a potential drug target in cancer therapy. Over the last 30 years a large number of inhibitors for sialyltransferases have been developed in order to analyze their structure-function behavior *in vivo*. A major challenge is the necessary cell permeability of the designed inhibitors which is not normally present in charged molecules.

During this work, novel inhibitors of the human β -galactoside α -2,6-sialyltransferase I (ST6Gal-I) were developed *in silico*, synthesized and subsequently analyzed for their binding affinity. The ST6Gal-I catalyzes the transfer of sialic acid from donor CMP-Neu5Ac to a terminal hydroxyl group of the acceptor LacNAc. This is a perfect model system in search of new inhibitors based on the three-dimensional structure of the enzyme. The designed, non-ionic inhibitors based on the structure of the donor CMP-Neu5Ac, whose affinity could be significantly increased by various modifications.

Firstly, a fragment-based strategy that allows a better control over the required properties of an inhibitor was pursued. Therefore, a *subset* of more than 700.000 structures was docked against the donor binding pocket of ST6Gal-I. As the result of the *de novo* design, the interesting core-structure 1,4-dihydroquinoxaline-2,3-dione (**15**) with an additional benzyl group which imitates the position of the natural donor was identified. The core-structure was further analyzed *in silico*. A neutral carbamate- or triazole-unit which are linked to the core-structure via an ethyl group, replaced the charged phosphorus diester. Finally, a benzyl

alcohol was introduced to mimic the *N*-acetylneuraminic acid to obtain the ligands **16** and **17**, which demonstrate a significant improvement in the theoretically calculated binding energy compared to the donor CMP.

A synthetic strategy was developed for the design of the ligands **16** and **17**. Therefore, the core-structure of the ligands was synthesized in a convergent route and then linked to a previously synthesized reactant. The reactant should enable the stereoselective introduction of the hydroxyl group and the formation of the carbamate- or triazole-unit at the same time. The individual reactants and the core-structure were obtained in good yields and successfully linked with each other. Ligands (*S*)-**16** and (*R*)-**16** who have a triazole-unit as a linker fragment were successfully synthesized through *Click-Chemistry* by reacting the dioxo-quinoxaline azide **34** with the enantiomerically pure alkyne (*S*)-**24** or (*R*)-**24** and final amide coupling with benzylamine (**25**). They were obtained in good yields. The selective introduction of the carbamate-unit for ligands (*S*)-**17** and (*R*)-**17** led to unexpected problems. After considerable synthetic effort they could be converted in a *Staudinger-like* reaction by reacting the azide **38** with a trimethylphosphine solution and adding the styrene carbonate (*S*)-**37** or (*R*)-**37**.

Finally, the inhibitory potential of ligands (*S*)-**16**, (*R*)-**16**, (*S*)-**17** and (*R*)-**17** to ST6Gal-I was investigated by SPR binding studies. All ligands showed interactions with the protein in the investigated concentrations. The resulting dissociation constants K_D are in low micromolar range. The ligands (*S*)-**16**, (*R*)-**16**, (*R*)-**17** show a better binding affinity with K_D values of 2.9 μM to 19 μM in comparison to the donor CMP-Neu5Ac. Only the ligand (*S*)-**17** has a similar binding affinity as the donor substrate with a K_D value of 40 μM . The inhibitory potential for (*R*)-**16** was confirmed by progress curve analysis. The resulting inhibition constants K_I of 25.4 μM is also in a low micromolar range and agrees with the resulting K_D value of 19 μM for (*R*)-**16** in the SPR binding studies.

Thereby, a new synthetic route and new targets for inhibitors of the human β -galactoside α -2,6-sialyltransferase I (ST6Gal-I) were successfully developed. Their low polarity and non-ionic nature should allow the transfer through cell membranes which is necessary to reach the site of the biosynthesis of the sialylated glycans.

3 Einleitung

Kohlenhydrate bilden neben Lipiden, Proteinen und Nucleinsäuren eine der größten Klassen von Naturstoffen. Sie zeichnen sich vor allem durch ihre große strukturelle Vielfalt und ihre Vielseitigkeit aus und stellen aufgrund zahlreicher wichtiger Funktionen im lebenden Organismus eine bedeutende Substanzklasse dar. Hergestellt mittels Photosynthese von Pflanzen und Mikroorganismen bilden sie, makroskopisch betrachtet, mit Cellulose und Chitin ein überaus wichtiges und strukturbildendes Baumaterial in Pflanzen und Lebewesen.^[1,2] Mikroskopisch betrachtet sind sie essentielle Grundbausteine von Zellen und Gewebe. So spielen sie z.B. in Form von Stärke und Glycogen eine herausragende Rolle als Energiespeicher in allen Lebewesen oder man betrachtet die Kohlenhydrate Ribose und Desoxyribose, die Teile des Moleküllückgrades der DNA und RNA bilden, welche eine zentrale Rolle bei der Speicherung der genetischen Information eines Organismus spielen.^[2,3]

In komplexen Glycostrukturen werden Kohlenhydrate beispielweise als Teil der Zellwände gefunden, denen ganz konkrete Funktionen zugeteilt sind. So besitzen Glycostrukturen eine umfassende Reihe biologischer und biochemischer Funktionen, wie bei der Signaltransduktion, der Proteinfaltung, der Adhäsions- und Infektionsprozesse von Bakterien und Viren, der Metastasis von Tumoren, der Zell-Zell-Kommunikation oder der Zell-Matrix-Interaktion. Sie können auch als Liganden für Bindungsereignisse dienen oder Zielstrukturen maskieren. Dieser weitreichende Bereich der kohlenhydrat-abhängigen Erkennungsphänomene auf zellulärer Ebene bedient ein großes Forschungsfeld, die Glycobiologie.^[4,5]

In der Natur wird die Glycosylierung von Proteinen unter anderem genutzt, um Polarität, Löslichkeit und Stabilität zu modifizieren. Dabei stellt sie aufgrund der möglichen Diversität die komplexeste Form der posttranslationalen Modifikation von Proteinen dar. Diese Kohlenhydrat-Spezies kann dabei entweder *O*- oder *N*-glycosidisch an das Protein gebunden werden. Betrachtet man die Glycobiosynthese spielen die Glycosyltransferasen (GTs) eine wichtige Rolle.^[5,6]

Ein eindrucksvolles Beispiel für die Wichtigkeit der zellspezifischen Glycosylierung ist die Differenzierung der Blutgruppen, die auf Existenz von verschiedenen Blutgruppenderminanten auf der Oberfläche von Erythrozyten zurückzuführen ist.^[7]

3.1 Glycosyltransferasen

Etwa zwei Drittel aller Proteine liegen glycosyliert vor und stellen eine der wichtigsten und anspruchsvollsten Modifikationen dar.^[8] Die Glycosylierung erfolgt dabei durch verschiedene Prozesse im endoplasmatischen Retikulum (ER) und teilweise im Golgi-Apparat, wobei sie hauptsächlich über eine *O*- oder *N*-glycosidische Bindung miteinander verknüpft sind. Die *O*-Glycosylierung erfolgt durch eine kovalente Bindung an eine Hydroxylgruppe der Aminosäuren Serin oder Threonin, während die *N*-Glycosylierung durch die Bindung an eine Amidgruppe eines Asparagins erfolgt.

Bei den meisten Enzymen, die an der Biosynthese von komplexen Kohlenhydratstrukturen, wie beispielsweise Glycoproteinen, Glycolipiden oder Glycokonjugaten beteiligt sind, handelt es sich um Glycosyltransferasen (GTs).^[6,9,10] Die meisten GTs sind als Typ II der Transmembranproteine im Golgi-Apparat lokalisiert und können bis zu zwei Prozent der Genprodukte eines Organismus ausmachen.^[10,11]

Die GTs zeichnen sich durch ihre hohe Spezifität bezüglich ihrer Substrate sowie der Regio- und Stereospezifität der katalysierten Transglycosylierungsreaktionen aus. In Abbildung 1 ist der regio- und stereospezifische Transfer schematisch dargestellt und zeigt, wie eine Glycosyl-Einheit von einem aktivierten Donorsubstrat auf ein spezifisches Akzeptorsubstrat übertragen wird. Der Transfer der Glycosyl-Einheit auf das Akzeptormolekül ist dabei abhängig vom jeweiligen Enzym und erfolgt unter Inversion oder Retention der anomeren Konfiguration, wodurch α - und β -Glycoside aus dem gleichen Donorsubstrat erhalten werden können.^[9,10]

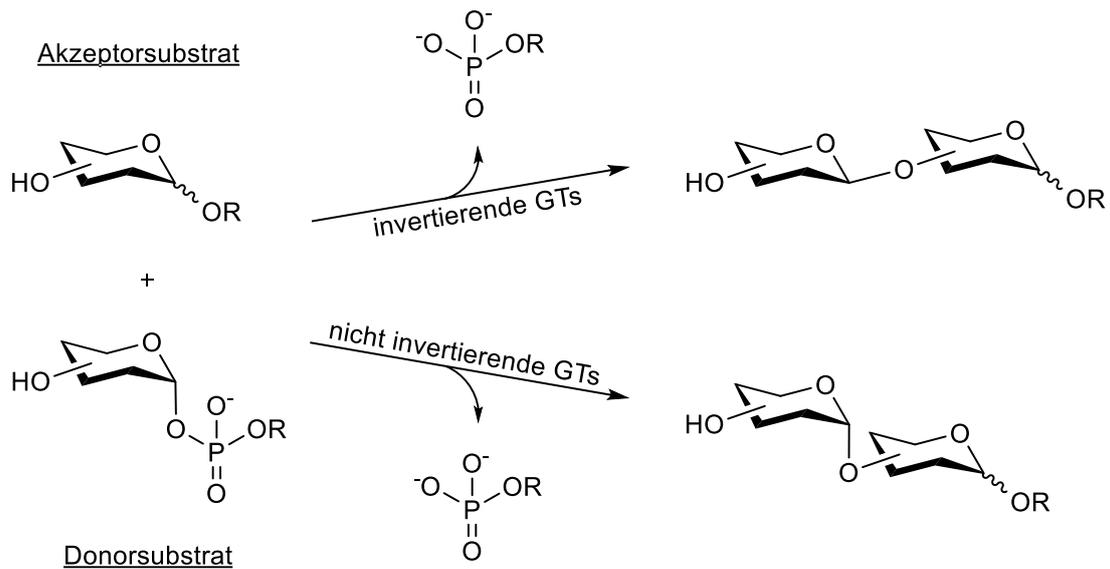


Abbildung 1: Schematische Darstellung einer durch Glycosyltransferasen katalysierten Reaktion. Unter Inversion oder Retention der anomeren Konfiguration wird von einem Donorsubstrat eine Glycosyl-Einheit auf ein Akzeptorsubstrat übertragen. Als Nebenprodukt wird ein Nucleosidmonophosphat (NMP) oder Nucleosiddiphosphat (NDP) erhalten.^[10]

Bedingt durch die hohe Beteiligung der GTs an den unterschiedlichsten Biosynthesen existiert eine große Anzahl an möglichen Akzeptormolekülen. Meist liegen die Akzeptorsubstrate als Kohlenhydrate mit einer Hydroxylfunktion vor, jedoch kann die Übertragung auch auf Lipide, Proteine, Nucleinsäuren, Antibiotika oder Naturstoffe erfolgen. Die aktivierten Donorsubstrate liegen hauptsächlich als Nucleosidzucker vor, sind aber auch in einigen Fällen als unsubstituierte Phosphatzucker oder Lipidphosphatzucker vertreten.^[10,12]

3.1.1 Strukturelle Eigenschaften von Glycosyltransferasen

Die meisten Glycosyltransferasen sind vom Typ II der Transmembranproteine, die im Golgi-Apparat lokalisiert sind. Im endoplasmatischem Retikulum (ER) liegen sie überwiegend als Multitransmembranproteine vor.^[11] Dabei setzen die GTs sich aus einem kurzen NH₂-terminalen, cytoplasmatischen Schwanz (**C**), der in der Zelle liegt, gefolgt von einer transmembranen Domänen (**T**), die sogenannte *Stem*-Region (**S**) und einer am Ende liegenden, großen COOH-terminalen, katalytischen Domäne zusammen.^[9,11] In Abbildung 2 ist die Struktur einer Glycosyltransferase, kurz **CTS**, schematisch dargestellt.

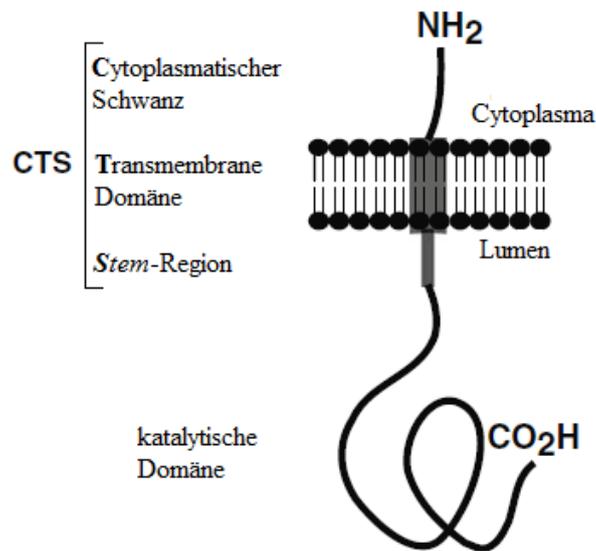


Abbildung 2: Schematische Darstellung des modularen Aufbaus von Glycosyltransferasen. Die Regionen sind eingeteilt in den cytoplasmatischen Schwanz (C), der Transmembran-Region (T) und der Stem-Region (S). Zusammengefasst als **CTS**.^[11]

Die Glycosyltransferasen weisen fast alle denselben Aufbau auf. Unterschieden werden sie hauptsächlich anhand der Homologien ihrer Primärsequenzen, wobei sie in unterschiedliche Familien eingeteilt sind.^[6,13] Bis heute sind 116 Familien mit über einer Million GTs bekannt, die in der CAZy Datenbank (*Carbohydrate Active enZyme database*) hinterlegt sind (Stand: März 2023).^[14]

3.1.2 Klassifizierung von Glycosyltransferasen

Die Einteilung von Glycosyltransferasen richtet sich nach der Identität des transferierten Kohlenhydrats (Akzeptorsubstrat), der gebildeten anomeren Verknüpfung und den Verknüpfungspositionen. So unterscheidet man bezüglich der Stereochemie am anomeren Zentrum des gebildeten Produktes zwischen invertierenden und nicht-invertierenden Glycosyltransferasen.^[15]

Eine spezifischere Klassifizierung der GTs richtet sich nach dem Faltungsmuster der Enzyme. Bislang konnten lediglich nur die drei Faltungstypen GT-A, GT-B und GT-C gefunden werden, obwohl eine weitreichende Diversität an Gensequenzen, die in Familien eingeteilt sind, bekannt ist.^[6,10]

Glycosyltransferasen mit dem Faltungstyp GT-A sind vor allem im Golgi-Apparat lokalisiert.^[16] Sie besteht aus zwei nah aneinandergrenzenden $\beta/\alpha/\beta$ -Rossmann-Domänen, in der die β -Faltblätter über die α -Helices alternierend miteinander verbunden sind (Abbildung 3).

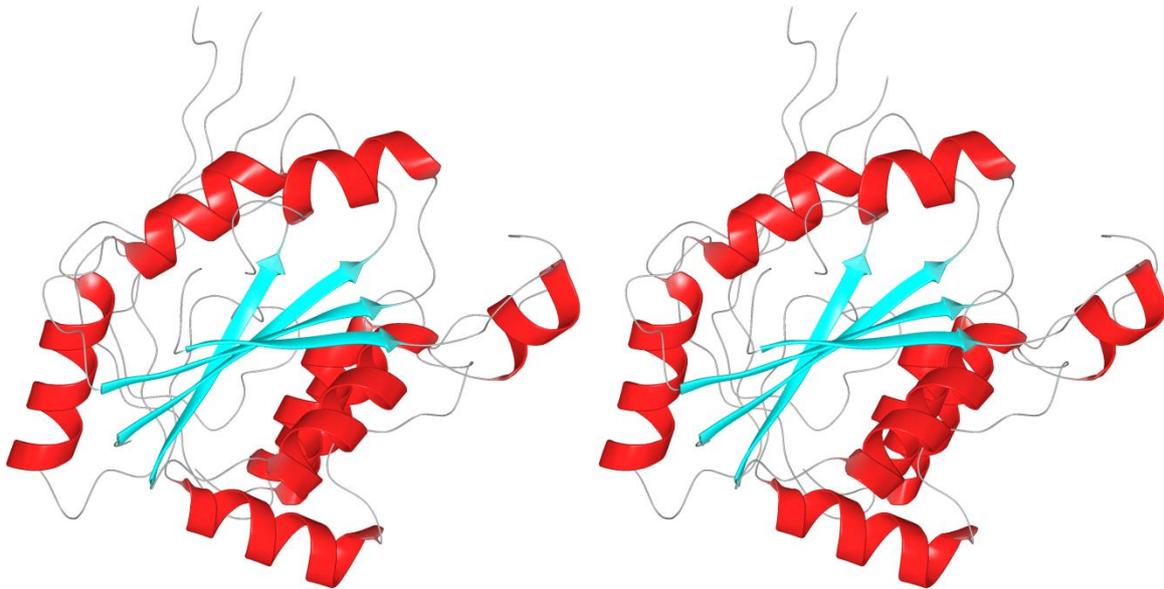


Abbildung 3: *Crossed eye* Darstellung des Faltungsmusters GT-A am Beispiel des invertierten Enzyms SpsA aus *Bacillus Subtilis* (PDB: 1qgq). Sie ist aus zwei eng aneinandergrenzenden $\beta/\alpha/\beta$ -Rossmann-Domänen aufgebaut.^[10,16]

Rossmann-Domänen sind ein typisches Strukturelement von Nucleotid-bindenden Enzymen. Dabei bilden das zentrale β -Faltblatt und ein angrenzendes kleineres durch ihre Assoziation das aktive Zentrum des Enzyms.^[6,17] Des Weiteren besitzen die Enzyme der GT-A Familie meist das sogenannte DXD-Motiv (Asp-X-Asp) in ihrer Aminosäuresequenz. Dabei sind sie koordinativ von der Anwesenheit eines bivalenten Metallkations (Mn^{2+} oder Mg^{2+}) abhängig, welches wiederum für die katalytische Funktion wichtig ist, da es mit dem Diphosphat des Donors interagiert. Die variable Aminosäure X in dem Motiv ist meistens eine polare oder aliphatische Aminosäure, die an der Bindung des Ribonukleotids beteiligt ist.^[18,19] Für die Erkennung des Akzeptorsubstrates dient meistens die große COOH-terminale katalytische Domäne der Glycosyltransferase.^[6,11] Es existieren aber auch Glycosyltransferasen die kein DXD-Motiv aufweisen, da das DXD-Motiv nicht konserviert ist und trotzdem dem Faltungstyp der GT-A folgt.^[20]

Im Vergleich zur Faltung der GT-A ist der Faltungstyp GT-B strukturell weniger einheitlich. Die Glycosyltransferasen der GT-B sind deutlich heterogener und kommen hauptsächlich in Prokaryoten vor.^[21] Dabei besteht die GT-B Faltung aus zwei separaten $\beta/\alpha/\beta$ -Rossmann-Domänen, die gegenüber der GT-A flexibler miteinander verknüpft sind. Sie liegen sich gegenüber, wodurch sich eine Spalte bildet, in der das katalytische Zentrum der GT-B lokalisiert ist (Abbildung 4).^[10,16]

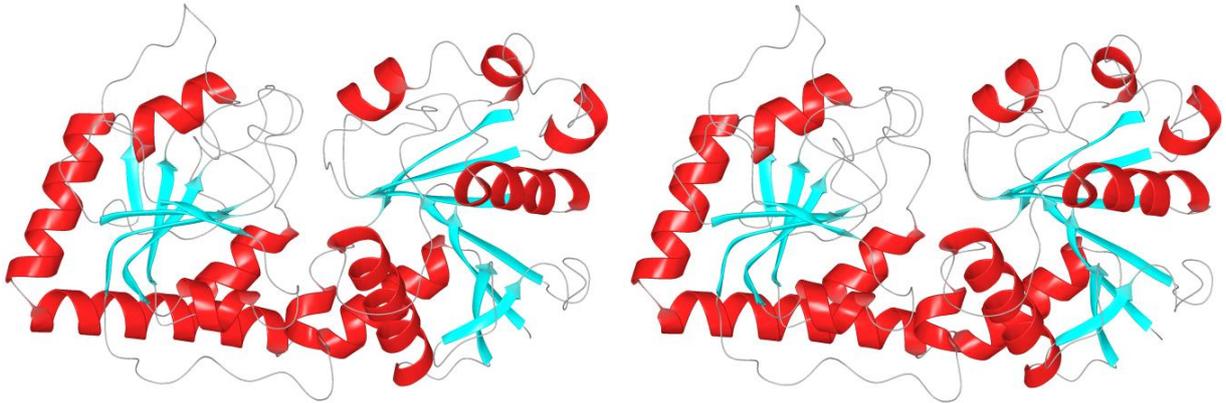


Abbildung 4: *Crossed eye* Darstellung des Faltungsmusters der GT-B am Beispiel des DNA-modifizierten Enzyms β -Glucosyltransferase aus bacteriophage T4 (PDB: 1jg7). Sie ist aus zwei separaten $\beta/\alpha/\beta$ -Rossmann-Domänen aufgebaut, die flexibel miteinander verknüpft sind und dabei eine katalytisch, aktive Spalte ausbilden.^[22]

Strukturelle Übereinstimmungen der GT-B Faltung gegenüber der GT-A Faltung treten vor allem im Bereich der COOH-terminalen Domäne auf. Eine größere Variabilität liegt hingegen in der NH₂-terminalen Domäne, die dem aktiven Zentrum zugewandt ist und somit eine größere Diversität an Akzeptoren aufzeigen. Des Weiteren scheint die Bindung eines bivalenten Metallions beim GT-B Typ für die Katalyse nicht essentiell zu sein, allerdings könnte die Koordination eines Metallions wichtig für die vollständige Aktivität des Enzyms sein.^[6]

Glycosyltransferasen, die eine GT-C Faltung aufweisen, können sowohl im ER als auch in der Plasmamembran vorliegen. Die GT-C Faltung wurde durch iterative Sequenzvergleiche vorhergesagt und entspricht dabei einem hydrophoben Membranprotein mit 8 bis 13 Transmembranhelices.^[23] Mittlerweile konnte eine Vielzahl von Strukturen, die der GT-C Faltung folgen, gefunden werden. Sie übertragen dabei hauptsächlich Lipidphosphatzucker als Donorsubstrat.^[10]

Trotz intensiver Forschung konnte bis heute noch kein Zusammenhang zwischen einem Faltungstyp einer Glycosyltransferase und der Stereochemie des gebildeten Produktes bei der Katalyse gefunden werden.^[15]

3.2 Sialinsäuren

Sialinsäuren sind eine Familie, die eng mit den 2-Keto-3-desoxy-nonulonsäuren verwandt ist und auf Grund ihrer variablen Struktur über 50 natürliche Derivate der Neuraminsäure aufzeigt. Die dabei am häufigsten auftretende Form ist das Derivat der *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac). Nebenbei ist noch die *N*-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc) in vielen Tierarten zu finden, welche durch die Hydroxylierung der Acetylgruppe gebildet wird und beim Menschen im Laufe der Evolution ausgesetzt wurde.^[24,25]

Hauptsächlich sind die Sialinsäuren α -2,3- oder α -2,6-glycosidisch an Galactose (Gal), α -2,6-glycosidisch an *N*-Acetylgalactosamin (GalNAc) oder α -2,8-glycosidisch an eine weitere Sialinsäure (Sia) gebunden und meistens an Oligosaccharidketten von Glycoproteinen oder Glycolipiden zu finden, wo sie eine terminale Position einnehmen. Dadurch weisen sie eine weitreichende Funktionsvielfalt auf und haben einen hohen Einfluss auf die Eigenschaften der gebundenen Glycane, wodurch sie eine wichtige Rolle bei biologischen und pathologischen Prozessen spielen.^[24] Sie sind in der Lage antigene Strukturen und Rezeptoren zu maskieren und so Moleküle und Zellen vor der Erkennung und dem Abbau durch das Immunsystem zu schützen. Des Weiteren sind sie in vielen Körperflüssigkeiten, Nervenzellen oder auch auf Zelloberflächen zu finden und an einer Vielzahl von zellulären Interaktionen, Differenzierungen und onkogenen Transformation beteiligt. So sind sie z.B. eine wichtige Komponente bei der Immunantwort und Hämostase oder sind an biologischen Erkennungsphänomenen, wie z.B. den Wechselwirkungen einer Virus-Zelle mit einigen Influenza-, Polyoma- oder Cosackie-Viren, beteiligt.^[26,27] Kommt es zu einer Änderung bzw. Störung des Glycosylierungsmusters kann dies zu einer Übersialylierung auf Zelloberflächenproteinen (Hypersialylierung) führen, welche meistens mit einer Invasion und Metastasierung einher gehen.^[28]

3.2.1 Sialyltransferasen

Sialyltransferasen (STs) sind eine Familie der Glycosyltransferasen, die eine wesentliche Rolle in der Biosynthese von Sialinsäuren an Oligosaccharide oder Glycokonjugate einnimmt. Sie sind vom Typ II der Transmembranproteine, die im Golgi-Apparat lokalisiert sind und in der CAZy Datenbank in fünf verschiedene Familien eingeteilt sind. Die ST-Sequenzen der Viren und Eukaryoten sind der Familie der GT29 zugeordnet. In die Familien der GT38, GT42, GT52 und GT80 sind die bakteriellen ST-Sequenzen eingeordnet.^[14,29] Alle STs katalysieren metallunabhängig den Transfer von Sialinsäuren vom aktiven Donorsubstrat CMP-Neu5Ac

unter Inversion des anomeren Zentrums auf eine endständige Hydroxylgruppe einer Akzeptorstruktur.^[30,31] Mechanistisch soll dabei ein nucleophiler Angriff der Hydroxylgruppe des Akzeptors, die zuvor durch eine katalytische Base im Enzym deprotoniert wurde, an das anomere Zentrum der Sialinsäure des Donors erfolgen.^[32,33] Als katalytische Base fungiert in den Familien GT29 und GT42 ein Histidinrest, während ein Asparaginsäurerest in den STs von GT52 und GT80 als Base dient.^[34-38]

Die humanen Sialyltransferasen umfassen etwas mehr als 20 Glycosyltransferasen, die in die ST3Gal-, ST6Gal-, ST6GalNAc- und ST8Sia-Familien unterteilt sind.^[31] Die Einteilung richtet sich nach der glycosidischen Bindung, die sie eingehen sowie nach dem übertragenden Akzeptorsubstrat.

Eine wichtige Rolle nehmen die Sialyltransferasen bei Krebszellen ein. Hierbei ist die Expression von Sialyltransferasen oft dereguliert, was meist zu einer erhöhten Sialylierung auf der Zelloberfläche von Proteinen und Lipiden führt und verschiedene Eigenschaften mit sich bringt. So können Zell-Zell-Wechselwirkungen durch ladungsabhängige Abstoßungen verhindert, spezifische Zell-Zell-Kontakte durch z.B. Selektine^[39] oder Siglec^[40] vermehrt ermöglicht oder auch die Erkennung für andere Lektine unterbunden werden. Dies geschieht, indem andere Kohlenhydratmoleküle maskiert werden.^[28]

Auf Grund der hohen Relevanz wurden diese Eigenschaften in verschiedenen Studien untersucht und es zeigte sich, dass die Veränderung der Zellsialylierung und die erhöhte Aktivität von Sialyltransferasen mit vielen Krebsarten und der Entwicklung von Metastasen einhergeht.^[41-46]

Eine Vielzahl an Sialyltransferasen wurden in Bezug auf Krebs untersucht, wobei die humane β -Galactosid α -2,6-Sialyltransferase I (ST6Gal-I) am meisten Beachtung fand, da deren Expression oft mit einer erhöhten Aggressivität von Tumoren und der Metastasierung korreliert und somit eine erfolgreiche Behandlung verhindert. Die ST6Gal-I ist in zahlreichen Karzinomen, wie z.B. Bauchspeicheldrüsen-, Brust-, Eierstock- und Prostatakrebs, hochreguliert und kann das Wachstum von Metastasen bzw. die Aggressivität von Tumoren stark beeinflussen.^[47-51]

3.2.2 β -Galactosid α -2,6-Sialyltransferase I (ST6Gal-I)

Die humane ST6Gal-I (EC 2.4.99.1; P15907) bildet mit der ST6Gal-II die Familie der ST6, die zu der CAZy-Familie der GT29 gehören.^[14] Beide katalysieren den Transfer der Sialinsäure (Neu5Ac) vom Donorsubstrat CMP-Neu5Ac auf eine Hydroxylgruppe einer endständigen Galactose eines Disaccharids (Gal- β 1-4-GlcNAc).^[52,53] Sie unterscheiden sich in ihrer

3 Einleitung

Substratspezifität und weisen eine Übereinstimmung ihrer Aminosäuresequenz von nur 48.9 % auf.^[54]

Der vorgeschlagene Mechanismus der humanen ST6Gal-I erfolgt über einen nucleophilen Angriff der zuvor deprotonierten 6'-Hydroxylgruppe der Galactose des Akzeptordisaccharids unter Inversion des anomeren Kohlenstoffs der vom Donor übertragenden Sialinsäure. Hierbei wird ein oxocarbenium-ähnlicher Übergangszustand angenommen, wobei das Histidin370 als katalytische Base und das CMP als Abgangsgruppe fungieren (Abbildung 5).^[55-57] Diese Eigenschaften weisen darauf hin, dass die ST6Gal-I als invertierende Glycosyltransferase fungiert und die Reaktion nach einem S_N2-ähnlichen Mechanismus abläuft.^[10]

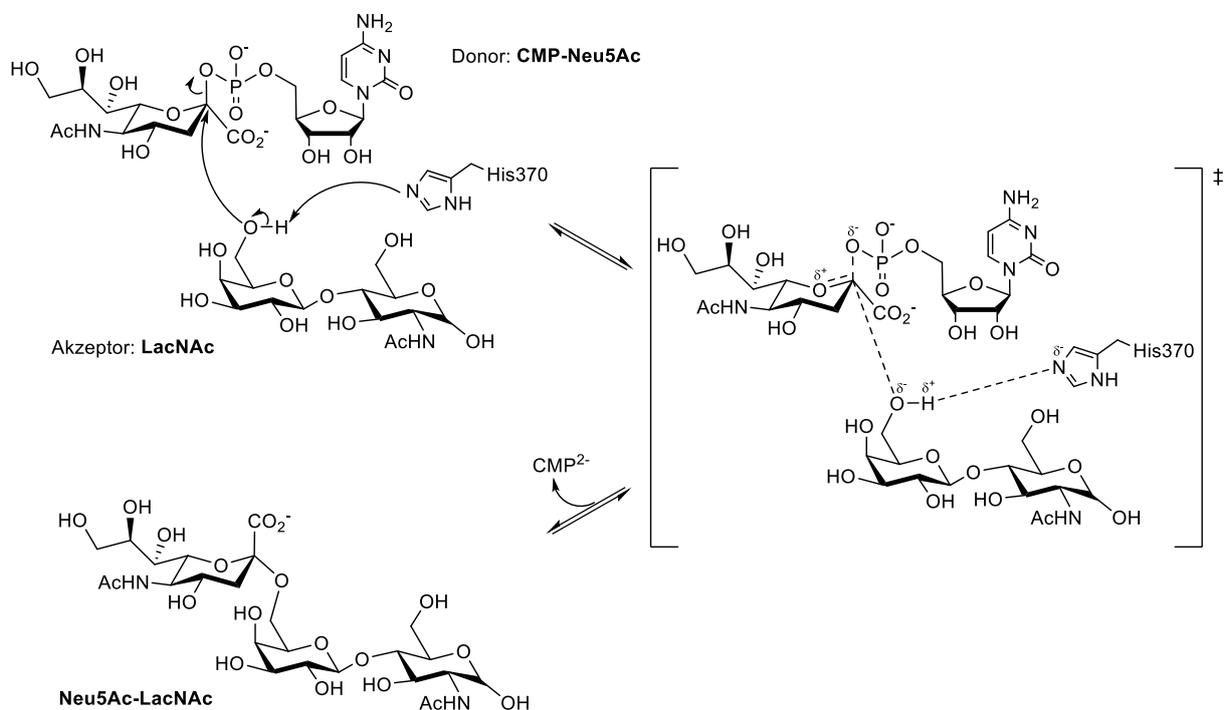


Abbildung 5: Vorgeschlagener Mechanismus der humanen ST6Gal-I. Angenommen wird ein direkter Substitutionsmechanismus, der über einen oxocarbenium-ähnlichen Übergangszustand unter Inversion der anomeren Konfiguration verläuft und das His370 als katalytische Base fungiert.^[55-57]

Wie die meisten eukaryotischen Sialyltransferasen ist die humane ST6Gal-I in der Membran des Golgi-Apparats lokalisiert, deren Primärsequenz sich aus den vier charakteristischen Regionen zusammensetzt: einem kurzen NH₂-terminalen, zytoplasmatischen Schwanz, einer transmembranen Domäne, der *Stem*-Region und einer großen COOH-terminalen, katalytischen Domäne (siehe Kapitel 3.1.1). Die transmembrane Domäne und die *Stem*-Region enthalten die Lokalisierungssignale des Golgi-Apparates, während sich innerhalb der großen,

katalytischen Domäne die sogenannten Sialylmotive *L* (groß), *S* (klein), *III* (dritte Sequenzposition) und *VS* (sehr klein) befinden. Die vier Motive weisen eine signifikante Sequenzkonservierung der sonst kaum vorhandenen Gesamtsequenzübereinstimmung von eukaryotischen STs auf und sind unterschiedlichen Funktionen zugeteilt.^[58-60] Die Motive *L* (Trp181-Gly224; nach der ST6Gal-I Sequenzbezeichnung) und *III* (Tyr354-Gln357) sind an der Bindung des Donorsubstrats CMP-Neu5Ac beteiligt, während das Motiv *S* (Pro321-Phe343) sowohl an der Bindung des Donors- als auch des Akzeptorsubstrats involviert ist und das Motiv *VS* (His370-Glu375) nimmt mit dem His370 an der katalytischen Reaktion des Proteins teil (Abbildung 6).^[61,62] Zudem bilden die invarianten Cysteinreste der beiden Motive *L* und *S* eine intramolekulare Disulfidbrücke aus, die für die Aufrechterhaltung der aktiven Konformation des Enzyms essenziell ist.^[37,61] Die ersten 80 Aminosäuren der humanen ST6Gal-I, die den zytoplasmatischen Schwanz, die transmembrane Domäne und die Stem-Region umfassen, zeigen keine besondere Aktivität im Enzym und können z.B. bei *in silico* Berechnungen ohne Beeinträchtigung ausgelassen werden (Abbildung 6).^[62,63]

Die erste Primärsequenz einer ST6Gal-I konnte im Jahre 1987 mit einer cDNA geklonten Struktur aus der Leber einer Ratte von J. Weinstein *et al.* erhalten und zweieinhalb Jahre später von U. Grundmann *et al.* komplett decodiert werden.^[64,65] Erst knapp 20 Jahre später gelang es F. Rao *et al.* mit der ST3Gal-I vom Schwein (PDB: 2WML, 2WNB, 2WNF) die erste Kristallstruktur eines Säugetiers erfolgreich zu erhalten.^[37] Vier Jahre später wurden die ersten Kristallstrukturen der Sialyltransferase ST6Gal-I publiziert, die vom Organismus des Menschen (PDB: 4JS1, 4JS2) und der Ratte (PDB: 4MPS) stammen.^[56,57] Insgesamt existieren nur wenige Kristallstrukturen von eukaryotischen Sialyltransferasen, da sie meist als membrangebundene Proteine vorliegen, was eine erfolgreiche Kristallisation stark erschwert.

In Abbildung 6 ist die Kristallstruktur der humanen β -Galactosid α -2,6-Sialyltransferase I von B. Kuhn *et al.* aus dem Jahr 2013 mit dem Produkt CMP im Komplex, sowie eine dazugehörige schematische Zeichnung der AS-Sequenz dargestellt.^[57]

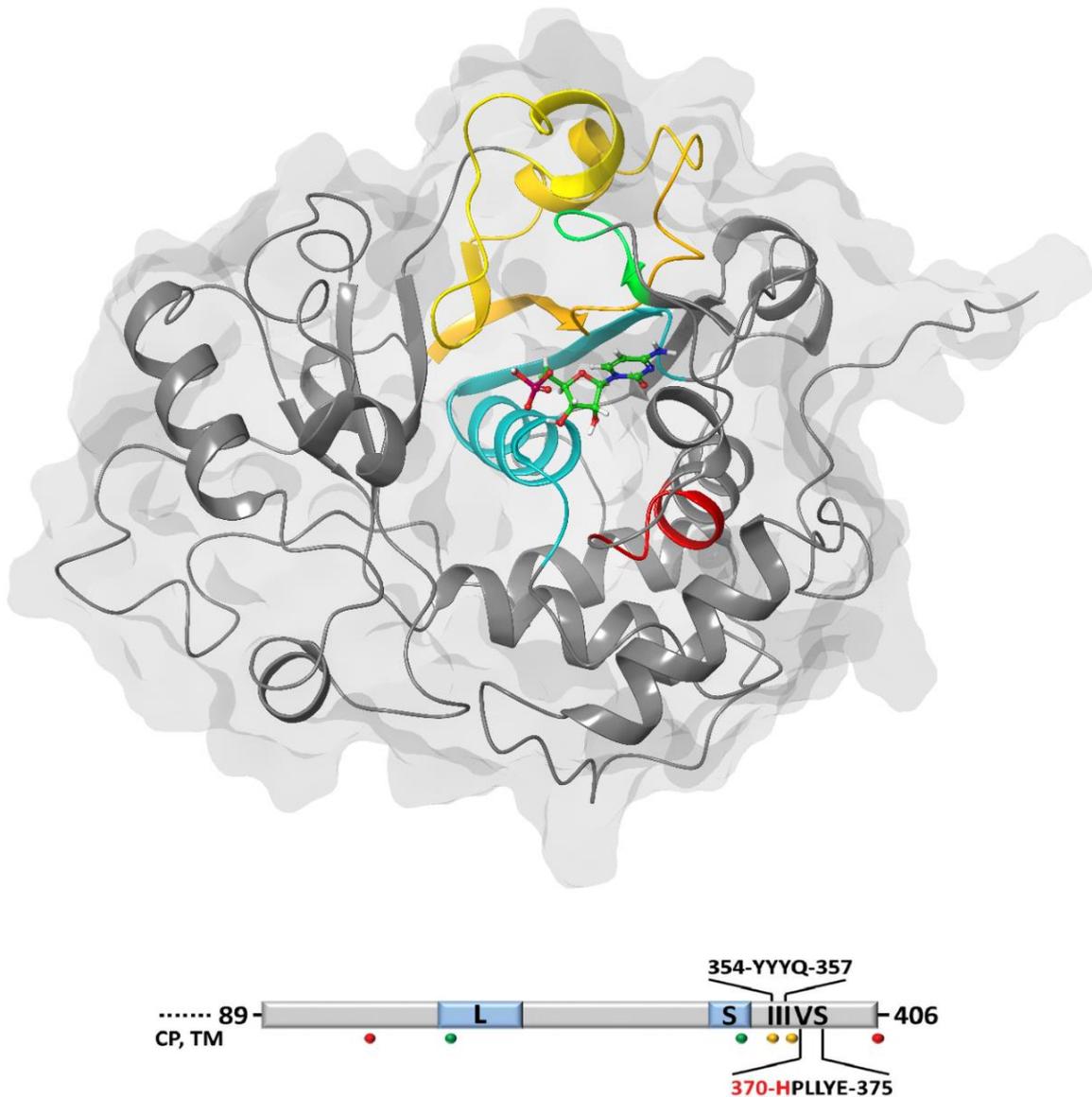


Abbildung 6: a) Darstellung der Kristallstruktur der humanen ST6Gal-I (PDB: 4JS2) mit dem CMP im Komplex (eingefärbtes Stäbchenmodell) und der farblich hervorgehobenen Sialymotive *L* (gelb), *S* (türkis), *III* (grün), *VS* (rot); b) Schematische Darstellung der humanen AS-Sequenz von ST6Gal-I. Die ersten 88 AS beinhalten den zytoplasmatischen Schwanz, die transmembrane Domäne und die *Stem*-Region. In der großen, katalytischen Domäne sind die relative Größe und Position der vier Sialymotive *L*, *S*, *III* und *VS* eingezeichnet. Das *VS*-Motive beinhaltet die katalytische AS His370, die rot markiert ist. Die roten, grünen und gelben Punkte zeigen paarweise die vorhandenen Disulfidbrückenbindungen zwischen Cys142-Cys406, Cys184-Cys335, sowie Cys353-Cys364 auf.^[57]

Die humane Struktur der ST6Gal-I nimmt eine GT-A Faltung (Variante 2) ein, wobei ein zentrales, siebensträngiges β -Faltblatt von mehreren α -Helices flankiert wird und sie weist drei intramolekulare Disulfidbrückenbindungen von Cys142-Cys406, Cys184-Cys335, sowie

Cys353-Cys364 auf. Das in der Kristallstruktur vorliegende CMP weist eine Bindung zu der Ribose in einer 3'-endo Konformation auf, die über Wechselwirkungen mit einer SerSerGly-Sequenz innerhalb des Sialylmotivs S erzeugt wird. Die Disulfidbrückenbindung Cys353-Cys364 liegt in einer wohldefinierten Schleife, die sich oben auf das Nukleosid legt. Diese beobachtete Bindung zeigt, dass die 6'-Hydroxylgruppe der endständigen Galactose des Akzeptors in der Nähe des His370 liegt und diese als katalytische Base in der ST6Gal-I fungiert. Zudem zeigt die humane ST6Gal-I einen großen N-terminalen Anhang über die Aminosäuren 89-136 auf, die an der Substratbindung beteiligt sind. Die ersten vier N-terminalen AS (89-92) werden durch Kristallkontakte stabilisiert, wodurch die katalytische Domäne bei der AS Phe93 beginnt.^[57]

3.2.3 Inhibitoren der humanen Sialyltransferasen

Wie in den vorherigen Abschnitten beschrieben, geht eine Veränderung der Zellsialylierung bzw. eine Überexpression der humanen Sialyltransferase ST6Gal-I mit einer erhöhten Aggressivität von Tumoren und Metastasierung von unterschiedlichen Krebsarten einher.^[47-51] Um ein besseres Verständnis der ablaufenden, biologischen Prozesse zu erlangen und den daraus entwickelten Krankheiten entgegenwirken zu können, wurden im Laufe der Zeit eine Vielzahl von Inhibitoren entwickelt und bezüglich der Hemmung des Enzyms untersucht.^[66-69] Die meisten der entwickelten Inhibitoren von Sialyltransferasen sind substratbasierte Analoga des Donorsubstrats CMP-Neu5Ac, des Akzeptorsubstrats oder des strukturell angenommenen oxocarbenium-ähnlichen Übergangszustandes. Des Weiteren wurden auch Naturprodukte oder aromatische Analoga gefunden, die eine starke Inhibierung des Enzyms aufweisen.

Analoga des Akzeptors bestehen hauptsächlich aus modifizierten Disacchariden, die zwar allgemein eine höhere Spezifität gegenüber Donoranaloga aufweisen, jedoch mit einer geringen Affinität einhergehen. In Folge dessen zeigen sie nur schwache Inhibitionskonstanten auf, die im Bereich der Stabilitätskonstante des natürlichen Enzym-Akzeptorsubstrat-Komplexes ($K_M = 900 \mu\text{M}$) liegen.^[70,71] Y. Kajihara *et al.*^[72] entwickelten verschiedene Arten des Akzeptors LacNAc, indem sie die 6'-Hydroxylgruppe der endständigen Galactose mit Desoxy-, O-THP-, Mercapto- und Disulfid-Gruppen modifizierten (Abbildung 7, **1**, **2**, **3**, **4**). Diese zeigten nur eine mäßige Hemmung der Sialyltransferase ST6Gal-I ($K_i = 760 - 4140 \mu\text{M}$) auf und führten zu der Aussage, dass die 6'-Hydroxylgruppe keine essentielle Aufgabe für die Bindung des Substrats einnimmt.^[70] Im Laufe der Jahre erfolgten weitere Modifizierungen des Akzeptorsubstrats durch andere Arbeitsgruppen, die jedoch ebenfalls nur mit mittelmäßigen Inhibitionskonstanten einhergingen.^[73-75]

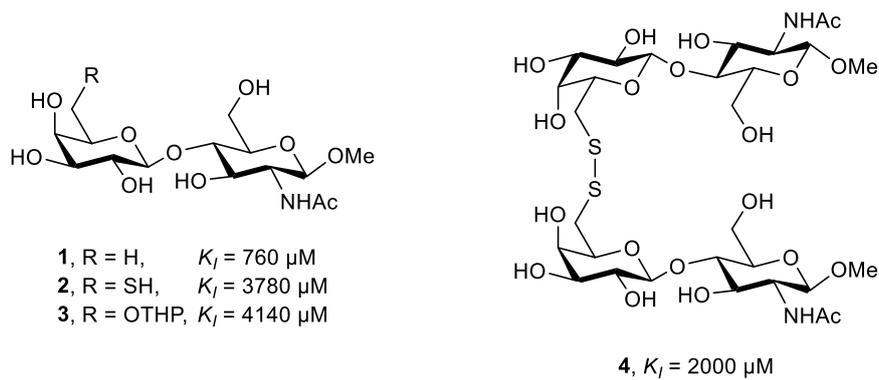


Abbildung 7: Darstellung einiger akzeptoranalogen Inhibitoren der α -2,6-Sialyltransferase.^[72]

Das natürliche Donorsubstrat CMP-Neu5Ac besteht aus drei Teilen, die auf der Suche nach Analoga des Donorsubstrats ausgetauscht bzw. modifiziert werden können: dem Cytidin, dem Phosphordiester und der Sialinsäure. Die ersten donoranaloge Inhibitoren, die untersucht wurden, waren die natürlichen Nukleotide CMP, CDP und CTP ($K_i = 16 - 50 \mu\text{M}$).^[76] Die stetigen Modifikationen der Ribose und dem Cytosin, sowie die Variationen der Phosphatgruppe (**5**)^[77,78] zeigten, dass die Ribose und das Cytosin zusammen für die hohe Affinität sorgen und für die Bindung an ein Enzym essentiell sind. Somit stellt die Cytidin-Komponente die minimalste Einheit eines donoranaloge Inhibitors dar, um einen inhibitorischen Effekt aufweisen zu können.^[33,79,80] Es folgten eine Vielzahl von weiteren Inhibitoren, die hauptsächlich im Bereich der Sialinsäure modifiziert wurden. Einer der potentesten, donoranaloge Inhibitoren ist das CMP-3-F-Neu5Ac (**6**) mit einer Inhibitionskonstante von $K_i = 5.7 \mu\text{M}$, welcher auch zu einer Referenzverbindung für weitere Inhibitionsuntersuchungen fungierte.^[81]

3 Einleitung

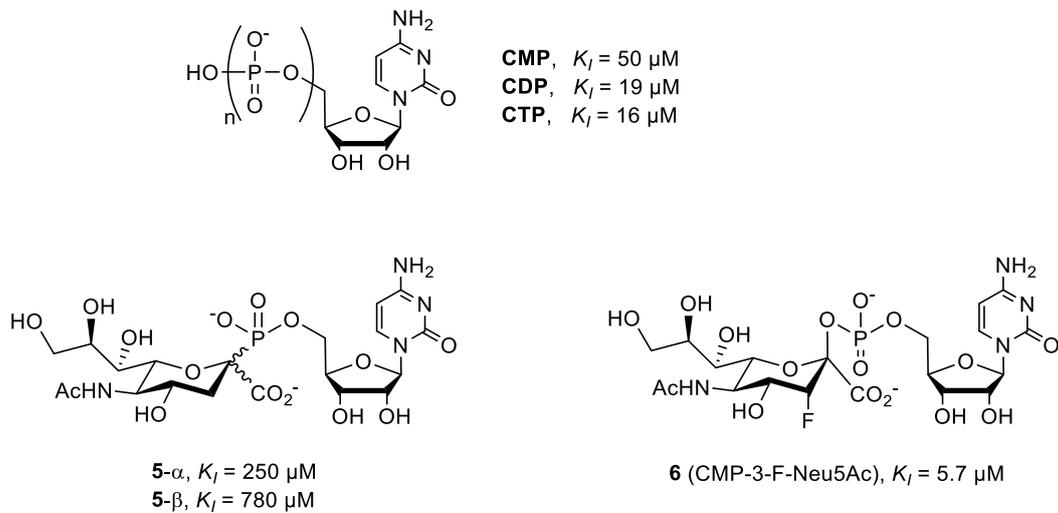


Abbildung 8: Darstellung einiger donoranalogen Inhibitoren der α -2,6-Sialyltransferase.^[76,78,81]

Inspiziert durch die strukturelle Annahme des oxocarbenium-ähnlichen Übergangszustands der Sialyltransferasen und den erhaltenen Informationen aus den Untersuchungen der donoranalogen Inhibitoren entwickelte die Gruppe um R. R. Schmidt potente Inhibitoren, die als sogenannten Übergangszustandsanaloga bezeichnet werden.^[33,82] Sie stellten dazu drei Strukturmerkmale auf, die jeder Übergangszustandsanaloge Inhibitor aufweisen sollte: 1. eine sp^2 -Hybridisierung am anomeren Kohlenstoff, 2. ein erhöhter Abstand zwischen dem anomeren Kohlenstoff und der Abgangsgruppe CMP und 3. mindestens zwei negative Ladungen mit einem Abstand von etwa fünf Bindungen.^[67] So führten sie am anomeren Zentrum der Sialinsäure eine Doppelbindung ein, um dort die planare Geometrie des oxocarbenium-ähnlichen Übergangszustandes nachzuahmen. Zudem fügten sie ein zusätzliches Kohlenstoffatom zwischen dem anomeren Kohlenstoff und der Phosphatgruppe ein, um den im Übergangszustand vergrößerten Abstand zwischen den beiden Atomen zu erhalten.^[33,83] Der anschließende Austausch der Carbonsäure durch ein Phosphonat führte zu einer 130-fachen Verbesserung der Affinität (Abbildung 9, **7**) gegenüber dem Donorsubstrat CMP-Neu5Ac ($K_M = 46 \mu\text{M}$).^[33,84] Diese positiven Ergebnisse motivierten sie zu der Entwicklung weiterer Übergangszustandsanalogen Inhibitoren, in denen die Sialinsäure weiter modifiziert (Abbildung 9, **8**)^[85] oder komplett durch aromatische Gruppen, wie Phenyl- und Furyl-Gruppen^[82], Heterozyklen^[86] oder substituierte Benzolringe^[83,87] ersetzt wurde.

