

10. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden eine Reihe von mono- und multivalenten Glycomimetika für die Mannose-spezifische Adhäsion von Typ-1-fimbrierten *E. coli* Bakterien an Meer-schweinchen-Erythrocyten oder Hefemannan synthetisiert. Dabei wurden verschiedene Wege zum Aufbau kleinerer Glycocluster besprochen, wobei die Chemie der Kupplungsreaktionen mit Ausnahme der glycosidisch-verbrückten Cluster unabhängig von der Konfiguration der verwendeten Kohlenhydrat-Bausteine ist. Der peptidisch-verbrückte Cluster **78** weist hervorragende Inhibitionseigenschaften mit IT-Werten im unteren μM -Bereich auf, sowohl im Hämagglutinations-Hemm-Test als auch im ELISA. Daher wurde die Struktur von Verbindung **78** durch Einführung verschiedener Spacerlängen zu den Verbindungen **98**, **99** und **100** und Austausch des Methylglycons gegen einen *p*-Nitrophenylrest zu Struktur **79** optimiert. Durch die Mannosylierung der Akzeptoralkohole **38**, **43** und **48** mit acetyliertem Trichloracetimidat **11** und nachfolgender nucleophiler Substitution mit Natriumazid wurden die erhaltenen Azide **40**, **45** und **50** entschützt und zu den Aminen **42**, **47** und **52** hydriert und anschließend mit EEDQ peptidverbrückt. Die Synthese der spacer-modifizierten Tricluster **98**, **99** und **100** gelang in 68%iger, 56%iger bzw. 49%iger Gesamtausbeute (je 5 Stufen).

Der Triclusters **78** war über Peptidkupplung mit dem benzoylgeschützten 6-Amin **21** und der Trisäure **2** nach Entschätzung in 72% Ausbeute erhältlich.

Die Oligomannosylierung des Triols **3** mit benzylgeschütztem Trichloracetimidat **15** gelang bei -65°C und nachfolgender De-*O*-benzylierung bei 60 bar/ 60°C mit Pd/C in 57%iger Ausbeute zum Trimannosid **76**. Die entsprechende Synthese mit acetylgeschütztem Trichloracetimidat ergab nicht umlagerbare Orthoesterstrukturen in **73**.

Der Thioharnstoff-verbrückte Tricluster **82** wurde mit acetylgeschütztem 6-Isothiocyanat **24** und Tris-(2-aminoethyl)-amin **61** nach Entschätzung in 75%iger Ausbeute zugänglich. Die Synthese von **82** mit benzoylgeschütztem 6-NCS-Mannosid **22** verlief mit 25%iger Ausbeute aufgrund auftretender Löslichkeitsprobleme während der Synthese. Mit ungeschütztem 6-NCS-Mannosid **27** gelang die Synthese in 23%iger Ausbeute infolge von Nebenreaktionen.

Durch die Synthese konformationell unterschiedlicher Cluster-Mannoside (*O*-glycosidisch (**76**)-, thioharnstoff- (**82** & **83**)- und peptidverbrückt (**78**)) können mit den potentesten Verbindungen konvergent dendritische Cluster aufgebaut werden, die ein *cross-linking* mit verschiedenen Lektindomänen erlauben und echte multivalente Bindungseffekte zeigen könnten. Aufgrund des flexibel gehaltenen Synthesekonzeptes ist die Einführung von Biomarkern möglich und wurde für den biotinylierten Tricluster **88** ausgehend vom Nitrotri-*t*-butylester **1** in 4 Stufen mit 86%iger Ausbeute exemplarisch durchgeführt. Durch Markierung von aminoterminalen Spacer-Cluster-Mannosiden wie **97** können auch sehr teure NHS-aktivierte Biomarker wie z. B. Oregon Green™ 488, Carbonsäuresuccinimidylyl-ester-5-isomer, eingeführt werden.

Die aromatischen Mannoside **34**, **36** und **37** gleichen in ihrer Inhibitoreigenschaft der vom *p*-Nitrophenyl- α -D-mannosid.