3 Einleitung

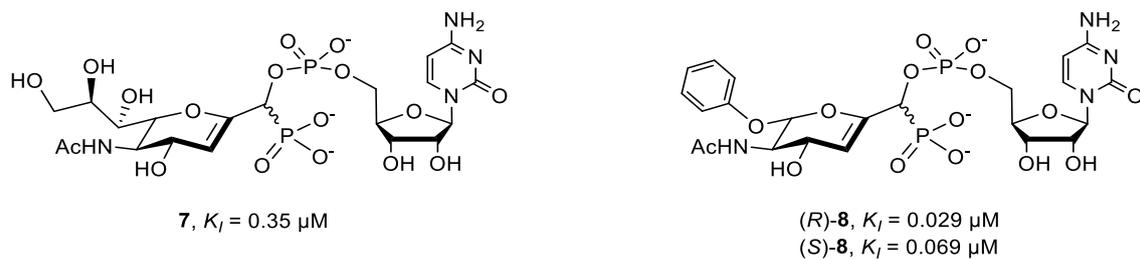


Abbildung 9: Darstellung einiger übergangszustandsanalogen Inhibitoren der α -2,6-Sialyltransferase.^[33,85]

Der Austausch der Sialinsäure durch einfachere Gruppen führte zu einer Vielzahl neuer, potentieller Inhibitoren im niedrigen nanomolaren Bereich und reduzierte den synthetischen Aufwand erheblich. Dieser Erfolg führte allgemein zu einer neuen Herangehensweise auf der Suche nach weiteren Inhibitoren. So entwickelten z.B. W. Li *et al.*^[88] einen der potentesten Inhibitoren gegenüber der humanen ST6Gal-I ($K_I = 0.028 \mu\text{M}$, **10**), indem sie die Sialinsäure durch eine Reihe funktionalisierter Cyclopentan-Ringe austauschten (Abbildung 10).

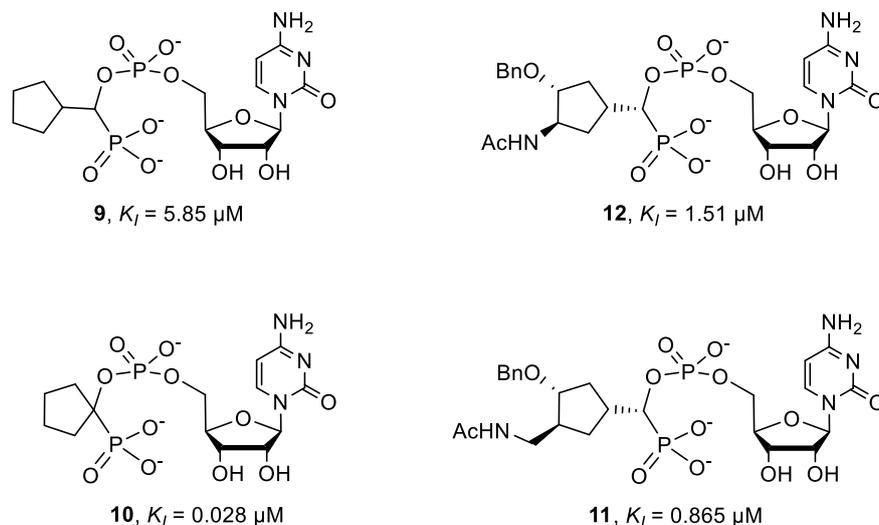


Abbildung 10: Darstellung einer Auswahl von funktionalisierten Cyclopentan-Derivaten als übergangszustandsanalogen Inhibitoren der α -2,6-Sialyltransferase.^[88]

Im Laufe der Zeit wurden eine Vielzahl von hochpotenten Inhibitoren der Sialyltransferasen entwickelt. Allerdings liegen sie hauptsächlich als polare und negative Moleküle vor, was die Zelluntersuchungen bzw. klinischen Studien aufgrund einer schlechten Zellmembranpermeabilität, geringen Bioverfügbarkeit oder möglichem Aktivitätsverlust durch die Spaltung von Phosphatasen, stark erschwert.^[89,90]

Dem gegenüber stehen Naturprodukte, wie Derivate der Lithocholsäure oder Flavonoide, die als potente, zellmembranpermeable Inhibitoren fungieren können (Abbildung 11).^[91-93] Das Steroidderivat Soyasaponin I (**13**) konnte aus Sojabohnen extrahiert werden und zeigte in *in vivo* Assays eine signifikante Inhibierung der Sialyltransferase ST3Gal-I ($K_i = 2.3 \mu\text{M}$).^[91] Neben der guten Zellpermeabilität konnte zudem *in vitro* gezeigt werden, dass es die Zelladhäsion von nichtmetastasierenden Tumorzellen stimuliert und die Zellmigration von metastasierenden Lungenkrebszellen erheblich reduziert.^[94] Weitere potente Naturstoffinhibitoren sind die Lithocholsäure und dessen Derivate (Abbildung 11).^[92] Das aktivste Lithocholsäure-Derivat AL-10 (**14**) ist strukturell mit dem Lith-O-Asp verwandt und ist in der Lage, die Adhäsion und Migration von Zelllinien verschiedener Krebsarten zu inhibieren. Zudem ist dies der erste Sialyltransferaseinhibitor, der *in vivo* eine antimetastatische Wirkung aufzeigte und in biochemischen Assays zu einer 40 %igen Reduktion von Lungenmetastasen führte.^[95] Basierend auf diesen Ergebnissen entwickelten C. W. Fu *et al.* weitere zellmembranpermeable und ungiftige Lith-O-Aminosäure-Inhibitoren, die erfolgreich die Zellmigration von Brustkrebszellen hemmen.^[96]

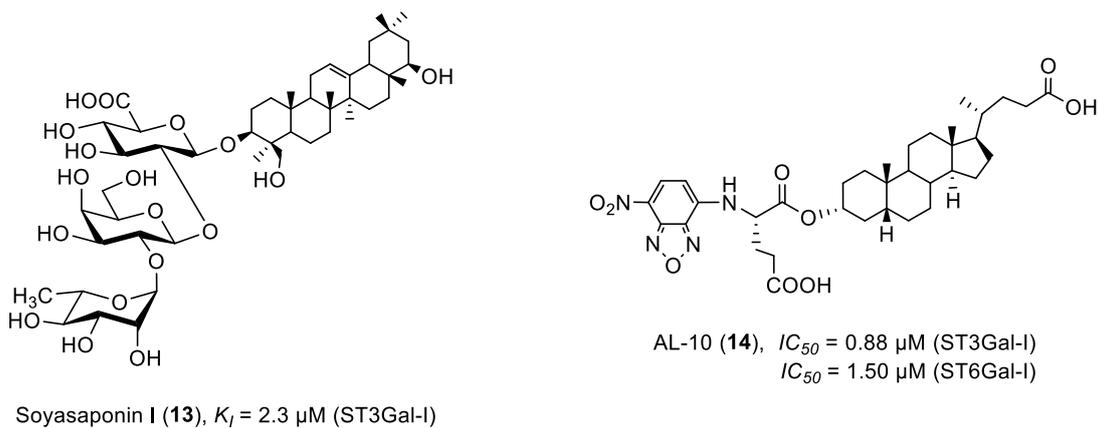


Abbildung 11: Darstellung der auf Naturprodukten basierenden Inhibitoren Soyasaponin I (**13**) und dem Lithocholsäure-Derivat AL-10 (**14**).^[91,95]

3.3 Strukturbasiertes Wirkstoffdesign

Vor mehr als 30 Jahren wurden die ersten automatisierten *de novo* Designtechniken entwickelt, um neuartige, molekulare Strukturen mit gewünschten, pharmakologischen Eigenschaften zu finden. Obwohl dabei viele Herausforderungen zu bewältigen waren, entwickelte sich das computerbasierte Design von möglichen Leitstrukturen, auch bedingt durch den technischen Fortschritt, stetig weiter.^[97] Die Suche nach einem neuen Wirkstoff ist sehr komplex, da der Anspruch für den Einsatz als Medikament sehr hoch ist. Hierbei müssen viele Kriterien, wie eine hohe Spezifität und gute Wirksamkeit als auch eine gute Bioverfügbarkeit, eine lange Wirkungsdauer des Medikaments am Zielort und eine möglichst geringe Toxizität, beachtet werden.^[98]

2001 untersuchten M. Hann *et al.*^[99] in einem einfachen Modell die Wechselwirkungen von Liganden und Rezeptoren verschiedener Komplexitäten und berechneten die möglichen Bindungswahrscheinlichkeiten. Sie kamen zu der Aussage, dass mit zunehmender Molekülgröße die Wahrscheinlichkeit ein Fragment zu finden, welches sich an eine spezifische Bindungsstelle bindet, stark abnimmt. Andersherum erhöht sich die Wahrscheinlichkeit eines Bindungsereignisses, je kleiner das Molekül bzw. Fragment ist. Somit ist die Suche nach bindenden Strukturen aus kleinen Fragmenten bzw. Molekülen besser geeignet als aus großen Molekülen. Zudem ist ein kleines, schwach bindendes Molekül gegenüber einem großen Molekül deutlich einfacher zu modifizieren und damit das Bindungsverhalten zu optimieren. Dies hat jedoch zur Folge, dass deutlich schwächere Affinitäten erhalten werden. Sie liegen meist im μM - bis mM -Bereich, was die Anforderungen an eine geeignete, biophysikalische Messmethode deutlich erhöht.

Für das Auffinden kompetitiver Inhibitoren ist das Design und die Synthese von Analoga ihrer natürlichen Substrate unerlässlich. Eine Strategie bei der Entwicklung potentieller Inhibitoren ist die Imitation der Form und der Funktionalität der natürlichen Substrate. Das Konzept des strukturbasierten Wirkstoffdesigns beschreibt diesen Prozess. Es beinhaltet die Suche, den Entwurf und die Optimierung eines geeigneten Liganden, der möglichst gut in die Bindungstasche des natürlichen Substrats eines Proteins bindet und energetisch gute Wechselwirkungen mit diesem eingeht.^[13,100] Im Gegensatz zum kombinatorischen Ansatz des Wirkstoffdesigns, der auf dem *screening* einer großen Anzahl von Verbindungen, die nach dem Zufallsprinzip einer synthetisierten Substanzbibliothek entnommen wurden (*high-throughput-screening*, HTS), beruht der strukturbasierte Ansatz auf der strukturellen Kenntnis des Targets und/oder bereits bestehender Stoffe, die damit in Wechselwirkung treten.^[101]

Der erste Schritt des strukturbasierten Ansatzes ist oft eine genaue Analyse des Proteins mit allen zur Verfügung stehenden Informationen, wie beispielweise der Struktur. Eine wichtige Rolle spielt dabei die Untersuchung der Bindungstasche. Es wird gezielt nach potenziell guten Bindungsstellen (*hot spots*) gesucht, die mit den funktionellen Gruppen des Liganden in Wechselwirkung treten können. Unterstützt wird die Suche insbesondere durch leistungsfähige pro- und eukaryotische Expressionssysteme, durch die eine ausreichende Menge von Proteinen für die Strukturanalyse und die Untersuchung von Bindungsenergien zur Verfügung stehen. Zudem wird die Suche durch große Fortschritte in der Röntgenstrukturanalyse, der NMR-Spektroskopie und die ständig steigende Leistungsfähigkeit an Rechenleistung unterstützt. Somit konnte die benötigte Zeit zur Aufklärung von Strukturen deutlich verkürzt und die Suche nach potenziellen Inhibitoren verbessert werden.^[13]

Betrachtet man die statistischen Zahlen der RCSB Proteindatenbank, waren 1991 insgesamt 694 aufgelöste 3D-Strukturen zu finden. Anfang 2023 waren es hingegen schon über 200000 hinterlegte 3D-Strukturen. Über die einzelnen Jahre ist eine ständige Zunahme an gelösten 3D-Strukturen zu erkennen, die ihren Höhepunkt im Jahr 2020 mit 14047 hinterlegten 3D-Strukturen erreicht hatte.^[102,103]

4 Aufgabenstellung

Die Zellen bösartiger Tumore besitzen die Fähigkeit sich aus ihrem Verband herauszulösen und in fremdem Gewebe Metastasen zu bilden, die hauptsächlich für die Letalität von Krebserkrankungen verantwortlich sind. Die Krebsentstehung folgt dabei keinem einfachen, linearen Muster, sondern jeder Krebs ist vom Beginn seiner Entstehung bis hin zu seinen molekularen Mechanismen einzigartig.^[104,105] Während Primärtumore bei frühzeitiger Erkennung oft erfolgreich behandelt werden können, stellt die Heilung bzw. Behandlung von metastasierenden Tumoren eine große Herausforderung dar.^[106] Klinische Studien und *in vitro* Experimente zeigten, dass ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Sialylierung von Zelloberflächenmolekülen und der Inversions- und Metastasierungsfähigkeit von Tumorzellen besteht, welche häufig mit einer erhöhten Sialyltransferasenaktivität einher geht. Die dabei beteiligten Mechanismen sind bisher wenig erforscht.^[28,91,107]

Bis heute wurde eine Vielzahl von Inhibitoren für Sialyltransferasen entwickelt, wovon die meisten auf der Nachbildung des polaren und negativ geladenen Donorsubstrats CMP-Neu5Ac beruhen. Diese Ladungen führen jedoch dazu, dass die Inhibitoren eine schlechte Zellmembranpermeabilität aufweisen und *in vivo* Untersuchungen stark erschweren bzw. verhindern.^[33,66-90] Somit besteht ein großes Interesse darin, zellgängige Inhibitoren für Sialyltransferasen zu entwickeln, mit denen die Beteiligung der Sialyltransferasen an dem Prozess der Metastasierung von Tumoren komplett aufgeklärt werden kann und somit mögliche Therapieentwicklungen voranzutreiben.

Aufgrund der biomedizinischen Relevanz beschäftigte sich diese Arbeit mit dem Design, der Synthese und der Analyse neuer Inhibitoren für die humane β -Galactosid α -2,6-Sialyltransferase I (ST6Gal-I). Zu Beginn bestand die Aufgabe darin, im *in silico* Verfahren geeignete Strukturen *de novo* zu ermitteln und hinsichtlich des natürlichen Liganden weiter zu optimieren.

Anschließend war es geplant, die *in silico* entwickelten Liganden im Hinblick auf eine mögliche Umsetzung und Kosteneffizienz retrosynthetisch zu analysieren und die für die Synthese ausgewählten, möglichen Inhibitoren dann in einer variablen, kurzen Syntheseroute darzustellen und zu charakterisieren. Abschließend wurde angestrebt, das inhibitorische Potential der isolierten Liganden gegenüber der ST6Gal-I zu untersuchen.

4 Aufgabenstellung

Hierfür stehen unterschiedliche Experimente, wie beispielweise die Oberflächenplasmonresonanz (*surface plasmon resonance* (SPR), als strömendes Verfahren) oder die NMR-Progresskurvenanalyse (als statisches Verfahren), zur Verfügung.

Das Ziel dieser Arbeit war es somit, neue Wege zu erarbeiten, mit denen es möglich ist, die Funktionalität der β -Galactosid α -2,6-Sialyltransferase I regulieren bzw. beeinflussen zu können. Solche Ansätze legen eine Basis für biomedizinische Arbeiten, die schlussendlich neue Wege zur Bekämpfung von beispielsweise Krebs aufzeigen können.

5 Ergebnisse und Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, neue potentielle Inhibitoren der ST6Gal-I darzustellen. Hierzu wurde als erstes in einem fragmentbasierten Ansatz eine Core-Struktur *de novo* erzeugt und in folgenden *in silico* Studien weiter zu einer energetisch günstigen Ligandenstruktur *in silico* entwickelt (Kapitel 5.1). Anschließend wurde eine passende Synthesestrategie für die potentiellen Liganden ausgearbeitet und dann erfolgreich synthetisiert (Kapitel 5.2). Die abschließenden *in vitro* Bindungsstudien erfolgten mittels SPR-Analyse und NMR-Spektroskopie und konnten zeigen, dass die Liganden eine sehr gute Affinität gegenüber der ST6Gal-I aufweisen (Kapitel 5.3).

5.1 Design von potentiellen Inhibitoren der ST6Gal-I

Die Suche nach neuen, potentiellen Inhibitoren der β -Galactosid α -2,6-Sialyltransferase I (ST6Gal-I) erfolgte zunächst in einem fragmentbasierten Ansatz mit dem Programm *Maestro*[®] und wurde dann spezifischer untersucht. Dabei ist das Verständnis über die Bindung des natürlichen Donorsubstrats Cytidin-5'-monophosphat-*N*-acetylneuraminsäure (CMP-Neu5Ac) eine wichtige Voraussetzung. Die Struktur besteht aus drei Komponenten, die für die Entwicklung neuer Inhibitoren ausgetauscht bzw. modifiziert werden können: der Cytosin-Base, der Phosphat-Gruppe und der Sialinsäure. Hierfür ist die im Jahr 2012 von T. Benz *et al.* publizierte Kristallstruktur der humanen β -Galactosid α -2,6-Sialyltransferase I (PDB-ID: 4JS2)^[57] gut geeignet. Die Kristallstruktur der ST6Gal-I beinhaltet das native Protein als Monomer mit dem Substrat Cytidin-5'-monophosphat im Komplex. Aufgrund der hohen Enzymaktivität des Proteins liegt nur das Substrat CMP vor, da die *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) schnell hydrolytisch abgespalten wird. Betrachtet man die Neu5Ac von der energetischen Seite des Proteins aus, weist diese wahrscheinlich nur eine untergeordnete Rolle auf und ist hauptsächlich für die Spezifität des Donorsubstrats mitverantwortlich. In den folgenden Bindungsstudien wurde die Lage und Interaktionen des mono-deprotonierten CMP in der Kristallstruktur des Proteins analysiert und anhand der Ergebnisse nach neuen, potentiellen Inhibitoren der ST6Gal-I gesucht.

Zunächst wurde eine molekulardynamische Simulation (MD) mit dem Donorsubstrat CMP in der Bindungstasche des Proteins durchgeführt, wodurch sich die Interaktionen im zeitlichen Verlauf begutachten ließen. Die MD-Simulation erfolgte mit dem Programm *Desmond* über eine Zeit von 1.5 ns (siehe Kapitel 6.5). In Abbildung 12 ist die abschließende Position des CMPs in der Bindungstasche des Enzyms, sowie deren Interaktionen nach der MD-Simulation dargestellt.

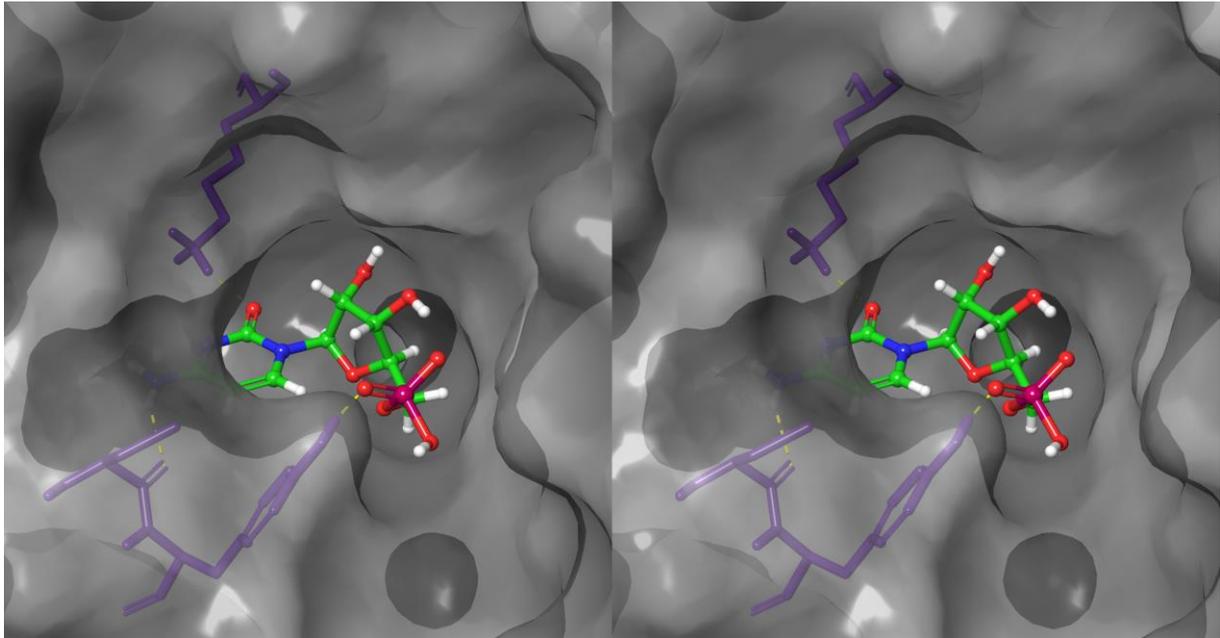


Abbildung 12: *Crossed eye* Darstellung des Donorsubstrats CMP in der Bindungstasche des Enzyms ST6Gal-I nach einer MD-Simulation von 1.5 ns. Die Aminosäuren Cys353, Tyr354 und Lys376 (in lila dargestellt) sind dabei hauptsächlich für die Bindungen des Donorsubstrats verantwortlich und für die Suche neuer, potentieller Liganden von zentraler Bedeutung. Die Wasserstoffbrückenbindungen sind als gelbe Strichlinien dargestellt und die Proteinoberfläche ist grau eingefärbt.

Die MD-Simulation zeigte, dass die Aminosäuren Cystein353, Tyrosin354 und Lysin376 fast über die gesamte Simulationszeit Wechselwirkungen mit dem Donor aufwiesen. Diese sind somit hauptsächlich für die Lage und den Erhalt des CMPs in der Bindungstasche des Proteins verantwortlich. So bestand im Bereich der Cytosin-Base eine Wasserstoffbrückenbindung des primären Amins über 97 % der simulierten Zeit zum Cystein353, sowie eine Wasserstoffbrückenbindung des Carbonyls CO zum Lysin376 über 71 % der Simulationszeit. Ebenso waren über 98 % der Zeit Wechselwirkungen zwischen der Phosphatgruppe und dem Tyrosin354 festzustellen.

Um einen weiteren Vergleich des Donorsubstrats mit den potentiellen Inhibitoren untereinander zu ermöglichen, wurde anschließend die Bindungsenergie des CMPs mit dem Programm *prime* MM-GBSA in *Maestro*[®] berechnet (siehe Kapitel 6.5). Dazu wurde der Ligand mit dem Protein in eine neue Ebene geladen, minimiert und die Energie des Protein-Liganden-Komplexes ($E_{Komplex}$) berechnet. Die einzelnen Energien des Proteins ohne Liganden ($E_{Protein}$) und die des freien Liganden (E_{Ligand}) wurden ebenfalls berechnet und nach Gleichung 1 vom Komplex subtrahiert.

$$E_{Bindung} = E_{Komplex} - (E_{Protein} + E_{Ligand}) \quad (1)$$

Hierbei ist zu beachten, dass die berechneten Bindungsenergien keine echten, absoluten Werte darstellen. Sie dienen zur Beurteilung, ob ein Ligand im Vergleich zu einem Referenzmolekül (meist der natürliche Ligand) im gleichen System eine verbesserte oder schlechtere Bindungsenthalpie aufweist.

Somit wurde das CMP mit dem Protein ST6Gal-I in eine neue Ebene geladen und deren Bindungsenergie nach Gleichung 1 zu -55.071 kcal/mol berechnet. Diese Bindungsenergie dient als Ausgangswert für den Vergleich mit den neu *in silico* entwickelten Inhibitoren.

5.1.1 *de novo* Design von Inhibitoren der ST6Gal-I

Für die Suche nach potenziell geeigneten Inhibitoren für die ST6Gal-I wurde eine große Menge (*subset*) von mehr als 700.000 Strukturen aus der *zinc*-Datenbank^[108,109] geladen, mit dem Programm *LigPrep* vorbereitet und zusammen mit dem Protein ST6Gal-I (PDB: 4JS2)^[102] berechnet (siehe Kapitel 6.5). Dieser nicht-substratbasierte Ansatz ermöglicht, da eine große Anzahl unterschiedlichster Strukturen im *docking* verwendet werden können, geeignete und potentiell neue Inhibitoren *de novo* zu ermitteln.

Die erhaltenen Ergebnisse wurden anhand des *docking scores* und ihrer Position in der Bindungstasche des Proteins ausgewertet. Hierbei wurde auch auf immer wiederkehrende Strukturelemente, funktionelle Gruppen und gleichbleibende Liganden-Protein-Interaktionen geachtet. Die erste Analyse ergab eine Vielzahl von interessanten Strukturen. Viele der positiv bewerteten Strukturen wiesen eine bicyclische Verbindung, sowie ein Carbonsäureamid auf und die polaren Wechselwirkungen mit dem Protein waren meist analog zu den Wechselwirkungen des natürlich vorliegenden CMP. Um eine genauere Bewertung der Bindungseigenschaften zu erhalten, wurden die besten Ergebnisse unter den gleichen Voraussetzungen mit einer genaueren Präzision (*SP, standard precision*) erneut berechnet.

Zudem wurde in der zweiten Analyse vermehrt auf eine synthetische Umsetzung und eine mögliche Erweiterung der Molekülstruktur geachtet.

Als vielversprechende Core-Struktur konnte das 1,4-Dihydrochinoxalin-2,3-dion (**15**) identifiziert werden. Diese Struktur trat wiederholt mit unterschiedlichen Modifikationen auf, in denen die beiden Sauerstoffatome der Core-Struktur immer je eine Wasserstoffbrückenbindung zu dem Histidin370, dem Tyrosin369 und dem Alanin368 ausbildeten. Durch diese bestehenden Bindungen und einer zusätzlichen π - π -Interaktion mit dem Histidin370 konnte eine gute Positionierung in der Bindungstasche der ST6Gal-I gewährleistet und die Molekülstruktur sinnvoll erweitert werden. In Abbildung 13 ist die Core-Struktur mit einer zusätzlichen Benzylgruppe, die über eine Amidbindung miteinander verknüpft sind, in der Bindungstasche der ST6Gal-I dargestellt.

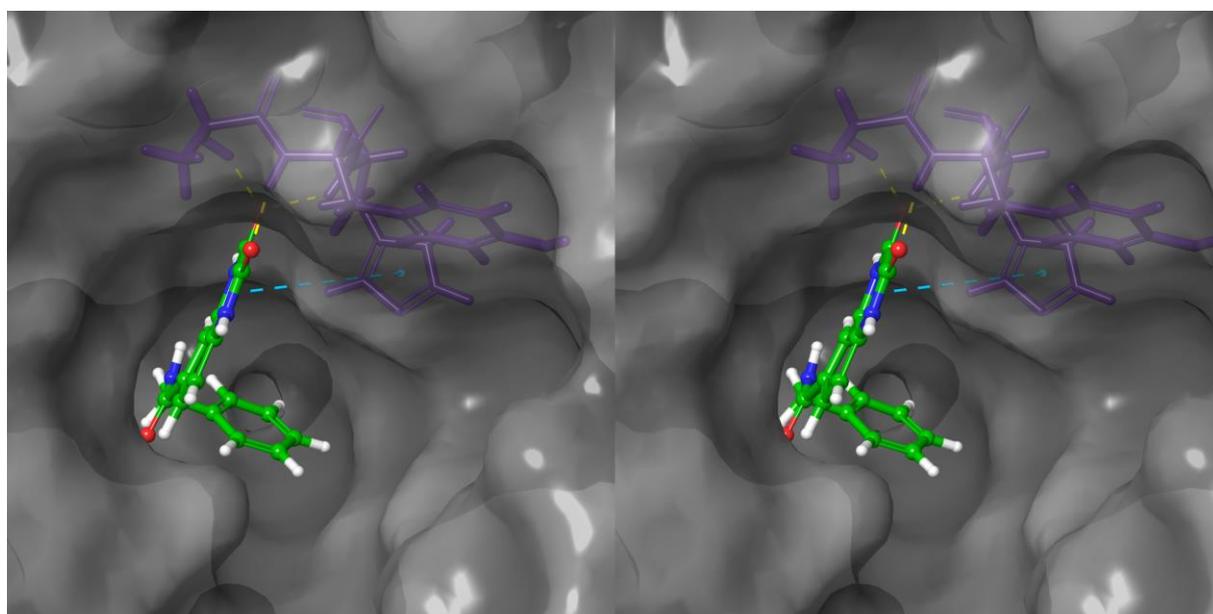


Abbildung 13: *Crossed eye* Darstellung des 1,4-Dihydrochinoxalin-2,3-dion (**15**) mit einer zusätzlichen Benzylgruppe, die über eine Amidbindung miteinander verknüpft sind, in der Bindungstasche der ST6Gal-I. Durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen der beiden Sauerstoffatome der Core-Struktur zu dem His370, Tyr369 und Ala368, sowie einer zusätzlichen π - π -Interaktion mit dem His370 konnte eine gute Positionierung in der Bindungstasche der ST6Gal-I erzielt werden. Die zusätzliche Benzylgruppe füllt die Bindungstasche weiter gut aus und eine Vielzahl weiterer hydrophoben Wechselwirkungen konnten erhalten werden. Die Wasserstoffbrückenbindungen sind als gelbe, die π - π -Interaktionen als türkise Strichlinien dargestellt und die Proteinoberfläche ist grau eingefärbt.

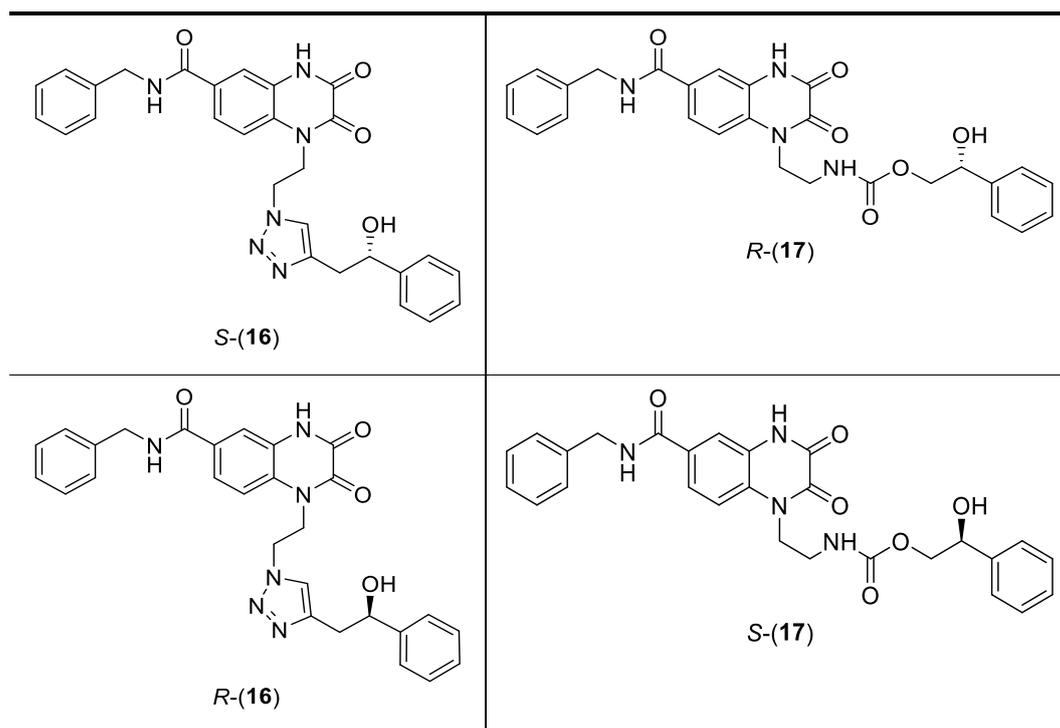
Die zusätzliche Benzylgruppe dreht sich weiter in die Bindungstasche hinein, füllt diese gut aus und bildet eine Vielzahl von weiteren hydrophoben Interaktionen mit dem Protein aus. Die Bindungsenergie der Core-Struktur mit der zusätzlichen Benzylgruppe wurde nach Gleichung 1 zu -61.497 kcal/mol berechnet. Im direkten Vergleich zum Donorsubstrat CMP konnte eine Verbesserung der Bindungsenergie von -6.426 kcal/mol erzielt werden.

Nachdem eine geeignete Core-Struktur berechnet werden konnte, die das CMP gut imitiert und die Lage des aufbauenden Liganden maßgeblich beeinflusst, wurde die Struktur *in silico* erweitert. Zunächst wurde geplant einen neutral geladenen Linker als Ersatz für den geladenen Phosphordiester zu finden, der zum einen synthetisch gut umsetzbar ist und zum anderen gute pharmakokinetischen Eigenschaften aufweist. Hierzu untersuchten A. Montgomery *et al.*^[110] in molekularen *docking*-Studien und MD-Simulationen die Einführung eines neutralen Carbamat- bzw. Triazol-Linkers als isosterer Ersatz für den geladenen Phosphordiester. Dabei konnten sie zeigen, dass die beiden Linker konsistente Wechselwirkungen mit der ST6Gal-I eingingen und dabei ähnliche Bindungseigenschaften wie der Phosphordiester aufwiesen.

Somit wurde die *in silico* entwickelte Core-Struktur 1,4-Dihydrochinoxalin-2,4-dion (**15**) (Abbildung 13) um eine Carbamat- bzw. Triazol-Einheit erweitert. Um dabei eine ausreichende Flexibilität und synthetische Umsetzbarkeit zu gewährleisten, wurde die Carbamat- bzw. Triazol-Einheit um eine Methyl- bzw. Ethylgruppe erweitert und die Lage des Moleküls in der Bindungstasche des Proteins neu bewertet. Die neuen *docking*-Studien zeigten, dass die Erweiterung um eine Methylgruppe zu einer schlechten Lage des Moleküls in der Bindungstasche des Proteins führte und vorherige, wichtige Ligand-Protein-Interaktionen nicht aufrechterhalten wurden. Jedoch konnte durch die Verwendung einer Ethylgruppe der gewünschte Effekt erzielt werden und die gute Lage des Moleküls, sowie deren Interaktionen beibehalten werden. Abschließend musste noch ein entsprechender Ersatz für die *N*-Acetylneuraminsäure des natürlichen Donorsubstrats gefunden werden. Hierzu wurde erneut ein *subset* aus der *zinc*-Datenbank^[108,109] geladen und an der gewünschten Position die Qualität der Interaktionen mit dem Protein berechnet. Die Auswertung der erhaltenen Ergebnisse erfolgte wie bei den zuvor durchgeführten *docking*-Studien, wobei primär auf eine synthetische Umsetzbarkeit geachtet wurde. Als geeignete Struktur wurde ein einfacher Benzylalkohol erhalten, der weiterhin eine gute Positionierung des Inhibitors in der Bindungstasche gewährleistet. In Tabelle 1 sind die sich ergebenden Inhibitoren dargestellt. Sie unterscheiden sich in der Wahl einer Carbamat- bzw. Triazol-Einheit als Linker-Fragment und in der Konfigurationsisomerie der Hydroxylgruppe des Benzylalkohols.

5 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 1: Darstellung der potentiellen Inhibitoren für die ST6Gal-I. Als Erstes wurde die Core-Struktur 1,4-Dihydrochinoxalin-2,3-dion (**15**) erhalten, die hauptsächlich für den Verbleib und die Lage der Inhibitoren im Protein verantwortlich ist. Als möglicher Ersatz für den geladenen Phosphordiester wurde die Core-Struktur um eine Carbamat- bzw. Triazol-Einheit erweitert, die über eine Ethylgruppe miteinander verknüpft sind. Abschließend wurde ein einfacher Benzylalkohol anstelle der natürlich vorliegenden *N*-Acetylneuraminsäure eingeführt. Die Liganden **16** und **17** unterscheiden sich in der Carbamat- bzw. Triazol-Einheit, sowie in der Konfigurationsisomerie der Hydroxylgruppe des Benzylalkohols.



Um abschließend das inhibitorische Potential der *in silico* entwickelten Liganden **16** und **17** bewerten und untereinander bzw. mit dem CMP vergleichen zu können, wurde jeder Ligand mit dem Protein ST6Gal-I in eine neue Ebene geladen, unter den identischen Parametern und Bedingungen gedockt und die theoretische Bindungsenergie nach Gleichung 1 berechnet. Die abschließende Orientierung jedes Liganden in der Bindungstasche des Proteins wurde betrachtet und analysiert. Durch die Imitation des natürlichen Donorsubstrats CMP-Neu5Ac sind die Liganden mit ca. 500 g/mol deutlich größer als das vorliegende CMP mit 324.21 g/mol. Somit wurde neben der theoretischen Bindungsenergie auch noch der *ligand efficiency* (*LE*) mit in die Auswertung einbezogen. Der *LE* bestimmt die Bindungsenergie pro Atom eines Liganden zu seinem Bindungspartner und zeigt dabei das Verhältnis der freien Enthalpie (Affinität) zur Molekülgröße, wobei die Molekülgröße über die Anzahl der Schweratome des Liganden ermittelt wird.^[111] Dadurch kann die Affinität bezüglich der Molekülgröße normalisiert werden und ermöglicht einen größenunabhängigen Vergleich von Molekülen.

Die *in silico* erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass die berechneten Liganden **16** und **17** in der Lage sind, sich erfolgreich an das Protein ST6Gal-I zu binden. Dabei nehmen alle Liganden eine gute Position in der Bindungstasche des Proteins ein und nutzen die Kavität der Bindungstasche gut aus. In Tabelle 2 sind die theoretischen Bindungsenergien und die *ligand efficiencies* der Liganden **16** und **17**, sowie ihre relative Energie zum natürlichen CMP, zusammengefasst.

Tabelle 2: Zusammenfassung der *in silico* ermittelten theoretischen Bindungsenergien und *ligand efficiencies* von den Liganden **16** und **17**, sowie ihre relative Bindungsenergie zum CMP. Es ist deutlich zu erkennen, dass die berechneten Liganden alle eine bessere Bindungsenergie gegenüber dem CMP aufweisen.

Ligand	Bindungsenergie [kcal/mol]	Relative Energie zum CMP [kcal/mol]	<i>ligand efficiency</i>
CMP	- 55.071	/	- 0.231
Core-Struktur	- 61.497	/	/
(S)- 16	- 98.401	- 43.330	- 0.261
(R)- 16	- 80.199	- 25.128	- 0.244
(R)- 17	- 82.556	-27.485	- 0.249
(S)- 17	- 77.224	- 22.153	- 0.173

In Abbildung 14 ist der Ligand (S)-**16** in der Bindungstasche des Proteins ST6Gal-I dargestellt. Es wurde eine theoretische Bindungsenergie von -98.401 kcal/mol, sowie ein *LE* von -0.261 erhalten. Im direkten Vergleich mit dem CMP konnte eine Verbesserung der Bindungsenergie von -43.330 kcal/mol, sowie des *LE* von -0.03 erzielt werden.

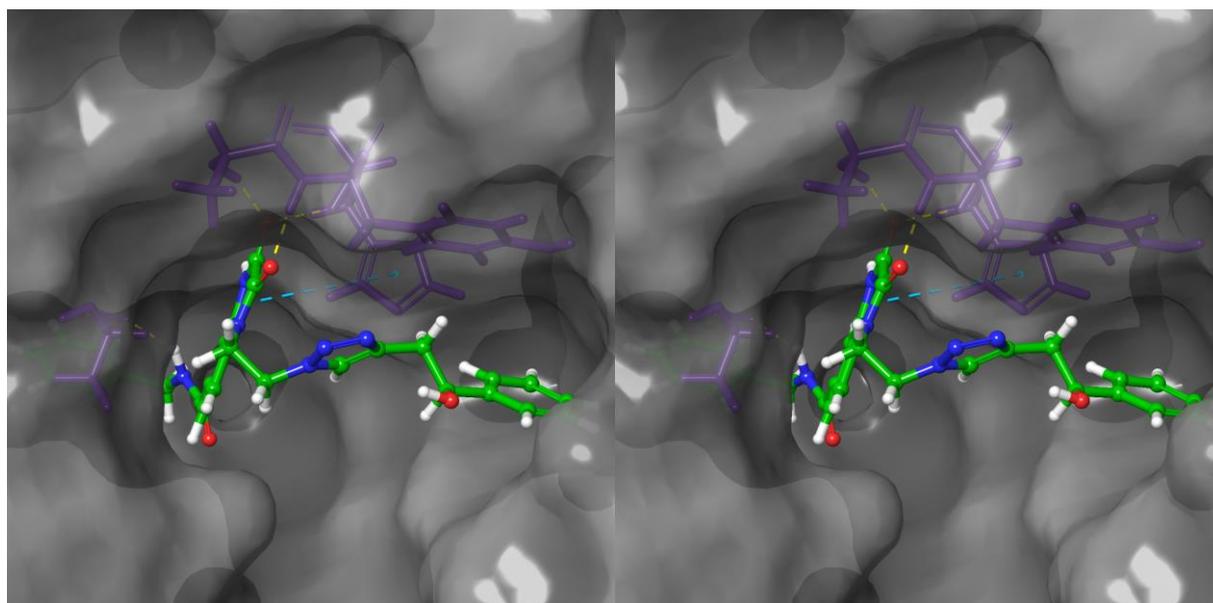


Abbildung 14: *Crossed eye* Darstellung des Liganden (S)-**16** in der Bindungstasche der ST6Gal-I. Der Ligand nimmt eine gute Position in der Bindungstasche ein und die Lage, sowie die Interaktionen stimmen sehr gut mit der zuvor ermittelten Core-Struktur überein. Die Triazol-Einheit füllt mit dem Benzylalkohol die Bindungstasche weiter gut aus. Die Wasserstoffbrückenbindungen sind als gelbe, die π - π -Interaktionen als türkise Strichlinien dargestellt und die Proteinoberfläche ist grau eingefärbt.

Der Ligand (S)-**16** nimmt eine gute Position in der Bindungstasche ein und die Lage stimmt sehr gut mit der zuvor ermittelten Core-Struktur überein. Dabei dreht sich die Benzylgruppe noch weiter in die Bindungstasche hinein und es konnten ebenfalls die Wasserstoffbrückenbindungen zu den Aminosäuren Cystein364, Alanin368, Tyrosin369 und Histidin370, sowie die π - π -Interaktionen zum Histidin370 aufrecht bzw. neu erhalten werden. Die erweiterte Triazol-Einheit des Liganden (S)-**16** dreht sich mit dem verknüpften Benzylalkohol nach rechts weg und füllt diesen Bereich der Bindungstasche ebenfalls gut aus. Hierbei konnten zahlreiche hydrophobe Wechselwirkungen erhalten werden, welche allgemein die Stabilität und den Verbleib eines Liganden in der Bindungstasche erhöhen. In Abbildung 15 ist das Ligand-Interaktions-Diagramm von (S)-**16** mit dem Protein ST6Gal-I schematisch dargestellt.

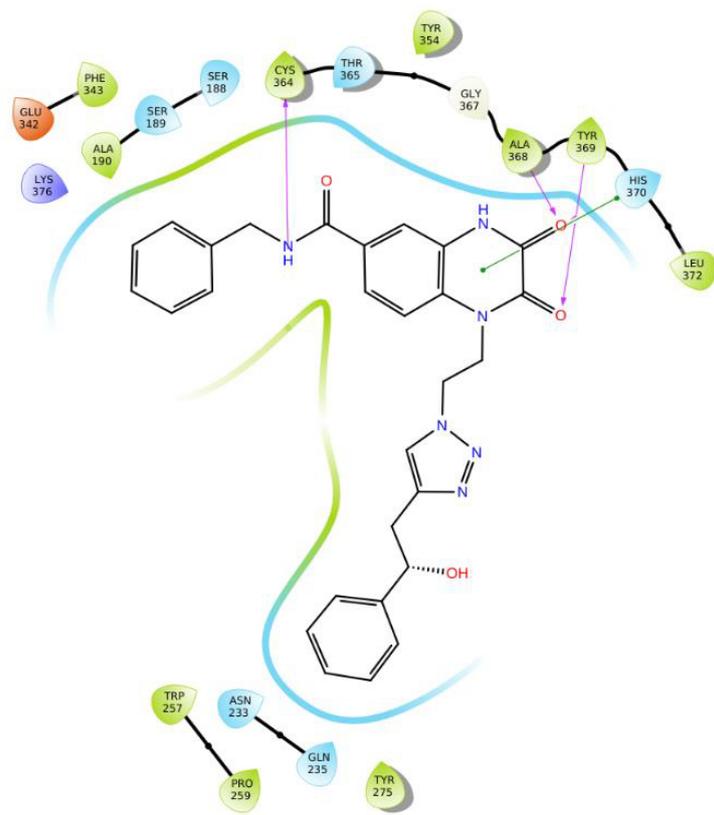


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Ligand-Interaktionen von (S)-**16** an die ST6Gal-I. Die Wasserstoffbrückenbindungen zu den Aminosäuren Cys364, Ala368, Tyr369 und His370 sind als lila Pfeile eingezeichnet. Die π - π -Interaktionen zwischen der Core-Struktur und dem His370 sind als grüne Linie dargestellt.

Der nächste Ligand (*R*)-**16** ist das Stereoisomer des zuvor analysierten Liganden (*S*)-**16**. Seine Lage in der Bindungstasche des Proteins ST6Gal-I ist in Abbildung 16 dargestellt. Seine theoretische Bindungsenergie konnte zu -80.199 kcal/mol, sowie der *LE* zu -0.244 bestimmt werden. Der direkte Vergleich des Liganden mit dem CMP wies eine Verbesserung der Bindungsenergie von -25.128 kcal/mol, sowie des *LE* von -0.013 auf.

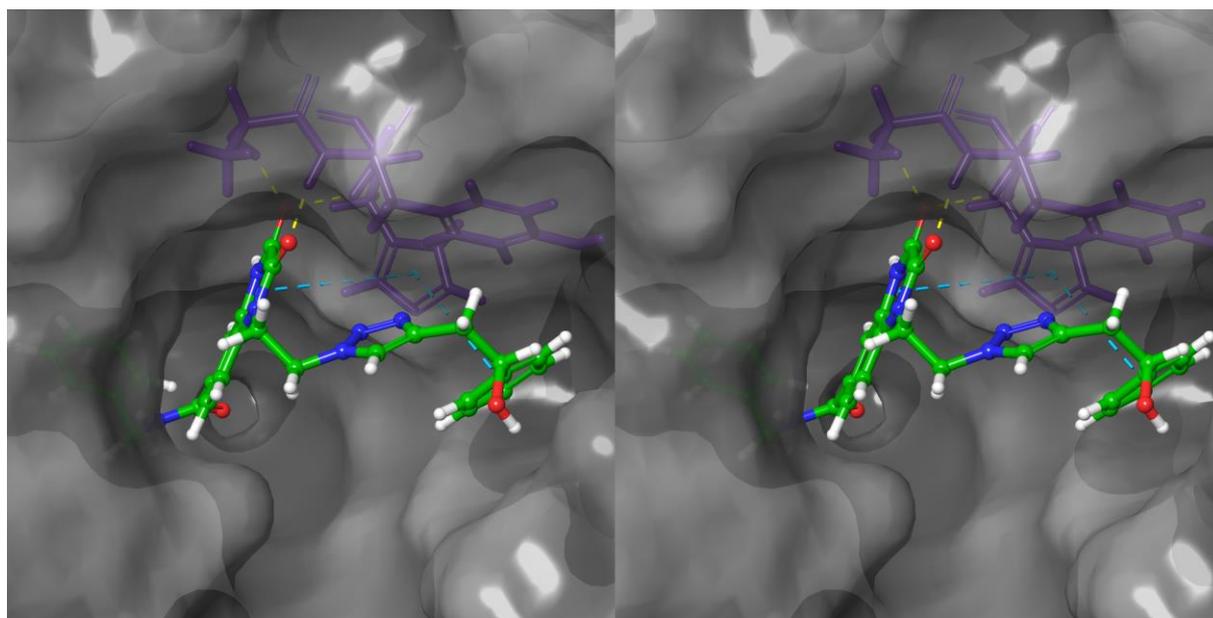


Abbildung 16: *Crossed eye* Darstellung des Liganden (*R*)-**16** in der Bindungstasche der ST6Gal-I. Der Ligand positioniert sich gut in der Bindungstasche und weist fast die gleiche Lage und Interaktionen wie sein Stereoisomer (*S*)-**16** auf. Der Aromat des Benzylalkohols dreht sich weiter nach hinten in die Bindungstasche des Proteins. Die Wasserstoffbrückenbindungen sind als gelbe, die π - π -Interaktionen als türkise Strichlinien dargestellt und die Proteinoberfläche ist grau eingefärbt.

Der Ligand (*R*)-**16** nimmt ebenfalls eine gute Position in der Bindungstasche ein und zeigt dabei fast die gleiche Lage wie sein Stereoisomer (*S*)-**16** auf. Es wurden Wasserstoffbrückenbindungen zu den Aminosäuren Ala368, Tyr369 und Histidin370, sowie π - π -Interaktionen zu dem His370 aufgebaut. Bedingt durch die andere Isomerie der Hydroxylgruppe des verknüpften Benzylalkohols dreht sich der Aromat weiter in die Bindungstasche des Proteins hinein und geht dabei eine zusätzliche π - π -Interaktionen mit dem Histidin370 ein. Des Weiteren besitzt der Ligand (*R*)-**16** eine große Anzahl an hydrophoben Wechselwirkungen mit dem Protein. Durch die erhöhte Menge an Interaktionen konnte eine Verbesserung der Bindungsenergie und des *LE* gegenüber dem CMP erzielt werden. In Abbildung 17 ist das Ligand-Interaktions-Diagramm von (*R*)-**16** mit dem Protein ST6Gal-I schematisch dargestellt.

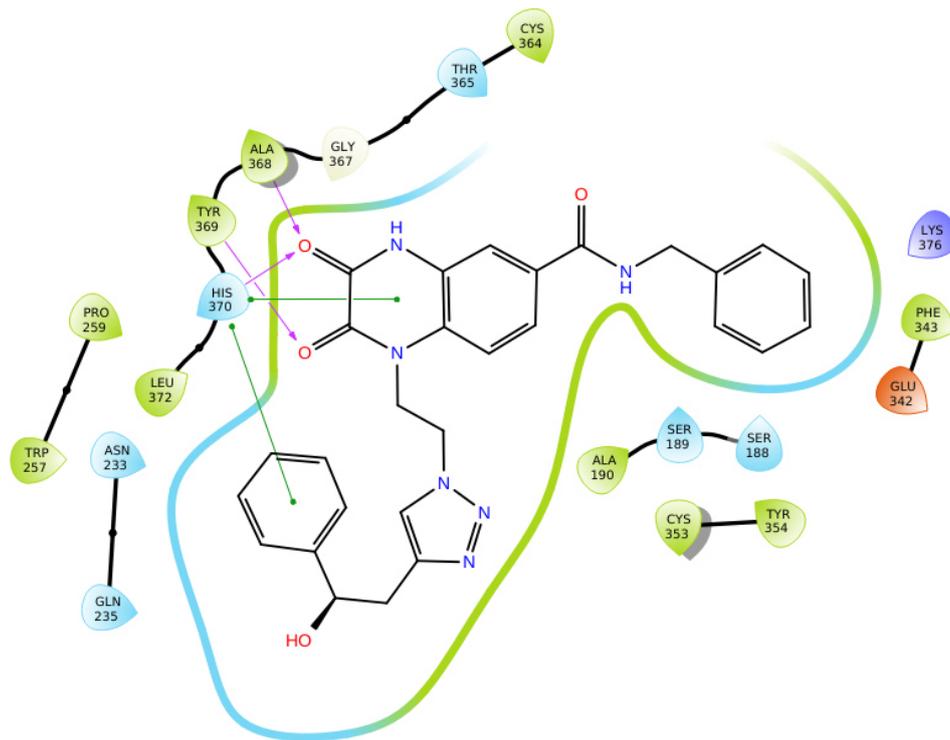


Abbildung 17: Schematische Darstellung der Ligand-Interaktionen von (*R*)-**16** an die ST6Gal-I. Die Wasserstoffbrückenbindungen zu den Aminosäuren Ala368, Tyr369 und His370 sind als lila Pfeile eingezeichnet. Die π - π -Interaktionen der Core-Struktur und des Benzylalkohols zum His370 sind als grüne Linien dargestellt.

Anschließend wurden die Liganden (*S*)-**17** und (*R*)-**17** analysiert, die ebenfalls zwei Stereoisomere sind. Die Positionierung des Liganden (*R*)-**17** in der Bindungstasche des Proteins ST6Gal-I ist in Abbildung 18 dargestellt. Es wurde eine theoretische Bindungsenergie von -82.556 kcal/mol, sowie ein *LE* von -0.249 erhalten. Gegenüber dem natürlichen CMP konnte die Bindungsenergie um -27.485 kcal/mol, sowie der *LE* um -0.018 verbessert werden.

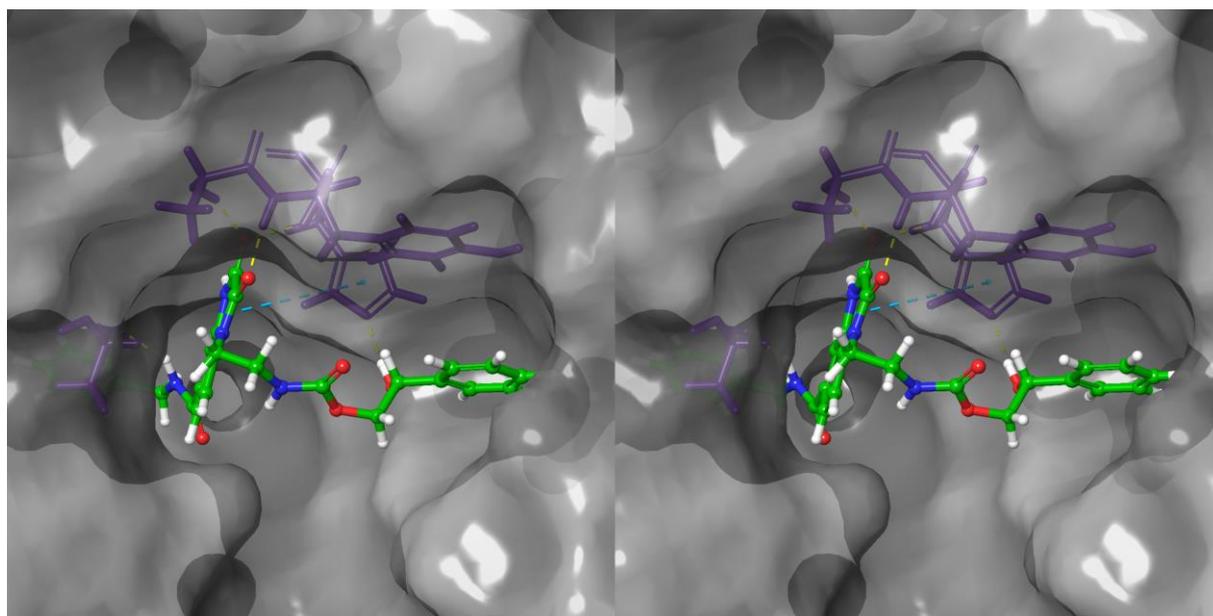


Abbildung 18: *Crossed eye* Darstellung des Liganden (*R*)-**17** in der Bindungstasche der ST6Gal-I. Der Ligand nimmt eine gute Position in der Bindungstasche ein und weist die gleiche Lage und Interaktionen der zuvor *in silico* entwickelten Core-Struktur auf. Der Carbamat-Linker füllt mit dem Benzylalkohol die Bindungstasche weiter gut aus. Die Wasserstoffbrückenbindungen sind als gelbe, die π - π -Interaktionen als türkise Strichlinien dargestellt und die Proteinoberfläche ist grau eingefärbt.

Auch der Ligand (*R*)-**17** konnte die gewünschte Lage und Interaktionen der zuvor ermittelten Core-Struktur beibehalten und sich gut in der Bindungstasche positionieren. Die Benzylgruppe dreht sich ebenfalls weiter in die Bindungstasche hinein und es konnten die gewünschten Wasserstoffbrückenbindungen zu den Aminosäuren Cystein364, Alanin368, Tyrosin369 und Histidin370, sowie die π - π -Interaktionen mit dem Histidin370 aufrechterhalten werden. Die erweiterte Carbamat-Einheit füllt mit dem verknüpften Benzylalkohol den rechten Bereich der Bindungstasche weiter gut aus und baut eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Hydroxylgruppe und dem Histidin370 auf. Zusätzlich wurden zahlreiche hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Protein erhalten. In Abbildung 19 ist das Ligand-Interaktions-Diagramm von (*R*)-**17** mit dem Protein ST6Gal-I schematisch dargestellt.

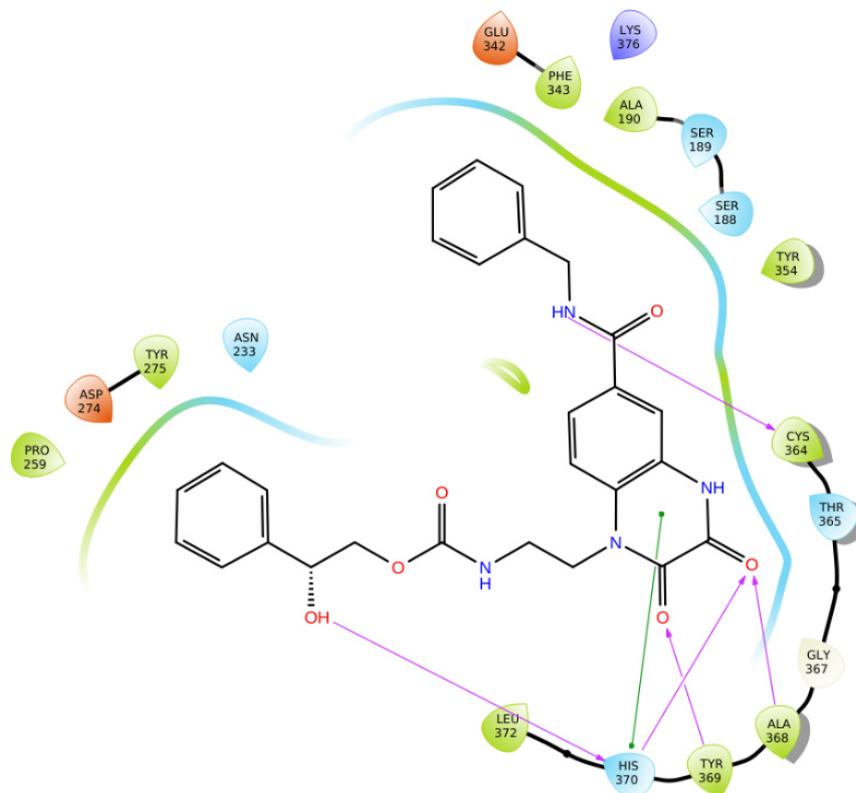


Abbildung 19: Schematische Darstellung der Ligand-Interaktionen von (*R*)-**17** an die ST6Gal-I. Die Wasserstoffbrückenbindungen zu den Aminosäuren Cys364, Ala368, Tyr369, His370 sind als lila Pfeile eingezeichnet. Die π - π -Interaktionen zwischen der Core-Struktur und dem His370 sind als grüne Linie dargestellt.

Der vierte Ligand (*S*)-**17** und dessen Position in der Bindungstasche des zu untersuchenden Proteins ist in Abbildung 20 gezeigt. Die theoretische Bindungsenergie des Liganden (*S*)-**17** wurde zu -77.224 kcal/mol, sowie der *LE* zu -0.173 berechnet. Im direkten Vergleich mit dem CMP konnte eine Verbesserung der Bindungsenergie von -22.153 kcal/mol erreicht werden.

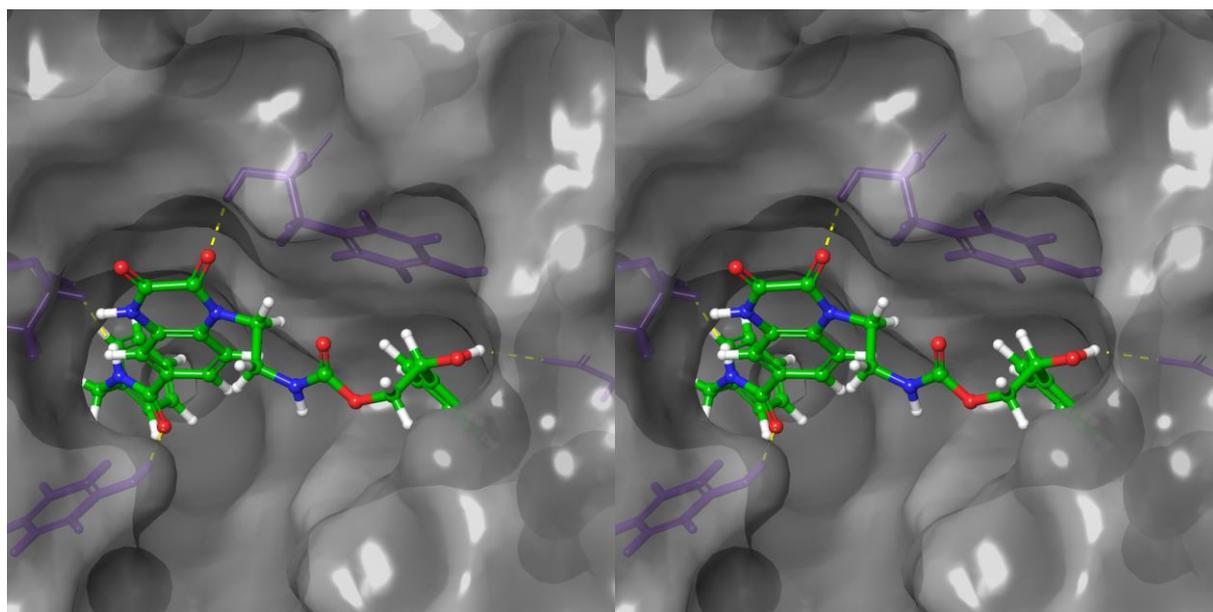


Abbildung 20: *Crossed eye* Darstellung des Liganden (S)-17 in der Bindungstasche der ST6Gal-I. Der Ligand positioniert sich gut in der Bindungstasche, konnte jedoch nicht die Lage und Interaktionen der zuvor *in silico* entwickelten Core-Struktur imitieren. Die Carbamat-Einheit füllt den rechten Bereich der Bindungstasche mit dem Benzylalkohol gut aus. Die Wasserstoffbrückenbindungen sind als gelbe, die π - π -Interaktionen sind als türkise Strichlinien dargestellt und die Proteinoberfläche ist grau eingefärbt

Der Ligand (S)-17 nimmt eine gute Position in der Bindungstasche ein, konnte jedoch nicht die gewünschte Lage und Interaktionen der zuvor ermittelten Core-Struktur imitieren und weist eine Verschlechterung des *LE* von 0.058 auf. Die Sauerstoffe der Core-Struktur drehen sich etwas aus der Bindungstasche hinaus und es wurden Wasserstoffbrückenbindungen von einem Sauerstoff zum Tyrosin369, sowie vom Amid zum Tyrosin354 und Cystein364 ausgebildet. Der erweiterte Carbamat-Linker dreht sich mit dem verknüpften Benzylalkohol nach rechts weg und füllt den Bereich der Bindungstasche gut aus. Neben einer Vielzahl von hydrophoben Wechselwirkungen des Liganden konnte die Hydroxylgruppe des Benzylalkohols eine Wasserstoffbrückenbindung zum Asparagin274, sowie der Aromat eine π - π -Interaktion mit dem Tryptophan257 ausbilden. In Abbildung 21 ist das Ligand-Interaktions-Diagramm von (S)-17 mit dem Protein ST6Gal-I schematisch dargestellt.

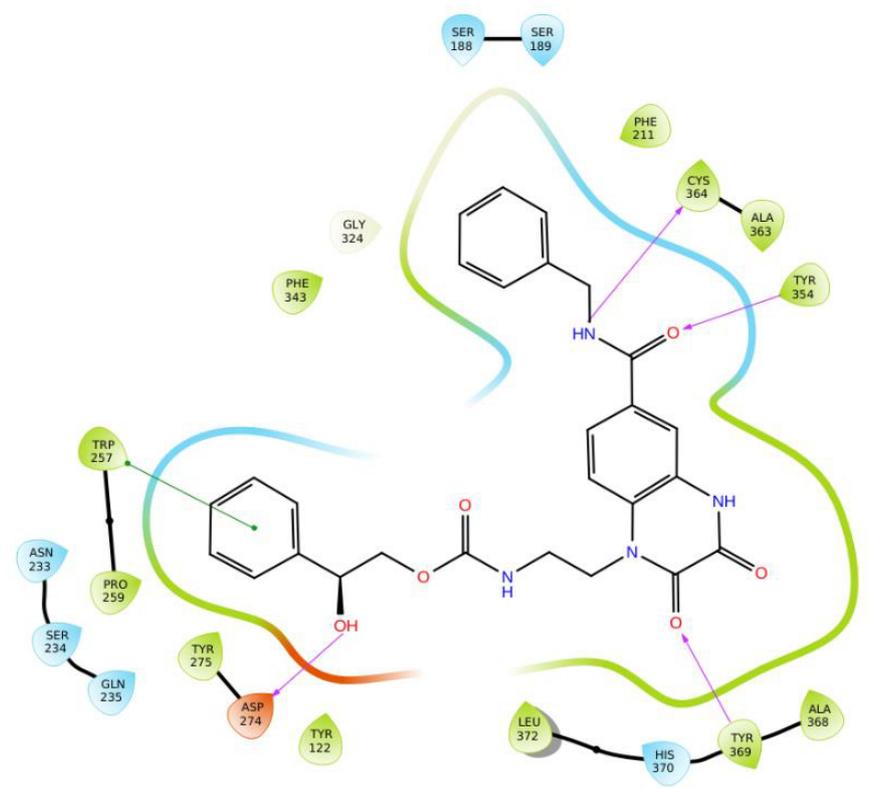


Abbildung 21: Schematische Darstellung der Ligand-Interaktionen von (S)-17 an die ST6Gal-I. Die Wasserstoffbrückenbindungen zu den Aminosäuren Asp274, Tyr354, Cys364 und Tyr369 sind als lila Pfeile eingezeichnet. Die π - π -Interaktionen zwischen dem Benzylalkohol und dem Trp257 sind als grüne Linien dargestellt.

Insgesamt zeigen die Liganden **16** und **17** gegenüber dem natürlichen Donorsubstrat CMP eine deutliche Verbesserung der theoretischen Bindungsenergie und konnten dabei, bis auf den Liganden (S)-17, die Lage und Interaktionen der zuvor *in silico* entwickelten Core-Struktur 1,4-Dihydrochinoxalin-2,3-dion (**15**) beibehalten. Durch die etwas andere Lage des Liganden (S)-17 wurden die Interaktionen der Core-Struktur zwar nicht imitiert, jedoch wurden andere Wasserstoffbrückenbindungen und π - π -Interaktionen zum Protein ausgebildet und gegenüber dem CMP eine Verbesserung der Bindungsenergie von -22.153 kcal/mol erhalten. Des Weiteren weist jeder Ligand eine Vielzahl von hydrophoben Wechselwirkungen mit dem Protein auf, welche die Stabilität und den Verbleib in der Bindungstasche erhöhen. Um zusätzlich einen größenunabhängigen Vergleich der Liganden und des CMPs zu schaffen, wurde der LE mit in die Auswertung einbezogen. Hierbei konnten die Liganden (S)-16, (R)-16 und (R)-17, die auch die Orientierung der Core-Struktur in der Bindungstasche aufrecht erhalten haben, einen höheren LE aufweisen.

5.2 Synthese der Inhibitoren 16 und 17 der ST6Gal-I

Nachdem *in silico* die erfolgsversprechenden Liganden **16** und **17** gefunden werden konnten, wurde eine passende Synthesestrategie entwickelt, die gleichzeitig auf beide Liganden anwendbar ist. Grundsätzlich können die Liganden dabei in drei Strukturfragmente aufgeteilt werden. In eine Benzylamin-Gruppe, in ein Dioxo-chinoxalin-Fragment mit einer Carbonsäure und ein Triazol- oder Carbamat-Fragment mit einem sekundären Benzylalkohol (Abbildung 22).

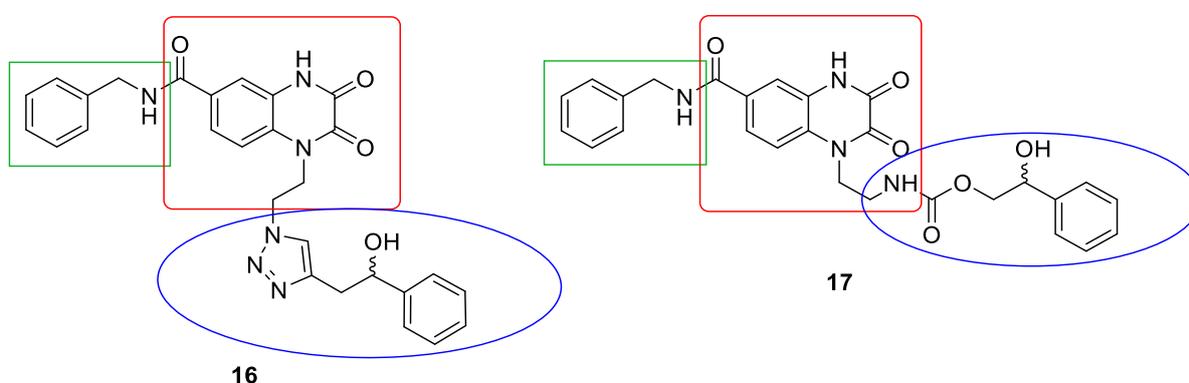


Abbildung 22: Die Liganden **16** und **17** lassen sich in drei Strukturfragmente einteilen. Eine Benzylamin-Gruppe (grün), einem Dioxo-chinoxalin-Fragment mit einer Carbonsäure (rot) und ein Triazol- oder Carbamat-Fragment mit einem sekundären Benzylalkohol (blau).

Die retrosynthetische Betrachtung der beiden Inhibitoren sah eine konvergente Synthesestrategie vor, die sich am Ende durch die selektive Einführung der Triazol- bzw. der Carbamat-Einheit unterscheidet. Parallel dazu war vorgesehen jeweils das enantiomerenreine (*S*)- und (*R*)-Isomer eines Liganden darzustellen.

Der synthetische Zugang zu den beiden Liganden erforderte zu Beginn eine passende Schutzgruppenstrategie. Geplant war, dass sie eine gute Einführung der Schutzgruppen erlaubt, die sich wieder schonend abspalten lassen und dabei andere funktionelle Gruppen nicht beeinflusst. Zudem wurde darauf geachtet, dass sie mit guten Ausbeuten einhergeht und eine gewisse Stabilität, wie eine saure, reduktive oder oxidative Umgebung, aufzeigt.

5.2.1 Retrosynthetische Analyse des Liganden 16

Zur Synthese des Liganden **16** wurde das in Abbildung 23 gezeigte Retrosynthesekonzept verfolgt. Zu Beginn wurde ausgehend von 4-Chlor-3-nitrobenzoesäure (**18**) geplant, die Carbonsäurefunktion zu verestert und anschließend mittels nucleophiler Substitution den 2-Aminoethanol (**19**) einzuführen. Durch weitere Umsetzung mit einem Oxalsäure-Derivat **20** und Natriumazid (**21**) wurde beabsichtigt das Dioxo-chinoxalin-Fragment **22** zu erhalten. Darauf folgend wurde vorgesehen das aus Styroloxid (**23**) zuvor dargestellte, enantiomerenreine Alkin **24** mit dem freien Azid des Fragments **22** nach dem Konzept der *Click-Chemie*^[112] umzusetzen und abschließend die Schutzgruppe wieder abzuspalten, um die freie Carbonsäure mit dem Benzylamin (**25**) in einer Amidkupplung miteinander zum Liganden **16** zu verknüpfen.

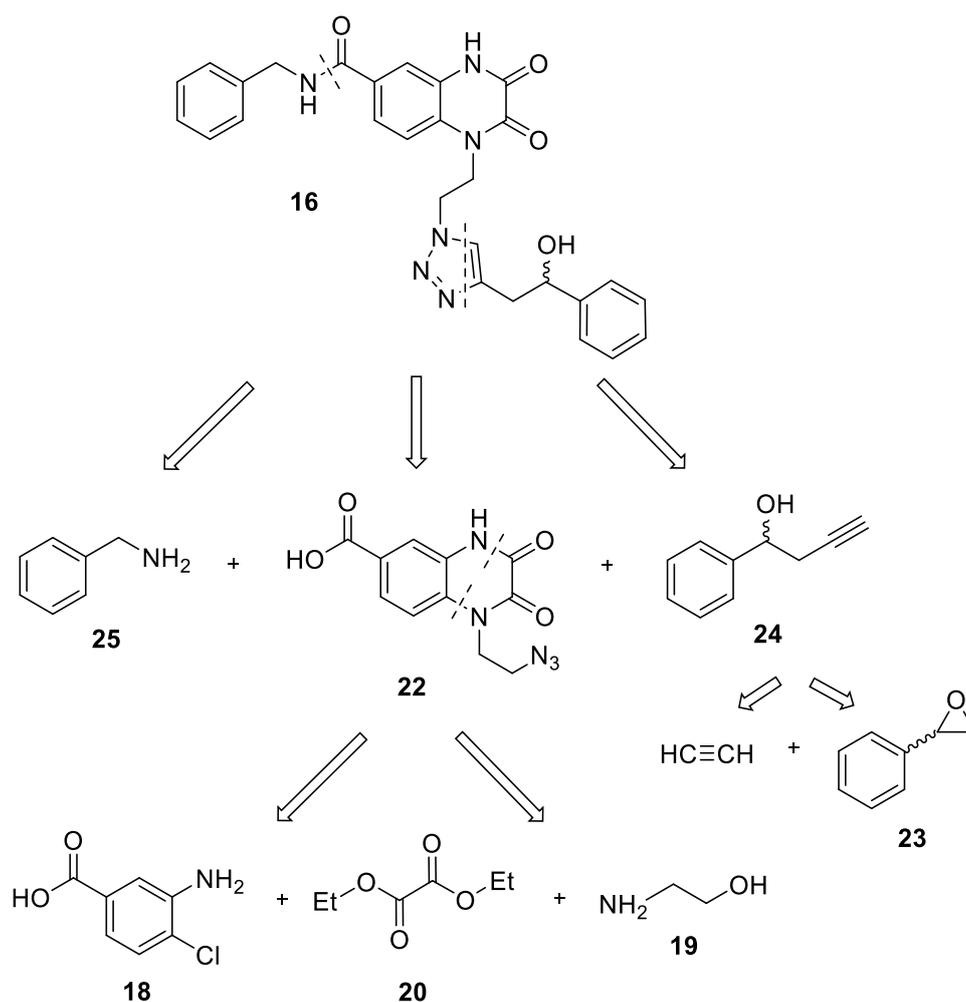


Abbildung 23: Retrosynthetische Analyse zur Darstellung des Liganden **16**. Die Synthesestrategie sieht vor zunächst das Dioxo-chinoxalin-Fragment **22** zu synthetisieren, dann das Triazol-Fragment mit dem enantiomerenreinen Alkin **24** selektiv mittels *Click-Chemie*^[112] einzuführen und abschließend mit dem Benzylamin (**25**) in einer Amidkupplung zum Liganden **16** umzusetzen.

Durch die Wahl dieser Synthesestrategie bestünde dann auch die Möglichkeit, neben der Synthese des Liganden **16**, weitere, mögliche Liganden synthetisch darzustellen, die sich nur in der Benzylamin-Gruppe unterscheiden. Durch die gute Einführung der Gruppe mittels Amidkupplung könnten diverse Modifikationen an der Benzylamin-Gruppe vorgenommen werden oder ganz neue Fragmente, die ein freies Amin zur Kopplung aufzeigen, eingesetzt werden und dann ebenfalls als potentielle Inhibitoren für die ST6Gal-I dienen.

5.2.2 Synthetische Darstellung des Liganden 16

Darstellung des Dioxo-chinoxalin-Bausteins 34

Um die Synthesepanung zur Darstellung des Liganden **16** zu realisieren, wurde zuerst der Dioxo-chinoxalin-Baustein **34** ausgehend von 4-Chlor-3-nitrobenzoesäure (**18**), 2-Aminoethanol (**19**) und Ethyloxalylchlorid (**26**) über insgesamt sechs Stufen synthetisiert.

Zunächst wurde die Carboxylgruppe der Säure **18** verestert. Versuche die 4-Chlor-3-nitrobenzoesäure (**18**) direkt ohne Schutzgruppe umzusetzen, erwiesen sich auf Grund von Nebenreaktionen und der erhöhten Polarität als ungeeignet. Somit wurde die Hydroxylgruppe der Säure **18** mit Thionylchlorid in abs. Methanol zum Methylester **27** mit einer Ausbeute von 87 % verestert. Parallel dazu wurde die Hydroxylgruppe des 2-Aminoethanols (**19**) mit *tert*-Butyldimethylsilylchlorid in Gegenwart von Triethylamin zum Ether **28** umgesetzt und konnte in nahezu quantitativer Ausbeute erhalten werden. Der Vorteil des Silyl ethers als Schutzgruppe besteht darin, dass dies meist mit guten Ausbeuten einhergeht und bezüglich der Einführung bzw. der späteren Abspaltung gut handhabbar ist.

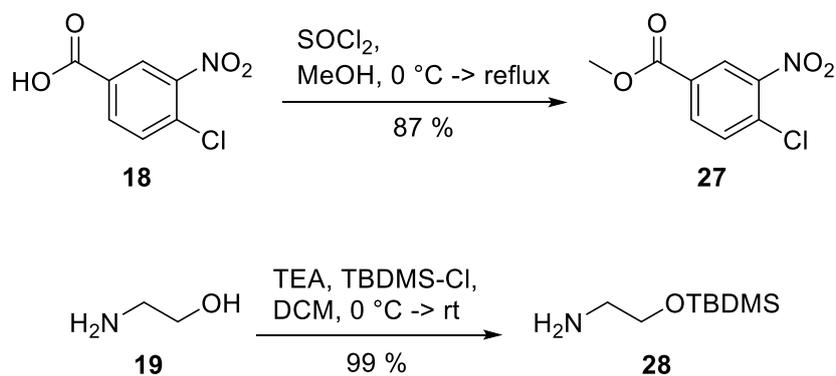


Abbildung 24: Einführung von Schutzgruppen. Die freie Säure **18** wurde mit Thionylchlorid in abs. Methanol zum Methylester **27** verestert. In Gegenwart der Base Triethylamin wurde der 2-Aminoethanol (**19**) mit *tert*-Butyldimethylsilylchlorid zum Silylether **28** umgesetzt.

Durch die Einführung der Schutzgruppen am Methylester **27** und am Amin **28** konnten im weiteren Reaktionsverlauf ungewollte Kupplungen vermieden und deutlich mildere Reaktionsbedingungen gewählt werden. Der Methylester **27** und das Amin **28** wurden zusammen in abs. Dichlormethan aufgenommen und zum verlängerten Methylester **29** alkyliert. Als Base wurde Diisopropylethylamin eingesetzt, da sie eine geringe Nucleophilie aufweist. Anschließend erfolgte die Hydrierung der Nitrogruppe von **29** mit Palladium auf

Aktivkohle (10 %) als Katalysator. Durch die Wahl des Lösungsmittelgemisches von Methanol/Dichlormethan (5:2) lag das Edukt komplett homogen vor und konnte nach einer kurzen Säulenchromatographie zum Produkt **30** mit einer Ausbeute von 98 % umgesetzt werden. Das nun vorliegende primäre Amin **30** wurde nun mit dem im gleichen Molekül vorhandenen sekundären Amin verknüpft werden, um so das Dioxo-chinoxalin-Grundgerüst **31** zu erhalten. Die Verknüpfung gestaltete sich dabei relativ schwierig, konnte letztendlich durch die Umsetzung mit Ethyloxalylchlorid (**26**) in Gegenwart von Kaliumcarbonat in abs. Aceton umgesetzt werden. Durch die Wahl der starken Reaktionsbedingungen wurde zudem der Silylether abgespalten und die freie Hydroxylgruppe zurückerhalten. Es wird vermutet, dass die bei der Reaktion in Lösung vorliegenden Chlorid-Ionen eine Abspaltung des Silylethers begünstigen, da Silicium-Ionen allgemein eine hohe Affinität zu Chlorid-Ionen aufzeigen. Des Weiteren könnte die verwendete Base Kaliumcarbonat die Abspaltung des Silylethers unterstützt haben.^[113] Nach Neutralisation und säulenchromatographischer Reinigung konnte das Grundgerüst **31** in einer zufriedenstellenden Ausbeute von 49 % isoliert werden.

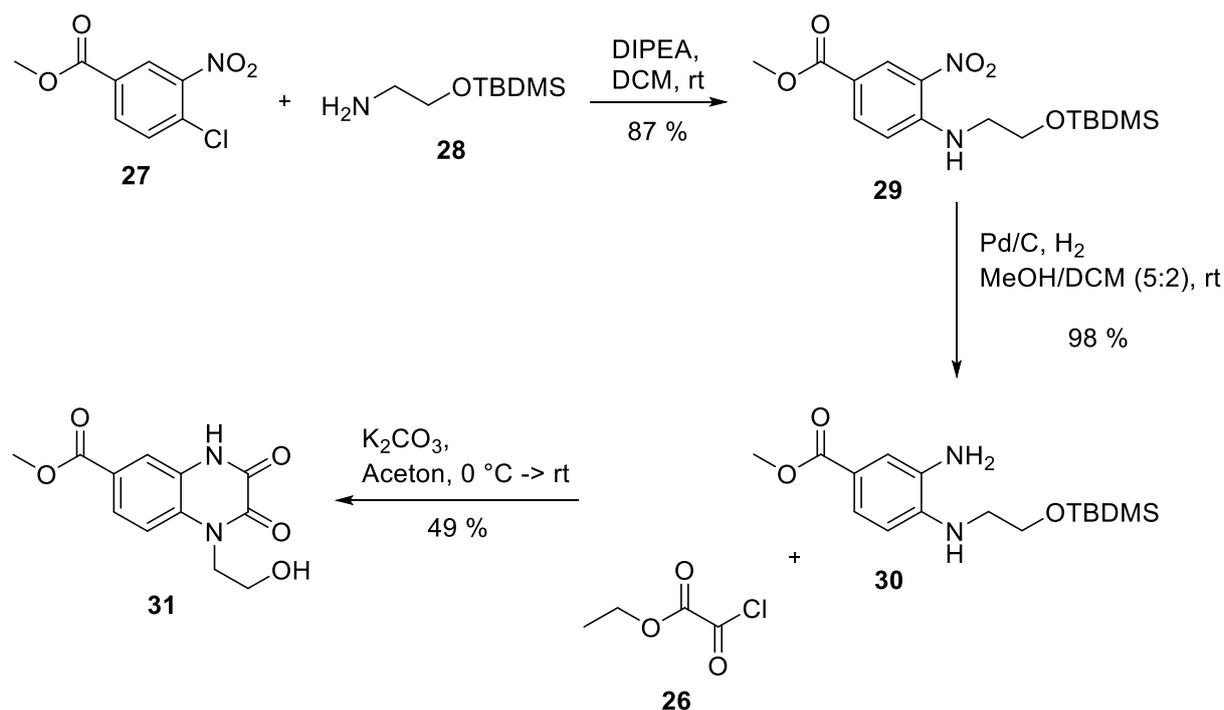


Abbildung 25: Darstellung des Dioxo-chinoxalin-Grundgerüsts **31**. Zunächst wurden der Methylester **27** und das Amin **28** zum Methylester **29** alkyliert. Anschließend folgte die Hydrierung der Nitrogruppe von **29** mit Pd/C als Katalysator zum primären Amin **30**, das dann mit dem sekundären Amin im gleichen Molekül durch Zugabe von Ethyloxalylchlorid (**26**) zum Dioxo-chinoxalin-Grundgerüst **31** verknüpft wurde.

Anschließend musste die reaktionsträge Hydroxylgruppe von **31** aktiviert werden, um sie in einer nucleophilen Substitution mit Natriumazid (**21**) zum gewünschten Dioxo-chinoxalin-Baustein **34** umsetzen zu können. Somit wurde **31** mit Triethylamin in abs. DMF gelöst, auf 0 °C abgekühlt und durch langsames Zutropfen mit Mesylchlorid versetzt. Hierbei wurde zunächst die Hydroxylgruppe zur Mesylgruppe umgesetzt. Durch die gewählten Reaktionsbedingungen und eine Reaktionszeit von 16 Stunden bei Raumtemperatur wird vermutet, dass das in Lösung vorliegende Chlorid-Ion anschließend als Nucleophil fungieren kann und die Mesylgruppe in einer nucleophilen Substitution angreift, wodurch das chlorierte Produkt **32** gebildet wird.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass durch die zusätzliche Zugabe von Natriumiodid im Überschuss (10 eq.) und den Wechsel des Lösungsmittels von DMF zu Aceton, primär das iodierte Produkt **33** erhalten wird. In Analogie zur *Finkelstein*-Reaktion^[114] wird vermutet, dass durch den Überschuss des Natriumiodids eine Umhalogenierung in einer nucleophilen Substitution 2. Ordnung stattfindet. Zudem verschiebt das Aceton das Halogengleichgewicht zugunsten des Iodids, da Natriumchlorid in Aceton wesentlich schlechter löslich ist und während der Reaktion als Salz ausfällt. Somit konnte nach säulenchromatographischer Reinigung das chlorierte Produkt **32** mit einer Ausbeute von 70 %, sowie das iodierte Produkt **33** mit einer Ausbeute von 19 % rein erhalten werden.

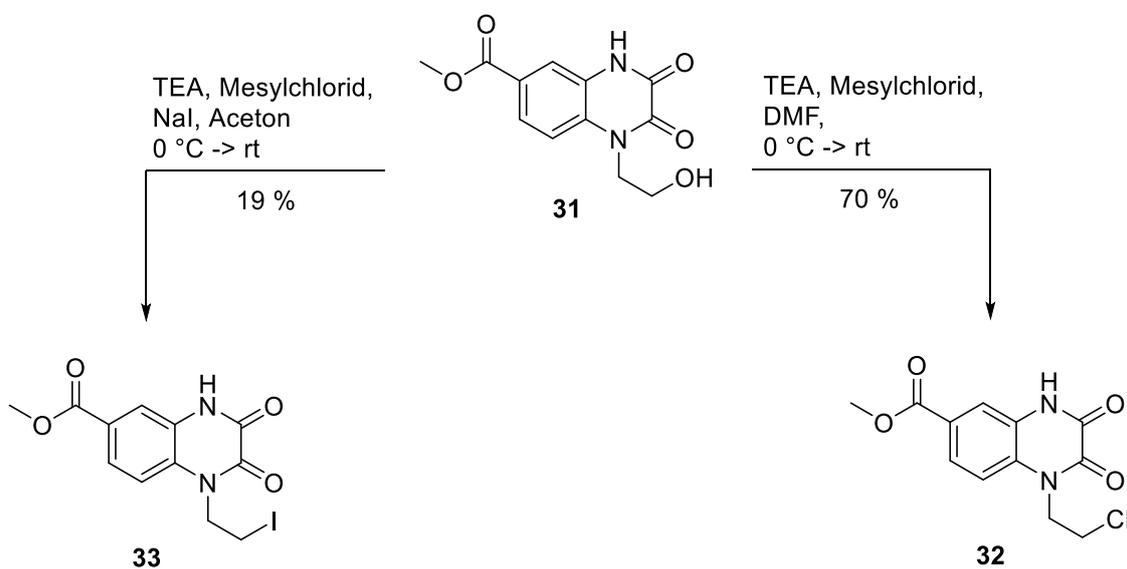


Abbildung 26: Aktivierung der Hydroxylgruppe von **31**. Das Edukt **31** wurde mit Mesylchlorid zum chlorierten Produkt **32** umgesetzt. Durch den Wechsel des Lösungsmittels und einem Überschuss Natriumiodid konnte das iodierte Produkt **33** dargestellt werden.

Nach der erfolgreichen Synthese des chlorierten Produkts **32** erfolgte eine nucleophile Substitution mit Natriumazid (**21**) in Dimethylformamid als polares aprotisches Lösungsmittel. Der methylgeschützte Dioxo-chinoxalin-Baustein **34** konnte in einer Ausbeute von 93 % isoliert werden.

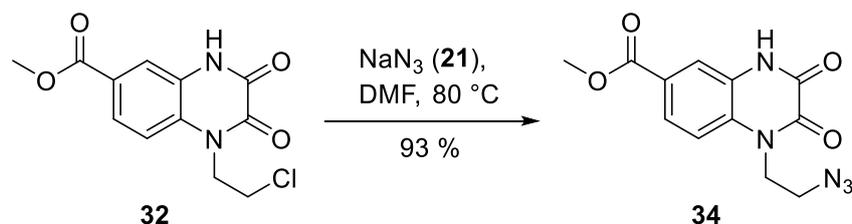


Abbildung 27: Die Darstellung des methylgeschützten Dioxo-chinoxalin-Bausteins **34** erfolgte mit dem chlorierten Produkt **32** in einer nucleophilen Substitution mit Natriumazid (**21**) in DMF.

Der methylgeschützte Dioxo-chinoxalin-Baustein **34** konnte über sechs Stufen mit einer Gesamtausbeute von 24 % dargestellt werden.

Darstellung des enantiomerenreinen Alkins **24**

Um nun das freie Azid von **34** nach dem Konzept der *Click-Chemie*^[112] weiter umzusetzen, wurde zunächst das enantiomerenreine Alkin **24** nach V. Sandgren *et al.*^[115] dargestellt. Da diese Reaktion für die stereoselektive Einführung der Hydroxylgruppe der Liganden (*S*)-**16** und (*R*)-**16** verantwortlich ist, wurden die jeweiligen Styroloxide (*S*)-(**23**) bzw. (*R*)-(**23**) enantiomerenrein erworben und eingesetzt. Hierzu wurden sie jeweils mit abs. DMSO verdünnt, zu einem Lithiumacetylid-Ethylendiamin-Komplex getropft und für 19 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der Angriff erfolgt dabei terminal am Oxiran von **23**, wodurch sich dieser zu einem Alkoholat öffnet und das Alkin sich anlagern kann. Bedingt durch den terminalen Angriff kommt es zudem zu einer Umkehr der Stereochemie der Hydroxylgruppe. Nach anschließender Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung konnten die Produkte (*S*)-**24** und (*R*)-**24** in einer Ausbeute von 82 % und 42 % erzielt werden.

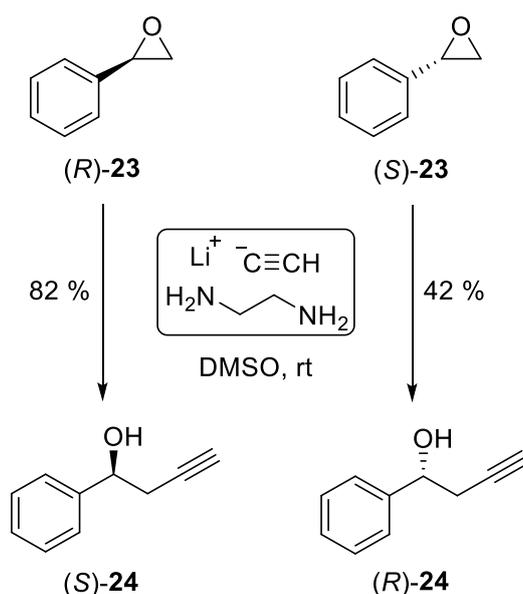


Abbildung 28: Die Umsetzung der jeweiligen, enantiomerenreinen Styroloxide (S)-**(23)** bzw. (R)-**(23)** erfolgte mit einem Lithiumacetylid-Ethylen-diamin-Komplex zu den Produkten (S)-**(24)** bzw. (R)-**(24)**.

Darstellung des Liganden 16

Nach dem Konzept der *Click-Chemie*^[112] erfolgte nun die Verknüpfung des Dioxo-chinoxalin-Bausteins **34** mit dem jeweils, enantiomerenreinen Alkin (S)-**(24)** oder (R)-**(24)** unter der Verwendung von Kupfer(II)-sulfat Pentahydrat. Diese Kupfer-katalysierte Alkin-Azid-Cycloaddition zählt zu einem der prominentesten Beispiele einer *Click-Reaktion*. Sie toleriert eine Vielzahl von anderen funktionellen Gruppen, unterschiedlichste Reaktionsbedingungen sowie wässrige Lösungsmittelgemische. Durch die Zugabe von Natriumascorbat wird das Kupfer(II)-sulfat *in situ* zum aktiven Kupfer(I)-Katalysator reduziert und toleriert neben dem Wasser auch vorhandenen Sauerstoff in der Reaktion. Des Weiteren verhindert ein Überschuss an Natriumascorbat die Bildung von oxidativen Kupplungsprodukten.^[116] Somit wurde das Azid **34** mit dem Alkin (S)-**(24)** bzw. das Azid **34** mit dem Alkin (R)-**(24)** in einer Kupfer(I)-katalysierten Reaktion mit Natriumascorbat selektiv zu den 1,4-disubstituierten 1,2,3-Triazolen (S)-**(35)** bzw. (R)-**(35)** in Ausbeuten von 60 % bzw. 76 % umgesetzt. Anschließend wurden die beiden Enantiomere **35** mit wässriger Natriumhydroxidlösung hydrolysiert und in nahezu quantitativen Ausbeuten die Produkte (S)-**(36)** bzw. (R)-**(36)** erhalten. Abschließend erfolgte die Verknüpfung der freien Carbonsäure von **36** mit dem Benzylamin (**25**) in einer Amidkupplung mit HATU zum gewünschten Liganden **16**. Das HATU fungiert bei der Reaktion als Kopplungsreagenz. Es bildet mit der freien Carbonsäure zunächst sehr schnell einen aktiven Ester, der durch die anschließende Zugabe eines Amins angegriffen wird und durch Umlagerung das gewünschte Amid bildet. Somit wurde zunächst das jeweilige Enantiomer

(*S*)-**36** bzw. (*R*)-**36** mit HATU in abs. DMF bei 0 °C gelöst und nach fünf Minuten mit Benzylamin (**25**) und der Base DIPEA in der Kälte vermischt. Nach weiteren 90 Minuten Rühren bei 0 °C wurde kein Edukt mehr detektiert. Eine abschließende, säulenchromatographische Reinigung konnte die Triazole (*S*)-**16** bzw. (*R*)-**16** in guten Ausbeuten von 44 % bzw. 98 % isolieren.

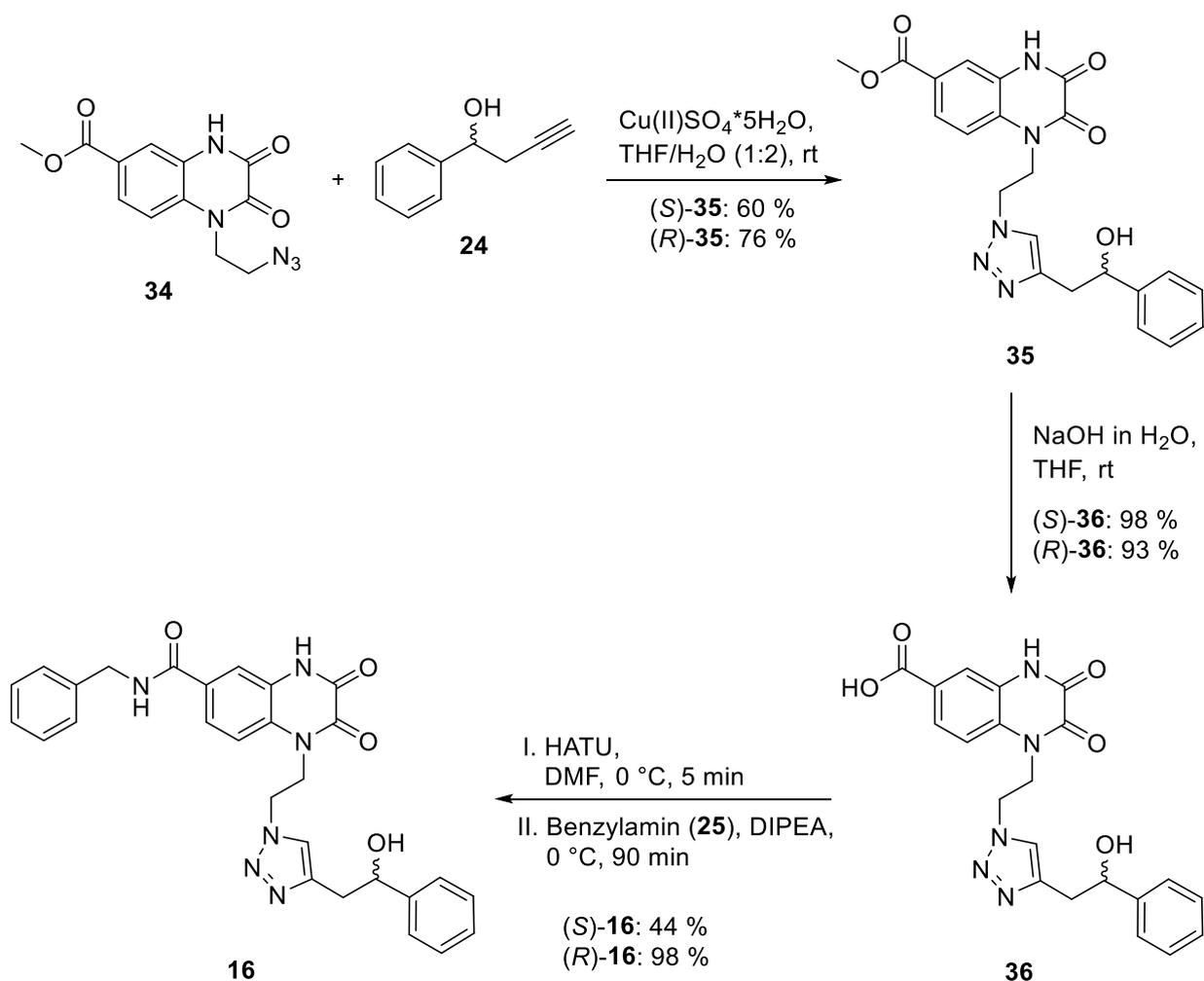


Abbildung 29: Darstellung der Liganden (*S*)-**16** und (*R*)-**16**. Zunächst wurde das Azid **34** mit dem jeweiligen Alkin (*S*)-**24** bzw. (*R*)-**24** in einer Kupfer-katalysierten Alkin-Azid-Cycloaddition zum 1,2,3-Triazol (*S*)-**35** bzw. (*R*)-**35** umgesetzt, dann mit wässriger Natriumhydroxid-Lösung zu **36** hydrolysiert und abschließend mit Benzylamin (**25**) mittels Amidkupplung zu den Liganden (*S*)-**16** bzw. (*R*)-**16** verknüpft.