Für hochaffine Liganden des NKR-P1-Rezeptorproteins aus Killerzellen von Ratten konnten wichtige Vorarbeiten geleistet werden. Die problematische chemische Synthese von *p*-Nitrophenyl-chitobiose konnte durch eine neu entwickelte enzymatische Transglycosylierung mit der β -*N*-Acetylhexosaminidase von *Aspergillus oryzae* umgangen werden. *p*-Nitrophenyl- β -*N*-acetylglucosamin (**56**) dient in einer kinetisch-kontrollierten Bildung des β (1 \rightarrow 4)-Regioisomers sowohl als Donor wie auch als Akzeptor (Abb. 13). Unter optimierten Bedingungen betrug die Ausbeute 22%, wobei auch Multigrammansätze möglich waren und nichtumgesetztes Edukt zurückgewonnen werden konnte. Die Transformation von *p*-Nitrophenyl-chitobiose **57** und *p*-Nitrophenyl-GalNAc **66** zu den *p*-Isothiocyanat-Verbindungen stieß auf Schwierigkeiten, die auf der Stufe der zwischenzeitlich gebildeten *p*-Amino-Derivate auftraten. Im Fall des *p*-NCS-Chitobiosides **59** erfolgte die Dimerisierung zu **60** bei der Transformation der Aminofunktion von **58** mit Thiophosgen.

11. Summary

This thesis describes the synthesis of a number of α -mannoside derivatives and various oligovalent α -mannoside clusters, which were designed as inhibitors of the mannose-specific adhesion of type 1-fimbriated *E. coli* bacteria to guinea pig erythrocytes and yeast mannan, respectively. In addition to glycosylation reactions other chemistries such as peptide coupling and thiourea bridging were used for linking the sugar moieties to an oligovalent core molecule. Peptide coupling and thiourea bridging reactions had the advantage that no optimization was needed for every particular sugar configuration used. The peptide-bridged cluster **78** showed the best inhibitory potency of all compounds tested, both in the hemagglutination inhibition assay as well as in the ELISA with an IT (inhibition titre) in the low micromolar range. Consequently cluster **78** was considered as a lead structure and was further modified by the introduction of spacers of different lengths leading to the spacer-modified clusters **98**, **99** and **100**. Furthermore, variation of the aglycon group from methyl to *p*-nitrophenyl was accomplished in order to add hydrophobic interactions to lectin binding. This led to the aglycon-modified cluster **79**.

The synthesis of cluster mannosides via oligo-glycosidation proved to be difficult. Especially mannosylation was complicated by the frequent formation of glycosyl orthoesters which could not be isomerized without degradation. Finally oligomannosylation of triol **3** was accomplished with the benzyl-protected trichloroacetimidate **15** at -65°C and subsequent de-*O*-benzylation at 60 bar/ 60°C with Pd/C leading to cluster mannoside **76** in 57% overall yield. Thiourea-bridged triclusters such as **82** were available by coupling of acetyl-protected 6-isothiocyanate **24** and tris(2-aminoethyl)amine **61** and subsequent deprotection in 75% overall yield. Other protecting groups such as *O*-benzoyl protection or no protecting groups gave low yields around 20%. The described syntheses to cluster mannosides such as the *O*-glycosidically linked cluster **76**, thiourea-bridged **82** and **83** or peptide-linked **78** are designed such that utilization of the clusters as molecular wedges and their assembly to carbohydrate-containing dendrimers in a convergent approach is possible. Moreover, due to the flexible synthetic concept the introduction of biomarkers is possible what could be demonstrated with the synthesis of biotinylated tricluster **88**.

The majority of the prepared mannosides and cluster mannosides were tested as inhibitors of mannose-specific adhesion of *E. coli* in collaboration with the research center Borstel.

The mannosides **34**, **36** and **37** containing an aromatic aglycon showed similar inhibitory potencies as *p*-nitrophenyl α -D-mannoside.

In addition to the work which was dedicated to mannose-specific inhibition, the clustering know-how collected in this thesis was also engaged to synthesize potential high affinity ligands of the NKR-P1 receptor protein from rat killer cells. The chemical synthesis of *p*-nitrophenyl chitobioside which was required in this context, was however, found to be difficult. Thus a new enzymatic transglycosylation reaction was developed using β -*N*-acetylhexosaminidase from *aspergillus oryzae* in collaboration of the laboratory of Prof. V. Křen (Prag). In the enzymatic glycosylation reaction *p*-nitrophenyl 2-deoxy-2-*N*-acetylamino-glucoside (**56**) served both as donor as well as acceptor in the kinetically controlled formation of the desired β (1 \rightarrow 4)-regioisomer. In the next chemical step, the transformation of *p*-nitrophenyl chitobioside **57** as well as *p*-nitrophenyl GalNAc (**66**) to the respective *p*-isothiocyanato-functionalized derivatives led to difficulties during its formation from the corresponding *p*-amino derivatives. In the case of *p*-NCS-phenyl chitobioside **59** dimerization to **60** occurred during the transformation of the amino function of **58** with thiophosgene. Therefore, this reaction sequence still awaits completion.