Die Darstellung der beiden Liganden (*S*)-**16** und (*R*)-**16** erfolgte linear gesehen enantiomerenrein über insgesamt neun Stufen mit einer Gesamtausbeute von 6 % für den Liganden (*S*)-**16** bzw. 16 % für den Liganden (*R*)-**16**. Hierbei wurde zunächst der Dioxo-chinoxalin-Baustein **34** über sechs Stufen dargestellt, dann mit dem jeweils enantiomerenreinen Alkin-Baustein **24** umgesetzt und abschließend mit dem Benzylamin (**25**) verknüpft.

5.2.3 Retrosynthetische Analyse des Liganden **17**

Das in Abbildung 30 dargestellte Retrosynthesekonzept wurde zur Synthese des Liganden **17** verwendet. Ebenfalls ausgehend von der 4-Chlor-3-nitrobenzoesäure (**18**) wurde beabsichtigt, dass es den gleichen retrosynthetischen Ansatz des Liganden **16** verfolgt, wie es in Kapitel 5.2.1 beschrieben ist. Der Unterschied besteht in der selektiven Einführung des Dioxo-chinoxalin-Fragments **22**. Hierbei wurde geplant **22** zunächst nach Abspaltung der Schutzgruppe mit dem Benzylamin (**25**) in einer Amidkupplung zu verknüpft. Zeitgleich wurde vorgesehen das enantiomerenreine Styroloxid (**23**) mit Kohlendioxid zu dem Styrolcarbonat **37** zu überführt und dann mit dem freien Azid von **22** in einer *Staudinger*-ähnlichen Reaktion^[117-119] umzusetzen.

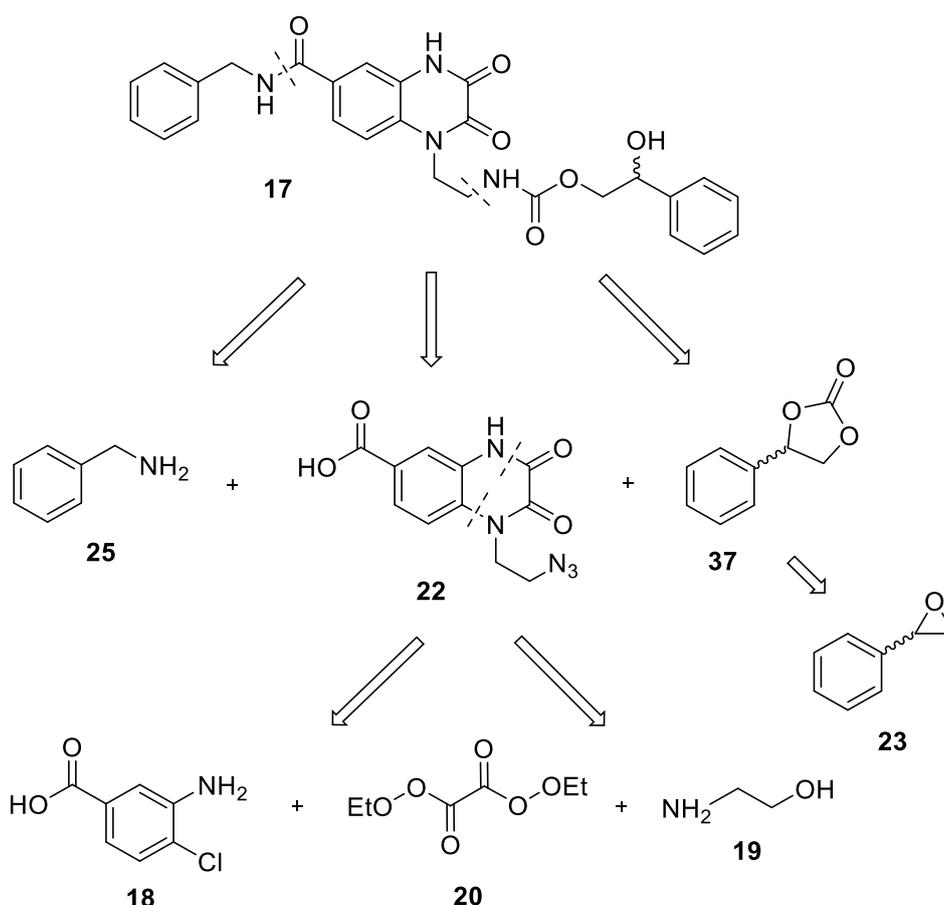


Abbildung 30: Retrosynthetische Analyse zur Darstellung des Liganden **17**. Die Synthesestrategie sieht vor zunächst das Dioxo-chinoxalin-Fragment **22** zu synthetisieren, dieses dann mit dem Benzylamin (**25**) in einer Amidkupplung umzusetzen und abschließend das Carbamat-Fragment mit dem Styrolcarbonat **37** in einer *Staudinger*-ähnlichen Reaktion^[117-119] darzustellen.

Wie in Kapitel 5.2.1 beschrieben, besteht hier ebenfalls die Möglichkeit diverse Modifikation an der Benzylamin-Gruppe vorzunehmen und diese dann auch als potentielle Inhibitoren für die β -Galactosid α -2,6-Sialyltransferase I einzusetzen.

5.2.4 Synthetische Darstellung des Liganden **17**

Darstellung des Azids **38**

Für die Umsetzung des Synthesepfades zur Darstellung des Liganden **17** wurde ausgehend von dem Dioxo-chinoxalin-Baustein **34** begonnen, der zuvor über sechs Stufen synthetisiert wurde (siehe Kapitel 5.2.2). Anschließend erfolgte in Analogie zur synthetischen Darstellung des

Liganden **16** die selektive Einführung der Carbamat-Einheit von **17**, was jedoch mit unerwarteten Problemen einherging. Ein vielversprechender Ansatz war zum Beispiel das iodierte Produkt **33** im Sinne einer *Curtis-Umlagerung*^[120] zum Carbamat **39** umzusetzen. Hierzu wurde das iodierte Produkt **33** mit Kaliumcyanat in abs. DMF zum Isocyanat **40** überführt und dann mit dem zuvor aus Styroloxid (**23**) mit PPTS umgesetzten 1-Phenyl-1,2-ethandiol (**41**) *in situ* direkt weiter zum gewünschten Carbamat **39** umgesetzt. Leider konnte in keinem Ansatz das gewünschte Produkt **39** nachgewiesen werden.

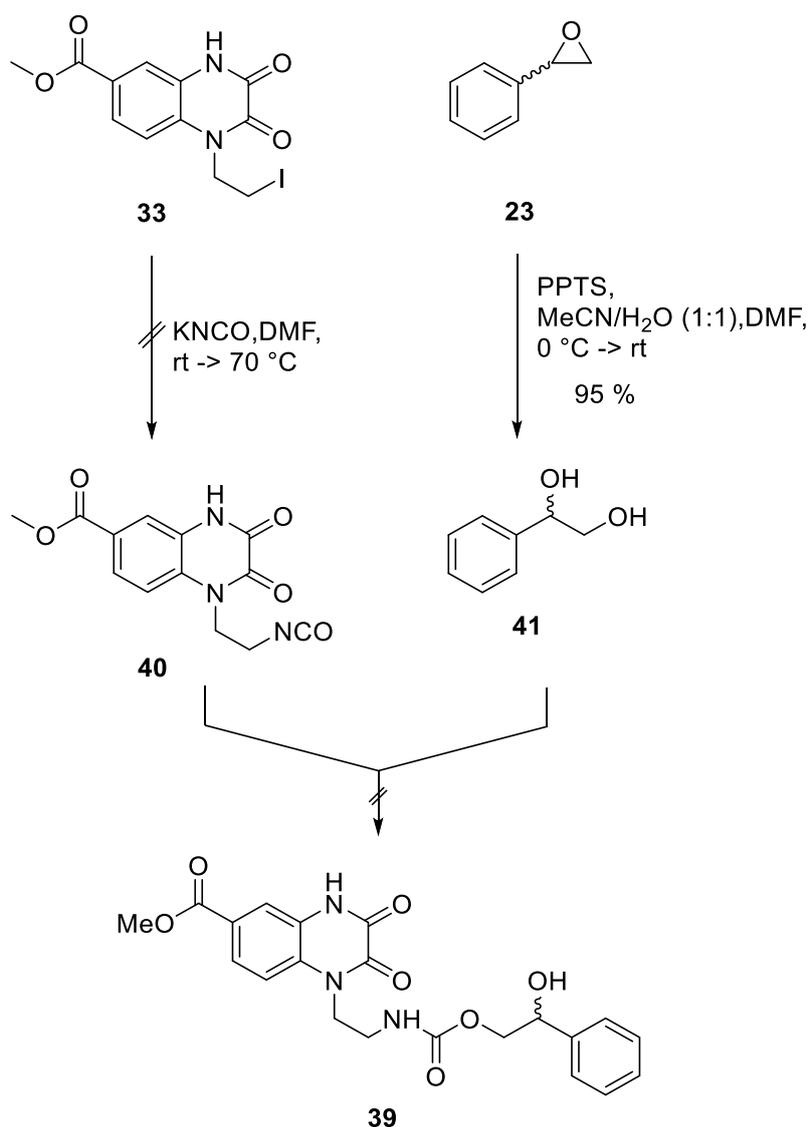


Abbildung 31: Versuch der Darstellung des Carbamats **39**. Hierzu wurde das iodierte Produkt **33** zum Isocyanat **40** umgesetzt und dann mit dem aus Styroloxid (**23**) dargestellten 1-Phenyl-1,2-ethandiol (**41**) im Sinne einer *Curtis-Umlagerung*^[120] verknüpft. Es konnte jedoch kein Produkt erhalten werden.

Somit wurde zunächst, wie in Kapitel 5.2.2 beschrieben, im Azid **34** der Ester mit wässriger Natriumhydroxidlösung hydrolysiert und die freie Säure **22** mit Benzylamin (**25**) in einer Amidkupplung mit HATU zum gewünschten Azid **38** umgesetzt. Das Produkt **38** wurde über zwei Stufen mit einer Ausbeute von 82 % erhalten.

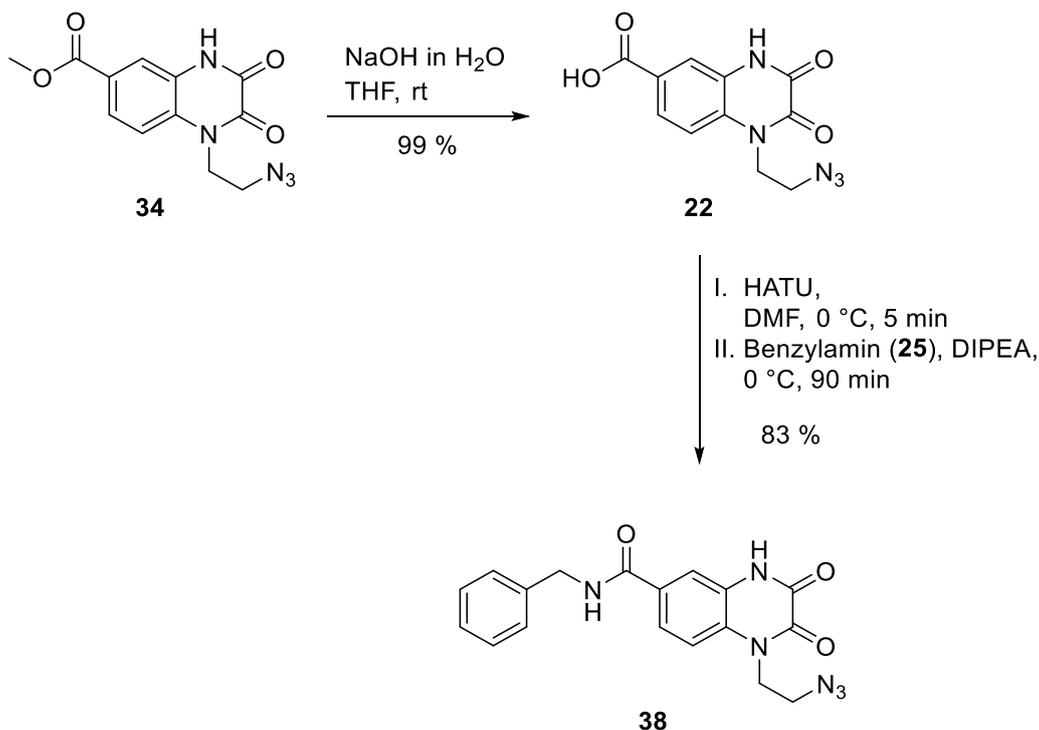


Abbildung 32: Darstellung des neuen Azids **38**. Zunächst wurde im Azid **34** der Ester mit wässriger Natriumhydroxidlösung zu **22** hydrolysiert und dann mit Benzylamin (**25**) mittels Amidkupplung zum Azid **38** umgesetzt.

Darstellung des enantiomerenreinen Styrolcarbonats **37**

Um nun das dargestellte Azid **38** zum Liganden (*S*)-**17** bzw. (*R*)-**17** umzusetzen, musste ein Reaktant gefunden werden, der sowohl zeitgleich die stereoselektive Einführung der Hydroxylgruppe, als auch den Aufbau der Carbamat-Einheit ermöglicht. Gefunden wurde hierfür das enantiomerenreine Styrolcarbonat **37**, das nach V. M. Lombardo *et al.*^[121] aus dem jeweiligen Styroloxid (*S*)-(**23**) bzw. (*R*)-(**23**) dargestellt wurde. Die Styroloxide (*S*)-(**23**) bzw. (*R*)-(**23**) wurden ebenfalls enantiomerenrein erworben und eingesetzt (siehe Kapitel 5.2.2).

Die Umsetzung der Styroloxide (*S*)-(**23**) bzw. (*R*)-(**23**) erfolgte dabei lösungsmittelfrei mit einer katalytischen Menge an Tetrabutylammoniumiodid unter Kohlendioxidatmosphäre und

Lichtausschluss bei 80 °C. Nach anschließender Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung konnten die enantiomerenreinen Styrolcarbonate (*S*)-**37** und (*R*)-**37** in Ausbeuten von 45 % und 78 % erhalten werden.

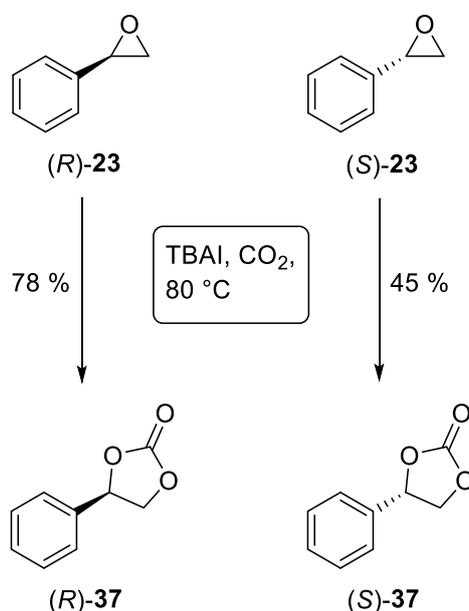


Abbildung 33: Die Umsetzung der jeweiligen, enantiomerenreinen Styroloxide (*S*)-**23** bzw. (*R*)-**23** erfolgte lösungsmittelfrei mit TBAI unter Kohlendioxidatmosphäre zu den Produkten (*S*)-**37** bzw. (*R*)-**37**.

Darstellung des Liganden **17**

Das Azid **38** wurde nun mit dem jeweiligen Styrolcarbonat (*S*)-**37** bzw. (*R*)-**37** zum gewünschten Liganden (*S*)-**17** bzw. (*R*)-**17** umgesetzt, was sich jedoch als relativ kompliziert herausstellte. Es wurden diverse Kupplungsreagenzien und unterschiedlichste Reaktionsbedingungen untersucht bis letztendlich die Liganden (*S*)-**17** und (*R*)-**17** in einer *Staudinger*-ähnlichen Reaktion^[117-119] erfolgreich erhalten werden konnten. Hierfür wurde das Azid **38** in abs. DMF gelöst, bei 0 °C mit einer Trimethylphosphin-Lösung in Toluol versetzt und für insgesamt 50 Minuten gerührt. Währenddessen wurde das jeweilige Styrolcarbonat (*S*)-**37** bzw. (*R*)-**37** in abs. DMF aufgenommen, mit DBU versetzt und für 10 Minuten gerührt. Anschließend erfolgte die Zugabe des umgesetzten Azids **38** zur Styrolcarbonatlösung und die Lösung wurde weitere 16 Stunden gerührt, bis dünnschichtchromatographisch keine Edukte mehr detektiert wurden. Mechanistisch gesehen, greift zunächst das Trimethylphosphin das Azid **38** nucleophil an. Es wird ein Phosphazid gebildet, das durch Umlagerung und wässrige Aufarbeitung elementaren Stickstoff und Trimethylphosphinoxid abspaltet und es wird das Amin erhalten. Währenddessen greift das DBU das Styrolcarbonat **37** an und bildet durch

Ringöffnung des cyclischen Carbonats ein DBU-Amid-Zwischenprodukt aus. Dieses aktivierte Carbamat wird durch die Zugabe des frischen Amins nucleophil angegriffen und bildet nach Deprotonierung des Amins das gewünschte Produkt **17**, sowie das Nebenprodukt **42** aus.^[121] Nach aufwendiger Reinigung und Abtrennung des Nebenproduktes **42** mittels Säulenchromatographie und *RP*-HPLC konnten die Liganden (*R*)-**17** bzw. (*S*)-**17** in Ausbeuten von 25 % bzw. 12 % enantiomerenrein isoliert werden.

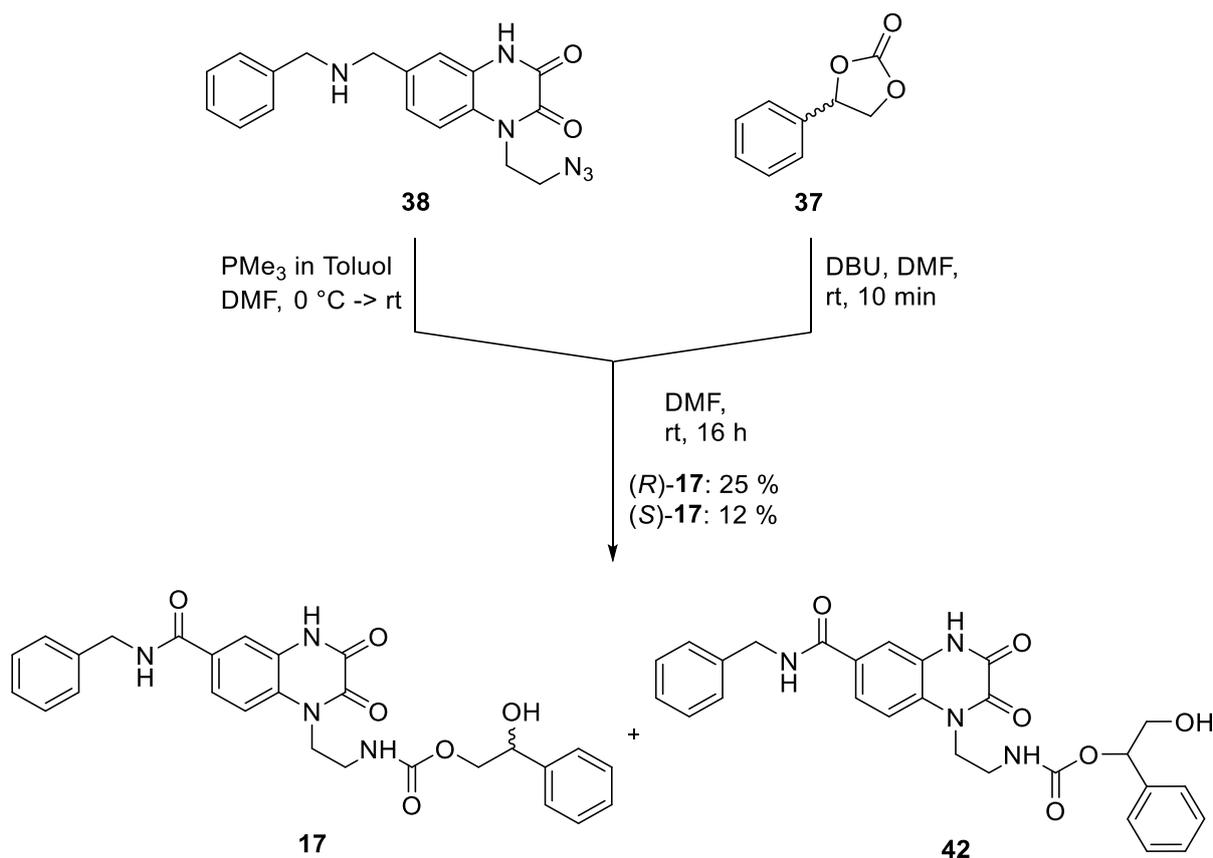


Abbildung 34: Darstellung der Liganden (*S*)-**17** und (*R*)-**17**. Zunächst wurden das Azid **38** mit einer Trimethylphosphin-Lösung in Toluol und das jeweilige Styrolcarbonat (*S*)-**37** bzw. (*R*)-**37** mit DBU parallel zueinander umgesetzt, anschließend ineinander vereinigt und zu den Liganden (*S*)-**17** bzw. (*R*)-**17** umgesetzt.

Die Umsetzung der beiden Liganden (*S*)-**17** und (*R*)-**17** verlief enantiomerenrein über insgesamt neun Stufen mit einer Gesamtausbeute von 5 % für den Liganden (*R*)-**17** bzw. 3 % für den Liganden (*S*)-**17**. Hierbei wurde zunächst der Dioxo-chinoxalin-Baustein **34**, der zuvor in Kapitel 5.2.2 über sechs Stufen dargestellt wurde, mit Benzylamin (**25**) innerhalb einer Amidkupplung verknüpft und abschließend mit dem jeweils enantiomerenreinen Styrolcarbonat (*S*)-**37** bzw. (*R*)-**37** umgesetzt.

Zusammenfassend konnte in Kapitel 5.2 gezeigt werden, dass die Liganden (*S*)-**16** bzw. (*R*)-**16** und (*S*)-**17** bzw. (*R*)-**17** mit den vorgeschlagenen Synthesestrategien erfolgreich dargestellt werden können. Sie konnten jeweils enantiomerenrein über neun Stufen mit einer Gesamtausbeute von 3 % bis 16 % isoliert werden. Im folgenden Kapitel 5.3 wurden nun mit den Liganden SPR- und NMR-basierte Enzymassays durchgeführt, um ihr inhibitorisches Potential gegenüber der β -Galactosid α -2,6-Sialyltransferase I zu untersuchen und untereinander vergleichen zu können.

5.3 Analyse des inhibitorischen Potenzials der dargestellten Inhibitoren gegenüber der ST6Gal-I

5.3.1 Bindungsstudien mittels Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)

Nachdem die synthetisierten Liganden (S)-16 bzw. (R)-16 und (S)-17 bzw. (R)-17 enantiomerenrein erhalten werden konnten, wurden anschließende Bindungsstudien durchgeführt, um zu überprüfen, ob diese ein inhibitorisches Potenzial gegenüber der ST6Gal-I aufweisen. Hierzu bietet sich zunächst die Verwendung der Oberflächenplasmonenresonanz (*surface plasmon resonance*, SPR) als geeignete Analysemethode an, um erste Informationen über das Bindungsverhalten der Liganden mit dem Protein zu erhalten. Ein großer Vorteil dieser Analysemethode ist, dass die Messung der Bindungskonstanten des Proteins (Affinität) und eines Liganden ohne weitere Beeinflussung anderer Analyten in Echtzeit erfolgen kann. Dabei kommt es auch ohne ein *labeling* der zu analysierenden Bindungspartner aus, was die Handhabung erheblich vereinfacht. Zudem werden die Bindungsereignisse in einem strömenden System gemessen, wodurch eine deutlich verbesserte Adaption eines biologischen Systems erreicht wird.

SPR ist ein optisches, biosensorisches Analyseverfahren, das auf dem Effekt der Oberflächenplasmonenresonanz beruht. Hierbei wird planar polarisiertes Licht durch ein Prisma auf eine dünne Metalloberfläche eingestrahlt und dort totalreflektiert. Dadurch interagieren die freien Elektronen im Metall mit den Photonen und erzeugen dort Oberflächenplasmonen, die in longitudinalen, elektronischen Schwingungen parallel zur Metalloberfläche verlaufen. Im Metall wird so ein evaneszentes Feld erzeugt, welches über das Metall hinaus bis in die vorbeifließende Analytlösung wirkt. Im Resonanzfall wird das einfallende Licht vom Einstrahlwinkel absorbiert, wobei es in Abhängigkeit vom Einstrahlwinkel steht. Tritt nun eine Änderung des Brechungsindex in unmittelbarer Nähe der Metalloberfläche auf, reagieren die elektronischen Schwingungen stark darauf. Es kommt zu einer Rückkopplung und damit zur Änderung des Winkels, um die Resonanzbedingung zu erfüllen.^[122,123]

Experimentell gesehen, kommt es dabei zu einem Abfall der Intensität des totalreflektierten Lichts, die dann in Abhängigkeit des Einstrahlwinkels gemessen werden kann. Dazu wird ein Bindungspartner (meist das Protein) auf eine gold- und matrixbeschichtete Oberfläche eines Mikrofluid-Chips kovalent gebunden und der andere Bindungspartner (meist der Ligand) durch ein internes mikrofluidisches System (IFC = *integrated fluidic cartige*) über die Chipoberfläche geleitet. Findet dann eine Interaktion zwischen den beiden Partnern statt,

kommt es zu einer messbaren Änderung des Reflexionswinkels des eingestrahnten, polarisierten Lichts. Die zeitabhängigen Interaktionen werden als Winkelveränderung der Oberflächenplasmonenresonanz detektiert und in einem Differenzsensorgramm aus der Messzelle und einer Referenzzelle in sogenannten RU (*response units*) dargestellt. Die Verwendung einer leeren Referenzzelle ermöglicht es, unspezifische Interaktionen von spezifischen Interaktionen zu unterscheiden und diese direkt entfernen zu können. Zudem lässt es eine Differenzierung der Änderung des Brechungsindex zu, welche z.B. beim Wechsel von Laufpuffer und Analytlösung auftreten können (*bulk*-Effekte).^[122,124]

Im erhaltenen Differenzsensorgramm wird die Zeit der Messung gegenüber der erhaltenen RU's aufgetragen (Abbildung 35). Nach dem Wechsel auf die injizierte Analytlösung beginnt die Assoziationsphase, in der die zunehmenden Bindungsereignisse die Dichte auf der Chipoberfläche erhöhen. Die Kurve steigt so lange an, bis sich ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Assoziation und Dissoziation eingestellt hat. Die erhaltende Bindungskurve der Assoziation gibt somit die Zunahme der Bindungsstellen wieder, bis eine Sättigung erreicht wurde. Mit dem Wechsel zurück auf den Laufpuffer beginnt die Dissoziationsphase, wobei die Analyten aus der Messzelle gespült werden. Da die Dissoziation der Analyten meist langsam verläuft, wird sie durch Detergenzien wie z.B. SDS oder der Veränderungen des pH-Wertes beschleunigt, bis wieder die Basisline erreicht wird. Eine vollständige Regeneration der Chipoberfläche ist für die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse bzw. den Wechsel der Analytlösung unerlässlich. Dabei muss beachtet werden, dass der immobilisierte Bindungspartner nicht mit herausgespült bzw. beschädigt wird.

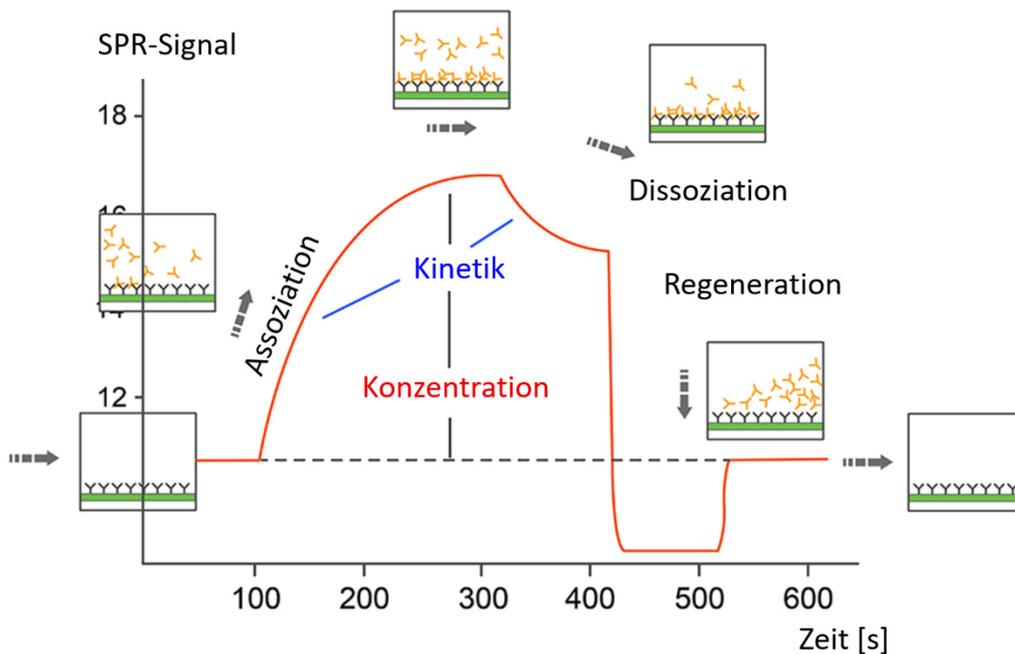


Abbildung 35: Verlauf eines idealen SPR-Sensorgramms einer Messung: In der Assoziationsphase werden die injizierten Analyten vom immobilisierten Bindungspartner gebunden, bis sich ein Gleichgewicht eingestellt hat. In der Dissoziationsphase werden die Analyten durch den Wechsel auf den Laufpuffer herausgespült, bis eine vollständige Regeneration erhalten wurde.

Die Aufnahme von Sensorgrammen mit unterschiedlichen Konzentrationen der Analytlösung ermöglicht die Ermittlung der thermodynamischen Dissoziationskonstante K_D . Unter der Annahme, dass $1 \text{ RU} = 1.0 \text{ pg/mm}^2$ des immobilisierten Bindungspartners entspricht, kann dessen Menge berechnet werden und der Wert RU_{\max} nach Gleichung (2) bestimmt werden.

$$\text{RU}_{\max} = \frac{\text{RU} * [\text{MW}_{\text{Analyt}}]}{[\text{MW}_{\text{binding partner}}]} \quad (2)$$

Hierbei gibt RU_{\max} die maximal zu erwartende RU -Antwort wieder und wird durch die Massen des Analyten ($\text{WM}_{\text{Analyt}}$) und des Bindungspartners ($\text{WM}_{\text{binding partner}}$), sowie die Menge des immobilisierten Bindungspartners definiert.

Durch Umformung von Gleichung (2) und einer Anpassung an das *one side binding* Modell kann die thermodynamische Dissoziationskonstante K_D nach Gleichung (3) erhalten werden.

$$RU = \frac{RU_{max} * [c_{Analyt}]}{K_D + [c_{Analyt}]} \quad (3)$$

Hierbei werden die erhaltenen Sättigungswerte (RU_{max}) gegen die jeweiligen Konzentrationen der Analytlösung (c_{Analyt}) aufgetragen.

Des Weiteren lässt sich aus den Kurvenverläufen der Assoziation und der Dissoziation eine kinetische Analyse der Bindungseigenschaften durchführen. Mit Hilfe der *Langmuir*-Funktion können die Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{on} und k_{off} bestimmt werden, deren Quotient die thermodynamische Dissoziationskonstante K_D ergibt. Die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{on} und k_{off} sind dabei stark vom Experiment (Analyt-Konzentration, Temperatur, Fließgeschwindigkeit) und Nebeneffekten (z.B. *bulk*-Effekte) abhängig und könnten somit zu unterschiedlichen Ergebnissen der kinetischen Analyse und der thermodynamischen Analyse führen.

5.3.1.1 Vorbereitungen für die SPR-Messungen

Bei den Vorbereitungen für die SPR-Messungen ergaben sich zunächst unerwartete Probleme. Es zeigte sich, dass die zu untersuchenden Liganden eine begrenzte Löslichkeit im verwendeten *HBS-P* Puffer aufwiesen. Somit wurde mittels NMR zunächst die höchstmögliche Konzentration des jeweiligen Liganden durch das Messen des *S/N*-Verhältnisses bestimmt. Als Vergleichssubstanz diente eine 2 mM Sucroslösung in D_2O . Ein Ligand konnte dabei in einer Konzentration von 20 μM bestimmt werden. Die anderen Ligandenkonzentrationen lagen deutlich darunter. Um die Löslichkeit der Liganden zu verbessern, wurde der *HBS-P* Puffer zusätzlich prozentual mit DMSO versetzt und die jeweilige Konzentration bestimmt. Erst durch den hohen Zusatz von 10 % DMSO zum Laufpuffer konnten akzeptable Konzentrationen der Liganden von 28 - 170 μM erzielt werden. Im Experiment muss darauf geachtet werden, dass der Laufpuffer und die Ligandenlösungen immer die gleiche Konzentration an DMSO haben, da DMSO einen hohen Brechungsindex aufweist. Schon kleinste Unterschiede führen zu deutlichen *bulk*-Effekten während der Messung, die sich zudem noch in jeder einzelnen Probe unterscheiden können. Des Weiteren muss beachtet werden, dass sich ein DMSO-haltiger Puffer negativ auf die Lebensdauer und Aktivität des immobilisierten Proteins auswirkt.

Für die Untersuchungen der Bindungseigenschaften der Liganden wurde die ST6Gal-I mit einem Acetat-Puffer (pH 5.5) auf eine Konzentration von 28 $\mu\text{M}/\text{mL}$ eingestellt und auf einem HC-30M Sensorchip der Firma *Xantec*[®] bei einer Flussrate von 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ für 300 Sekunden immobilisiert. Als Laufpuffer diente der kommerziell bezogene *HBS-P* Puffer mit 10 % DMSO (pH 7.4). Es wurden verschiedene Flussraten von 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ bis 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ untersucht. Hierbei konnten mit einer Flussrate von 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ die besten Ergebnisse verzeichnet werden. Alle SPR-Experimente wurden bei einer konstanten Temperatur von 20 °C durchgeführt.

Zur Überprüfung der Aktivität des immobilisierten Proteins wurde zunächst das natürliche Donorsubstrat CMP-Neu5Ac in einem Konzentrationsbereich von 0 - 250 μM vermessen. Anschließend wurden die synthetisierten Liganden (*S*)-**16** bzw. (*R*)-**16** und (*S*)-**17** bzw. (*R*)-**17** in ihren jeweiligen Konzentrationen über den Chip geleitet. Am Anfang jeder Konzentrationsreihe erfolgte zunächst zweimal eine Doppelnullbestimmung. Am Ende jeder Konzentrationsreihe erfolgte eine Doppelbestimmung einer mittleren Konzentration des zu untersuchenden Liganden und eine Bestimmung des Donorsubstrats CMP-Neu5Ac in einer Konzentration von 75 μM , um eine gleichbleibende Enzymaktivität zu gewährleisten.

Die Untersuchungen der Bindungseigenschaften der Liganden mittels SPR erfolgten zunächst thermodynamisch durch die Aufnahme von Titrationsreihen der zu untersuchenden Liganden. Anschließend erfolgte eine kinetische Analyse. Hierzu wurden die einzelnen Titrationskonzentrationspunkte eines Liganden ausgewertet. Wie schon zuvor erläutert, können die Ergebnisse aus der kinetischen Auswertung stark von denen der thermodynamischen Auswertung abweichen. Die kinetische Auswertung dient aber als sinnvolle Ergänzung, um die thermodynamischen Ergebnisse ggf. zu verifizieren.

5.3.1.2 SPR-Bindungsstudien vom Donor CMP-Neu5Ac

Die Untersuchung der Bindungsaffinität vom Donor CMP-Neu5Ac erfolgte in einem Konzentrationsbereich von 0 - 250 μM . Die Konzentrationen von 50 μM (DB) und 75 μM wurden als Ausreißer bestimmt und daher für die Auswertung nicht berücksichtigt. Zudem wurde die Konzentrationsmessung von 37.5 μM nicht mit in die Auswertung einbezogen, da es während der Assoziationsphase zu einem deutlichen Abfall der RU-Antworten kam und somit als Messfehler gewertet wurde. Die bei der Analyse von CMP-Neu5Ac erhaltenen Sensorgramme und die Anpassung an das *one side binding* Modell sind in Abbildung 36 dargestellt.

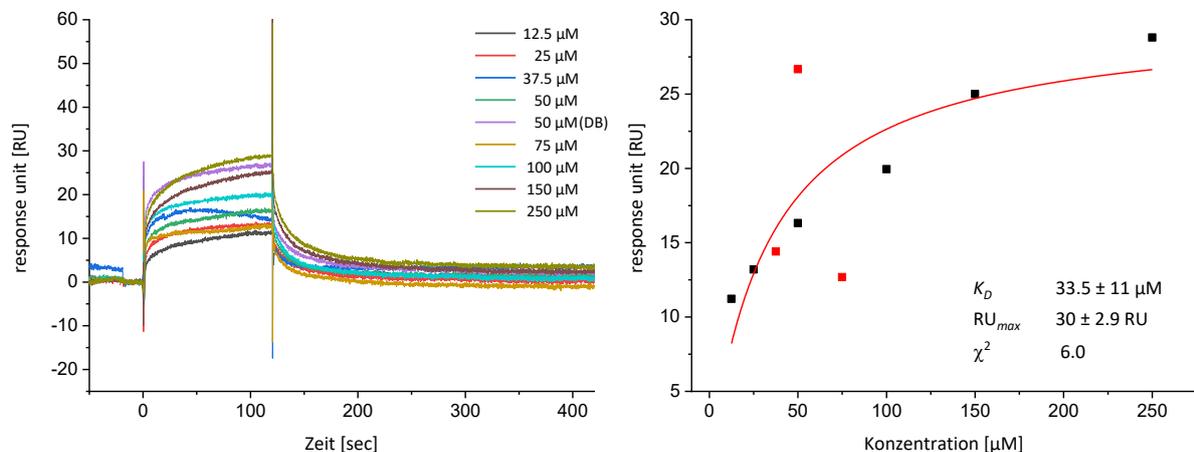


Abbildung 36: Darstellung der bei der Analyse von CMP-Neu5Ac erhaltenen Sensorgramme (links) und die dazugehörige Anpassung an das *one side binding* Modell (rechts). Trotz deutlichen *bulk*-Effekten wurde ein gutes Signal-zu-Rausch Verhältnis erhalten. Der bestimmte RU_{max} -Wert beträgt ungefähr 1/5 des theoretischen RU_{max} -Wertes. Die Dissoziationskonstante K_D konnte zu 33.5 μM bestimmt werden. Die rot dargestellten Messpunkte wurden bei der Kurvenanpassung nicht berücksichtigt.

Obwohl durch den Zusatz an DMSO zum Laufpuffer deutliche *bulk*-Effekte aufgetreten sind, zeigten die Sensorgramme ein gutes Signal-zu-Rausch Verhältnis und konnten erfolgreich ausgewertet werden. Der bestimmte RU_{max} -Wert von 30 beträgt ungefähr 1/5 des theoretischen RU_{max} -Wertes. Die Anpassung der erhaltenen Daten an das *one side binding* Modell ergab eine Dissoziationskonstante K_D von 33.5 μM und konnte auch in einer weiteren Messzelle bestätigt werden.

Anschließend erfolgte eine kinetische Analyse des natürlichen Donors CMP-Neu5Ac. Auf Grund des Zusatzes von 10 % DMSO zum Puffer traten starke *bulk*-Effekte auf und eine Anpassung der einzelnen Konzentrationen an die *Langmuir*-Gleichung mit dem Programm

T100 Evolution war somit nicht möglich. Um dennoch eine kinetische Analyse durchführen zu können, wurden die betroffenen Messteile der jeweiligen Kurve herausgenommen und nicht mit in die Bestimmung des jeweiligen *fits* einbezogen. Durch die entstandene Unterbrechung des Übergangs von der Assoziationsphase zur Dissoziationsphase mussten die Werte k_{obs} und k_{off} separat voneinander ausgewertet werden, um am Ende die kinetisch ermittelte Dissoziationskonstante K_D zu erhalten. Die Auswertung erfolgte durch die Anpassung an eine exponentielle Funktion (*ExpDecay2*) mit dem Programm *Origin Pro 2019*. Die Grenzen der jeweiligen Phase wurden dabei so gewählt, dass eine maximale Anzahl an Datenpunkten miteinbezogen wurde und auch ein guter *fit* erhalten wurde.

In Abbildung 37 ist exemplarisch links der *fit* der Assoziationsphase zur Bestimmung von k_{obs} und rechts der *fit* der Dissoziationsphase zur Bestimmung von k_{off} des Donors CMP-Neu5Ac bei einer Konzentration von 25 μM gezeigt.

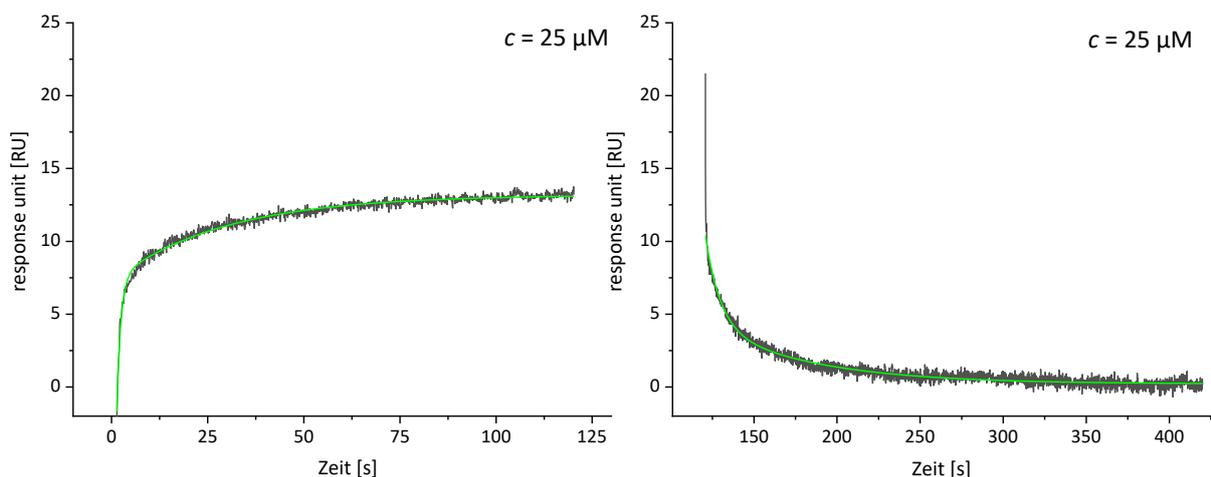


Abbildung 37: Exemplarische Darstellung der kinetischen Analyse des Donors CMP-Neu5Ac bei einer Konzentration von 25 μM . Durch die Anpassung an eine exponentielle Funktion wurde links die Assoziationsphase mit dem *fit* zur Bestimmung von k_{obs} und rechts die Dissoziationsphase mit dem *fit* zur Bestimmung von k_{off} erhalten.

Die Ergebnisse der kinetischen Analyse des Donors CMP-Neu5Ac sind in Tabelle 3 aufgeführt. Die Bestimmung von k_{obs} und k_{off} erfolgte für jede Konzentration, die auch zuvor in der thermodynamischen Analyse berücksichtigt wurde. Hierbei war eine Auswertung aller Konzentrationen nicht möglich, da bei der Berechnung von k_{on} aus k_{obs} auch negative Werte erhalten wurden. Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_D mittels Division von k_{off} durch k_{on} konnte somit nicht immer erfolgen. Die nicht berücksichtigten Werte wurden in Klammern gesetzt und sind der Vollständigkeit halber mit aufgeführt.

5 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 3: Zusammenfassung der ermittelten Daten aus der kinetischen Analyse vom CMP-Neu5Ac. Die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{on} wurde durch Subtraktion der erhaltenden Konstante k_{obs} von der Konstante k_{off} und anschließender Division durch die jeweilige Konzentration c erhalten. Der K_D -Wert wurde dann mittels Division von k_{off} durch k_{on} berechnet.

c [μM]	t_{on} [s]	k_{obs} [1/s]	t_{off} [s]	k_{off} [1/s]	k_{on} [1/Ms]	K_D [μM]
12.5	(49.32)	(0.020)	(47.76)	(0.021)	(n.a.)	(n.a.)
25	29.17	0.034	63.32	0.016	739.82	21.4
50	(52.24)	(0.019)	(41.07)	(0.024)	(n.a.)	(n.a.)
100	39.46	0.025	65.68	0.015	101.19	150.5
150	43.24	0.023	56.53	0.018	36.22	488.4
250	39.56	0.025	44.24	0.023	10.68	2116.2
Mittelwert	37.86	0.027	57.44	0.018	221.98	694.1

Die kinetische Analyse ergab im Mittel einen höheren K_D -Wert von 694 μM als die thermodynamische Analyse. Besonders auffällig sind die hohen K_D -Werte bei höheren Konzentrationen. Allgemein werden bei der kinetischen Analyse die besten k_{on} - und k_{off} -Werte für die Konzentrationen erhalten, die im Bereich der Dissoziationskonstante K_D liegen, da sekundäre Bindungen oder Aggregationsphänomene, die bei höheren Konzentrationen auftreten können, wegfallen und genügend Abstand vom Signal zum Rauschen besteht. Werden die höheren Konzentrationen hier nicht mit in die Betrachtung einbezogen, stimmt der K_D -Wert von 21.4 μM gut mit dem thermodynamischen K_D -Wert von 33.5 μM überein.

5.3.1.3 SPR-Bindungsstudien des Liganden (S)-16

Der Ligand (S)-16 konnte in einer höchstmöglichen Konzentration von 60 μM gelöst werden und wurde somit in einem Konzentrationsbereich von 0 - 60 μM untersucht. Die Konzentrationen von 9.0 μM und 36 μM wurden als Ausreißer bestimmt und daher für die weitere Auswertung nicht berücksichtigt. Die bei der Analyse von (S)-16 erhaltenen Sensorgramme und die Anpassung an das *one side binding* Modell sind in Abbildung 38 dargestellt.

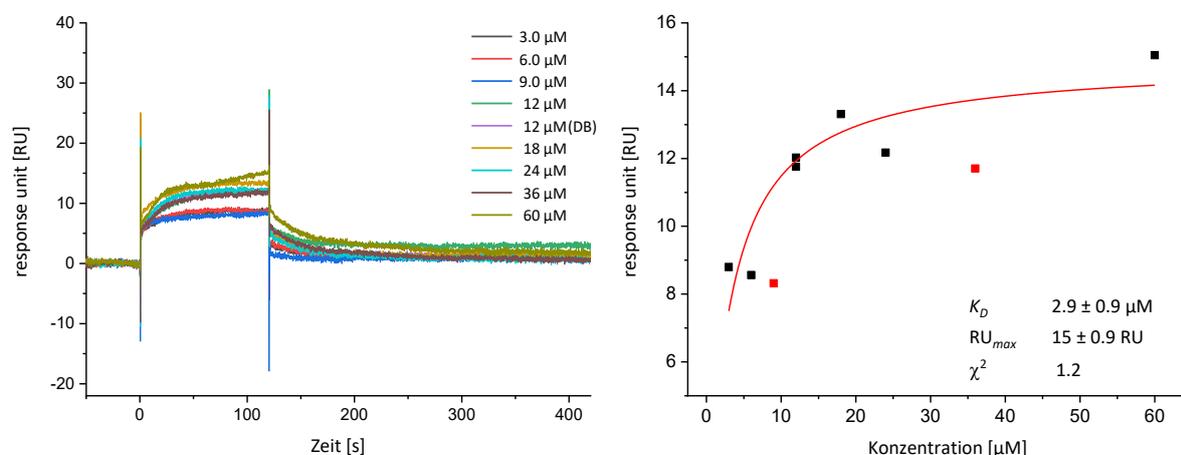


Abbildung 38: Darstellung der bei der Analyse von (S)-16 erhaltenen Sensorgramme (links) und die dazugehörige Anpassung an das *one side binding* Modell (rechts). Obwohl deutliche *bulk*-Effekte aufgetreten sind, konnte ein gutes Signal-zu-Rausch Verhältnis erhalten werden. Der bestimmte RU_{max} -Wert beträgt etwas mehr als 1/8 des theoretischen RU_{max} -Wertes. Die Dissoziationskonstante K_D wurde zu 2.9 μM bestimmt. Die rot dargestellten Messpunkte wurden bei der Kurvenanpassung nicht mit einbezogen.

Der bestimmte RU_{max} -Wert von 15 beträgt etwas mehr als 1/8 des zuvor theoretisch berechneten RU_{max} -Wertes. Dennoch konnten die Sensorgramme neben deutlichen *bulk*-Effekten in einem guten Signal-zu-Rausch Verhältnis erhalten werden. Die Anpassung der erhaltenen Daten an das *one side binding* Modell ergab eine Dissoziationskonstante K_D von 2.9 μM . Der ermittelte K_D -Wert konnte in einer anderen Messzelle bestätigt werden.

Anschließend erfolgte eine kinetische Analyse des Liganden (S)-16. Auf Grund der ebenfalls auftretenden *bulk*-Effekte war eine Anpassung der einzelnen Konzentrationen an die *Langmuir*-Gleichung nicht möglich und die kinetische Analyse erfolgte analog zum Donor CMP-Neu5Ac. In Abbildung 39 ist exemplarisch links der *fit* der Assoziationsphase zur Bestimmung von k_{obs} und rechts der *fit* der Dissoziationsphase zur Bestimmung von k_{off} des Liganden (S)-16 bei einer Konzentration von 12 μM (DB) gezeigt.

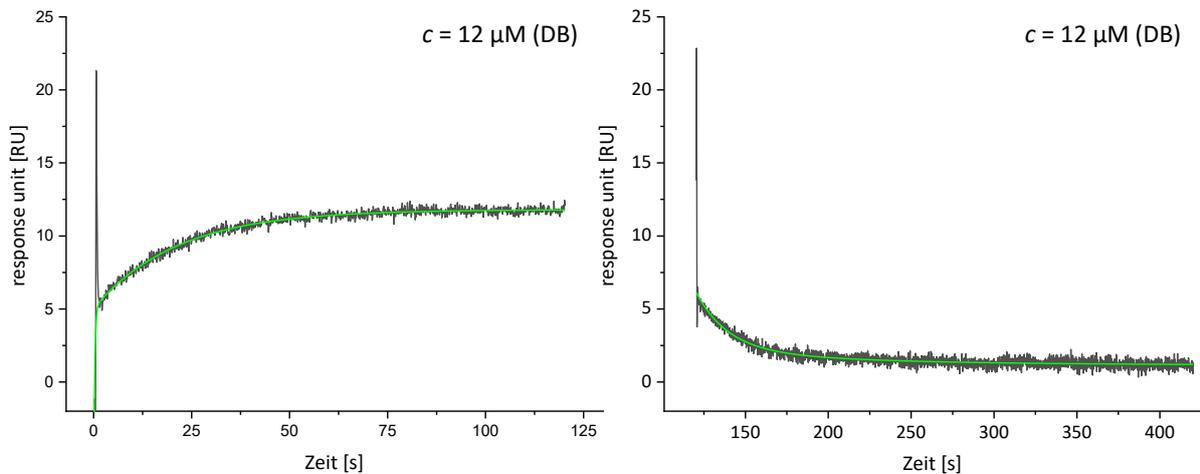


Abbildung 39: Exemplarische Darstellung der kinetischen Analyse von (S)-16 bei einer Konzentration von 12 μM (DB). Durch die Anpassung an eine exponentielle Funktion wurde links die Assoziationsphase mit dem *fit* zur Bestimmung von k_{obs} und rechts die Dissoziationsphase mit dem *fit* zur Bestimmung von k_{off} erhalten.

Die Ergebnisse der kinetischen Analyse von (S)-16 sind in Tabelle 4 wiedergegeben. Die Bestimmung von k_{obs} und k_{off} erfolgte für jede Konzentration, die auch zuvor in der thermodynamischen Analyse verwendet wurde. Hierbei war eine Auswertung aller Konzentrationen nicht möglich, da bei der Berechnung von k_{on} aus k_{obs} auch negative Werte erhalten wurden. Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_D mittels Division von k_{off} durch k_{on} konnte somit nicht immer erfolgen. Die nicht berücksichtigten Werte wurden in Klammern gesetzt und sind der Vollständigkeit halber mit aufgeführt.

5 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 4: Zusammenfassung der ermittelten Daten aus der kinetischen Analyse von (S)-16. Die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{on} wurde durch Subtraktion der erhaltenen Konstante k_{obs} von der Konstante k_{off} und anschließender Division durch die jeweilige Konzentration c erhalten. Der K_D -Wert wurde dann mittels Division von k_{off} durch k_{on} berechnet.

c [μM]	t_{on} [s]	k_{obs} [1/s]	t_{off} [s]	k_{off} [1/s]	k_{on} [1/Ms]	K_D [μM]
3	(24.91)	(0.040)	(18.44)	(0.054)	(n.a.)	(n.a.)
6	15.76	0.063	23.34	0.043	3435.1	12.5
12	28.19	0.035	38.08	0.026	767.7	34.2
12 (DB)	21.25	0.047	93.09	0.011	3026.9	3.5
18	24.54	0.041	39.48	0.025	856.2	29.6
24	19.57	0.051	78.70	0.013	1599.8	7.6
60	(3696.34)	(0.0003)	(72.91)	(0.014)	(n.a.)	(n.a.)
Mittelwert	21.86	0.048	54.54	0.024	1937.1	17.6

Die kinetische Analyse ergab gemittelt zwar einen 6-fach höheren K_D -Wert als die thermodynamische Analyse, bestätigt jedoch den Wert im niedrigen mikromolaren Bereich. Der Unterschied der beiden Dissoziationskonstanten könnte daher kommen, dass die Flussgeschwindigkeit für eine kinetische Analyse zu niedrig ist. Dies führt mitunter zu einer Massentransportlimitierung (*mass transfer limitation*, MTL) und würde dann den Wert von k_{on} negativ beeinflussen. Wird nur die Konzentration von 12 μM (DB) betrachtet, stimmt der kinetische K_D -Wert von 3.5 μM sehr gut mit dem thermodynamischen K_D -Wert von 2.9 μM überein.

5.3.1.4 SPR-Bindungsstudien des Liganden (R)-16

Für den Liganden (R)-16 wurde eine höchstmögliche Konzentration von 170 μM ermittelt und konnte somit in einem Konzentrationsbereich von 0 - 170 μM analysiert werden. Die Konzentrationen von 34 μM und 51 μM wurden als Ausreißer bestimmt und daher für die weitere Auswertung nicht berücksichtigt. Die bei der Analyse von (R)-16 erhaltenen Sensorgramme und die Anpassung an das *one side binding* Modell sind in Abbildung 40 dargestellt.

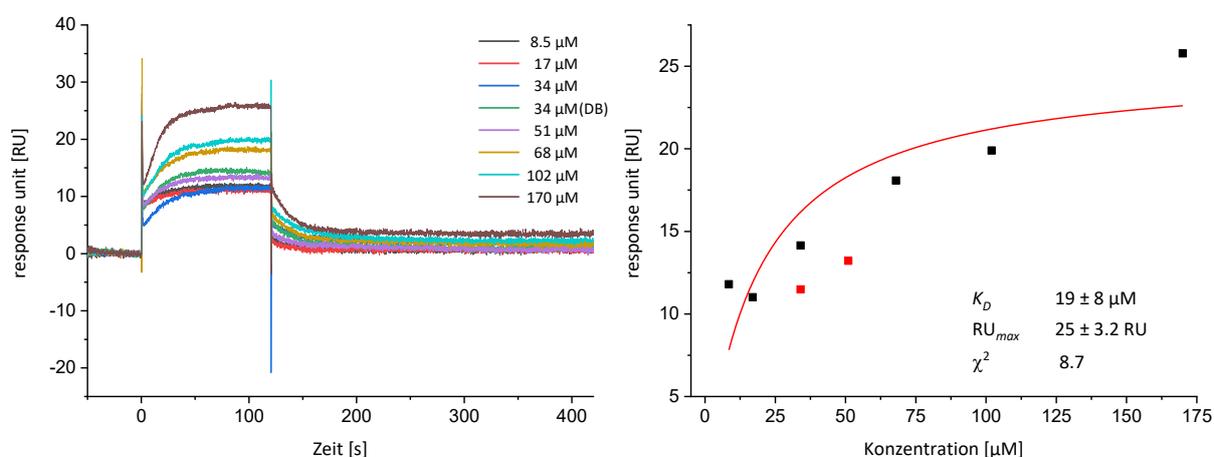


Abbildung 40: Darstellung der bei der Analyse von (R)-16 erhaltenen Sensorgramme und die dazugehörige Anpassung an das *one side binding* Modell. Die Sensorgramme zeigten ein gutes Signal-zu-Rausch Verhältnis, obwohl deutliche *bulk*-Effekte auftraten. Der bestimmte RU_{max} -Wert beträgt etwas mehr als 1/5 des theoretischen RU_{max} -Wertes. Die Dissoziationskonstante K_D konnte zu 19 μM bestimmt werden. Die rot dargestellten Messpunkte wurden bei der Kurvenanpassung nicht berücksichtigt.

Die erhaltenen Sensorgramme zeigten ein gutes Signal-zu-Rausch Verhältnis. Somit konnten die erhaltenen Daten gut an das *one side binding* Modell angepasst werden, auch wenn der bestimmte RU_{max} -Wert von 25 nur etwas mehr als 1/5 des theoretischen RU_{max} -Wertes entspricht. Die Dissoziationskonstante K_D konnte zu 19 μM bestimmt werden. Dieser Wert konnte auch in einer weiteren Messzelle bestätigt werden.

Anschließend wurde eine kinetische Analyse des Liganden (R)-16 durchgeführt, die auf Grund der aufgetretenen *bulk*-Effekte analog zum Donor CMP-Neu5Ac erfolgte. In Abbildung 41 ist exemplarisch links der *fit* der Assoziationsphase zur Bestimmung von k_{obs} und rechts der *fit* der Dissoziationsphase zur Bestimmung von k_{off} des Liganden (R)-16 bei einer Konzentration von 34 μM (DB) gezeigt.

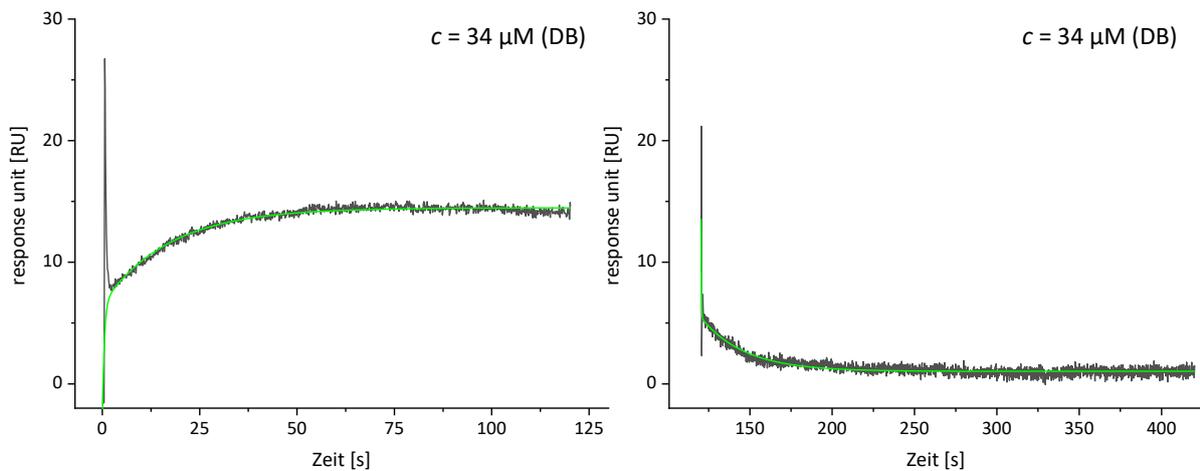


Abbildung 41: Exemplarische Darstellung der kinetischen Analyse von (R)-16 bei einer Konzentration von $34 \mu\text{M}$ (DB). Durch die Anpassung an eine exponentielle Funktion wurde links die Assoziationsphase mit dem *fit* zur Bestimmung von k_{obs} und rechts die Dissoziationsphase mit dem *fit* zur Bestimmung von k_{off} erhalten.

Die Ergebnisse der kinetischen Analyse von (R)-16 sind in Tabelle 5 wiedergegeben. Die Bestimmung von k_{obs} und k_{off} erfolgte für jede Konzentration, die auch zuvor in der thermodynamischen Analyse verwendet wurde. Hierbei war eine Auswertung aller Konzentrationen nicht möglich, da bei der Berechnung von k_{on} aus k_{obs} auch negative Werte erhalten wurden. Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_D mittels Division von k_{off} durch k_{on} konnte somit nicht immer erfolgen. Die nicht berücksichtigten Werte wurden in Klammern gesetzt und sind der Vollständigkeit halber mit aufgeführt.

5 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 5: Zusammenfassung der ermittelten Daten aus der kinetischen Analyse von (*R*)-**16**. Die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{on} wurde durch Subtraktion der erhaltenen Konstante k_{obs} von der Konstante k_{off} und anschließender Division durch die jeweilige Konzentration c erhalten. Der K_D -Wert wurde dann mittels Division von k_{off} durch k_{on} berechnet.

c [μM]	t_{on} [s]	k_{obs} [1/s]	t_{off} [s]	k_{off} [1/s]	k_{on} [1/Ms]	K_D [μM]
8.5	(21.64)	(0.046)	(15.47)	(0.065)	(n.a.)	(n.a.)
17	(17.53)	(0.057)	(13.82)	(0.072)	(n.a.)	(n.a.)
34 (DB)	17.05	0.059	26.48	0.038	614.3	61.5
68	20.04	0.050	131.27	0.008	621.8	12.3
102	20.79	0.048	44.28	0.023	250.2	90.3
170	16.28	0.061	84.47	0.012	291.7	40.6
Mittelwert	18.54	0.055	71.62	0.020	444.5	51.1

Die kinetische Analyse ergab im Mittel einen K_D -Wert von 51.1 μM . Dieser entspricht ungefähr dem 3-fachen des K_D -Werts, welcher bei der thermodynamischen Analyse erhalten wurde, bestätigt jedoch weitestgehend den Wert im mikromolaren Bereich. Dieser Unterschied der beiden K_D -Werte steht in Analogie zum Enantiomer (*S*)-**16** und bekräftigt die Aussage, dass eine zu niedrige Flussgeschwindigkeit für eine kinetische Analyse vorliegen könnte und so zu fehlerhaften Werten bei k_{on} führen kann.

5.3.1.5 SPR-Bindungsstudien des Liganden (R)-17

Der Ligand (R)-17 konnte in einer höchstmöglichen Konzentration von 28 μM gelöst werden und wurde somit in einem Konzentrationsbereich von 0 - 28 μM untersucht. Die Konzentrationen von 2.8 μM , 11.2 μM und 16.8 μM wurden als Ausreißer bestimmt und daher für die weitere Auswertung nicht berücksichtigt. Die bei der Analyse von (R)-17 erhaltenen Sensorgramme und die Anpassung an das *one side binding* Modell sind in Abbildung 42 dargestellt.

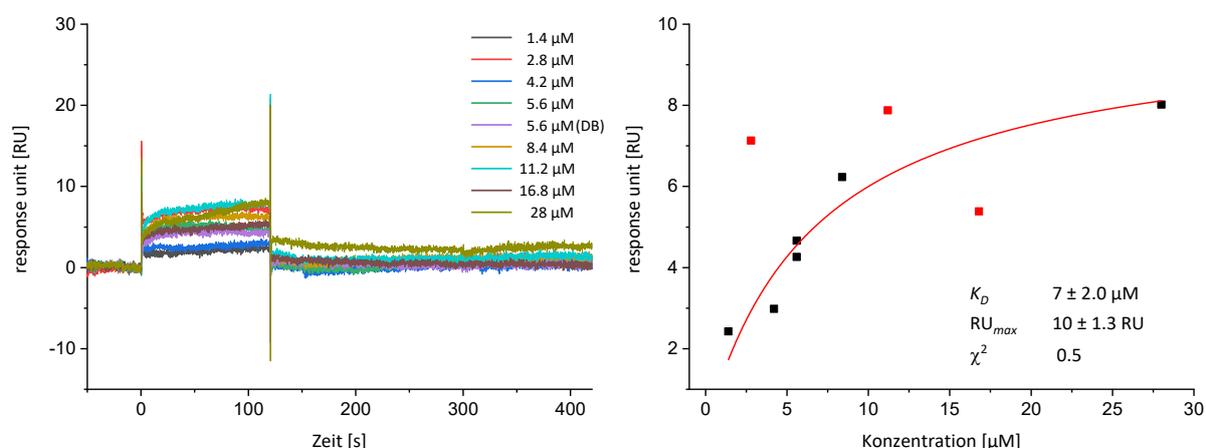


Abbildung 42: Darstellung der bei der Analyse von (R)-17 erhaltenen Sensorgramme (links) und die dazugehörige Anpassung an das *one side binding* Modell (rechts). Trotz deutlicher *bulk*-Effekte und einem nur akzeptablen Signal-zu-Rausch Verhältnis konnten die Daten erfolgreich ausgewertet werden. Der bestimmte RU_{max} -Wert beträgt nur 8 % des theoretischen RU_{max} -Wertes. Die Dissoziationskonstante K_D konnte zu 7.0 μM bestimmt werden. Die rot dargestellten Messpunkte wurden dabei nicht mit einbezogen.

Trotz deutlicher *bulk*-Effekte und einem nur akzeptablen Signal-zu-Rausch Verhältnis konnten die erhaltenen Daten erfolgreich ausgewertet werden. Der bestimmte RU_{max} beträgt dabei nur 8 % des theoretischen RU_{max} -Wertes. Die Anpassung an das *one side binding* Modell ergab eine Dissoziationskonstante K_D von 7.0 μM . Dieser Wert konnte in einer anderen Messzelle bestätigt werden.

Anschließend wurde eine kinetische Analyse des Liganden (R)-17 durchgeführt, die auf Grund der aufgetretenen *bulk*-Effekte analog zum Donor CMP-Neu5Ac erfolgte. In Abbildung 43 ist exemplarisch links der *fit* der Assoziationsphase zur Bestimmung von k_{obs} und rechts der *fit* der Dissoziationsphase zur Bestimmung von k_{off} des Liganden (R)-17 bei einer Konzentration von 5.6 μM (DB) gezeigt.

5 Ergebnisse und Diskussion

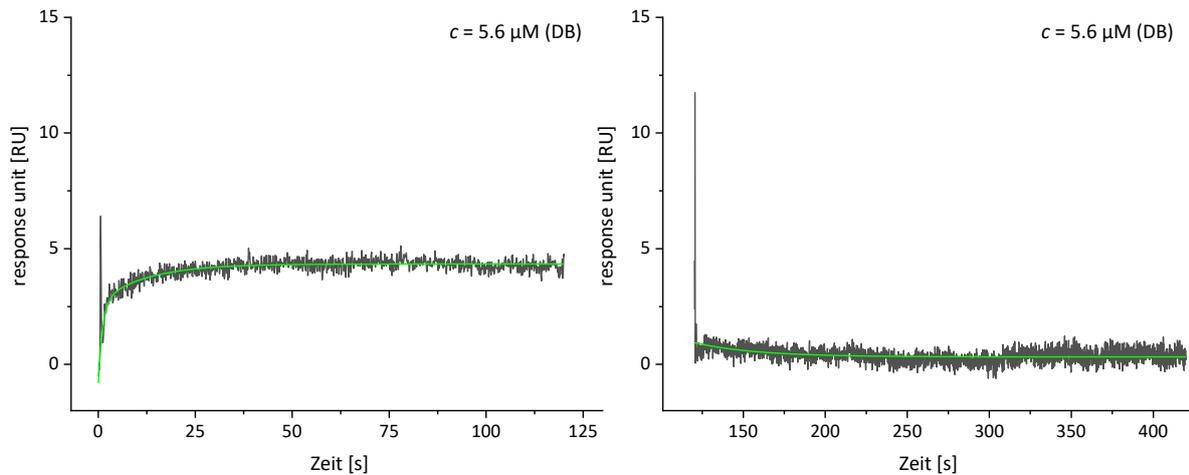


Abbildung 43: Exemplarische Darstellung der kinetischen Analyse von (R)-17 bei einer Konzentration von 5.6 μM (DB). Durch die Anpassung an eine exponentielle Funktion wurde links die Assoziationsphase mit dem *fit* zur Bestimmung von k_{obs} und rechts die Dissoziationsphase mit dem *fit* zur Bestimmung von k_{off} erhalten.

Die Ergebnisse der kinetischen Analyse von (R)-17 sind in Tabelle 6 wiedergegeben. Die Bestimmung von k_{obs} und k_{off} erfolgte für jede Konzentration, die auch zuvor in der thermodynamischen Analyse verwendet wurde. Hierbei war eine Auswertung aller Konzentrationen nicht möglich, da bei der Berechnung von k_{on} aus k_{obs} auch negative Werte erhalten wurden. Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_D mittels Division von k_{off} durch k_{on} konnte somit nicht immer erfolgen. Die nicht berücksichtigten Werte wurden in Klammern gesetzt und sind der Vollständigkeit halber mit aufgeführt.

5 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 6: Zusammenfassung der ermittelten Daten aus der kinetischen Analyse von (R)-17. Die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{on} wurde durch Subtraktion der erhaltenen Konstante k_{obs} von der Konstante k_{off} und anschließender Division durch die jeweilige Konzentration c erhalten. Der K_D -Wert wurde dann mittels Division von k_{off} durch k_{on} berechnet.

c [μM]	t_{on} [s]	k_{obs} [1/s]	t_{off} [s]	k_{off} [1/s]	k_{on} [1/Ms]	K_D [μM]
1.4	(48585.93)	($2.1 \cdot 10^{-5}$)	(135.60)	(0.007)	(n.a.)	(n.a.)
4.2	(24964.29)	($4.0 \cdot 10^{-5}$)	(5.82)	(0.172)	(n.a.)	(n.a.)
5.6	0.72	1.385	1.39	0.719	118790.7	6.1
5.6 (DB)	12.08	0.083	37.87	0.026	10062.6	2.6
8.4	15.19	0.066	26.28	0.038	3307.5	11.5
28	(1546.65)	(0.001)	(29.04)	(0.034)	(n.a.)	(n.a.)
Mittelwert	9.33	0.511	21.85	0.261	44053.6	6.7

Die kinetische Analyse ergab eine gemittelte Dissoziationskonstante K_D von 6.7 μM , die sehr gut mit dem thermodynamisch ermittelten K_D -Wert von 7.0 μM übereinstimmt und bestätigt den Wert im niedrigen mikromolaren Bereich. Zudem kann die vorherige Aussage bestätigt werden, dass bei der kinetischen Analyse die besten Werte für die jeweiligen Konzentrationen erhalten werden, die im Bereich der Dissoziationskonstante K_D liegen.

5.3.1.6 SPR-Bindungsstudien des Liganden (S)-17

Der Ligand (S)-17 konnte in einer höchstmöglichen Konzentration von 115 μM gelöst werden und wurde somit in einem Konzentrationsbereich von 0 - 115 μM untersucht. Die Konzentrationen von 5.75 μM und 23.0 μM (DB) wurden als Ausreißer bestimmt und daher für die weitere Auswertung nicht berücksichtigt. Die bei der Analyse von (S)-17 erhaltenen Sensorgramme und die Anpassung an das *one side binding* Modell sind in Abbildung 44 dargestellt.

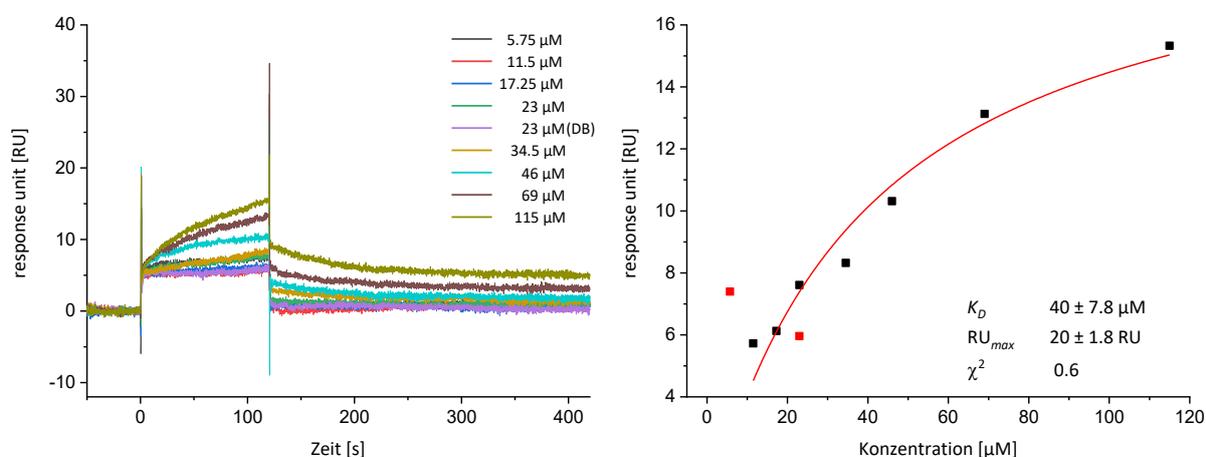


Abbildung 44: Darstellung der bei der Analyse von (S)-17 erhaltenen Sensorgramme und die dazugehörige Anpassung an das *one side binding* Modell. Obwohl die Sensorgramme deutliche *bulk*-Effekte aufwiesen, konnten die Daten erfolgreich ausgewertet werden. Der bestimmte RU_{max} -Wert beträgt etwas mehr als 1/6 des theoretischen RU_{max} -Wertes. Die Dissoziationskonstante K_D konnte zu 40 μM bestimmt werden. Die rot dargestellten Messpunkte wurden bei der Kurvenanpassung nicht mit einbezogen.

Der bestimmte RU_{max} -Wert von 20 beträgt etwas mehr als 1/6 des theoretischen RU_{max} -Wertes. Die Sensorgramme wiesen dennoch ein gutes Signal-zu-Rausch Verhältnis auf und konnten mit einem guten R^2 -Wert von 0.95 erfolgreich an das *one side binding* Modell angepasst werden. Die Dissoziationskonstante K_D konnte zu 40 μM bestimmt und zusätzlich in einer anderen Messzelle bestätigt werden.

Anschließend wurde eine kinetische Analyse vom Liganden (S)-17 durchgeführt, die auf Grund der aufgetretenen *bulk*-Effekte analog zum Donor CMP-Neu5Ac erfolgte. In Abbildung 45 ist exemplarisch links der *fit* der Assoziationsphase zur Bestimmung von k_{obs} und rechts der *fit* der Dissoziationsphase zur Bestimmung von k_{off} des Liganden (S)-17 bei einer Konzentration von 46 μM gezeigt.

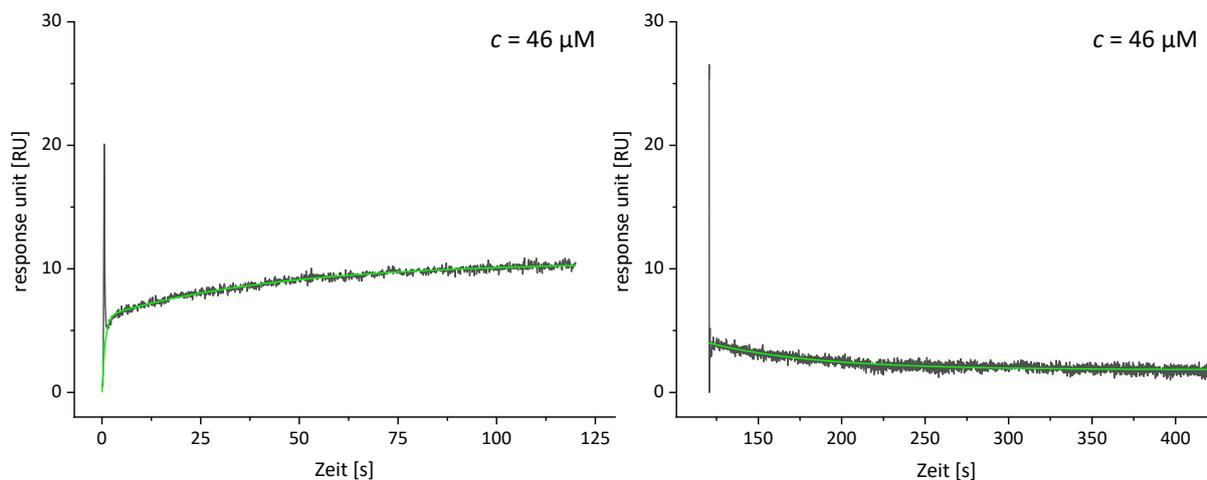


Abbildung 45: Exemplarische Darstellung der kinetischen Analyse von (S)-17 bei einer Konzentration von $46 \mu\text{M}$. Durch die Anpassung an eine exponentielle Funktion wurde links die Assoziationsphase mit dem *fit* zur Bestimmung von k_{obs} und rechts die Dissoziationsphase mit dem *fit* zur Bestimmung von k_{off} erhalten.

Die Ergebnisse der kinetischen Analyse von (S)-17 sind in Tabelle 7 wiedergegeben. Die Bestimmung von k_{obs} und k_{off} erfolgte für jede Konzentration, die auch zuvor in der thermodynamischen Analyse verwendet wurde. Hierbei war eine Auswertung aller Konzentrationen nicht möglich, da bei der Berechnung von k_{on} aus k_{obs} auch negative Werte erhalten wurden. Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_D mittels Division von k_{off} durch k_{on} konnte somit nicht immer erfolgen. Die nicht berücksichtigten Werte wurden in Klammern gesetzt und sind der Vollständigkeit halber mit aufgeführt.

5 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 7: Zusammenfassung der ermittelten Daten aus der kinetischen Analyse von (S)-17. Die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{on} wurde durch Subtraktion der erhaltenden Konstante k_{obs} von der Konstante k_{off} und anschließender Division durch die jeweilige Konzentration c erhalten. Der K_D -Wert wurde dann mittels Division von k_{off} durch k_{on} berechnet.

c [μM]	t_{on} [s]	k_{obs} [1/s]	t_{off} [s]	k_{off} [1/s]	k_{on} [1/Ms]	K_D [μM]
11.5	(69487.41)	($1.4 \cdot 10^{-5}$)	(13.80)	(0.072)	(n.a.)	(n.a.)
17.25	(285.29)	0.004	50.84	0.020	(n.a.)	(n.a.)
23	(136.87)	(0.007)	(63.32)	(0.016)	(n.a.)	(n.a.)
34.5	2217.94	0.0005	4139.45	0.0002	6.07	39.8
46	44.41	0.023	64.05	0.016	150.04	104.1
69	76.62	0.013	84.55	0.012	17.76	666.0
115	(76.76)	(0.013)	(60.95)	(0.016)	(n.a.)	(n.a.)
Mittelwert	779.66	0.012	1429.35	0.009	57.95	270.0

Die kinetische Analyse konnte bei drei Konzentrationen erfolgreich durchgeführt werden und ergab eine gemittelte Dissoziationskonstante K_D von 270 μM . Allgemein zeigten alle Konzentrationen eine große Varianz in der Assoziations- und Dissoziationsrate auf, die zum Teil auf die deutlichen *bulk*-Effekte in den Sensorgrammen zurück zu führen ist und eine erfolgreiche Auswertung deutlich erschwert. Wird nur der Wert im mikromolaren Bereich von 34.5 μM betrachtet, stimmt der kinetische K_D -Wert von 39.8 μM sehr gut mit dem thermodynamischen K_D -Wert von 40 μM überein.

Zusammenfassend konnte in der Analyse der durchgeführten SPR-Experimente erfolgreich gezeigt werden, dass die synthetisierten Liganden (S)-16 bzw. (R)-16 und (S)-17 bzw. (R)-17 in der Lage sind, sich an das Enzym ST6Gal-I zu binden und somit als potentielle Inhibitoren dienen könnten. In Tabelle 8 sind die mittels thermodynamischer und kinetischer Analyse erhaltenden Ergebnisse des natürlichen Donorsubstrats CMP-Neu5Ac und der jeweiligen Liganden zusammen aufgeführt.

Tabelle 8: Zusammenfassung der aus den SPR-Experimenten erhaltenden Ergebnisse des Donorsubstrats CMP-Neu5Ac und den Liganden (S)-16 bzw. (R)-16 und (S)-17 bzw. (R)-17. Angegeben sind die ermittelten K_D -Werte der thermodynamischen Analyse, die durch Anpassung an das *one side binding* Modell erhalten wurden, sowie die bestimmten Mittelwerte der kinetischen Analyse, die durch eine Anpassung an eine exponentielle Funktion (*ExpDecay2*) erhalten wurden.

Ligand	Thermodyn.		Kinetisch				
	K_D [μ M]	K_D [μ M]	t_{on} [s]	k_{obs} [1/s]	t_{off} [s]	k_{off} [1/s]	k_{on} [1/MS]
(S)-16	2.9	17.6	21.9	0.048	54.5	0.024	1937.1
(R)-16	19.0	51.1	18.5	0.055	71.6	0.020	444.5
(R)-17	7.0	6.7	9.3	0.511	21.9	0.034	44053.6
(S)-17	40.0	270.0	779.7	0.012	1429.4	0.009	58.0
CMP-Neu5Ac	33.5	694.1	37.9	0.027	57.4	0.018	222.0

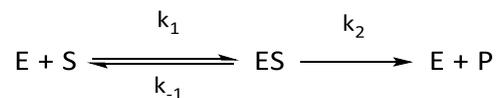
Wie in der Tabelle 8 erkennbar, liegen die erhaltenen Dissoziationskonstanten K_D alle im mikromolaren Bereich. Im direkten Vergleich mit dem natürlichen Donor CMP-Neu5Ac zeigen die Liganden (S)-16, (R)-16 und (R)-17 in thermodynamischen Analyse, als auch in der kinetischen Analyse eine deutlich bessere Bindungsaffinität. Lediglich der Ligand (S)-17 weist eine ähnliche Bindungsaffinität auf. Zudem konnte durch die Aufnahme einer Doppelbestimmung einer mittleren Konzentration des untersuchenden Liganden und einer Konzentration des Donorsubstrats am Ende einer Messreihe eines Liganden gezeigt werden, dass eine gleichbleibende Enzymaktivität über die gesamte Messzeit vorlag. Die erhaltenen Dissoziationskonstanten K_D konnten in weiteren Untersuchungen bzw. Messung in einer anderen Messzelle bestätigt werden.

Im direkten Vergleich der thermodynamisch und der kinetisch bestimmten Dissoziationskonstanten K_D eines Liganden konnte eine gute Übereinstimmung erhalten werden, auch wenn die einzelnen Werte für k_{obs} und k_{off} zum Teil unterschiedliche Größenverhältnisse aufwiesen und eine Auswertung nicht immer möglich war. Dies lässt sich auf den hohen Anteil von 10 % DMSO zurückführen, der jedoch von Nöten war, um eine akzeptable Konzentration an gelöstem Liganden zu erhalten. Die daraus resultierenden *bulk*-Effekte erschwerten sowohl die thermodynamische als auch die kinetische Analyse der erhaltenen Daten erheblich.

5.3.2 Progresskurvenanalyse der Inhibition von **16** und **17** gegenüber der ST6Gal-I

Die SPR-Bindungsstudien der Liganden zeigten, dass die Liganden **16** und **17** ein inhibitorisches Potenzial besitzen und in der Lage sind mit der ST6Gal-I eine Bindung einzugehen. Um die mittels SPR erhaltenen Dissoziationskonstanten K_D zu verifizieren und weitere Informationen über das Bindungsverhalten der Liganden mit dem Protein zu erhalten, wurde ein NMR basierter Inhibitionsassay mit den Liganden und eine anschließende Progresskurvenanalyse angestrebt. Ein großer Vorteil der Progresskurvenanalyse besteht darin, dass diese den gesamten Konzentrations-Zeit-Verlauf eines Liganden als Funktion der Zeit wiedergibt und dadurch die gesamten kinetischen Informationen der Protein-Liganden-Interaktion beinhaltet. Zudem reduziert sich dabei der experimentelle Aufwand, da die Messung der Reaktion in nur einer zuvor definierten Konzentration an Protein und Ligand erfolgt. Dabei kommt es ebenfalls ohne ein *labeling* oder einer chemischen Veränderung der Bindungspartner aus.

Im Jahre 1913 entwickelten L. Michaelis und M. Menten ein einfaches Modell, um Mechanismen von Enzymreaktionen aufzuklären. Bis heute ist die Michaelis-Menten-Kinetik eine der wichtigsten Methoden, um enzymatische Vorgänge zu beschreiben.^[125] Das Modell beschreibt die Abhängigkeit zwischen Enzymaktivität und Substratkonzentration. Entscheidend dabei ist, dass Enzym [E] und Substrat [S] einen Enzym-Substrat-Komplex [ES] als Zwischenprodukt bilden, der dann irreversibel zum Produkt [P] und Enzym [E] zerfällt. Um dabei die geltenden Geschwindigkeitsgesetze zu beschreiben, nahmen Michaelis und Menten an, dass $k_2 \ll k_{-1}$ gilt. Dabei muss das Substrat [S] dann im Überschuss eingesetzt werden, damit sich ein Gleichgewicht des Enzym-Substrat-Komplexes [ES] einstellen und k_2 mit dem Zerfall zum Produkt [P] und Enzym [E] den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktion darstellen kann. So gilt:



Anschließend wurde das Modell von G. Briggs und J. Haldane durch die Einführung eines quasistationären Zustandes (*steady state*) für den Enzym-Substrat-Komplex [ES] erweitert, dessen Konzentration über die gesamte Reaktionszeit konstant bleibt.^[126] Dadurch ist es möglich, eine quantitative Bewertung der Enzymaktivität und der Analyse der Enzyminhibition zu erhalten.

$$v_0 = \frac{d[S]}{dt} = -\frac{v_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad (3)$$

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (4)$$

$$v_{max} = k_2[E]_0 \quad (5)$$

mit [S] = Substratkonzentration
 v_{max} = maximale Reaktionsgeschwindigkeit
 K_M = Michaelis-Menten-Konstante

Die Analyse der Enzymkinetik erfolgt dabei meist durch die Messung der Initialgeschwindigkeiten, wobei die Substratkonzentration [S] gegen die Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} aufgetragen wird. Die daraus erhaltene Sättigungskurve beinhaltet v_{max} als Sättigungswert und K_M als Substratkonzentration bei $v_{max}/2$. Gilt nun die Michaelis-Menten-Bedingung $k_2 \ll k_{-1}$, ist die Michaelis-Menten-Konstante K_M gleich der Dissoziationskonstante K_D und gibt die Affinität des Substrates gegenüber dem Enzym wieder. Stellt der Zerfall zum Produkt [P] und Enzym [E] mit der Geschwindigkeitskonstante k_2 den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt da, ist $k_2 = k_{cat}$ (Wechselzahl, *turnover number*) und gibt bei vollständiger Substratsättigung die Menge des umgesetzten Substrats wieder. Der Quotient k_{cat}/K_M gilt als Maß für die Substratspezifität. Sie zeigt die katalytische Effizienz des Enzyms und ermöglicht es, die Enzymaktivität bestimmen und mit anderen vergleichen zu können.

Alternativ können die kinetischen Parameter auch über eine Analyse von Progresskurven bestimmt werden. Die Progresskurvenanalyse beruht nicht auf der Messung von Initialgeschwindigkeiten und ermöglicht die Bestimmung der kinetischen Daten aus einer einzigen Progresskurve. Dafür muss zunächst eine Lösung der integrierten Form der Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 6), für die es keine explizite Lösung gibt, gefunden werden.^[127]

$$v_{max}t = ([S]_0 - [S]) - K_M \ln \left(\frac{[S]}{[S]_0} \right) \quad (6)$$

1997 gelang es S. Schell und C. Mendoza auf Basis der Lambert-W-Funktion mit leistungsstarken Computern eine Lösung für die integrierte Form der Michaelis-Menten-Gleichung zu entwickeln. Die auch als *Omega* bezeichnete Funktion ist eine Umkehrfunktion von $f(w) = we^w$, wobei w für eine beliebige Zahl steht.^[127]

$$[S] = K_M W \left\{ \frac{[S]_0}{K_M} \exp \left(\frac{-v_{max}t + [S]_0}{K_M} \right) \right\} \quad (7)$$

$$W(x) + \ln\{W(x)\} = \ln(x) \quad (8)$$

Dabei ist die Lambert-W-Funktion je nach dem Wert von x in drei Funktionsbereiche aufgeteilt (Abbildung 46). Nur in der oberen Region mit $x > 0$ ist W positiv und weist eine eindeutige Lösung auf. Für x -Werte mit $-1/e < x < 0$ sind zwei Lösungen mit $W > -1$ im mittleren Bereich und mit $W < -1$ im unteren Bereich möglich.^[128,129]

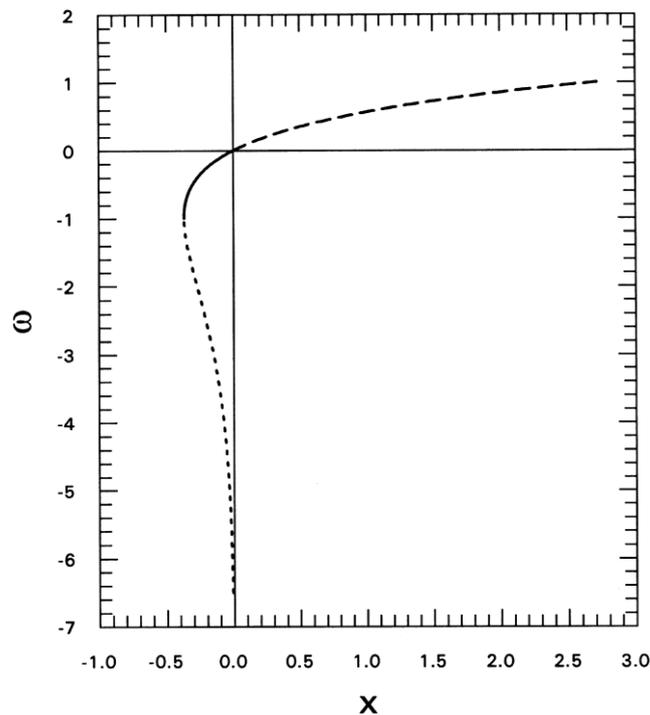


Abbildung 46: Darstellung des Plots der Lambert-W-Funktion. Er ist je nach Wert von x in drei Funktionsbereiche aufgeteilt. Mit $x > 0$ wird W positiv und weist eine eindeutige Lösung auf (oberer Bereich). Für x -Werte mit $-1/e < x < 0$ sind zwei Lösungen mit $W > -1$ (mittlerer Bereich) und $W < -1$ (unterer Bereich) möglich.^[128,129]

Anschließend gelang es C. Goudar *et al.* die Lösung der Lambert-W-Funktion mit einer nicht-linearen Regression zu verknüpfen und eine Lösung der integrierten Michaelis-Menten-Gleichung zu erhalten, die auf die Analyse experimenteller Progressionskurven oder kompetitiver Inhibition einer Enzymreaktion angewendet werden kann.^[128-130] Durch die Zugabe eines möglichen Inhibitors werden die kinetischen Parameter v_{max} und K_M beeinflusst und die apparenten Parameter K'_M und v'_{max} erhalten.

$$[S] = K'_M W \left\{ \frac{[S]_0}{K'_M} \exp \left(\frac{[S]_0 - v'_{max} t}{K'_M} \right) \right\} \quad (9)$$

$$K'_M = K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right) \quad (10)$$

mit $[I]$ = Inhibitorkonzentration

$[K_I]$ = Inhibitionskonstante

Unter der Verwendung von Gleichung 9 können dann mit Hilfe von mathematischer Software, wie z.B. MATLAB® oder Maple®, die kinetischen Parameter K_M und v_{max} bestimmt werden. Durch die Umstellung von Gleichung 10 zu Gleichung 11 und unter Inhibitionsbedingungen ist es zudem möglich, die Inhibitionskonstante K_I zu bestimmen.

$$K_I = \frac{K_M * [I]}{K'_M - K_M} \quad (11)$$

mit $[K'_M]$ = Michaelis-Menten-Konstante in Anwesenheit eines Inhibitors

$[K_M]$ = Michaelis-Menten-Konstante ohne Anwesenheit eines Inhibitors

5.3.2.1 Vorbereitungen der NMR-Progresskurvenanalyse von ST6Gal-I

Die Sialyltransferase ST6Gal-I katalysiert die Übertragung der *N*-Acetylneuraminsäure vom Donorsubstrat CMP-Neu5Ac auf einen terminalen Galactose-Rest eines Disaccharids über eine α -2,6-Verknüpfung. In den durchgeführten Progressionskurven diente das Disaccharid *N*-Acetyllactosamin (LacNAc) als Akzeptorsubstrat. Im Experiment wurde die Umsetzung vom Donor CMP-Neu5Ac zum CMP durch die Abnahme der einzelnen Protonensignale über die Zeit beobachtet. Um eine weitere Produktinhibierung durch das frei gewordene CMP zu unterbinden, wurde der Reaktion zusätzlich saure Phosphatase hinzugegeben. Die saure Phosphatase fängt das CMP ab und katalysiert die Umsetzung vom CMP zum Cytidin (Abbildung 47).

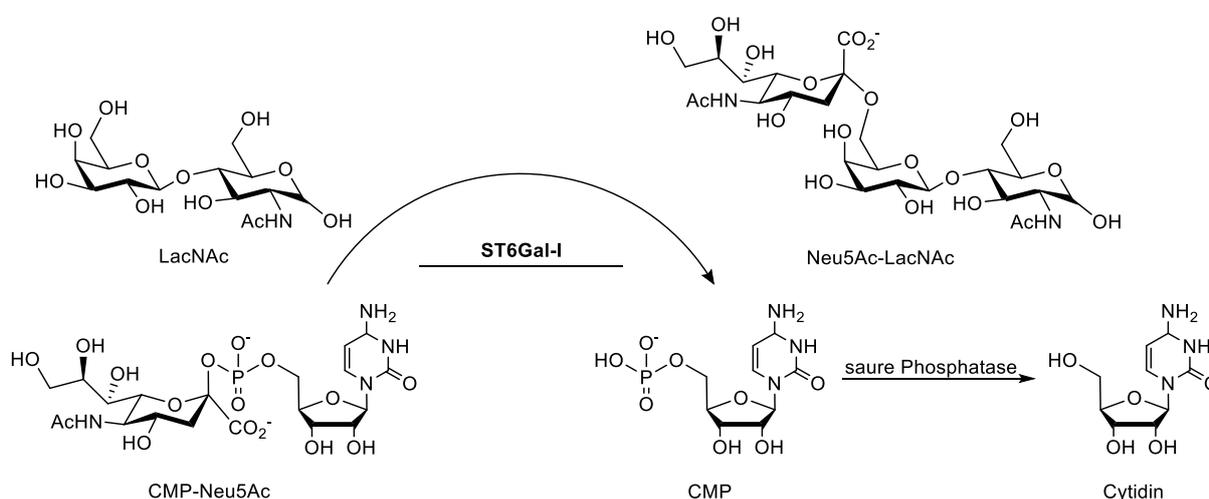


Abbildung 47: Darstellung der analysierten Reaktion mittels Progressionskurve. Die ST6Gal-I katalysiert die Übertragung der *N*-Acetylneuraminsäure vom CMP-Neu5Ac auf das terminale Ende des *N*-Acetyllactosamins (LacNAc) über eine α -2,6-Verknüpfung. Um eine weitere Produktinhibierung durch das CMP zu unterbinden, wurde zusätzlich saure Phosphatase hinzugefügt, welche die Umsetzung vom CMP zum Cytidin katalysiert.

Die Verfolgung der Reaktion erfolgte durch die Analyse der aufgenommenen ^1H -NMR Spektren, wobei die Änderung der chemischen Verschiebung einzelner Protonen vom Donor CMP-Neu5Ac betrachtet wurden. Im zeitlichen Verlauf der Reaktion nimmt die Intensität der Protonensignale vom CMP-Neu5Ac ab und es werden neue Signale vom umgesetzten Cytidin erhalten. Die deutlichste Änderung der Signalintensität über die Zeit konnte mit den Protonen H-5 (bei 5.95 ppm) und H-6 (bei 7.78 ppm) erhalten werden. Sie liegen außerhalb des *bulk*-Bereichs der verschiedenen Kohlenhydratstrukturen und sind nicht anderweitig überlagert (Abbildung 48 und Abbildung 49).

5 Ergebnisse und Diskussion

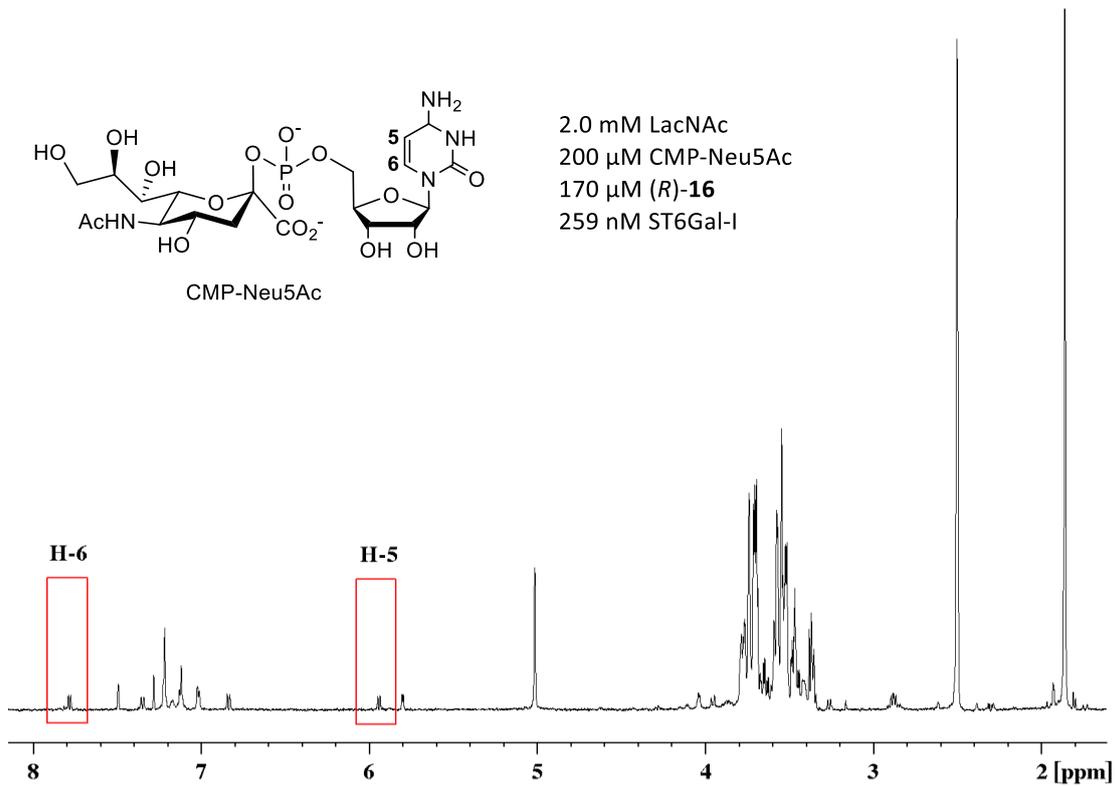


Abbildung 48: Darstellung eines ¹H-NMR Spektrums der von ST6Gal-I katalysierten Reaktion vom Donor CMP-Neu5Ac und dem Akzeptor LacNAc mit dem Inhibitor (*R*)-**16** in einem 20 mM Tris-*d*₁₉ Puffer (600 MHz, 310 K). Zwischen 6.8 bis 7.5 ppm liegen Aromatensignale des Inhibitors (*R*)-**16** und zwischen 3.2 bis 4.0 ppm befindet sich ein *bulk*-Bereich, indem eine starke Signalüberlagerung verschiedener Strukturen auftritt. Für die Auswertung der Reaktion wurden die Protonensignale H-5 (bei 5.95 ppm) und H-6 (bei 7.78 ppm) vom CMP-Neu5Ac verwendet. Sie zeigen die deutlichste Änderung der chemischen Verschiebung über die Zeit. Zudem liegen sie außerhalb des *bulk*-Bereichs und werden nicht von anderen Signalen überlagert.

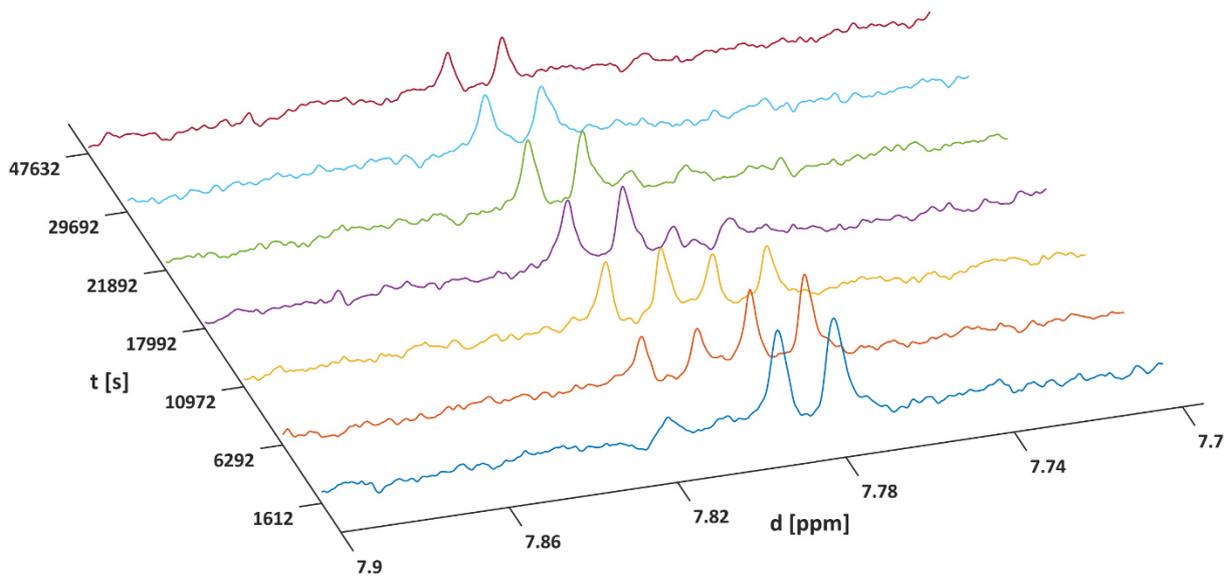


Abbildung 49: Darstellung der zeitlichen Umsetzung vom Donor CMP-Neu5Ac zum Cytidin anhand der chemischen Verschiebung des Protons H-6. Das erste aufgenommene $^1\text{H-NMR}$ Spektrum liegt bei $t = 1612$ s und entspricht der chemischen Verschiebung vom CMP-Neu5Ac. Im zeitlichen Verlauf der enzymatischen Reaktion verringert sich die Intensität des Signals, während das Protonensignal des umgesetzten Cytidins erhalten wird und an Intensität zunimmt. Bei $t = 47632$ s ist kein Protonensignal vom CMP-Neu5Ac mehr detektierbar und die Reaktion des Donors CMP-Neu5Ac zum umgesetzten Cytidin ist beendet.

5.3.2.2 Bestimmung der kinetischen Parameter K_M und v_{max} von ST6Gal-I

Um das inhibitorische Potential der synthetisierten Liganden **16** und **17** mittels Progressionskurvenanalyse untersuchen und vergleichen zu können, mussten zunächst die kinetischen Parameter von ST6Gal-I unter den gewählten Messbedingungen ohne Inhibitor bestimmt werden.

Die Untersuchung der Reaktion von ST6Gal-I erfolgte in einem frisch angesetzten 20 mM Tris- d_{19} Puffer mit 150 mM NaCl, 0.05 mg/mL saurer Phosphatase und 10 % DMSO- d_6 bei einem optimalen pD von 6.1 (entspricht einem pH von 6.5).^[131] Der Zusatz von saurer Phosphatase dient dazu, eine weitere Produktinhibition durch das bei der Reaktion entstandene CMP zu verhindern. Das pH-Optimum der sauren Phosphatase liegt im Bereich von pH 4.0 - 7.0 und katalysiert dabei die Umsetzung vom CMP zum Cytidin. Die Zugabe des Enzyms ST6Gal-I erfolgte in einer Konzentration von 274 nM und das Donorsubstrat wurde in einer zuvor festgelegten Startkonzentration von 200 μM eingesetzt. Als Akzeptorsubstrat wurden 2.0 mM *N*-Acetyllactosamin (LacNAc) verwendet, das dem zehnfachen Überschuss gegenüber dem Donor CMP-Neu5Ac entspricht. Dies gewährleistet die Annahme einer

quasi-konstanten Konzentration an Akzeptor über die gesamte Experimentdauer, da bei der Aufnahme der Progressionskurve nur der Umsatz und damit die Konzentrationsänderung des Donorsubstrats gemessen werden.

Zunächst wurden alle Reagenzien außer dem Donorsubstrat in einem NMR-Röhrchen vereinigt und ein ^1H -NMR Spektrum aufgenommen, um alle NMR-spektroskopischen Parameter einzustellen. Durch die Zugabe des Donors CMP-Neu5Ac wurde die Reaktion umgehend gestartet und nach homogener Durchmischung NMR spektroskopisch verfolgt. Hierzu wurde alle 13 Minuten ein ^1H -NMR Spektrum mit 128 *scans* und *excitation sculpting* für die Wasserunterdrückung bei 310 K aufgenommen. Insgesamt wurde das Experiment über 54 Stunden und der Aufnahme von 250 ^1H -NMR Spektren verfolgt.

Für die Analyse der erhaltenen Daten wurde zunächst der Bereich um das Protonensignal H-5/ H-6 vom CMP-Neu5Ac Basislinien-korrigiert und dann seriell prozessiert. Eine Basislinienkorrektur über das gesamte Spektrum war nicht möglich. Anschließend wurde die Konzentration von CMP-Neu5Ac gegen die Zeit der von ST6Gal-I katalysierten Reaktion aufgetragen und eine Progresskurve erhalten. Mit Hilfe von MATLAB® konnten die Daten unter Verwendung der kombinierten Lambert-*W*-Funktion mit der integrierten Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 9) angepasst werden, was die Bestimmung der kinetischen Parameter K_M und v_{max} ermöglichte (Abbildung 50).

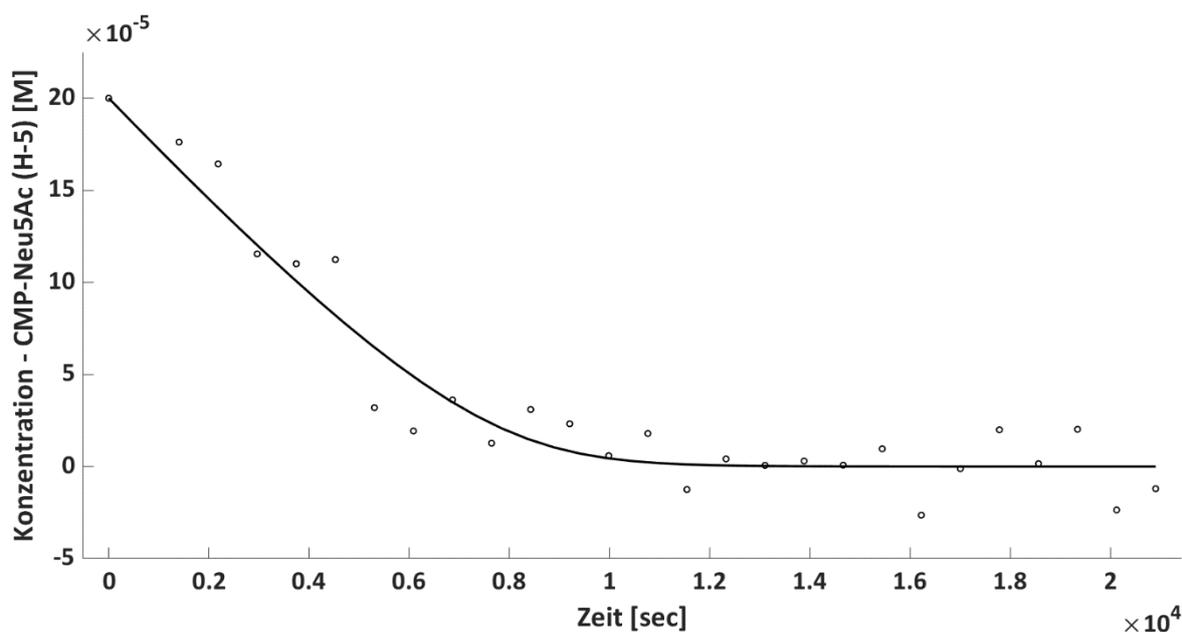


Abbildung 50: Darstellung der Progresskurvenanalyse von CMP-Neu5Ac. Die Konzentration des umgesetzten Donors CMP-Neu5Ac wurde durch das Protonensignal H-5 bestimmt und gegen die Reaktionszeit aufgetragen. Die erhaltene Progresskurve wurde mit Hilfe von MATLAB® unter Verwendung der kombinierten Lambert-W-Funktion mit der integrierten Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 9) angepasst und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} zu $3.3 \cdot 10^{-8}$ M/s, sowie die Michaelis-Menten-Konstante K_M zu $34.8 \mu\text{M}$ bestimmt. Die erhaltenen Werte stimmen gut mit den in der Literatur beschriebenen Werten überein.^[132-134]

Die Progresskurvenanalyse der enzymatischen Umsetzung vom Donor CMP-Neu5Ac konnte erfolgreich durchgeführt werden. Die Auswertung der Progresskurve erfolgte dabei bis zum Zeitpunkt $t = 20905$ s, da die enzymatische Reaktion schon abgeschlossen war und ergab eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} von $3.3 \cdot 10^{-8}$ M/s, sowie eine Michaelis-Menten-Konstante K_M von $34.8 \mu\text{M}$. Die in der Literatur berichtete Bindungsaffinität vom natürlichen Donor CMP-Neu5Ac zu der humanen ST6Gal-I ist mit K_M -Werten im Bereich von $555 \mu\text{M}$ bis $1.46 \mu\text{M}$ angegeben und stimmen gut mit den erhaltenen Ergebnissen überein.^[132-134]

5.3.2.3 Untersuchung der Inhibition von (*R*)-**16** gegenüber der ST6Gal-I

Nachdem die kinetischen Daten der enzymatisch katalysierten Reaktion von ST6Gal-I mit den natürlichen Substraten erfolgreich ermittelt werden konnten, war es geplant in weiteren Inhibitionsassays das inhibitorische Potential der synthetisierten Liganden **16** und **17** zu untersuchen. Auf Grund der geringen vorhandenen Menge des Enzyms ST6Gal-I konnte dies nur für einen Liganden erfolgen. Die Analyse wurde mit dem Liganden (*R*)-**16** durchgeführt, da hier die höchstmögliche Konzentration an gelöstem Liganden gegeben ist und die gleichen Messbedingungen der vorherigen Progresskurvenanalyse gewählt werden konnten.

Die Progresskurvenanalyse des Liganden (*R*)-**16** erfolgte ebenfalls im 20 mM Tris-*d*₁₉ Puffer mit 150 mM NaCl, 0.05 mg/mL saurer Phosphatase und 10 % DMSO-*d*₆. Der Ligand (*R*)-**16** wurde in der höchstmöglichen Konzentration von 170 μM, gelöst in DMSO-*d*₆, hinzugegeben. Die Zugabe der ST6Gal-I erfolgte in einer Konzentration von 259 nM. Das Donorsubstrat CMP-Neu5Ac wurde in einer Konzentration von 200 μM eingesetzt und das Akzeptorsubstrat *N*-Acetyllactosamin wurde in einem zehnfachen Überschuss von 2.0 mM hinzugegeben, wodurch eine quasi-konstante Konzentration an Akzeptor über die gesamte Experimentdauer gewährleistet werden konnte.

Wie zuvor wurden alle Reagenzien außer dem Donorsubstrat vereinigt und alle NMR-spektroskopischen Parameter eingestellt. Durch die Zugabe des CMP-Neu5Ac wurde die enzymatische Reaktion gestartet und über 13 Stunden NMR spektroskopisch verfolgt, wobei alle 13 Minuten ein ¹H-NMR mit 128 *scans* und *excitation sculpting* für die Wasserunterdrückung bei 310 K aufgenommen wurde.

Die Auswertung der Reaktion erfolgte anhand des Protonensignals H-5 des Donors CMP-Neu5Ac, dessen Konzentrationsabnahme gegen die Reaktionszeit aufgetragen wurde. Mit Hilfe von MATLAB® konnten die Daten unter der Verwendung der kombinierten Lambert-*W*-Funktion mit der integrierten Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 9) angepasst werden, was die Bestimmung der kinetischen Parameter K'_M und v_{max} ermöglichte (Abbildung 51).

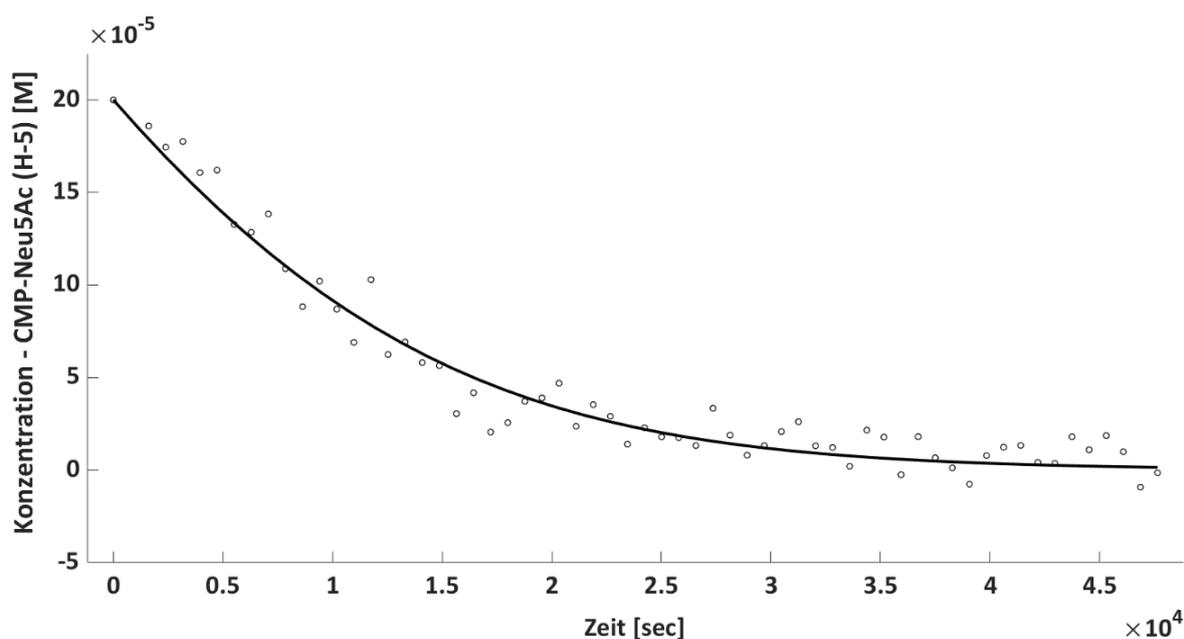


Abbildung 51: Darstellung der Progressionskurvenanalyse von CMP-Neu5Ac mit dem Inhibitor (R)-16. Die Konzentrationsabnahme von CMP-Neu5Ac wurde anhand des Protonensignals H-5 bestimmt und gegen die Reaktionszeit aufgetragen. Die erhaltene Progresskurve wurde mit Hilfe von MATLAB® unter Verwendung der kombinierten Lambert-W-Funktion mit der integrierten Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 9) angepasst und v_{max} zu $3.1 \cdot 10^{-8}$ M/s, sowie K'_M zu $267.5 \mu\text{M}$ bestimmt. Nach Gleichung 11 konnte dann die Inhibitionskonstante K_I zu $25.4 \mu\text{M}$ ermittelt werden.

Die Analyse der Progressionskurve von CMP-Neu5Ac mit dem Inhibitor (R)-16 konnte erfolgreich durchgeführt werden und ermittelte eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} von $3.1 \cdot 10^{-8}$ M/s und eine Michaelis-Menten-Konstante K'_M von $267.5 \mu\text{M}$. Damit konnte nach Gleichung 11 die Inhibitionskonstante K_I zu $25.4 \mu\text{M}$ bestimmt werden.

In Abbildung 52 sind die ausgewerteten Progresskurven der enzymatischen Reaktion mit und ohne Inhibitor zusammen dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Progresskurve der Reaktion mit dem Inhibitor (R)-16 deutlich flacher ist und somit die Umsetzung des Donors CMP-Neu5Ac über die Zeit langsamer verläuft. Dies deutet auf eine erfolgreiche Inhibierung von (R)-16 hin, die zudem mit einer langsameren Kinetik und einer geringeren maximalen Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} einhergeht.

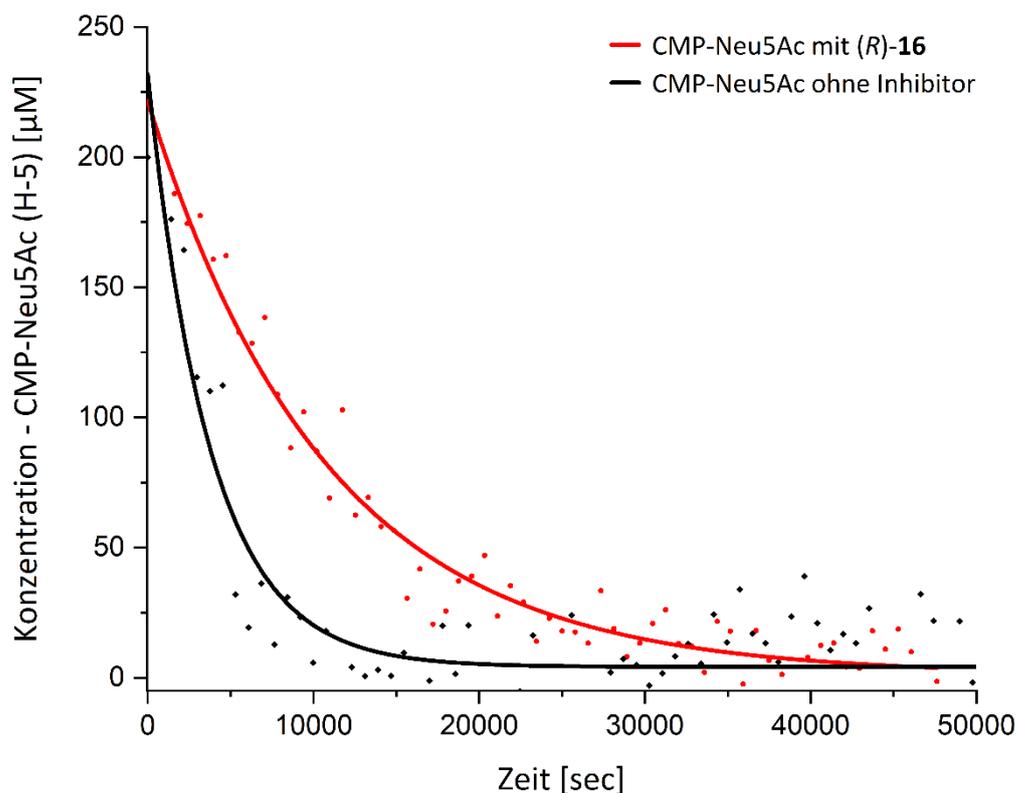


Abbildung 52: Darstellung der ausgewerteten Progressionskurven mit und ohne Inhibitor. Der Vergleich zeigt, dass die erfolgreiche Zugabe des Inhibitors (R)-16 zu einer langsameren Umsetzung des Donors CMP-Neu5Ac über die Zeit führt und dadurch eine geringere maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} und eine langsamere Kinetik aufweist.

Zusammenfassend konnte die Analyse der durchgeführten Progresskurven trotz erschwelter Bedingungen, wie z.B. dem hohen Zusatz an DMSO, erfolgreich durchgeführt werden. Es zeigte sich, dass der Ligand (R)-16 in der Lage ist, das Enzym ST6Gal-I zu inhibieren und somit als potenzieller Inhibitor dienen zu können. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} von $3.1 \cdot 10^{-8}$ M/s zeigt eine minimale Verminderung gegenüber der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit $v_{max} = 3.3 \cdot 10^{-8}$ M/s ohne Inhibitor auf. Zudem konnte für den Liganden (R)-16 die Inhibitionskonstante K_i zu $25.4 \mu\text{M}$ bestimmt werden. Dieser Wert befindet sich ebenfalls im niedrigen mikromolaren Bereich und stimmt sehr gut mit dem mittels SPR bestimmten K_D -Wert von $19 \mu\text{M}$ für (R)-16 überein.

Auf Grund der geringen vorhandenen Menge des Enzyms ST6Gal-I konnte in dieser Arbeit leider nur das inhibitorische Potential des Liganden (R)-16 mittels Progresskurvenanalyse bestimmt werden. Ob die anderen synthetisierten Liganden (S)-16, (S)-17 und (R)-17 ebenfalls ein inhibitorisches Potential in der Analyse einer Progresskurve aufzeigen und auch im

Einklang mit den durch SPR erhaltenen Ergebnissen stehen, kann in weiteren Inhibitionsassays untersucht werden.

Zudem war es auf Grund der geringen vorhandenen Menge des Enzyms ST6Gal-I nicht möglich, das inhibitorische Potential der Liganden **16** und **17** mittels *saturation transfer difference* NMR (STD-NMR) zu messen. Die Durchführung von STD-NMR Studien als drittes Analyseverfahren wäre eine sinnvolle Ergänzung, um die zuvor erhaltenen Dissoziationskonstanten verifizieren zu können. Das Verfahren beruht dabei auf der Beobachtung der Bindung eines niedermolekularen Liganden an ein Protein, ohne dass dabei ein Bindungspartner chemisch verändert wird. Das erhaltene Bindungsereignis wird dabei aus der Sicht des Liganden betrachtet. Experimentell wird gezielt ein Sättigungspuls auf das Protein eingestrahlt, dessen Sättigung dann auf einen gebundenen Liganden mittels Spindiffusion übertragen wird. Wenn der gesättigte Ligand wieder in Lösung diffundiert, kann dies detektiert werden. Das STD Spektrum wird dann durch die Differenz eines *on-resonance* Spektrums, in dem das Protein gesättigt vorliegt, und eines *off-resonance* Spektrums, in dem nicht auf das Protein eingestrahlt wird und ungesättigt vorliegt, erhalten.^[135,136] Die Durchführung erfolgt dabei durch eine NMR-Titrationsreihe, in der stufenweise die Konzentration des zu untersuchenden Liganden in einem einzelnen NMR-Röhrchen erhöht wird. Dieser klassische Ansatz einer Titrationsreihe ist hier nicht möglich, da keine konstante Konzentration von 10 % DMSO eingehalten werden kann. Hierzu müsste für jeden zu messenden Konzentrationspunkt ein NMR-Röhrchen mit der benötigten Konzentration des Enzyms ST6Gal-I und dem Donor CMP-Neu5Ac angesetzt werden, wofür eine große Menge an Enzym benötigt wird.

6 Experimenteller Teil

6.1 Verwendete Geräte und Materialien

Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Geräte und Materialien.

Gerät	Gerätetyp	Hersteller
Amicon	Amicon Ultra 0.5 mL, MWCO 10kDa	Millipore
DC-Alufolie	Alugram® Xtra SIL F/UV ₂₅₄ TLC Silica gel 60 F ₂₅₄	Mechery & Nagel Merck
ESI-TOF	6224 TOF LC/MS	Agilent Technologies
Gefriertrocknungsanlage	Alpha 1-2, Alpha 1-4	Martin Christ
HPLC	Merck Hitachi LaCrom L-7000	Merck Hitachi
NMR Spektrometer (400 MHz)	AMX 400	Brucker Biospin
NMR Spektrometer (500 MHz)	DRX 500	Brucker Biospin
NMR Spektrometer (600 MHz)	Avance III HD 600	Brucker Biospin
Messwaage	AE 240, d = 0.01 mg	Mettler
Messwaage	ABS 220-4, d = 0.1 mg	Kern
pH-Meter	Orion Star A111	Thermo Scientific
Polarimeter	P8000	A. Kruss Optronic
Reinstwasseranlage	Ultra Clear UV 18.2 MΩ	SG Water
Rotationsverdampfer	Laborota 4000	Heidolph
RP-HPLC Säule	Nucleodur C ₁₈ Isis EC250/4, 5 μM, 300 Å	Macherey & Nagel

Gerät	Gerätetyp	Hersteller
RP-HPLC Säule	Nucleodur C ₁₈ Isis EC250/21, 5 µM, 300 Å	Macherey & Nagel
Schmelzpunktbestimmung	Melting Point M-565	Büchi
SPR	T100 Biacore®	GE Healthcare
SPR Sensorchips	HC-30M, CMD-50M	Xantec®
Ultraschallbad	Sonorex Super, RK512H	Bandelin
UV/Vis Spektralphotometer	NanoDrop® 2000C	Thermo Scientific
Zentrifugen	5415 D, 5417 R, 5804 R	Eppendorf

6.2 Verwendete Software

Tabelle 10: Auflistung der verwendeten Software.

Software	Hersteller
Biacore T100 Control (Vers. 1.1.1)	GE Healthcare
Biacore T100 Evaluation (Vers. 1.1.1)	GE Healthcare
ChemDraw Pro (Vers. 19.0/ 20.0)	CambrigeSoft
EZ Crom Lite	Agilent Technologies
Maestro (Vers. 2017-1)	Schrödinger
Matlab R2021b	MathWorks
MestReNova (Vers. 14.0)	Mestrelab Research
Origin Pro 2019 64Bit	Origin Lab
Topspin 4.1.1	Bruker Biospin

6.3 Verwendete Chemikalien

Tabelle 11: Auflistung der verwendeten Chemikalien.

Hersteller	Chemikalie
abcr GmbH	DBU
Acros Organics	Aceton (abs.), Acetonitril (abs.), Dichlormethan (abs.), Ethanol (abs.), Methanol (abs.), Tetrahydrofuran (abs.), Methansulfonylchlorid, DMF (abs.)
Alfa Aesar	Lithiumacetylid-Ethylendiamin, 4-Chlor-3-nitrobenzoesäure
Antibodies-online GmbH	β -Galactosid α -2,6-Sialyltransferase I (ST6Gal-I)
Cambridge Isotope Lab. Inc.	BisTris- d_{19}
Deutero	D ₂ O, DMSO- d_6 , Aceton- d_6 , Acetonitril- d_4 , DMF- d_7
Eurisotop	CDCl ₃ , Methanol- d_4
Fluka	Pd/C (10 %), 2-Aminoethanol
GE Helthcare	HBS-P Puffer
Grüssing	Ameisensäure, Kupfer(II)-sulfat Pentahydrat, Natriumchlorid, Natriumsulfat, Triethylamin
Honeywell	Ammoniumchlorid, Essigsäure
Iris Biotech	DIPEA, HATU
Merck	Kieselgel 60, Natriumazid, Benzylamin, Kaliumcarbonat, Natriumhydrogencarbonat, Pyridiniumtoluol-4-sulfonat, Thionylchlorid, Trimethylphosphan
Sigma-Aldrich	NaI, Natriumascorbat, (R)-(+)-Styroloxid, Trimethylphosphin-Lösung in Toluol (1.0 M)
Th. Geyer	Natriumhydroxid
TCI	<i>tert.</i> -Butyldimethylsilylchlorid, Tetrabutylammoniumiodid, Ethyloxalylchlorid, (S)-(-)-Styroloxid, saure Phosphatase

Hersteller	Chemikalie
VWR	Acetonitril (HPLC grade), DMSO (abs.),
Westphalen	H ₂ (gas)

6.4 Verwendete Puffer

Tabelle 12: Zusammensetzung der verwendeten Puffer.

Puffer	Zusammensetzung
Acetat-Puffer (SPR, Immobilisierungspuffer)	10 mM Na-Acetat pH 5.5
<i>HBS-P</i> / DMSO-Puffer (SPR-Puffer, 9:1)	0.1 M HEPES 1.5 M NaCl 0.5 % (v/v) P20 10 % DMSO pH 7.4
Tris- <i>d</i> ₁₉ Puffer (NMR-Progresskurvenanalyse) in D ₂ O	20 mM Tris- <i>d</i> ₁₉ DCI 150 mM NaCl 10 % DMSO- <i>d</i> ₆ pD 6.1 (entspricht pH 6.5) ^[131]

6.5 Angewendete Methoden

6.5.1 *Molecular Modelling* und *Docking*-Studien

Die *molecular modelling*-Studien wurden mit dem Programm *Maestro* (Vers. 2017-1) von Schrödinger auf einer *hp* Workstation *z 600* durchgeführt und berechnet. Hierfür wurde die Röntgenkristallstruktur der humanen β -Galactosid α -2,6-Sialyltransferase I von M. Benz *et al.* aus dem Jahr 2013 verwendet (ST6Gal-I; PDB-ID: 4JS2, Auflösung = 2.30 Å)^[57], die aus der RCSB Protein Data Base geladen wurde.^[102]

Protein Preparation Wizard

Der *Protein Preparation Wizard* aus *Maestro* dient zur Optimierung einer Proteinkristallstruktur. Hierfür wurde die Proteinstruktur in eine neue Ebene geladen und die folgenden Preprozessierungsschritte durchgeführt:

Assign bond orders, add hydrogens, create disulfide bonds, create zero-order bond to metals, delete water beyond 5 Å from het groups.

Des Weiteren wurden alle Wassermoleküle, Metalle und Reagenzien, die zu einer Kristallisation führten, entfernt. Durch die Verwendung von *Use PROPKA* bei pH 5.0 wurden die Protonierungszustände und Tautomerengleichgewichte aller Hydroxylgruppen, Asparagine, Glutamine und Histidine neu berechnet. Abschließend wurde eine kleine Minimierung durchgeführt, um mögliche Spannungen in der Struktur zu entfernen.

Liganden-Docking

Für das *docking* wurde ein *subset* von mehr als 700.000 Strukturen aus der *zinc*-Datenbank^[108,109] als *SD-file* in *Maestro*[®] geladen und dann mit dem Programm *LigPrep* für das *docking* vorbereitet. *LigPrep* konvertiert die zweidimensionalen Strukturen in dreidimensionale Strukturen, wodurch Tautomere und stereochemische Variationen der möglichen Liganden miteinbezogen werden können. Der pH-Wert wurde auf 7.0 ± 0.2 eingestellt und ein *OPLS_2005* Kraftfeld ausgewählt. Des Weiteren musste noch ein Gitter erstellt werden, in dem die unterschiedlichen Liganden gedockt werden konnten. Hierfür wurde die vorbereitete Proteinstruktur mit dem natürlichen Liganden in eine Ebene geladen und mit dem Programm *glide* ein Gitter erzeugt. Das Gitter orientiert sich dabei an der Bindungstasche im Protein, indem der natürliche Ligand zentral vorliegt. Es wurde ein quadratisches Gitter mit einer Achsenlänge von jeweils 30 Å festgelegt.

Das so erstellte Gitter und die vorbereiteten Liganden wurden ausgewählt und mit dem Programm *glide* berechnet. Dabei wurden die Liganden immer als flexibel eingestellt und die

Van-der-Waals-Radien von Atomen mit einer atomaren Teilladung von weniger als 0.15 um den Faktor 0.8 skaliert.^[137] Für das *sampling* wurde eine Präzision mit *HTVS (high-throughput virtual screening)* ausgewählt. Die berechneten Liganden wurden in einer Tabelle ausgegeben, in der sie nach ihrem *docking-score* sortiert sind. Der *docking-score* stellt zwar keine energetische Einheit dar, gibt aber eine gute Bewertung der Bindungseigenschaften eines Liganden in der Proteintasche wieder. Neben der Bewertung des *docking-scores* wurde eine qualitative Bewertung der Liganden anhand ihrer Bindungsposition, der chemischen Umsetzbarkeit und der Anzahl der möglichen Bindungsstellen vorgenommen. Die am besten bewerteten Liganden wurden ausgewählt und zum Teil per Hand weiter modifiziert. Sie wurden erneut unter den gleichen Voraussetzungen mit einer genaueren Präzision (*SP, standard precision*) im selben Gitter berechnet und ausgewertet.

Bindungsenergien - Berechnung mit *Prime* MM-GBSA

Die Berechnungen der jeweiligen Bindungsenergien wurden mit dem Programm *Prime* MM-GBSA in Maestro durchgeführt. Hierfür wurde die zuvor vorbereitete Proteinstruktur in eine neue Ebene geladen und die einzelnen Liganden wurden entsprechend positioniert. Als Kraftfeld wurde das *OPLS_2005* verwendet. Es wurden die einzelnen und gemeinsamen Energien eines Liganden mit dem Protein berechnet. Daraus ergab sich nach Gleichung 1 (siehe Kapitel 5.1) die jeweilige Bindungsenergie. Hierbei ist zu beachten, dass die berechneten Bindungsenergien keine echten, absoluten Werte darstellen. Sie dienen zur Abschätzung, ob ein Ligand im Vergleich zu einem Referenzmolekül (meist der natürliche Ligand) im gleichen System eine verbesserte oder schlechtere Bindungsenthalpie aufweist.

Moleküldynamik-Simulationen (MD-Simulation)

Die Moleküldynamik-Simulationen wurden mit dem Programm *Desmond* in Maestro simuliert. Zunächst musste mit dem *system-builder* von *Desmond* ein Modellsystem erstellt werden, indem das Protein mit dem Liganden solvatisiert vorliegt. Als Solvationsmodell wurde das schon vorliegende SPC-Modell gewählt. Dabei liegt das Protein mit dem Liganden in einer orthorhombischen Lösungsmittelbox, die an allen Seiten 10 Å über das Protein hinausragt. Durch die automatische Zugabe von Chlorid- oder Natrium-Ionen wurde das System neutralisiert. Zusätzlich wurde Natriumchlorid in einer Konzentration von 0.15 M hinzugegeben, um die Gesamtionstärke zu erhöhen.

Mit dem erhaltenen Modellsystem konnten die MD-Simulationen gestartet werden. Hierzu wurde eine Simulationszeit von 1.5 ns eingestellt und ein NPT-Ensemble gewählt, dass die Temperatur von 310 K und den Druck von 1.01325 bar über die gesamte Zeit konstant hielt. Die Aufzeichnungsintervalle wurden mit 0.1 ps für die Energie und 0.5 ps für die Trajektorie eingestellt.

6.5.2 Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)

Die SPR-Experimente wurden an einer Biacore® T100 durchgeführt. Untersucht wurde das inhibitorische Potential des natürlichen Substrates CMP-Neu5Ac und der Liganden (*S*)-**16**, (*R*)-**16**, (*S*)-**17** und (*R*)-**17** gegenüber der ST6Gal-I.

Zunächst wurde die Sialyltransferase ST6Gal-I mit Hilfe des Immobilisierungswizards auf der Goldoberfläche eines HC-30M Sensorchips der Firma Xantec® immobilisiert. Hierbei wurde die Oberfläche zunächst durch die Zugabe von EDC/NHS bei einer Flussrate von 10 µL/min aktiviert. Die ST6Gal-I wurde mit dem Immobilisierungspuffer (siehe Kapitel 6.4) auf 28 µg/mL verdünnt und ebenfalls bei einer Flussrate von 10 µL/min für 300 Sekunden immobilisiert. Dabei wurde eine Immobilisierung von 4000 - 10000 RU erhalten. Abschließend wurden kupplungsaktive Gruppen in der Referenzzelle als auch in der Messzelle mit Ethanolamin-HCl deaktiviert.

Aufgrund der geringen Löslichkeit der zu untersuchenden Liganden wurden diese in einem kommerziell bezogenen *HBS-P* Puffer mit 10 % DMSO gelöst, der ebenfalls als Laufpuffer diente und bei einer Flussrate von 30 µL/min und einer Temperatur von 20 °C über die Chipoberfläche geleitet wurde. Eine Übersicht der untersuchten Konzentrationsbereiche jedes Liganden bzw. des natürlichen Donors CMP-Neu5Ac sind in Tabelle 13 aufgelistet. Jede Konzentration wurde bei einer Assoziationszeit von 120 Sekunden und einer Dissoziationszeit von 300 Sekunden gemessen. Nach jeder Messreihe eines Liganden erfolgte eine Kontrolle der Aktivität des Proteins mit dem Donor CMP-Neu5Ac bei einer Konzentration von 75 µM.

Tabelle 13: Übersicht der mittels SPR gemessenen Verbindungen mit dem jeweiligen verwendeten Konzentrationsbereich.

Verbindung	Konzentrationsbereich	
CMP-Neu5Ac	0 - 1.0 mM	alle bei 30 µL/min und 20 °C im Puffer <i>HBS-P</i> mit 10 % DMSO
(<i>R</i>)- 16	0 - 170 µM	
(<i>S</i>)- 16	0 - 60 µM	
(<i>S</i>)- 17	0 - 115 µM	
(<i>R</i>)- 17	0 - 28 µM	

6.5.3 NMR-Progresskurvenanalyse

Das Experiment der Progresskurvenanalyse mittels NMR dient zur Verfolgung einer Enzymreaktion und somit zur Bestimmung der K_M , v_{max} und der K_I -Werte. Die hier durchgeführten Experimente erfolgten mithilfe des 600 MHz Spektrometers in 3 mm NMR-Probenröhrchen mit einem Gesamtvolumen von 180 μ L bei 310 K.

Alle Messungen wurden in gepufferter Lösung durchgeführt. Als Puffer wurde ein 20 mM Tris- d_{11} mit 150 mM NaCl gelöst in D_2O verwendet. Der pH-Wert des Puffers wurde mit einer 2 M DCl-Lösung auf pH 6.1 eingestellt. Dies entspricht einem korrigierten pD-Wert von 6.5, da die Messungen in deuteriertem Puffer durchgeführt wurden und somit um 0.4 Einheiten korrigiert werden mussten.^[131]

Für die Messungen wurde die humane β -Galactosid α -2,6-Sialyltransferase I (ST6Gal-I) der Firma *antibodies-online* verwendet. Diese war in einem 20 mM TrisHCl Puffer bei pH 8.0 gelagert und musste zunächst in den 20 mM Tris- d_{11} Puffer umgepuffert werden. Für die Umpufferung wurden Amicon® Ultra 0.5 mL Zentrifugationsröhrchen mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa verwendet. Zu Beginn wurden die Filtereinheit zweimal mit je 0.5 mL D_2O und dreimal mit je 0.5 mL Messpuffer bei 22 °C und 14000 g zentrifugiert, um das in der Membran zur Konservierung enthaltene Glycerin zu entfernen. Anschließend wurde die Protein-Puffer-Lösung viermal bei 4 °C und 4000 g zentrifugiert, wobei auf eine minimale Konzentration von 100 μ g/mL Protein geachtet werden musste. Abschließend wurde die Proteinkonzentration photometrisch ermittelt und auf die gewünschte Konzentration bei der Probenvorbereitung eingestellt.

Für die Probenvorbereitung wurden entsprechende Stammlösungen der verwendeten Substanzen hergestellt und diese auf die gewünschte Konzentration an das Gesamtvolumen von 180 μ L angepasst. Um eine weitere Produktinhibition durch umgesetztes CMP zu vermeiden, wurde der Messprobe zusätzlich 0.05 mg/mL saure Phosphatase (APase) hinzugefügt. Als natürlicher Akzeptor wurde *N*-Acetyllactosamin (LacNAc) verwendet und in einem zehnfachen Überschuss gegenüber dem Donorsubstrat CMP-Neu5Ac eingesetzt, um eine gleichbleibende Konzentration an Akzeptor über die gesamte Experimentdauer zu gewährleisten. Eine Übersicht der verwendeten Substanzen mit den eingestellten Konzentrationen sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14: Übersicht der eingestellten Konzentrationen von Protein, Donorsubstrat, Akzeptorsubstrat und des Inhibitors, sowie die Dauer der Reaktionsverfolgung für das Experiment der NMR-Progresskurvenanalyse.

	c (Protein) ST6Gal-I	c (Donor) CMP-Neu5Ac	c (Akzeptor) LacNAc	c (Inhibitor)	Dauer der Reaktionsverfolgung
/	273.5 nM	200 μ M	2000 μ M	/	54 h 26 min
(R)-16	259.3 nM	200 μ M	2000 μ M	170 μ M	13 h 14 min

Die eingesetzten Liganden wurden in DMSO- d_6 gelöst und so zur Messung hinzugegeben, dass die Probe am Ende eine Konzentration von 10 % DMSO- d_6 aufwies. Hierbei wurde die höchstmögliche Konzentration an jeweiligen Liganden eingesetzt, welche zuvor durch Bestimmung des S/N-Verhältnisses mittels NMR ermittelt wurde. Als Vergleichssubstanz wurde eine 2 mM Sucroslösung in D₂O verwendet. Bei der Bestimmung der Vergleichswerte von v_{max} und K_M ohne Inhibitor wurde zusätzlich eine Konzentration von 10 % DMSO- d_6 eingestellt.

Für das jeweilige Experiment wurde die Probe zunächst ohne das Donorsubstrat CMP-Neu5Ac vorbereitet und ein ¹H-NMR Spektrum mit *excitation sculpting* (*zgesgp*) als Wasserunterdrückung aufgenommen, um alle benötigten NMR-spektroskopischen Parameter einzustellen. Anschließend erfolgte die Zugabe vom Donorsubstrat direkt am Spektrometer. Nachdem sich die Probe homogen durchmischt und auf die eingestellte Messtemperatur erwärmt hatte, wurde die Aufnahme der Spektren gestartet. Die Zeit zwischen der Zugabe des Donorsubstrats und der Aufnahme des ersten Spektrums wurde gemessen und bei der Auswertung als Totzeit berücksichtigt. Verwendet wurde das Pulsprogramm *zgesgp_4.mf* mit *excitation sculpting* als Wasserunterdrückung, bei dem alle 13 Minuten ein ¹H-NMR Spektrum mit 65536 Datenpunkten und 128 *scans* aufgenommen wurde.

Für die Auswertung wurden alle Spektren seriell prozessiert und die Basislinien korrigiert. Die Bestimmung der kinetischen Parameter erfolgte mit den Protonen H-5/ H-6 des Cytidins vom Donorsubstrat CMP-Neu5Ac. Durch serielle Integration der Protonen konnte die jeweilige Substratkonzentration bezogen auf das 1. Spektrum als Referenz ermittelt werden. Mithilfe der Konzentrationen und der dazugehörigen Zeit konnte eine Progressionskurve erstellt und anschließend durch Anpassung mit *Matlab*[®] die kinetischen Parameter K_M und v_{max} bestimmt werden. Die Konzentration zum Zeitpunkt $t = 0$ wurde zuvor durch lineare Regression der ersten 10 bzw. 16 Konzentrationswerte ermittelt.

6.6 Synthesevorschriften

Die Reaktionen mit luft- und hydrolyseempfindlichen Reaktanten wurden, wenn nicht anders beschrieben, unter Stickstoffatmosphäre nach der Schlenk-Technik und in absolutierten Lösungsmitteln durchgeführt. Kommerziell erhältliche Chemikalien wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt. Die dünnschichtchromatographische Detektion erfolgte auf TLC Silica Gel 60 beschichteten Aluminiumfolien mit einer UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 254 nm bzw. 320 nm. Alle R_f -Werte wurden bei Kammerfüllung ermittelt.

Die Zuordnung der Signale vom ^1H - und ^{13}C -NMR wurden mit Hilfe von H,H-COSY, HSQC und HMBC Spektren unterstützt bzw. bestätigt. Die jeweilige Kalibrierung eines Spektrums erfolgte dabei auf das verwendete Lösungsmittel der zu untersuchenden NMR-Probe.

6.6.1 Vorschrift zur Reinigung der dargestellten Produkte mittels RP-HPLC

Die Reinigung der Produkte erfolgte über eine präparative RP-HPLC mit einer C_{18} Säule der Firma Macherey & Nagel (Nucleodur C_{18} Isis, 5 μm , 250x4.6 mm) bei einer Flussrate von 1.5 mL/min. Die Detektion erfolgte hier UV-spektroskopisch unter der Verwendung eines DAD. Die Elution wurde durch die Verwendung eines Gradienten der Laufmittelgemische **A** (Wasser + 0.1 % FA) und **B** (Acetonitril + 0.1 % FA) durchgeführt. Für die Injektion wurde das zu reinigende Produkt in maximal 1.0 mL des Startlaufmittelgemisches (Wasser/Acetonitril, 95:5 + 0.1 % FA) gelöst und die Lösung für eine Minute bei 13200 g zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde dann nach der gewählten Methode gereinigt. Der nicht gelöste Rückstand wurde in einem weiteren Reinigungszyklus mittels RP-HPLC nach der gleichen Methode gereinigt. Die so erhaltenen Reinstoffe wurden anschließend vereinigt.

Tabelle 15: Auflistung der HPLC-Methoden für die Reinigung der dargestellten Produkte.

HPLC_1		HPLC_2	
Minute [min]	Anteil B	Minute [min]	Anteil B
0 - 20	5 - 15 %	0 - 30	5 - 20 %
20 - 45	15 - 25 %	30 - 50	20 - 25 %
45 - 52	25 - 100 %	50 - 58	25 - 100 %
52 - 55	100 - 5 %	58 - 62	100 - 5 %

6.6.2 Durchgeführte Synthesen

6.6.2.1 Darstellung von *Methyl 4-chloro-3-nitrobenzoatesäureester* [27]

Es wurden 10.0 g (49.6 mmol, 1.0 eq.) 4-Chlor-3-nitrobenzoessäure (**18**) in 49.6 mL abs. Methanol gelöst, auf 0 °C abgekühlt und langsam mit 10.1 mL (16.5 mmol, 2.8 eq.) Thionylchlorid über 45 Minuten in der Kälte versetzt. Nach der Zugabe wurde die Lösung für vier Stunden zum Rückfluss erhitzt und für weitere 16 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Hierbei fiel ein Niederschlag aus, der saugfiltriert, mit kaltem Methanol gewaschen und abschließend im Hochvakuum getrocknet wurde. Es wurden 9.31 g (43.2 mmol, 87 %) eines weißen, kristallinen Feststoffes erhalten.

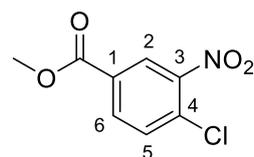
Charakterisierung:

Weißer, kristalliner Feststoff.

R_f-Wert: 0.66 (EE/PE, 3:1).

T_{Schmelzpunkt}: 80.4 °C

HR-ESI-MS: m/z = ber.: 216.0059 ([M+H]⁺),
gef.: 216.0063 ([M+H]⁺).



27

C₈H₆ClNO₄

M = 215.589 g/mol

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8.52 (d, ⁴J_{H2,H6} = 2.0 Hz, 1H, **H-2**), 8.17 (dd, ³J_{H6,H5} = 8.4 Hz, ³J_{H6,H2} = 2.0 Hz, 1H, **H-6**), 7.65 (d, ³J_{H5,H6} = 8.4 Hz, 1H, **H-5**), 3.97 (s, 3H, C(O)OCH₃).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 164.6 (C(O)OCH₃), 148.3 (C-3), 134.0 (C-6), 132.6 (C-5), 132.1 (C-4), 130.5 (C-1), 127.0 (C-2), 53.3 (C(O)OCH₃).

6.6.2.2 2-[*tert*-Butyl(dimethyl)silyl]oxyethanamin [28]

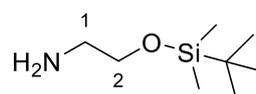
1.83 mL (30.0 mmol, 1.0 eq.) 2-Aminoethanol (**19**) wurden in 30.0 mL abs. Dichlormethan gelöst, mit 6.24 mL (45.0 mmol, 1.5 eq.) Triethylamin versetzt und auf 0 °C abgekühlt. Dann wurden 4.97 g (33.0 mmol, 1.1 eq.) *tert*-Butyldimethylsilylchlorid in 6.6 mL abs. Dichlormethan gelöst und langsam in der Kälte zu der Lösung hinzu getropft. Nach der Zugabe wurde die Kühlung entfernt und die Reaktionslösung für 72 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden jeweils 50 mL Wasser und Dichlormethan zur Lösung gegeben und die Phasen voneinander getrennt. Die wässrige Phase wurde zweimal mit Dichlormethan extrahiert. Abschließend wurden die vereinigten, organischen Phasen einmal mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 5.21 g (29.7 mmol, 99 %) einer klaren, leicht gelblichen Lösung erhalten.

Charakterisierung:

Klare, leicht gelbliche Lösung

R_f-Wert: 0.48 (DCM/MeOH, 12:1).

HR-ESI-MS: m/z = ber.: 176.1466 ([M+H]⁺),
gef.: 176.1464 ([M+H]⁺).



28

C₈H₂₁NOSi

M = 175.347 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 3.60 (t, ³J_{H1,H2} = 5.3 Hz, 2H, **H-2**), 2.75 (t, ³J_{H2,H1} = 5.3 Hz, 2H, **H-1**), 0.88 (s, 9H, Si(CH₃)₂C(CH₃)₃), 0.04 (s, 6H, Si(CH₃)₂C(CH₃)₃).

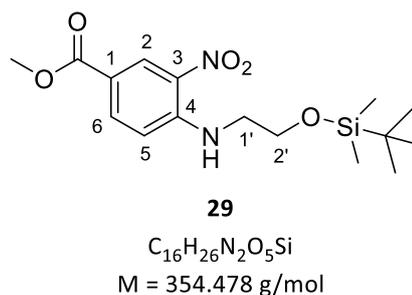
¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 65.4 (**C-2**), 44.5 (**C-1**), 26.0 (Si(CH₃)₂C(CH₃)₃), 18.4 (Si(CH₃)₂C(CH₃)₃), -3.4 (Si(CH₃)₂C(CH₃)₃).

6.6.2.3 Methyl 4-[N-[2'-[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxyethylamino]]-3-nitrobenzoessäureester [29]

4.42 g (20.5 mmol, 1.0 eq.) **27** wurden in 10.3 mL abs. Dichlormethan gelöst und mit 6.85 mL DIPEA versetzt. Nun wurden 6.35 mL (30.8 mmol, 1.5 eq.) **28** innerhalb von 20 Minuten langsam hinzu getropft und die Reaktionslösung für 42 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Hochvakuum entfernt und der Rückstand jeweils in 50 mL Dichlormethan und Wasser aufgenommen. Die Phasen wurden voneinander getrennt und die wässrige Phase dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden jeweils einmal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Abschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand aus Ethanol umkristallisiert. Es wurden 6.33 g (17.9 mmol, 87 %) eines gelben, kristallinen Feststoffes erhalten.

Charakterisierung:

Gelber, kristalliner Feststoff.
 R_f-Wert: 0.82 (EE/PE, 1:1).
 T_{Schmelzpunkt}: 99.2 °C
 HR-ESI-MS: *m/z* = ber.: 355.1684 ([M+H]⁺),
 gef.: 355.1685 ([M+H]⁺).



¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8.88 (d, ⁴J_{H2,H6} = 2.0 Hz, 1H, **H-2**), 8.61 (bs, 1H, **NH**), 8.03 (dd, ³J_{H6,H5} = 9.1 Hz, ⁴J_{H6,H2} = 2.0 Hz, 1H, **H-6**), 6.89 (d, ³J_{H5,H6} = 9.1 Hz, 1H, **H-5**), 3.91 (t, ³J_{H2',H1'} = 5.2 Hz, 1H, **H-2'**), 3.89 (s, 3H, C(O)OCH₃), 3.48 (dd, ³J_{H1',H2'} = 5.2 Hz, ³J_{H1',NH} = 10.5 Hz, 1H, **H-1'**), 0.91 (s, 9H, Si(CH₃)₂C(CH₃)₃), 0.09 (s, 6H, Si(CH₃)₂C(CH₃)₃).

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 165.8 (C(O)OCH₃), 148.0 (C-4), 136.4 (C-6), 131.5 (C-3), 129.7 (C-2), 117.2 (C-1), 113.9 (C-5), 61.1 (C-2'), 52.2 (C(O)OCH₃), 45.2 (C-1'), 25.9 (Si(CH₃)₂C(CH₃)₃), 18.3 (Si(CH₃)₂C(CH₃)₃), -5.3 (Si(CH₃)₂C(CH₃)₃).

6.6.2.4 *Methyl 3-amino-4-[N-[2'-(tert-butyl(dimethyl)silyl)oxyethylamino]]benzoessäureester [30]*

Es wurden 276.6 mg (780 μ mol, 1.0 eq.) **29** und 9.96 mg Pd/C (10 %) zusammen eingewogen und mit 3.5 mL einer Lösung aus abs. Methanol/Dichlormethan (5:2) versetzt. Das Gemisch wurde für 18 Stunden unter Wasserstoffatmosphäre (1.0 bar) bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand über eine kurze Säulenchromatographie an Kieselgel (EE/PE, 1:1) gereinigt. Es wurden 248 mg (764 μ mol, 98 %) eines weißen Feststoffes erhalten.

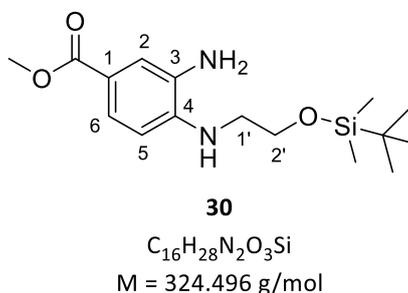
Charakterisierung:

Weißer Feststoff.

R_f-Wert: 0.70 (EE/PE, 1:1).

T_{Schmelzpunkt}: 63.1 °C

HR-ESI-MS: m/z = ber.: 325.1942 ([M+H]⁺),
gef.: 325.2117 ([M+H]⁺).



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.55 (dd, ³J_{H₆,H₅} = 8.2 Hz, ⁴J_{H₆,H₂} = 1.9 Hz, 1H, **H-6**), 7.39 (d, ⁴J_{H₂,H₆} = 1.9 Hz, 1H, **H-2**), 6.57 (d, ³J_{H₅,H₆} = 8.2 Hz, 1H, **H-5**), 3.85 (t, ³J_{H₂',H₁'} = 5.3 Hz, 1H, **H-2'**), 3.82 (s, 3H, C(O)OCH₃), 3.25 (t, ³J_{H₁',H₂'} = 5.3 Hz, 1H, **H-1'**), 0.90 (s, 9H, Si(CH₃)₂C(CH₃)₃), 0.06 (s, 6H, Si(CH₃)₂C(CH₃)₃).

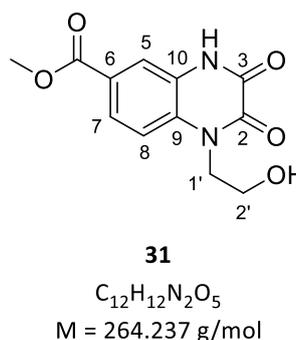
¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 167.6 (C(O)OCH₃), 142.9 (C-4), 132.8 (C-3), 124.0 (C-6), 119.0 (C-1), 117.8 (C-2), 109.6 (C-5), 61.5 (C-2'), 51.6 (C(O)OCH₃), 45.5 (C-1'), 25.9 (Si(CH₃)₂C(CH₃)₃), 18.3 (Si(CH₃)₂C(CH₃)₃), -5.3 (Si(CH₃)₂C(CH₃)₃).

6.6.2.5 *Methyl 1-(2'-hydroxyethyl)-2,3-dioxo-4H-chinoxalin-6-carboxylat [31]*

240 mg (734 μmol , 1.0 eq.) **30** und 51.1 mg (370 μmol , 0.5 eq.) Kaliumcarbonat wurden mit 2.0 mL abs. Aceton vermengt und auf 0 °C abgekühlt. Nun wurden 91.1 μL (814 μmol , 1.1 eq.) Ethyloxalylchlorid (**26**), verdünnt in 2.0 mL abs. Aceton, innerhalb von 30 Minuten zu dem Reaktionsgemisch in der Kälte hinzu getropft. Die Lösung wurde zunächst zwei Stunden bei 0 °C und dann weitere 17 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 4.0 mL Wasser abgebrochen und die Lösung mit einer 1 M Natriumhydroxidlösung auf pH 6.5 eingestellt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (MeCN/H₂O, 20:1) gereinigt. Es wurden 95.7 mg (362 μmol , 49 %) eines weißen Feststoffes erhalten.

Charakterisierung:

Weißer Feststoff.

R_f-Wert: 0.53 (MeCN/H₂O, 20:1).T_{Schmelzpunkt}: 239.4 °C (Zersetzung).HR-ESI-MS: m/z = ber.: 265.0819 ([M+H]⁺),gef.: 265.0859 ([M+H]⁺).

¹H-NMR (600 MHz, MeCN/D₂O, 10:1): δ [ppm] = 7.80 (dd, ³J_{H7,H8} = 8.8 Hz, ⁴J_{H7,H5} = 1.9 Hz, 1H, **H-7**), 7.77 (d, ⁴J_{H5,H7} = 1.9 Hz, 1H, **H-5**), 7.51 (d, ³J_{H8,H7} = 8.8 Hz, 1H, **H-8**), 4.27 (t, ³J_{H2',H1'} = 6.1 Hz, 2H, **H-2'**), 3.85 (s, 3H, C(O)OCH₃), 3.79 (t, ³J_{H1',H2'} = 6.1 Hz, 2H, **H-1'**).

¹³C-NMR (151 MHz, MeCN/D₂O, 10:1): δ [ppm] = 166.7 (C(O)OCH₃), 156.7 (C-2), 154.6 (C-3), 130.9 (C-9), 125.8 (C-10), 125.5 (C-6), 125.2 (C-7), 117.3 (C-5), 116.1 (C-8), 58.2 (C-2'), 52.6 (C(O)OCH₃), 45.4 (C-1').

6.6.2.6 Methyl 1-(2'-chloroethyl)-2,3-dioxo-4H-chinoxalin-6-carboxylat [32]

10.0 mg (37.9 μmol , 1.0 eq.) **31** wurden in 0.25 mL abs. Dimethylformamid gelöst, auf 0 °C abgekühlt und mit 6.3 μL (45.4 μmol , 1.2 eq.) Triethylamin versetzt. Daraufhin wurden 3.23 μL (41.6 μmol , 1.1 eq.) Methansulfonylchlorid, verdünnt mit 0.1 mL abs. Dimethylformamid, langsam bei 0 °C in die Reaktionslösung getropft und weitere 90 Minuten bei dieser Temperatur gerührt. Nach weiteren 16 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand mit jeweils 5.0 mL Wasser und Dichlormethan versetzt, die Phasen voneinander getrennt und die wässrige Phase zweimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden jeweils einmal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Abschließend wurde der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (DCM/MeOH, 12:1) gereinigt. Es wurden 7.5 mg (26.5 μmol , 70 %) eines weißen, kristallinen Feststoffes erhalten.

Charakterisierung:

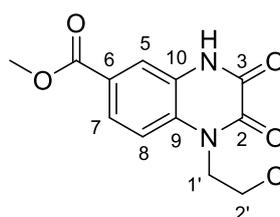
Weißer, kristalliner Feststoff.

R_f-Wert: 0.57 (DCM/MeOH, 12:1).

T_{Schmelzpunkt}: 238.5 °C

HR-ESI-MS: m/z = ber.: 283.0481 ([M+H]⁺),

gef.: 283.0502 ([M+H]⁺).



32

C₁₂H₁₁ClN₂O₄
M = 282.680 g/mol

¹H-NMR (500 MHz, Aceton-*d*₆): δ [ppm] = 11.0 (bs, 1H, NH), 7.95 (d, ⁴J_{H5,H7} = 1.9 Hz, 1H, H-5), 7.84 (dd, ³J_{H7,H8} = 8.7 Hz, ⁴J_{H7,H5} = 1.9 Hz, 1H, H-7), 7.64 (d, ³J_{H8,H7} = 8.7 Hz, 1H, H-8), 4.61 (t, ³J_{H2',H1'} = 7.1 Hz, 2H, H-2'), 3.93 (t, ³J_{H1',H2'} = 7.1 Hz, 2H, H-1') 3.90 (s, 3H, C(O)OCH₃).

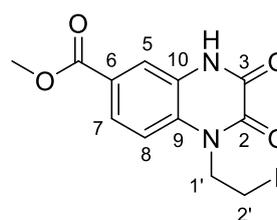
¹³C-NMR (126 MHz, Aceton-*d*₆): δ [ppm] = 166.3 (C(O)OCH₃), 156.3 (C-2), 153.8 (C-3), 131.3 (C-9), 127.0 (C-10), 126.4 (C-6), 125.3 (C-7), 117.7 (C-5), 115.9 (C-8), 52.5 (C(O)OCH₃), 44.9 (C-2'), 40.3 (C-1').

6.6.2.7 Methyl 1-(2'-iodoethyl)-2,3-dioxo-4H-chinoxalin-6-carboxylat [33]

180 mg (683 μmol , 1.0 eq.) **31** wurden mit 3.3 mL abs. Aceton vermengt, auf 0 °C abgekühlt und mit 114 μL (819 μmol , 1.2 eq.) Triethylamin und 1.02 g (6.83 mmol, 10.0 eq.) Natriumiodid versetzt. Daraufhin wurden 58.1 μL (751 μmol , 1.1 eq.) Methansulfonylchlorid, verdünnt mit 3.0 mL abs. Aceton, langsam über 45 Minuten in das kalte Gemisch getropft und weitere 120 Minuten bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde die Lösung für weitere 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in jeweils 6.0 mL Wasser und Dichlormethan aufgenommen. Die Phasen wurden voneinander getrennt und die wässrige Phase dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden einmal mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (DCM/MeOH, 12:1) gereinigt. Es wurden 48.4 mg (129 μmol , 19 %) eines weißen, feinen Feststoffes erhalten.

Charakterisierung:

Weißer, feiner Feststoff.
 R_f-Wert: 0.71 (DCM/MeOH, 12:1).
 T_{Schmelzpunkt}: 200.3 °C
 HR-ESI-MS: m/z = ber.: 374.9837 ([M+H]⁺),
 gef.: 374.9846 ([M+H]⁺).



33

$\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{IN}_2\text{O}_4$
 M = 374.135 g/mol

¹H-NMR (600 MHz, MeOD-*d*₄): δ [ppm] = 7.87 (dd, ³J_{H7,H8} = 8.8 Hz, ⁴J_{H7,H5} = 1.9 Hz, 1H, **H-7**), 7.85 (d, ⁴J_{H5,H7} = 1.9 Hz, 1H, **H-5**), 7.61 (d, ³J_{H8,H7} = 8.8 Hz, 1H, **H-8**), 4.41 (t, ³J_{H2',H1'} = 5.9 Hz, 2H, **H-2'**), 3.92 (s, 3H, C(O)OCH₃), 3.90 (t, ³J_{H1',H2'} = 5.9 Hz, 2H, **H-1'**).

¹³C-NMR (151 MHz, MeOD-*d*₄): δ [ppm] = 167.4 (C(O)OCH₃), 157.7 (C-2), 156.3 (C-3), 132.2 (C-9), 127.0 (C-10), 126.7 (C-6), 126.0 (C-7), 118.3 (C-5), 116.9 (C-8), 59.6 (C-2'), 52.8 (C(O)OCH₃), 46.5 (C-1').

6.6.2.8 Methyl 1-(2'-azidoethyl)-2,3-dioxo-4H-chinoxalin-6-carboxylat [34]

11.0 mg (38.9 μmol , 1.0 eq.) **32** wurden in 1.0 mL abs. Dimethylformamid gelöst, mit 12.7 mg (195 μmol , 5.0 eq.) Natriumazid (**21**) versetzt und für 4 Stunden bei 80 °C erhitzt. Danach wurden jeweils 5.0 mL Wasser und Dichlormethan hinzugegeben, die Phasen voneinander getrennt und die wässrige Phase zweimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden jeweils einmal mit gesättigter Natriumchloridlösung und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 10.5 mg (36.3 μmol , 93 %) eines weißen, feinen Feststoffes erhalten.

Charakterisierung:

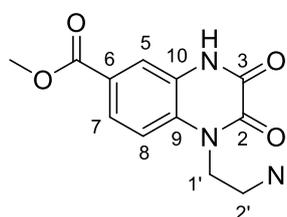
Weißer, feiner Feststoff.

R_f-Wert: 0.62 (DCM/MeOH, 12:1).

T_{Schmelzpunkt}: 216.5 °C (Zersetzung).

HR-ESI-MS: m/z = ber.: 290.0884 ([M+H]⁺),

gef.: 290.0897 ([M+H]⁺).



34

C₁₂H₁₁N₅O₄
M = 289.251 g/mol

¹H-NMR (600 MHz, Aceton-d₆): δ [ppm] = 11.0 (bs, 1H, NH), 7.95 (d, ⁴J_{H5,H7} = 1.9 Hz, 1H, H-5), 7.84 (dd, ³J_{H7,H8} = 8.7 Hz, ⁴J_{H7,H5} = 1.9 Hz, 1H, H-7), 7.65 (d, ³J_{H8,H7} = 8.7 Hz, 1H, H-8), 4.50 (t, ³J_{H2',H1'} = 6.3 Hz, 2H, H-2'), 3.90 (s, 3H, C(O)OCH₃), 3.80 (t, ³J_{H1',H2'} = 6.3 Hz, 2H, H-1').

¹³C-NMR (151 MHz, Aceton-d₆): δ [ppm] = 166.3 (C(O)OCH₃), 156.4 (C-2), 153.8 (C-3), 131.5 (C-9), 127.0 (C-10), 126.3 (C-6), 125.2 (C-7), 117.7 (C-5), 116.0 (C-8), 52.5 (C(O)OCH₃), 48.9 (C-1'), 42.7 (C-2').

6.6.2.9 (1S)-1-Phenylbut-3-yn-1-ol [(S)-24]

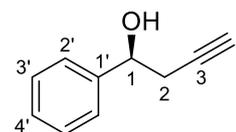
114 μL (1.0 mmol, 1.0 eq.) (*R*)-(+)-Styroloxid (**23**) wurden mit 0.5 mL abs. DMSO vermischt und langsam zu einer Lösung aus 147 mg (1.60 mmol, 1.6 eq.) eines Lithiumacetylid-Ethylendiamin-Komplexes, gelöst in 1.6 mL abs. DMSO, getropft. Die leicht braune Lösung wurde 19 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständiger Umsetzung wurde die Reaktion durch Zugabe von gesättigter Ammoniumchloridlösung unter Eiskühlung abgebrochen und die Lösung dreimal mit Petrolether extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden zweimal mit gesättigter Natriumchloridlösung sowie einmal mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Abschließend wurde der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (EE/PE, 2:1) gereinigt. Es wurden 120 mg (817 μmol , 82 %) eines gelben Sirups erhalten.

Charakterisierung:

Gelber Sirup.

 R_f -Wert: 0.73 (EE/PE, 2:1). $[\alpha]_D^{20} = -58.0^\circ$ ($c = 0.1$, CHCl_3).

HR-ESI-MS: $m/z =$ ber.: 146.0732 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), 129.0704 ($[\text{M}-\text{OH}]^+$),
gef.: 129.0696 ($[\text{M}-\text{OH}]^+$).



(S)-24

 $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}$

M = 146.189 g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.42-7.34 (m, 4H, **H-2'**, **H-3'**), 7.33-7.28 (m, 1H, **H-4'**), 4.89 (t, $^3J_{\text{H}1,\text{H}2} = 6.4$ Hz, 1H, **H-1**), 2.67-2.63 (m, ABXY-System, 2H, **H-2a**, **H-2b**), 2.08 (t, $^4J_{\text{H}4,\text{H}2} = 2.6$ Hz, 1H, **H-4**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 142.6 (**C-1'**), 128.7 (**C-3'**), 128.2 (**C-4'**), 125.9 (**C-2'**), 80.8 (**C-3**), 72.5 (**C-1**), 71.1 (**C-4**), 29.6 (**C-2**).

6.6.2.10 (1*R*)-1-Phenylbut-3-yn-1-ol [(*R*)-**24**]

Nach der Vorschrift von (*S*)-**24** wurden 456 μL (4.0 mmol, 1.0 eq.) des Eduktes (*S*)-(-)-Styroloxid (**23**) zu (*R*)-**24** umgesetzt. Hierbei wurden 244 mg (1.67 mmol, 42 %) eines gelben Sirups erhalten.

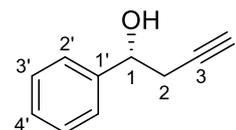
Charakterisierung:

Gelber Sirup.

R_f -Wert: 0.73 (EE/PE, 2:1)

$[\alpha]_D^{20} = +60.0^\circ$ ($c = 0.1$, CHCl_3).

HR-ESI-MS: $m/z =$ ber.: 146.0732 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), 129.0704 ($[\text{M}-\text{OH}]^+$),
gef.: 129.0662 ($[\text{M}-\text{OH}]^+$).

(*R*)-**24** $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}$

M = 146.189 g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.41-7.35 (m, 4H, **H-2'**, **H-3'**), 7.33-7.29 (m, 1H, **H-4'**), 4.89 (t, $^3J_{\text{H1,H2}} = 6.4$ Hz, 1H, **H-1**), 2.67-2.63 (m, ABXY-System, 2H, **H-2a**, **H-2b**), 2.08 (t, $^4J_{\text{H4,H2}} = 2.6$ Hz, 1H, **H-4**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 142.6 (**C-1'**), 128.6 (**C-3'**), 128.2 (**C-4'**), 125.9 (**C-2'**), 80.8 (**C-3**), 72.5 (**C-1**), 71.1 (**C-4**), 29.6 (**C-2**).

6.6.2.11 (4S)-4-Phenyl-1,3-dioxolan-2-on [(S)-37]

1.5 mL (13.1 mmol, 1.0 eq.) (S)-(-)-Styroloxid (**23**) wurden mit 484 mg (1.31 mmol, 0.1 eq.) Tetrabutylammoniumiodid versetzt und für 11 Stunden unter Kohlendioxidatmosphäre und Lichtausschluss bei 80 °C erhitzt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden 20 mL Dichlormethan hinzugegeben, die organische Lösung dreimal mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Abschließend wurde das erhaltende Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (EE/PE, 3:7) gereinigt. Es wurden 963 mg (5.87 mmol, 45 %) eines weißen, feinen Feststoffes erhalten.

Charakterisierung:

Weißer, feiner Feststoff.

R_f-Wert: 0.45 (EE/PE, 3:7).

[α]_D²⁰ = +22.0 ° (c = 0.1, CHCl₃).

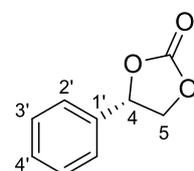
T_{Schmelzpunkt}: 61.2 °C

HR-ESI-MS: *m/z* = ber.: 165.0547 ([M+H]⁺),

gef.: 165.0560 ([M+H]⁺).

EI-(DIP)-MS: *m/z* = ber.: 164.0473 ([M]⁺),

gef.: 164.1000 ([M]⁺).



(S)-37

C₉H₈O₃

M = 164.160 g/mol

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.47-7.41 (m, 3H, H-4', H-3'), 7.38-7.35 (m, 2H, H-2'), 5.68 (t, ³J_{H4,H5} = 8.0 Hz, 1H, H-4), 4.80 (dd, ³J_{H5a,H4} = 8.0 Hz, ²J_{H5a,H5b} = 8.6 Hz, 1H, H-5a), 4.35 (dd, ³J_{H5b,H4} = 8.0 Hz, ²J_{H5b,H5a} = 8.6 Hz, 1H, H-5b).

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 155.0 (OC(O)O), 135.9 (C-1'), 129.9 (C-4'), 129.4 (C-3'), 126.0 (C-2'), 78.1 (C-4), 71.3 (C-5).

6.6.2.12 (4*R*)-4-Phenyl-1,3-dioxolan-2-on [(*R*)-**37**]

Nach der Vorschrift von (*S*)-**37** wurden 1.0 mL (8.74 mmol, 1.0 eq.) des Eduktes (*R*)-(+)-Styroloxid (**23**) und 323 mg (874 μ mol, 0.1 eq.) Tetrabutylammoniumiodid zu (*R*)-**37** umgesetzt. Hierbei wurden 1.11 g (6.77 mmol, 78 %) eines weißen, feinen Feststoffes erhalten.

Charakterisierung:

Weißer, feiner Feststoff.

R_f-Wert: 0.45 (EE/PE, 3:7).

$[\alpha]_D^{20} = -21.0^\circ$ ($c = 0.1$, CHCl₃).

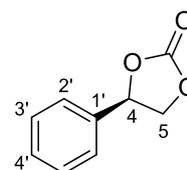
T_{Schmelzpunkt}: 52.4 °C

HR-ESI-MS: $m/z =$ ber.: 165.0574 ([M+H]⁺),

gef.: 165.0596 ([M+H]⁺).

EI-(DIP)-MS: $m/z =$ ber.: 164.0473 ([M]⁺),

gef.: 164.1000 ([M]⁺).



(*R*)-**37**

C₉H₈O₃

M = 164.160 g/mol

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.47-7.41 (m, 3H, H-4', H-3'), 7.38-7.35 (m, 2H, H-2'), 5.68 (t, ³J_{H4,H5} = 8.0 Hz, 1H, H-4), 4.80 (dd, ³J_{H5a,H4} = 8.0 Hz, ²J_{H5a,H5b} = 8.6 Hz, 1H, H-5a), 4.35 (dd, ³J_{H5b,H4} = 8.0 Hz, ²J_{H5b,H5a} = 8.6 Hz, 1H, H-5b).

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 155.0 (OC(O)O), 135.9 (C-1'), 129.9 (C-4'), 129.4 (C-3'), 126.0 (C-2'), 78.1 (C-4), 71.3 (C-5).

6.6.2.13 Methyl 1-[2'-[4''-[(2''')S)-2''''-hydroxy-2''''-phenyl-ethyl]triazol-1-yl]ethyl]-2,3-dioxo-4H-chinoxalin-6-carboxylat [(S)-35]

70.3 mg (243 μmol , 1.0 eq.) **34** und 35.5 mg (243 μmol , 1.0 eq.) (S)-**24** wurden in 3.75 mL eines THF/H₂O-Gemisches (1:2) gelöst und dann mit 12.1 mg (48.1 μmol , 0.2 eq.) Kupfer(II)-sulfat Pentahydrat und 14.5 mg (72.9 μmol , 0.3 eq.) Natriumascorbat versetzt. Die Reaktionslösung wurde für vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt, wobei ein Niederschlag ausfiel. Der Niederschlag wurde saugfiltriert, mit kaltem Wasser gewaschen und das zurückgebliebene Filtrat noch dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden jeweils einmal mit gesättigter Natriumchloridlösung und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand und der abfiltrierte Niederschlag wurden vereinigt und säulenchromatographisch an Kieselgel (DCM/MeOH, 12:1) gereinigt. Es wurden 63.0 mg (145 μmol , 60 %) eines weißen, feinen Feststoffes erhalten.

Charakterisierung:

Weißer, feiner Feststoff.

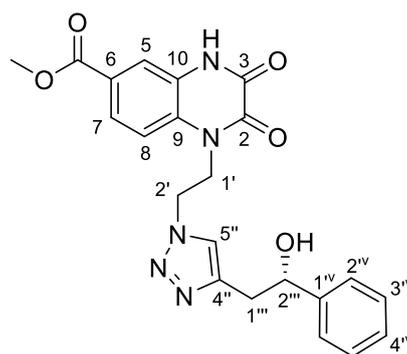
R_f-Wert: 0.31 (DCM/MeOH, 12:1).

[α]_D²⁰ = -15.5 ° (c = 0.1, MeOH).

T_{Schmelzpunkt}: 228.3 °C (Zersetzung).

HR-ESI-MS: m/z = ber.: 436.1616 ([M+H]⁺),

gef.: 436.1559 ([M+H]⁺).



(S)-35

C₂₂H₂₁N₅O₅

M = 435.440 g/mol

¹H-NMR (600 MHz, DMF-*d*₇): δ [ppm] = 12.0 (bs, 1H, NH), 7.86 (d, ⁴J_{H5,H7} = 1.9 Hz, 1H, H-5), 7.85 (s, 1H, H-5''), 7.60 (dd, ³J_{H7,H8} = 8.7 Hz, ⁴J_{H7,H5} = 1.9 Hz, 1H, H-7), 7.29 (d, ³J_{H8,H7} = 8.7 Hz, 1H, H-8), 7.27-7.24 (m, 2H, H-2^v), 7.22-7.18 (m, 2H, H-3^v), 7.14-7.10 (m, 1H, H-4^v), 5.21 (d, ³J_{OH,H2'''} = 4.4 Hz, 1H, OH), 4.74-4.72 (m, 1H, H-2'''), 4.70 (t, ³J_{H2',H1'} = 6.3 Hz, 2H, H-2'), 4.61 (t, ³J_{H1',H2'} = 6.3 Hz, 2H, H-1'), 3.79 (s, 3H, C(O)OCH₃), 2.87 (dd, ³J_{H1''''a,H2''''} = 7.7 Hz, ²J_{H1''''a,H1''''b} = 14.8 Hz, 1H, H-1''''a), 2.84 (dd, ³J_{H1''''b,H2''''} = 5.8 Hz, ²J_{H1''''b,H1''''a} = 14.8 Hz, 1H, H-1''''b).

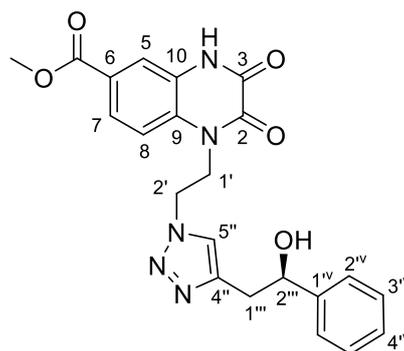
¹³C-NMR (151 MHz, DMF-*d*₇): δ [ppm] = 165.7 (C(O)OCH₃), 155.7 (C-2), 153.3 (C-3), 145.6 (C-1^v), 144.9 (C-4''), 130.6 (C-9), 128.1 (C-3^v), 127.0 (C-4^v), 126.4 (C-10), 126.1 (C-2^v), 125.1 (C-6), 124.2 (C-7), 124.0 (C-5''), 116.9 (C-5), 114.7 (C-8), 72.8 (C-2'''), 52.0 (C(O)OCH₃), 46.5 (C-2'), 43.0 (C-1'), 36.2 (C-1''').

6.6.2.14 Methyl 1-[2'-[4''-[(2''''*R*)-2''''-hydroxy-2''''-phenyl-ethyl]triazol-1-yl]ethyl]-2,3-dioxo-4H-chinoxalin-6-carboxylat [(*R*)-35]

Nach der Vorschrift von (*S*)-**35** wurden 89.7 mg (310 μ mol, 1.0 eq.) **34** und 45.3 mg (310 μ mol, 1.0 eq.) (*R*)-**24** zu (*R*)-**35** umgesetzt. Es wurden 102 mg (234 μ mol, 76 %) eines feinen, weißen Feststoffes erhalten.

Charakterisierung:

Feiner, weißer Feststoff.
 R_f -Wert: 0.31 (DCM/MeOH, 12:1).
 $[\alpha]_D^{20} = +15.0^\circ$ ($c = 0.1$, MeOH).
 $T_{\text{Schmelzpunkt}}: 230.5^\circ\text{C}$ (Zersetzung).
 HR-ESI-MS: $m/z =$ ber.: 436.1616 ($[\text{M}+\text{H}]^+$),
 gef.: 436.1620 ($[\text{M}+\text{H}]^+$).



(*R*)-**35**

$\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_5$
 $M = 435.440 \text{ g/mol}$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm] = 12.20 (bs, 1H, NH), 7.85 (s, 1H, H-5''), 7.79 (d, $^4J_{\text{H}5, \text{H}7} = 1.9 \text{ Hz}$, 1H, H-5), 7.63 (dd, $^3J_{\text{H}7, \text{H}8} = 8.8 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{H}7, \text{H}5} = 1.9 \text{ Hz}$, 1H, H-7), 7.31-7.26 (m, 4H, H-2''', H-3'''), 7.25 (d, $^3J_{\text{H}8, \text{H}7} = 8.8 \text{ Hz}$, 1H, H-8), 7.23-7.19 (m, 1H, H-4'''), 5.32 (d, $^3J_{\text{OH}, \text{H}2'''} = 4.5 \text{ Hz}$, 1H, OH), 4.72-4.66 (m, 1H, H-2'''), 4.64 (t, $^3J_{\text{H}2', \text{H}1'} = 6.0 \text{ Hz}$, 2H, H-2'), 4.54 (t, $^3J_{\text{H}1', \text{H}2'} = 6.0 \text{ Hz}$, 2H, H-1'), 3.86 (s, 3H, C(O)OCH₃), 2.89 (dd, $^3J_{\text{H}1''''\text{a}, \text{H}2''''} = 7.5 \text{ Hz}$, $^2J_{\text{H}1''''\text{a}, \text{H}1''''\text{b}} = 14.5 \text{ Hz}$, 1H, H-1''''a), 2.84 (dd, $^3J_{\text{H}1''''\text{b}, \text{H}2''''} = 5.7 \text{ Hz}$, $^2J_{\text{H}1''''\text{b}, \text{H}1''''\text{a}} = 14.5 \text{ Hz}$, 1H, H-1''''b).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm] = 165.3 (C(O)OCH₃), 155.3 (C-2), 153.1 (C-3), 145.2 (C-1'''), 144.1 (C-4'''), 130.1 (C-9), 127.9 (C-3'''), 126.8 (C-4'''), 125.9 (C-2'''), 125.8 (C-10), 124.4 (C-6), 123.9 (C-7), 123.8 (C-5'''), 116.5 (C-5), 114.6 (C-8), 72.0 (C-2'''), 52.3 (C(O)OCH₃), 46.1 (C-2'), 42.6 (C-1'), 35.7 (C-1''').

6.6.2.16 1-[2'-[4''-[(2''''*R*)-2''''-hydroxy-2''''-phenyl-ethyl]triazol-1-yl]ethyl]-2,3-dioxo-4*H*-chinoxalin-6-carbonsäure [(*R*)-36]

Nach der Vorschrift von (*S*)-36 wurden 50.0 mg (115 μ mol, 1.0 eq.) (*R*)-35 und 18.4 mg (459 μ mol, 4.0 eq.) festem Natriumhydroxid zu (*R*)-36 umgesetzt. Es wurden 45.0 mg (107 μ mol, 93 %) eines feinen, weißen Feststoffes erhalten.

Charakterisierung:

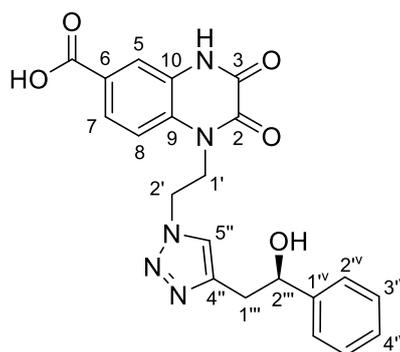
Weißer Feststoff.

R_f-Wert: 0.25 (MeCN/H₂O, 10:1).

[α]_D²⁰ = +15.0 ° (c = 0.1, MeOH).

T_{Schmelzpunkt}: 280.5 °C (Zersetzung).

HR-ESI-MS: *m/z* = ber.: 422.1459 ([M+H]⁺),
gef.: 422.1485 ([M+H]⁺).



(*R*)-36

C₂₁H₁₉N₅O₅

M = 421.413 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 13.02 (bs, 1H, C(O)OH), 12.18 (bs, 1H, NH), 7.84 (s, 1H, H-5''), 7.77 (d, ⁴J_{H5,H7} = 1.9 Hz, 1H, H-5), 7.62 (dd, ³J_{H7,H8} = 8.8 Hz, ⁴J_{H7,H5} = 1.9 Hz, 1H, H-7), 7.30-7.25 (m, 4H, H-2''', H-3'''), 7.24 (d, ³J_{H8,H7} = 8.8 Hz, 1H, H-8), 7.22-7.18 (m, 1H, H-4'''), 5.31 (d, ³J_{OH,H2'''} = 4.5 Hz, 1H, OH), 4.71-4.66 (m, 1H, H-2'''), 4.63 (t, ³J_{H2',H1'} = 5.9 Hz, 2H, H-2'), 4.53 (t, ³J_{H1',H2'} = 5.9 Hz, 2H, H-1'), 2.88 (dd, ³J_{H1''''a,H2''''} = 7.4 Hz, ²J_{H1''''a,H1''''b} = 14.5 Hz, 1H, H-1''''a), 2.84 (dd, ³J_{H1''''b,H2''''} = 5.6 Hz, ²J_{H1''''b,H1''''a} = 14.5 Hz, 1H, H-1''''b).

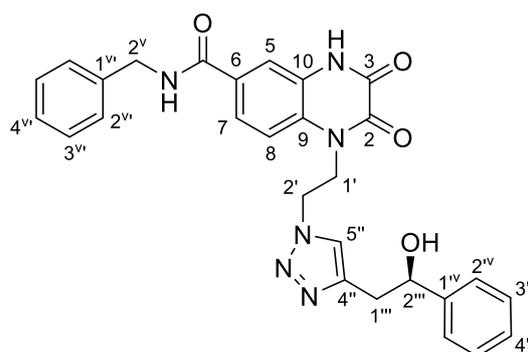
¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 166.4 (C(O)OCH₃), 155.4 (C-2), 153.2 (C-3), 145.2 (C-1'''), 144.1 (C-4'''), 129.8 (C-9), 127.9 (C-3'''), 126.8 (C-4'''), 125.9 (C-2'''), 125.7 (C-10), 125.6 (C-6), 124.1 (C-7), 123.8 (C-5''), 116.4 (C-5), 114.4 (C-8), 72.0 (C-2'''), 46.1 (C-2'), 42.6 (C-1'), 35.7 (C-1''').

6.6.2.17 N-Benzyl-1-[2'-[4''-[(2''''R)-2''''-hydroxy-2''''-phenyl-ethyl]triazol-1-yl]ethyl]-2,3-dioxo-4H-chinoxalin-6-carbonsäureamid [(R)-16]

20.0 mg (47.5 μmol , 1.0 eq.) (R)-**36** wurden in 0.8 mL abs. DMF gelöst und mit Eiswasser auf 0 °C abgekühlt. Nun wurden 36.1 mg (94.9 μmol , 2.0 eq.) HATU, gelöst in 0.4 mL DMF, hinzugegeben und die Lösung für fünf Minuten in der Kälte gerührt. Daraufhin wurden 7.81 μL (71.2 μmol , 1.5 eq.) Benzylamin (**25**) und 32.3 μL (190 μmol , 4.0 eq.) DIPEA hinzugefügt und für weitere 90 Minuten in der Kälte gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (MeCN/H₂O, 10:1 + 0.1 % FA) gereinigt. Es wurden 23.7 mg (46.2 μmol , 98 %) eines weißen Feststoffes erhalten.

Charakterisierung:

Weißer Feststoff.
 R_f-Wert: 0.58 (MeCH/H₂O, 10:1).
 $[\alpha]_D^{20} = +10.5^\circ$ (c = 0.1, DMSO).
 T_{Schmelzpunkt}: 247.9 °C (Zersetzung).
 HR-ESI-MS: $m/z =$ ber.: 511.2089 ([M+H]⁺),
 gef.: 511.2090 ([M+H]⁺).



(R)-16

C₂₈H₂₆N₆O₄

M = 510.554 g/mol

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 12.14 (bs, 1H, NH), 9.09 (t, ³J_{NH,H2v} = 6.0 Hz, 1H, C(O)NHCH₂), 7.81 (s, 1H, H-5''), 7.71 (d, ⁴J_{H5,H7} = 1.9 Hz, 1H, H-5), 7.62 (dd, ³J_{H7,H8} = 8.8 Hz, ⁴J_{H7,H5} = 1.9 Hz, 1H, H-7), 7.33-7.20 (m, 10H, H-2''v, H-2''', H-3''v, H-3''', H-4''v, H-4'''), 7.19 (d, ³J_{H8,H7} = 8.8 Hz, 1H, H-8), 5.34 (bs, 1H, OH), 4.70-4.66 (m, 1H, H-2'''), 4.63 (t, ³J_{H2',H1'} = 6.1 Hz, 2H, H-2'), 4.54 (t, ³J_{H1',H2'} = 6.1 Hz, 2H, H-1'), 4.47 (d, ³J_{H2v,NH} = 6.0 Hz, 2H, H-2''v), 2.87 (dd, ³J_{H1''a,H2''} = 7.8 Hz, ²J_{H1''a,H1''b} = 14.7 Hz, 1H, H-1''a), 2.83 (dd, ³J_{H1''b,H2''} = 5.9 Hz, ²J_{H1''b,H1''a} = 14.7 Hz, 1H, H-1''b).

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 165.3 (C(O)NHCH₂), 155.5 (C-2), 153.5 (C-3), 145.3 (C-1''v), 144.2 (C-4'''), 139.7 (C-1''v), 129.6 (C-6), 128.6 (C-9), 128.4 (C-3''v), 128.1 (C-3''v), 127.2 (C-2''v), 127.0 (C-4''v), 126.9 (C-4''v), 126.0 (C-2''v), 125.7 (C-10), 124.0 (C-5'''), 121.6 (C-7), 115.6 (C-5), 114.2 (C-8), 72.2 (C-2'''), 46.3 (C-2'), 42.7 (C-1'), 42.6 (C-2''v), 35.8 (C-1''').

6.6.2.18 N-Benzyl-1-[2'-[4''-[(2''''S)-2''''-hydroxy-2''''-phenyl-ethyl]triazol-1-yl]ethyl]-2,3-dioxo-4H-chinoxalin-6-carbonsäureamid [(S)-16]

Nach der Vorschrift von (R)-16 wurden 18.4 mg (43.7 μmol , 1.0 eq.) (S)-36 zu (S)-16 umgesetzt. Es wurden 9.7 mg (19.0 μmol , 44 %) eines weißen Feststoffes erhalten.

Charakterisierung:

Weißer Feststoff.

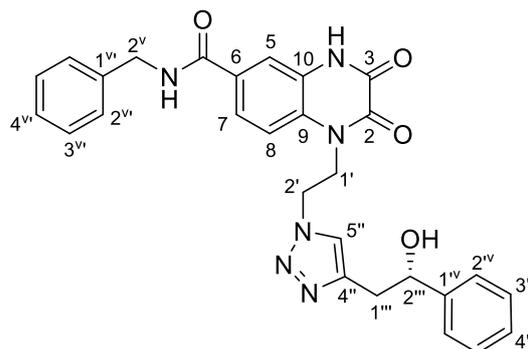
R_f-Wert: 0.58 (MeCN/H₂O, 10:1).

[α]_D²⁰ = -10.9 ° (c = 0.06, DMSO).

T_{Schmelzpunkt}: 218.8 °C (Zersetzung).

HR-ESI-MS: m/z = ber.: 511.2089 ([M+H]⁺),

gef.: 511.2118 ([M+H]⁺).



(S)-16

C₂₈H₂₆N₆O₄

M = 510.554 g/mol

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 12.16 (bs, 1H, NH), 9.07 (t, ³J_{NH,H2v} = 6.0 Hz, 1H, C(O)NHCH₂), 7.83 (s, 1H, H-5''), 7.72 (d, ⁴J_{H5,H7} = 1.9 Hz, 1H, H-5), 7.63 (dd, ³J_{H7,H8} = 8.7 Hz, ⁴J_{H7,H5} = 1.9 Hz, 1H, H-7), 7.33-7.20 (m, 10H, H-2''', H-2'', H-3''', H-3'', H-4''', H-4''), 7.20 (d, ³J_{H8,H7} = 8.7 Hz, 1H, H-8), 5.31 (d, ³J_{OH,H2'''} = 4.5 Hz, 1H, OH), 4.70-4.66 (m, 1H, H-2'''), 4.63 (t, ³J_{H2',H1'} = 6.1 Hz, 2H, H-2'), 4.54 (t, ³J_{H1',H2'} = 6.1 Hz, 2H, H-1'), 4.48 (d, ³J_{H2v,NH} = 6.0 Hz, 2H, H-2^v), 2.87 (dd, ³J_{H1''',H2'''} = 7.7 Hz, ²J_{H1''',H1''''b} = 14.7 Hz, 1H, H-1''''a), 2.83 (dd, ³J_{H1''',H2'''} = 5.7 Hz, ²J_{H1''',H1''''a} = 14.7 Hz, 1H, H-1''''b).

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 165.1 (C(O)NHCH₂), 155.3 (C-2), 153.3 (C-3), 145.1 (C-1^v), 144.1 (C-4''), 139.7 (C-1^v), 129.3 (C-6), 128.3 (C-9), 128.2 (C-3^v), 128.0 (C-3^v), 127.1 (C-2^v), 126.8 (C-4^v), 126.7 (C-4^v), 125.9 (C-2^v), 125.6 (C-10), 123.9 (C-5''), 121.5 (C-7), 115.3 (C-5), 114.0 (C-8), 72.0 (C-2'''), 46.1 (C-2'), 42.6 (C-1'), 42.5 (C-2^v), 35.8 (C-1''').

6.6.2.19 1-[2'-Azidoethyl]-2,3-dioxo-4H-chinoxalin-6-carbonsäure [22]

10.0 mg (34.6 μmol , 1.0 eq.) **34** wurden mit 2.77 mL Tetrahydrofuran vermengt und dann mit 5.53 mg (138.3 μmol , 4.0 eq.) festem Natriumhydroxid und 138 μL Wasser versetzt. Die nun homogene Reaktionslösung wurde für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, wobei sich langsam ein Niederschlag bildete. Durch anschließende Zugabe von Wasser wurde dieser wieder gelöst und die Lösung mit konzentrierter Essigsäure auf ein pH von 3 eingestellt, wobei erneut ein Niederschlag ausfiel. Der Niederschlag wurde saugfiltriert, mit kaltem Wasser gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Es wurden 9.40 mg (34.2 μmol , 99 %) eines weißen, kristallinen Feststoffes erhalten.

Charakterisierung:

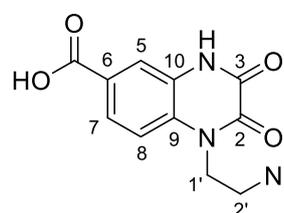
Weißer, kristalliner Feststoff.

R_f-Wert: 0.04 (DCM/MeOH, 12:1)

T_{Schmelzpunkt}: 281.9 °C (Zersetzung).

HR-ESI-MS: m/z = ber.: 276.0728 ([M+H]⁺),

gef.: 276.0723 ([M+H]⁺).



22

C₁₁H₉N₅O₄

M = 275.224 g/mol

¹H-NMR (600 MHz, MeOD-*d*₄): δ [ppm] = 12.09 (bs, 1H, NH), 7.90 (dd, ³J_{H7,H8} = 8.7 Hz, ⁴J_{H7,H5} = 1.9 Hz, 1H, H-7), 7.88 (d, ⁴J_{H5,H7} = 1.9 Hz, 1H, H-5), 7.57 (d, ³J_{H8,H7} = 8.7 Hz, 1H, H-8), 4.48 (t, ³J_{H2',H1'} = 6.3 Hz, 2H, H-2'), 3.72 (t, ³J_{H1',H2'} = 6.3 Hz, 2H, H-1').

¹³C-NMR (151 MHz, MeOD-*d*₄): δ [ppm] = 168.6 (C(O)OH), 157.8 (C-2), 155.5 (C-3), 131.4 (C-9), 128.1 (C-10), 126.9 (C-6), 126.4 (C-7), 118.7 (C-5), 116.3 (C-8), 49.2 (C-1'), 43.3 (C-2').

6.6.2.20 1-[2'-Azidoethyl]-*N*-benzyl-2,3-dioxo-4H-chinoxalin-6-carbonsäureamid [38]

Es wurden 26.8 mg (97.4 μmol , 1.0 eq.) **22** in 1.56 mL abs. DMF gelöst und mit Eiswasser auf 0 °C abgekühlt. Nun wurden 74.1 mg (195 μmol , 2.0 eq.) HATU, gelöst in 0.78 mL abs. DMF, hinzugegeben und die Lösung für fünf Minuten bei 0 °C gerührt. Anschließend wurden 15.9 μL (146.1 μmol , 1.5 eq.) Benzylamin (**25**) und 66.2 μL (390 μmol , 4.0 eq.) DIPEA hinzugefügt und die Lösung für weitere 90 Minuten in der Kälte gerührt. Nun wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand über eine kurze Säulenchromatographie an Kieselgel (DCM/MeOH, 12:1) gereinigt und anschließend aus Wasser umkristallisiert. Es wurden 29.3 mg (80.4 μmol , 83 %) eines weißen, kristallinen Feststoffes erhalten.

Charakterisierung:

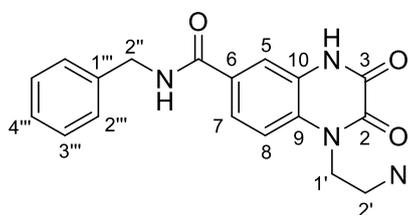
Weißer, kristalliner Feststoff.

R_f-Wert: 0.22 (DCM/MeOH, 12:1).

T_{Schmelzpunkt}: 166.5 °C

HR-ESI-MS: *m/z* = ber.: 365.1357 ([M+H]⁺),

gef.: 365.1351 ([M+H]⁺).



38

C₁₈H₁₆N₆O₃
M = 364.365 g/mol

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 12.19 (bs, 1H, NH), 9.10 (t, ³J_{NH,H2''} = 6.0 Hz, 1H, C(O)NHCH₂), 7.74-7.70 (m, 2H, H-5, H-7), 7.58 (d, ³J_{H8,H7} = 8.6 Hz, 1H, H-8), 7.35-7.30 (m, 5H, H-2''', H-3''', H-4'''), 7.26-7.22 (m, 1H, H-1'''), 4.48 (d, ³J_{H2'',NH} = 6.0 Hz, 2H, H-2''), 4.38 (t, ³J_{H1',H2'} = 6.1 Hz, 2H, H-1'), 3.66 (t, ³J_{H2',H1'} = 6.1 Hz, 2H, H-2').

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 165.1 (C(O)NHCH₂), 155.5 (C-2), 153.4 (C-3), 139.6 (C-1'''), 129.6 (C-6), 128.6 (C-9), 128.3 (C-3'''), 127.2 (C-2'''), 126.8 (C-4'''), 125.7 (C-10), 121.6 (C-7), 115.6 (C-5), 114.8 (C-8), 47.6 (C-2'), 42.6 (C-2''), 41.4 (C-1').

6.6.2.21 [(2'*R*)-2'-Hydroxy-2'-phenyl-ethyl] *N*-[2'''-[6^v-(benzylcarbamoyl)-2^v,3^v-dioxo-4*H*-chinoxalin-1^v-yl]ethyl]carbamate [(*R*)-17]

15.3 mg (42.0 μmol, 1.0 eq.) des Azides **38** wurden in 1.5 mL abs. DMF gelöst, auf 0 °C abgekühlt und vorsichtig mit 101 μL einer 1.0 M Trimethylphosphin-Lösung in Toluol (2.4 eq.) versetzt. Die Reaktionslösung wurde zunächst 20 Minuten in der Kälte und dann für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Durch Zugabe von 1.5 mL Wasser wurde die Reaktion gequentscht und die Lösung unter vermindertem Druck stark eingeeengt. Währenddessen wurden 8.27 mg (50.4 μmol, 1.2 eq.) (*S*)-**37** in 0.8 mL abs. DMF gelöst, mit 3.76 μL (25.2 μmol, 0.6 eq.) DBU versetzt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der zuvor erhaltene Rückstand vom Edukt **38** in 0.7 mL abs. DMF aufgenommen und zu der Reaktionslösung hinzugegeben. Die Lösung wurde für 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und dann das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (MeCN/H₂O, 12:1 + 0.1 % FA) vorgereinigt und abschließend mittels *RP*-HPLC (Methode: HPLC_2) gereinigt. Es wurden 5.2 mg (10.4 μmol, 25 %) eines weißen, feinen Feststoffes erhalten.

Charakterisierung:

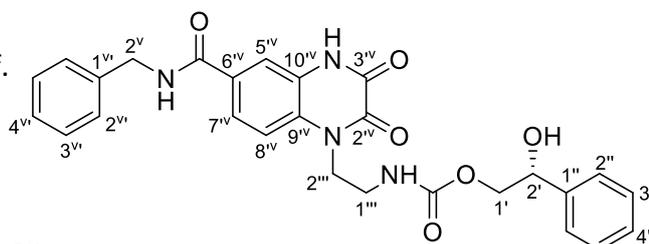
Weißer, amorpher Feststoff.

R_f-Wert: 0.60 (MeCN/H₂O, 12:1).

[α]_D²⁰ = -46.0 ° (c = 0.05, DMSO).

HR-ESI-MS: *m/z* = ber.: 525.1745 ([M+H]⁺),

gef.: 525.1713 ([M+Na]⁺).



(*R*)-17

C₂₇H₂₆N₄O₆

M = 502.527 g/mol

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 12.13 (bs, 1H, NH), 9.04 (t, ³J_{NH,H2v} = 5.9 Hz, 1H, C(O)NHCH₂), 7.71 (d, ⁴J_{H5^v,H7^v} = 1.6 Hz, 1H, H-5^v), 7.64 (dd, ³J_{H7^v,H8^v} = 8.6 Hz, ⁴J_{H7^v,H5^v} = 1.6 Hz, 1H, H-7^v), 7.45 (d, ³J_{H8^v,H7^v} = 8.6 Hz, 1H, H-8^v), 7.37-7.29 (m, 8H, H-2'', H-2^v, H-3'', H-3^v), 7.27-7.21 (m, 2H, H-4'', H-4^v), 6.68-6.62 (m, 1H, NH(CO)O), 5.52 (bs, 1H, OH), 4.73-4.67 (m, 1H, H-2'), 4.48 (d, ³J_{H2v,NH} = 5.9 Hz, 2H, H-2^v), 4.17 (t, ³J_{H1''',H2'''} = 6.7 Hz, 2H, H-1'''), 4.01 (dd, ³J_{H1'a,H2'} = 7.2 Hz, ²J_{H1'a,H1'b} = 11.2 Hz, 1H, H-1'a), 3.97 (dd, ³J_{H1'b,H2'} = 5.1 Hz, ²J_{H1'b,H1'a} = 11.2 Hz, 1H, H-1'b), 3.26 (t, ³J_{H2''',H1'''} = 6.1 Hz, 2H, H-2''').

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 165.4 (C(O)NHCH₂), 156.6 (NH(CO)O), 155.6 (C-2^v), 153.4 (C-3^v), 142.3 (C-1''), 139.8 (C-1^v), 129.5 (C-6^v), 128.7 (C-9^v), 128.2 (C-3^v), 128.0 (C-3''), 127.2 (C-4^v), 127.1 (C-2^v), 126.7 (C-4''), 126.3 (C-2''), 125.7 (C-10^v), 119.6 (C-7^v), 115.9 (C-5^v), 113.3 (C-8^v), 70.4 (C-2'), 68.5 (C-1'), 42.5 (C-2^v), 41.3 (C-1'''), 37.1 (C-2''').

6.6.2.22 [(2'S)-2'-Hydroxy-2'-phenyl-ethyl] N-[2'''-[6''-(benzylcarbamoyl)-2''',3'''-dioxo-4H-chinoxalin-1''-yl]ethyl]carbamate [(S)-17]

Nach der Vorschrift von (R)-17 wurden 18.8 mg (51.6 μmol , 1.0 eq.) **38** und 10.2 mg (61.9 μmol , 1.2 eq.) (R)-37 zu (S)-17 umgesetzt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (MeCN/H₂O, 12:1 + 0.1 % FA) vorgereinigt und abschließend mittels RP-HPLC (Methode: HPLC_2) gereinigt. Es wurden 3.0 mg (5.97 μmol , 12 %) eines weißen, feinen Feststoffes erhalten.

Charakterisierung:

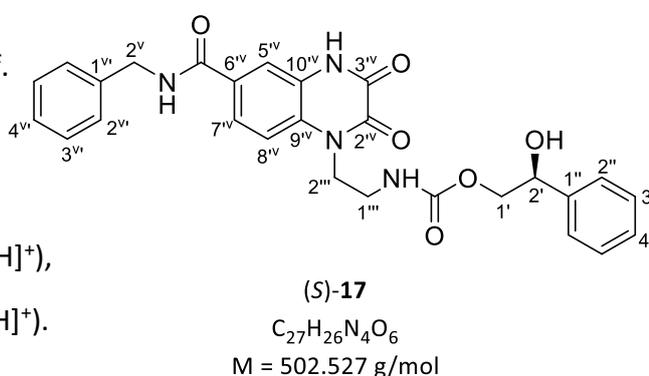
Weißer, amorpher Feststoff.

R_f-Wert: 0.60 (MeCN/H₂O, 12:1).

$[\alpha]_D^{20} = +45.5^\circ$ (c = 0.02, DMSO).

HR-ESI-MS: $m/z =$ ber.: 525.1745 ([M+H]⁺),

gef.: 525.1711 ([M+H]⁺).



¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 12.11 (bs, 1H, NH), 9.06 (t, ³J_{NH,H2v} = 5.9 Hz, 1H, C(O)NHCH₂), 7.70 (d, ⁴J_{H5''v,H7''v} = 1.6 Hz, 1H, H-5''), 7.63 (dd, ³J_{H7''v,H8''v} = 8.6 Hz, ⁴J_{H7''v,H5''v} = 1.6 Hz, 1H, H-7''), 7.44 (d, ³J_{H8''v,H7''v} = 8.7 Hz, 1H, H-8''), 7.37-7.29 (m, 8H, H-2'', H-2''', H-3'', H-3'''), 7.27-7.21 (m, 2H, H-4'', H-4'''), 6.68-6.62 (m, 1H, NH(CO)O), 5.55 (bs, 1H, OH), 4.73-4.67 (m, 1H, H-2'), 4.47 (d, ³J_{H2v,NH} = 5.9 Hz, 2H, H-2'), 4.17 (t, ³J_{H1''',H2''''} = 6.7 Hz, 2H, H-1'''), 4.01 (dd, ³J_{H1'a,H2'} = 7.3 Hz, ²J_{H1'a,H1'b} = 11.2 Hz, 1H, H-1'a), 3.97 (dd, ³J_{H1'b,H2'} = 5.2 Hz, ²J_{H1'b,H1'a} = 11.2 Hz, 1H, H-1'b), 3.26 (t, ³J_{H2''',H1''''} = 6.1 Hz, 2H, H-2''').

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 165.5 (C(O)NHCH₂), 156.6 (NH(CO)O), 155.6 (C-2''), 153.6 (C-3''), 142.5 (C-1''), 139.8 (C-1'''), 129.6 (C-6''), 128.8 (C-9''), 128.3 (C-3'''), 128.1 (C-3'''), 127.3 (C-4''), 127.2 (C-2'''), 126.8 (C-4'''), 126.4 (C-2''), 125.8 (C-10''), 119.7 (C-7''), 116.1 (C-5''), 113.5 (C-8''), 70.5 (C-2'), 68.5 (C-1'), 42.6 (C-2'), 41.4 (C-1'''), 37.2 (C-2''').

7 Toxikologische Daten

In der folgenden Tabelle 16 sind die Gefahrenpiktogramme, sowie die dazugehörigen H- und P-Sätze der verwendeten Chemikalien aufgeführt.^[138]

Tabelle 16: Toxikologische Daten der verwendeten Substanzen.^[138]

Substanz	Piktogramme	H-Sätze	P-Sätze
2-Aminoethanol		302-312-314- 332-335-412	261-273-301+312+330- 303+361+353- 304+340+310- 305+351+338
Aceton, Aceton- <i>d</i> ₆		225-319-336 EUH066	210-240-305+351+338- 403+233
Acetonitril		225-302-319	210-280-301+312- 303+361+353- 304+340+312- 305+351+338
Ameisensäure		226-302-331- 314 EUH071	210-280-303+361+353- 304+340+310- 305+351+338
Ammoniumchlorid		302-319	305+351+338
Benzylamin		302-312-314	280-301+330+331- 303+361+353- 305+351+338-310
BisTris- <i>d</i> ₁₉		315, 319, 335	261, 305+351+338

7 Toxikologische Daten

Substanz	Piktogramme	H-Sätze	P-Sätze
Chloroform, CDCl_3	 	302-331-315- 319-351-361d- 336-372-412	201-273-301+312+330- 302+352-304+340+- 308+313
4-Chlor-3-nitrobenzoesäure		315-319-335	261-280-302+352- 305+351+338
DBU	 	290-301-314- 412	273-280-301+310+330- 301+330+331- 303+361+353- 305+351+338
Dichlormethan	 	315-319-336- 351	201-302+352- 305+351+338-308+313
Diethylether	 	224-303-336 EUH019-EUH066	210-233-240-241- 301+312-403+233
Dimethylformamid, DMF- d_7	  	226-312+332- 319-360D	201-210-302+352- 305+351+338-308+313
Dimethylsulfoxid, DMSO- d_6		Kein gefährlicher Stoff nach GHS.	
DIPEA	  	225-302-318- 331-335	210-261-280- 305+351+338-311
EDC	 	302-315-317- 319-410	280-301+330+331- 302+352-312-333+313- 337+313
Essigsäure (konz.)	 	226-314	210-280-301+330+331- 303+361+353- 305+351+338
Ethanol	 	225-319	210-240-305+351+338- 403+233

7 Toxikologische Daten

Substanz	Piktogramme	H-Sätze	P-Sätze
Ethanolamin-HCl		302-315-319-335	261-280-301+312-302+352-305+351+338
Ethylacetat	 	225-319-336 EUH066	210-233-240-305+351+338-403+235
Ethylxalylchlorid	 	226-302-314 EUH014	210-280-301+330+331-302+352-305+351+338-310
HATU	 	228-315-319-335	210-241-264-280-332+313-337+313
Kaliumcarbonat		315-319-335	261-264-271-280-302+352-305+351+338
Kohlendioxid		280	403
Kupfer(II)-sulfat Pentahydrat	 	302-315-319-410	264-273-280-301+312-302+352-305+351+338-321-330-332+313-337+313-361-391-501
Lithiumacetylid-Ethylendiamin	 	260-302-314 EUH014	231+232-280-301+330+331-303+361+353-305+351+338-310-335+334
Methanol, MeOH- <i>d</i> ₄	 	225-301+311+331-370	210-233-280-301+310-303+361+353-304+340+311
Methansulfonylchlorid	 	290-301-311-314-317-330-335	280-310-305+351+338-304+340-301+330+331-303+361+353
Natriumascorbat		Kein gefährlicher Stoff nach GHS.	

7 Toxikologische Daten

Substanz	Piktogramme	H-Sätze	P-Sätze
Natriumazid		300+310+330- 373-410 EUH032	282-273-280- 301+310+330- 302+352+310- 304+340+310
Natriumhydroxid		290-314	280-301+330+331- 305+351+338-308+310
Natriumiodid		400	273
N-Hydroxysuccinimid (NHS)		315-319-335	261-280-302+352- 305+351+338
Palladium auf Aktivkohle (10 %, Pd/C)		228	233
Petrolether		225-304-315- 336-361f-373- 411	201-210-301+310-331- 370+378-501
Pyridiniumtoluol-4- sulfonat		315-319-335	280-302+352-304+340- 312-332+313-337+313
Salzsäure, 37 %		290-314-335	280-303+361+353- 305+351+338+310
(R)-(+)-Styroloxid, (S)-(-)-Styroloxid		312-315-317- 319-331-340- 350	201-280-302+352- 304+340-305+351+338- 311
<i>tert</i> - Butyldimethylsilylchlorid		228-314-411	210-280-301+330+331- 303+361+353- 305+351+338-310
Tetrabutylammoniumiodid		302	301+312+330

7 Toxikologische Daten

Substanz	Piktogramme	H-Sätze	P-Sätze
Tetrahydrofuran	  	225-302-319- 335-336-351 EUH019	210-280-301+312+330- 305+351+338-370+378- 403+235
Thionylchlorid	 	302-314-331- 335 EUH014-EUH029	280-301+330+331- 304+340-305+351+338- 308+310
Toluol	  	225-304-315- 336-361d-373	210-240-301+310+330- 302+352-314-403+233
Triethylamin	  	225-302- 311+331-314- 335	210-280-301+330+331- 303+361+353- 304+340+311- 305+351+338+310
Trimethylphosphin-Lösung in Toluol (1.0 M)	 	225-250-252- 314	235+410-280- 301+330+331- 305+351+338-310
Triphenylphosphan		315-319-335	261-264-280-302+352- 304+340-305+351+338- 312-321-332+313- 337+313-362-403+233- 405
Wasserstoff	 	220-280	210-377-381-403

8 Literaturverzeichnis

1. T.K. Lindhorst, *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. 3. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim, **2007**.
2. T.K. Lindhorst, Struktur und Funktion von Kohlenhydraten, *Chemie in unserer Zeit* **2000**, *34*, (1), 38-52.
3. J.M. Berg, L.J. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*. 5. Aufl., W. H. Freeman, New York, **2002**.
4. A. Varki, Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct, *Glycobiology* **1993**, *3*, (2), 97-130.
5. R.A. Dwek, Glycobiology: Toward Understanding the Function of Sugars, *Chemical Reviews* **1996**, *96*, (2), 683-720.
6. C. Breton, L. Šnajdrová, C. Jeanneau, J. Koča, A. Imberty, Structures and mechanisms of glycosyltransferases, *Glycobiology* **2005**, *16*, (2), 29R-37R.
7. T. Feizi, Cell-cell adhesion and membrane glycosylation, *Current Opinion in Structural Biology* **1991**, *1*, (5), 766-770.
8. R. Apweiler, H. Hermjakob, N. Sharon, On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1999**, *1473*, (1), 4-8.
9. J.C. Paulson, K.J. Colley, Glycosyltransferases: Structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation, *Journal of Biological Chemistry* **1989**, *264*, (30), 17615-17618.
10. L.L. Lairson, B. Henrissat, G.J. Davies, S.G. Withers, Glycosyltransferases: Structures, Functions, and Mechanisms, *Annual Review of Biochemistry* **2008**, *77*, (1), 521-555.
11. L. Tu, D.K. Banfield, Localization of Golgi-resident glycosyltransferases, *Cellular and Molecular Life Sciences* **2010**, *67*, (1), 29-41.
12. S.F. Hansen, E. Bettler, Å. Rinnan, S.B. Engelsen, C. Breton, Exploring genomes for glycosyltransferases, *Molecular BioSystems* **2010**, *6*, (10), 1773-1781.
13. H. Gohlke, G. Klebe, Ansätze zur Beschreibung und Vorhersage der Bindungsaffinität niedermolekularer Liganden an makromolekulare Rezeptoren, *Angewandte Chemie* **2002**, *114*, (15), 2764-2798.
14. CAZy Datenbank, Webseite: <http://www.cazy.org/>, zuletzt aufgerufen am **22.02.2023**.
15. P.M. Coutinho, E. Deleury, G.J. Davies, B. Henrissat, An Evolving Hierarchical Family Classification for Glycosyltransferases, *Journal of Molecular Biology* **2003**, *328*, (2), 307-317.
16. S.J. Charnock, G.J. Davies, Structure of the Nucleotide-Diphospho-Sugar Transferase, SpsA from *Bacillus subtilis*, in Native and Nucleotide-Complexed Forms, *Biochemistry* **1999**, *38*, (20), 6380-6385.

17. C. Breton, A. Imberty, Structure/function studies of glycosyltransferases, *Current Opinion in Structural Biology* **1999**, *9*, (5), 563-571.
18. N. Tarbouriech, S.J. Charnock, G.J. Davies, Three-dimensional structures of the Mn and Mg dTDP complexes of the family GT-2 glycosyltransferase SpsA: a comparison with related NDP-sugar glycosyltransferases, *Journal of Molecular Biology* **2001**, *314*, (4), 655-661.
19. S. Wang, J.A. Cuesta-Seijo, D. Lafont, M.M. Palcic, S. Vidal, Design of Glycosyltransferase Inhibitors: Pyridine as a Pyrophosphate Surrogate, *Chemistry – A European Journal* **2013**, *19*, (45), 15346-15357.
20. J.E. Pak, P. Arnoux, S. Zhou, P. Sivarajah, M. Satkunarajah, X. Xing, J.M. Rini, X-ray Crystal Structure of Leukocyte Type Core 2 β -1,6-*N*-Acetylglucosaminyltransferase, *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281*, (36), 26693-26701.
21. C.D. King, G.R. Rios, M.D. Green, T.R. Tephly, UDP-glucuronosyltransferases, *Current Drugs Metabolism* **2000**, *1*, (2), 143-161.
22. A. Vrielink, W. Rüger, H.P. Driessen, P.S. Freemont, Crystal structure of the DNA modifying enzyme β -glucosyltransferase in the presence and absence of the substrate uridine diphosphoglucose, *The EMBO Journal* **1994**, *13*, (15), 3413-3422.
23. J. Liu, A. Mushegian, Three monophyletic superfamilies account for the majority of the known glycosyltransferases, *Protein Science* **2003**, *12*, (7), 1418-1431.
24. A. Varki, Diversity in the sialic acids, *Glycobiology* **1992**, *2*, (1), 25-40.
25. A. Varki, Multiple changes in sialic acid biology during human evolution, *Glycoconjugate Journal* **2009**, *26*, (3), 231-245.
26. K. Ley, The role of selectins in inflammation and disease, *Trends in Molecular Medicine* **2003**, *9*, (6), 263-268.
27. U. Neu, J. Bauer, T. Stehle, Viruses and sialic acids: rules of engagement, *Current Opinion in Structural Biology* **2011**, *21*, (5), 610-618.
28. F. Dall'Olio, M. Chiricolo, Sialyltransferases in cancer, *Glycoconjugate Journal* **2001**, *18*, (11), 841-850.
29. K.J. Colley, E.U. Lee, B. Adler, J.K. Browne, J.C. Paulson, Conversion of a Golgi apparatus sialyltransferase to a secretory protein by replacement of the NH₂-terminal signal anchor with a signal peptide, *Journal of Biological Chemistry* **1989**, *264*, (30), 17619-17622.
30. A. Harduin-Lepers, M.A. Recchi, P. Delannoy, 1994, the year of sialyltransferases, *Glycobiology* **1995**, *5*, (8), 741-758.
31. A. Harduin-Lepers, V. Vallejo-Ruiz, M.A. Krzewinski-Recchi, B. Samyn-Petit, S. Julien, P. Delannoy, The human sialyltransferase family, *Biochimie* **2001**, *83*, (8), 727-737.
32. B.A. Horenstein, M. Bruner, Acid-Catalyzed Solvolysis of CMP-*N*-Acetyl Neuraminate: Evidence for a Sialyl Cation with a Finite Lifetime, *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118*, (43), 10371-10379.
33. F. Amann, C. Schaub, B. Müller, R.R. Schmidt, New Potent Sialyltransferase Inhibitors - Synthesis of Donor and of Transition-State Analogues of Sialyl Donor CMP-Neu5Ac, *Chemistry European Journal* **1998**, *4*, (6), 1106-1115.

34. C.P.C. Chiu, L.L. Lairson, M. Gilbert, W.W. Wakarchuk, S.G. Withers, N.C.J. Strynadka, Structural Analysis of the α -2,3-Sialyltransferase Cst-I from *Campylobacter jejuni* in Apo and Substrate-Analogue Bound Forms, *Biochemistry* **2007**, *46*, (24), 7196-7204.
35. L. Ni, H.A. Chokhawala, H. Cao, R. Henning, L. Ng, S. Huang, H. Yu, X. Chen, A.J. Fisher, Crystal Structures of *Pasteurella multocida* Sialyltransferase Complexes with Acceptor and Donor Analogues Reveal Substrate Binding Sites and Catalytic Mechanism, *Biochemistry* **2007**, *46*, (21), 6288-6298.
36. P.H.W. Chan, L.L. Lairson, H.J. Lee, W.W. Wakarchuk, N.C.J. Strynadka, S.G. Withers, L.P. McIntosh, NMR Spectroscopic Characterization of the Sialyltransferase CstII from *Campylobacter jejuni*: Histidine 188 Is the General Base, *Biochemistry* **2009**, *48*, (47), 11220-11230.
37. F.V. Rao, J.R. Rich, B. Rakić, S. Buddai, M.F. Schwartz, K. Johnson, C. Bowe, W.W. Wakarchuk, S. DeFrees, S.G. Withers, N.C.J. Strynadka, Structural insight into mammalian sialyltransferases, *Nature Structural & Molecular Biology* **2009**, *16*, (11), 1186-1188.
38. L.Y.C. Lin, B. Rakic, C.P.C. Chiu, E. Lameignere, W.W. Wakarchuk, S.G. Withers, N.C.J. Strynadka, Structure and Mechanism of the Lipooligosaccharide Sialyltransferase from *Neisseria meningitidis*, *Journal of Biological Chemistry* **2011**, *286*, (43), 37237-37248.
39. T. Feizi, Carbohydrate-mediated recognition systems in innate immunity, *Immunological Reviews* **2000**, *173*, 79-88.
40. P.R. Crocker, A. Varki, Siglecs, sialic acids and innate immunity, *Trends in Immunology* **2001**, *22*, (6), 337-342.
41. F. Dall'Olio, M. Chiricolo, A. D'Errico, E. Gruppioni, A. Altimari, M. Fiorentino, W.F. Grigioni, Expression of β -galactoside α -2,6 sialyltransferase and of α -2,6-sialylated glycoconjugates in normal human liver, hepatocarcinoma, and cirrhosis, *Glycobiology* **2004**, *14*, (1), 39-49.
42. P.H. Wang, W.L. Lee, C.M. Juang, Y.H. Yang, W.H. Lo, C.R. Lai, S.L. Hsieh, C.C. Yuan, Altered mRNA expressions of sialyltransferases in ovarian cancers, *Gynecologic Oncology* **2005**, *99*, (3), 631-639.
43. D. López-Morales, N. Velázquez-Márquez, O. Valenzuela, G. Santos-López, J. Reyes-Leyva, V. Vallejo-Ruiz, Enhanced sialyltransferases transcription in cervical intraepithelial neoplasia, *Investigacion Clinica* **2009**, *50*, (1), 45-53.
44. G. Picco, S. Julien, I. Brockhausen, R. Beatson, A. Antonopoulos, S. Haslam, U. Mandel, A. Dell, S. Pinder, J. Taylor-Papadimitriou, J. Burchell, Over-expression of ST3Gal-I promotes mammary tumorigenesis, *Glycobiology* **2010**, *20*, (10), 1241-1250.
45. A. Cebi, H. Mert, N. Mert, Evaluation of some tumor markers, acute phase proteins, sialic acid and lipid bound sialic acid before and after chemotherapy in stomach cancer, *Medical Science and Discovery* **2016**, *3*, 22-27.
46. B.N. Vajaria, K.A. Patel, P.S. Patel, Role of aberrant glycosylation enzymes in oral cancer progression, *Journal of Carcinogenesis* **2018**, *17*, 1-5.
47. F. Dall'Olio, The sialyl- α 2,6-lactosaminyl-structure: Biosynthesis and functional role, *Glycoconjugate Journal* **2000**, *17*, (10), 669-676.
48. J. Lu, T. Isaji, S. Im, T. Fukuda, N. Hashii, D. Takakura, N. Kawasaki, J. Gu, β -Galactoside α -2,6-Sialyltransferase 1 Promotes Transforming Growth Factor- β -mediated Epithelial-

- Mesenchymal Transition, *Journal of Biological Chemistry* **2014**, *289*, (50), 34627-34641.
49. A. Wei, B. Fan, Y. Zhao, H. Zhang, L. Wang, X. Yu, Q. Yuan, D. Yang, S. Wang, ST6Gal-I overexpression facilitates prostate cancer progression via the PI3K/Akt/GSK-3 β / β -catenin signaling pathway, *Oncotarget* **2016**, *7*, (40), 65374-65388.
50. C.C. Hsieh, Y.M. Shyr, W.Y. Liao, T.H. Chen, S.E. Wang, P.C. Lu, P.Y. Lin, Y.B. Chen, W.Y. Mao, H.Y. Han, M. Hsiao, W.B. Yang, W.S. Li, Y.P. Sher, C.N. Shen, Elevation of β -galactoside α 2,6-sialyltransferase 1 in a fructoseresponsive manner promotes pancreatic cancer metastasis, *Oncotarget* **2017**, *8*, (5), 7691-7709.
51. B. Wichert, K. Milde-Langosch, V. Galatenko, B. Schmalfeldt, L. Oliveira-Ferrer, Prognostic role of the sialyltransferase ST6GAL-I in ovarian cancer, *Glycobiology* **2018**, *28*, (11), 898-903.
52. P.F. Rohfritsch, J.A.F. Joosten, M.A. Krzewinski-Recchi, A. Harduin-Lepers, B. Laporte, S. Juliant, M. Cerutti, P. Delannoy, J.F.G. Vliegenthart, J.P. Kamerling, Probing the substrate specificity of four different sialyltransferases using synthetic β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow 2)- α -D-Manp-(1 \rightarrow O) (CH₂)₇CH₃ analogues: General activating effect of replacing *N*-acetylglucosamine by *N*-propionylglucosamine, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2006**, *1760*, (4), 685-692.
53. M. Audry, C. Jeanneau, A. Imberty, A. Harduin-Lepers, P. Delannoy, C. Breton, Current trends in the structure–activity relationships of sialyltransferases, *Glycobiology* **2010**, *21*, (6), 716-726.
54. S. Takashima, S. Tsuji, M. Tsujimoto, Characterization of the Second Type of Human β -Galactoside α -2,6-Sialyltransferase (ST6Gal-II), Which Sialylates Gal- β -1,4GlcNAc Structures on Oligosaccharides Preferentially, *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, (48), 45719-45728.
55. C. Breton, S. Fournel-Gigleux, M.M. Palcic, Recent structures, evolution and mechanisms of glycosyltransferases, *Current Opinion in Structural Biology* **2012**, *22*, (5), 540-549.
56. L. Meng, F. Forouhar, D. Thieker, Z. Gao, A. Ramiah, H. Moniz, Y. Xiang, J. Seetharaman, S. Milaninia, M. Su, R. Bridger, L. Veillon, P. Azadi, G. Kornhaber, L. Wells, G.T. Montelione, R.J. Woods, L. Tong, K.W. Moremen, Enzymatic Basis for *N*-Glycan Sialylation, *Journal of Biological Chemistry* **2013**, *288*, (48), 34680-34698.
57. B. Kuhn, J. Benz, M. Greif, A.M. Engel, H. Sobek, M.G. Rudolph, The structure of human α -2,6-sialyltransferase reveals the binding mode of complex glycans, *Acta Crystallographica - Biological Crystallography* **2013**, *69*, (9), 1826-1838.
58. A.K. Datta, J.C. Paulson, The Sialyltransferase “Sialylmotif” Participates in Binding the Donor Substrate CMP-NeuAc, *Journal of Biological Chemistry* **1995**, *270*, (4), 1497-1500.
59. A.K. Datta, A. Sinha, J.C. Paulson, Mutation of the Sialyltransferase S-sialylmotif Alters the Kinetics of the Donor and Acceptor Substrates, *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273*, (16), 9608-9614.
60. C. Jeanneau, V. Chazalet, C. Augé, D.M. Soumpasis, A. Harduin-Lepers, P. Delannoy, A. Imberty, C. Breton, Structure-Function Analysis of the Human Sialyltransferase ST3Gal_I, *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, (14), 13461-13468.

61. A.K. Datta, R. Chammas, J.C. Paulson, Conserved Cysteines in the Sialyltransferase Sialylmotifs Form an Essential Disulfide Bond, *Journal of Biological Chemistry* **2001**, 276, (18), 15200-15207.
62. A.K. Datta, Comparative sequence analysis in the sialyltransferase protein family: analysis of motifs, *Current Drugs Targets* **2009**, 10, (6), 483-498.
63. P. Legaigneur, C. Breton, A. El Battari, J.C. Guillemot, C. Augé, M. Malissard, E.G. Berger, C. Ronin, Exploring the Acceptor Substrate Recognition of the Human β -Galactoside α -2,6-Sialyltransferase, *Journal of Biological Chemistry* **2001**, 276, (24), 21608-21617.
64. J. Weinstein, E.U. Lee, K. McEntee, P.H. Lai, J.C. Paulson, Primary structure of β -galactoside α -2,6-sialyltransferase, *Journal of Biological Chemistry* **1987**, 262, (36), 17735-17743.
65. U. Grundmann, C. Nerlich, T. Rein, G. Zettlmeissl, Complete cDNA sequence encoding human β -galactoside α -2, 6-sialyltransferase, *Nucleic Acids Research* **1990**, 18, (3), 667-667.
66. N.B. Drinnan, J. Halliday, T. Ramsdale, Inhibitors of Sialyltransferases: Potential Roles in Tumor Growth and Metastasis, *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* **2003**, 3, (6), 501-517.
67. K.H. Jung, R. Schwörer, R.R. Schmidt, Sialyltransferase Inhibitors, *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* **2003**, 15, (85), 275-289.
68. X. Wang, L.H. Zhang, X.S. Ye, Recent development in the design of sialyltransferase inhibitors, *Medicinal Research Reviews* **2003**, 23, (1), 32-47.
69. L. Wang, Y. Liu, L. Wu, X.L. Sun, Sialyltransferase inhibition and recent advances, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **2016**, 1864, (1), 143-153.
70. Y. Kajihara, H. Kodama, T. Wakabayashi, K.I. Sato, H. Hashimoto, Characterization of inhibitory activities and binding mode of synthetic 6'-modified methyl *N*-acetyl- β -lactosaminide toward rat liver CMP-D-Neu5Ac: D-galactoside-(2 \rightarrow 6)- α -D-sialyltransferase, *Carbohydrate Research* **1993**, 247, 179-193.
71. J.A.L.M. Van Dorst, J.M. Tikkanen, C.H. Krezdorn, M.B. Streiff, E.G. Berger, J.A. Van Kuik, J.P. Kamerling, J.F.G. Vliegenthart, Exploring the Substrate Specificities of α -2,6-and α -2,3-Sialyltransferases using Synthetic Acceptor Analogues, *European Journal of Biochemistry* **1996**, 242, (3), 674-681.
72. Y. Kajihara, H. Hashimoto, H. Kodama, T. Wakabayashi, K.I. Sato, Synthesis of Methyl 6'-Deoxy- and 6'-Thiolactosaminides and Their Inhibitory Activity Toward CMP-NeuNAc:D-galactoside-(2 \rightarrow 6)- α -D-sialyltransferase, *Journal of Carbohydrate Chemistry* **1993**, 12, (7), 991-995.
73. K.B. Wlasichuk, M.A. Kashem, P.V. Nikrad, P. Bird, C. Jiang, A.P. Venot, Determination of the specificities of rat liver Gal(β -1-4)GlcNAc α -2,6-sialyltransferase and Gal(β -1-3/4)GlcNAc α -2,3-sialyltransferase using synthetic modified acceptors, *Journal of Biological Chemistry* **1993**, 268, (19), 13971-13977.
74. M.C. Galan, A.P. Venot, G.J. Boons, Glycosyltransferase Activity Can Be Modulated by Small Conformational Changes of Acceptor Substrates, *Biochemistry* **2003**, 42, (28), 8522-8529.

75. F.M. Perron-Sierra, M. Burbridge, C. Péan, G.C. Tucker, P. Casara, Synthesis of a novel dioxan sialic acid analog, *Tetrahedron Letters* **2004**, *45*, (21), 4163-4166.
76. W.D. Klohs, R.J. Bernacki, W. Korytnyk, Effects of Nucleotides and Nucleotide:Analogues on Human Serum Sialyltransferase1, *Cancer Research* **1979**, *39*, (4), 1231-1238.
77. M. Imamura, H. Hashimoto, Synthesis of novel CMP-NeuNAc analogues having a glycosyl phosphonate structure, *Tetrahedron Letters* **1996**, *37*, (9), 1451-1454.
78. B. Müller, T.J. Martin, C. Schaub, R.R. Schmidt, Synthesis of phosphonate analogues of CMP-Neu5Ac determination of $\alpha(2-6)$ -sialyltransferase inhibition, *Tetrahedron Letters* **1998**, *39*, (7), 509-512.
79. R.G. Kleineidam, T. Schmelter, R.T. Schwarz, R. Schauer, Studies on the inhibition of sialyl- and galactosyltransferases, *Glycoconjugate Journal* **1997**, *14*, (1), 57-66.
80. G. Dufner, R. Schwörer, B. Müller, R.R. Schmidt, Base- and Sugar-Modified Cytidine Monophosphate *N*-Acetylneuraminic Acid (CMP-Neu5Ac) Analogues - Synthesis and Studies with $\alpha(2-6)$ -Sialyltransferase from Rat Liver, *European Journal of Organic Chemistry* **2000**, *2000*, (8), 1467-1482.
81. M.D. Burkart, S.P. Vincent, C.H. Wong, An efficient synthesis of CMP-3-fluoroneuraminic acid, *Chemical Communications* **1999**, (16), 1525-1526.
82. B. Müller, C. Schaub, R.R. Schmidt, Efficient Sialyltransferase Inhibitors Based on Transition-State Analogues of the Sialyl Donor, *Angewandte Chemie International Edition* **1998**, *37*, (20), 2893-2897.
83. D. Skropeta, R. Schwörer, R.R. Schmidt, Stereoselective synthesis of phosphoramidate $\alpha(2-6)$ Sialyltransferase transition-State analogue inhibitors, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2003**, *13*, (19), 3351-3354.
84. C. Schaub, B. Muller, R.R. Schmidt, New sialyltransferase inhibitors based on CMP-quinic acid: development of a new sialyltransferase assay, *Glycoconjugate Journal* **1998**, *15*, (4), 345-354.
85. R. Schwörer, R.R. Schmidt, Efficient Sialyltransferase Inhibitors Based on Glycosides of *N*-Acetylglucosamine, *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, (8), 1632-1637.
86. B. Mathew, R.R. Schmidt, Potential sialyltransferase inhibitors based on neuraminyl substitution by hetaryl rings, *Carbohydrate Research* **2007**, *342*, (3), 558-566.
87. D. Skropeta, R. Schwörer, T. Haag, R.R. Schmidt, Asymmetric synthesis and affinity of potent sialyltransferase inhibitors based on transition-state analogues, *Glycoconjugate Journal* **2004**, *21*, (5), 205-219.
88. W. Li, Y. Niu, D.C. Xiong, X. Cao, X.S. Ye, Highly Substituted Cyclopentane-CMP Conjugates as Potent Sialyltransferase Inhibitors, *Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, *58*, (20), 7972-7990.
89. C.S. Rye, J.B. Baell, Phosphate isosteres in medicinal chemistry, *Current Medicinal Chemistry* **2005**, *12*, (26), 3127-3141.
90. R. Kumar, R. Nasi, M. Bhasin, N. Huan Khieu, M. Hsieh, M. Gilbert, H. Jarrell, W. Zou, H.J. Jennings, Sialyltransferase inhibitors: consideration of molecular shape and charge/hydrophobic interactions, *Carbohydrate Research* **2013**, *378*, 45-55.

91. C.Y. Wu, C.C. Hsu, S.T. Chen, Y.C. Tsai, Soyasaponin I, a Potent and Specific Sialyltransferase Inhibitor, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2001**, *284*, (2), 466-469.
92. K.H. Chang, L. Lee, J. Chen, W.S. Li, Lithocholic acid analogues, new and potent α -2,3-sialyltransferase inhibitors, *Chemical Communications* **2006**, (6), 629-631.
93. K.I.P.J. Hidari, K.I. Oyama, G. Ito, M. Nakayama, M. Inai, S. Goto, Y. Kanai, K.I. Watanabe, K. Yoshida, T. Furuta, T. Kan, T. Suzuki, Identification and characterization of flavonoids as sialyltransferase inhibitors, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2009**, *382*, (3), 609-613.
94. C.C. Hsu, T.W. Lin, W.W. Chang, C.Y. Wu, W.H. Lo, P.H. Wang, Y.C. Tsai, Soyasaponin-I-modified invasive behavior of cancer by changing cell surface sialic acids, *Gynecologic Oncology* **2005**, *96*, (2), 415-422.
95. C.H. Chiang, C.H. Wang, H.C. Chang, S.V. More, W.S. Li, W.C. Hung, A novel sialyltransferase inhibitor AL10 suppresses invasion and metastasis of lung cancer cells by inhibiting integrin-mediated signaling, *Journal of Cellular Physiology* **2010**, *223*, (2), 492-499.
96. C.W. Fu, K.H. Chang, Y.C. Jen, T.T. Chang, W.S. Li, Synthesis of Amino Acid-comprising Sialyltransferase Inhibitors and Their Antimetastatic Activities against Human Breast Cancer Cells, *Journal of the Chinese Chemical Society* **2016**, *63*, (2), 171-180.
97. G. Schneider, U. Fechner, Computer-based *de novo* design of drug-like molecules, *Nature Reviews Drug Discovery* **2005**, *4*, (8), 649-663.
98. S. Fox, S. Farr-Jones, M.A. Yund, High Throughput Screening for Drug Discovery: Continually Transitioning into New Technology, *Journal of Biomolecular Screening* **1999**, *4*, (4), 183-186.
99. M.M. Hann, A.R. Leach, G. Harper, Molecular Complexity and Its Impact on the Probability of Finding Leads for Drug Discovery, *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* **2001**, *41*, (3), 856-864.
100. I.D. Kuntz, Structure-Based Strategies for Drug Design and Discovery, *Science* **1992**, *257*, (5073), 1078-1082.
101. U. Holzgrabe, Development of antibiotics today and yesterday, *Chemotherapie Journal* **2004**, *13*, 142-147.
102. RCSB Protein Data Bank (RCSB PDB), Webseite: <https://www.rcsb.org/>, zuletzt aufgerufen am **02.02.2023**.
103. H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne, The Protein Data Bank, *Nucleic Acids Research* **2000**, *28*, (1), 235-242.
104. D. Hanahan, R.A. Weinberg, The Hallmarks of Cancer, *Cell* **2000**, *100*, (1), 57-70.
105. D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of Cancer: The Next Generation, *Cell* **2011**, *144*, (5), 646-674.
106. T. Meyer, I.R. Hart, Mechanisms of tumour metastasis, *European Journal of Cancer* **1998**, *34*, (2), 214-221.
107. A. Cazet, S. Julien, M. Bobowski, M.A. Krzewinski-Recchi, A. Harduin-Lepers, S. Groux-Degroote, P. Delannoy, Consequences of the expression of sialylated antigens in breast cancer, *Carbohydrate Research* **2010**, *345*, (10), 1377-1383.

108. zinc Datenbank, Webseite: <https://zinc.docking.org/>, zuletzt aufgerufen am **02.08.2020**.
109. J.J. Irwin, T. Sterling, M.M. Mysinger, E.S. Bolstad, R.G. Coleman, ZINC: A Free Tool to Discover Chemistry for Biology, *Journal of Chemical Information and Modeling* **2012**, *52*, (7), 1757-1768.
110. A. Montgomery, R. Szabo, D. Skropeta, H. Yu, Computational characterisation of the interactions between human ST6Gal-I and transition-state analogue inhibitors: insights for inhibitor design, *Journal of Molecular Recognition* **2016**, *29*, (5), 210-222.
111. I.D. Kuntz, K. Chen, K.A. Sharp, P.A. Kollman, The maximal affinity of ligands, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1999**, *96*, (18), 9997-10002.
112. H.C. Kolb, M.G. Finn, K.B. Sharpless, Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions, *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40*, (11), 2004-2021.
113. T.D. Nelson, R.D. Crouch, Selective Deprotection of Silyl Ethers, *Synthesis* **1996**, (9), 1031-1069.
114. H. Finkelstein, Darstellung organischer Jodide aus den entsprechenden Bromiden und Chloriden, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1910**, *43*, (2), 1528-1532.
115. V. Sandgren, T. Agback, P.O. Johansson, J. Lindberg, I. Kvarnström, B. Samuelsson, O. Belda, A. Dahlgren, Highly potent macrocyclic BACE-1 inhibitors incorporating a hydroxyethylamine core: Design, synthesis and X-ray crystal structures of enzyme inhibitor complexes, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2012**, *20*, (14), 4377-4389.
116. F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V.V. Rostovtsev, L. Noodleman, K.B. Sharpless, V.V. Fokin, Copper(I)-Catalyzed Synthesis of Azoles. DFT Study Predicts Unprecedented Reactivity and Intermediates, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, (1), 210-216.
117. H. Staudinger, J. Meyer, Über neue organische Phosphorverbindungen III. Phosphinmethylenderivate und Phosphinimine, *Helvetica Chimica Acta* **1919**, *2*, (1), 635-646.
118. Y.G. Gololobov, I.N. Zhmurova, L.F. Kasukhin, Sixty years of staudinger reaction, *Tetrahedron* **1981**, *37*, (3), 437-472.
119. Y.G. Gololobov, L.F. Kasukhin, Recent advances in the staudinger reaction, *Tetrahedron* **1992**, *48*, (8), 1353-1406.
120. A.K. Ghosh, A. Sarkar, M. Brindisi, The Curtius rearrangement: mechanistic insight and recent applications in natural product syntheses, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2018**, *16*, (12), 2006-2027.
121. V.M. Lombardo, E.A. Dhulst, E.K. Leitsch, N. Wilmot, W.H. Heath, A.P. Gies, M.D. Miller, J.M. Torkelson, K.A. Scheidt, Cooperative Catalysis of Cyclic Carbonate Ring Opening: Application Towards Non-Isocyanate Polyurethane Materials, *European Journal of Organic Chemistry* **2015**, *2015*, (13), 2791-2795.
122. R.B.M. Schasfoort, A.J. Tudos, *Handbook of Surface Plasmon Resonance*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2008**.
123. M.J.E. Fischer, N.J. de Mol, *Surface Plasmon Resonance - Methods and Protocols*. Humana Press, New York, **2010**.
124. U. Jönsson, L. Fägerstam, B. Ivarsson, B. Johnsson, R. Karlsson, K. Lundh, S. Löfås, B. Persson, H. Roos, I. Rönnerberg, S. Sjölander, E. Stenberg, R. Ståhlberg, C. Urbaniczky, M.

- Malmqvist, Real-Time Biospecific Interaction Analysis Using Surface Plasmon Resonance and a Sensor Chip Technology, *Biotechniques* **1991**, *11*, (5), 620-627.
125. L. Michaelis, M.L. Menten, Die Kinetik der Invertwirkung, *Biochemische Zeitschrift* **1913**, (49), 333-369.
126. G.E. Briggs, J.B.S. Haldane, A Note on the Kinetics of Enzyme Action, *Biochemical Journal* **1925**, *19*, (2), 338-339.
127. S. Schnell, C. Mendoza, Closed Form Solution for Time-dependent Enzyme Kinetics, *Journal of Theoretical Biology* **1997**, *187*, (2), 207-212.
128. C.T. Goudar, J.R. Sonnad, R.G. Duggleby, Parameter estimation using a direct solution of the integrated Michaelis-Menten equation, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1999**, *1429*, (2), 377-383.
129. C.T. Goudar, S.K. Harris, M.J. McInerney, J.M. Suflita, Progress curve analysis for enzyme and microbial kinetic reactions using explicit solutions based on the Lambert W function, *Journal of Microbiological Methods* **2004**, *59*, (3), 317-326.
130. F. Exnowitz, B. Meyer, T. Hackl, NMR for direct determination of K_M and v_{max} of enzyme reactions based on the Lambert W function-analysis of progress curves, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **2012**, *1824*, (3), 443-449.
131. A.K. Covington, M. Paabo, R.A. Robinson, R.G. Bates, Use of the glass electrode in deuterium oxide and the relation between the standardized pD (paD) scale and the operational pH in heavy water, *Analytical Chemistry* **1968**, *40*, (4), 700-706.
132. Brenda Datenbank, Webseite: <https://www.brenda-enzymes.org/index.php>, zuletzt aufgerufen am **06.04.2023**.
133. H.G. Kim, S.M. Yang, Y.C. Lee, S.I. Do, I.S. Chung, J.M. Yang, High-level expression of human glycosyltransferases in insect cells as biochemically active form, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2003**, *305*, (3), 488-493.
134. B. Janesch, H. Saxena, L. Sim, W.W. Wakarchuk, Comparison of α -2,6-sialyltransferases for sialylation of therapeutic proteins, *Glycobiology* **2019**, *29*, (10), 735-747.
135. M. Mayer, B. Meyer, Characterization of Ligand Binding by Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy, *Angewandte Chemie International Edition* **1999**, *38*, (12), 1784-1788.
136. B. Meyer, T. Peters, NMR-Techniken zum Screening und zur Identifizierung der Bindung von Liganden an Proteinrezeptoren, *Angewandte Chemie* **2003**, *115*, (8), 890-918.
137. A.M. Ferrari, B.Q. Wei, L. Costantino, B.K. Shoichet, Soft Docking and Multiple Receptor Conformations in Virtual Screening, *Journal of Medicinal Chemistry* **2004**, *47*, (21), 5076-5084.
138. Gestis-Stoffdatenbank, Webseite: <http://www.gestis.dguv.de/>, zuletzt aufgerufen am **30.03.2022**.

9 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Frau Dr. Maria Riedner und Herrn Prof. Dr. Markus Fischer für ihre Teilnahme am Dissertationskolloquium bedanken.

Den Teams der NMR- und MS-Abteilung unter der Leitung von Dr. Thomas Hackl und Dr. Maria Riedner danke ich für die Messung der zahlreichen Spektren, sowie dem IT-Service für den hervorragenden Support. Insbesondere möchte ich mich bei Thorsten für seine Hilfsbereitschaft bei der Aufnahme der Progresskurven bedanken.

Für die tatkräftige Unterstützung bei den experimentellen Arbeiten danke ich meinen Forschungspraktikantinnen/-en, insbesondere Thomas für sein unermüdliches Engagement.

Dem gesamten Arbeitskreis Meyer danke ich für die freundliche Aufnahme und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Mein besonderer Dank gilt Moritz für die vielen fachlichen und fachfremden Diskussionen, sowie Ilona für die großartige Unterstützung bei der Synthese.

Außerdem bedanke ich mich bei Brita für ihr Engagement und ihre motivationale Unterstützung.

Zudem möchte ich mich auch bei meinem „zweiten Arbeitskreis“ Holl für die herzliche Aufnahme, die große Hilfsbereitschaft und die vielen Gespräche bedanken. Insbesondere danke ich meinem „neuen“ Labornachbarn Patrick, für den wissenschaftlichen Austausch und die unzähligen Tipps. Des Weiteren möchte ich mich bei Katharina für die Einführung in die SPR-Analyse bedanken.

Mein größter Dank gilt schließlich von ganzem Herzen meiner Familie. Ich danke Ihnen für ihre Liebe und ihre Unterstützung dabei, das Ziel vor Augen nicht zu verlieren.

10 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbstständig verfasst wurde und ich keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.

Hamburg, den 25. Oktober 2023



Maximilian Britz