

Design, Synthese und Analyse multivalenter Inhibitoren der Adhäsion des Hämagglutinin H5 des Vogelgrippe Virus

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Moritz Waldmann
aus Hildesheim

Hamburg 2013



„Turn on, tune in, drop out.“

Für meine Eltern.

Die praktischen Arbeiten wurden in der Zeit von April 2009 bis November 2012 am Institut für Organische Chemie, Department Chemie der Universität Hamburg, Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. Christian Stark, durchgeführt.

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

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Wittko Francke danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

1. Gutachter: Prof. Dr. Bernd Meyer
2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. Wittko Francke

Tag der Disputation: 03.05.2013

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Kohlenhydrat Erkennung viraler Oberflächenproteine	1
1.2	Influenza Hämagglutinin	2
1.3	Multivalenz in biologischen Systemen.....	3
1.4	Multivalente Inhibitoren in der medizinischen Chemie	6
1.5	Glykokonjugate und Neoglycopeptide	7
1.6	Inhibitoren des Influenza Hämagglutinin	10
2	Zielsetzung	13
3	Ergebnisse und Diskussion.....	14
3.1	Entwicklung der Leitstruktur.....	15
3.2	Synthetische Studien zur Darstellung der Leitstruktur I	19
3.3	Weiterentwicklung zu den in dieser Arbeit untersuchten Strukturen.....	26
3.4	Entwicklung der neuen Synthesestrategie	31
3.5	Durchgeführte Synthesen	33
3.5.1	Darstellung der <i>core</i> -Struktur.....	33
3.5.2	Darstellung des Neuraminsäurederivats	34
3.5.3	Darstellung der Glykokonjugate 21-26.....	35
3.5.4	Darstellung der geschützten Liganden 27-32	40
3.5.5	Entschützung der Liganden	46
3.6	Vorbereitende Untersuchungen	49
3.6.1	CD spektroskopische Analyse des Linkers	49
3.6.2	Untersuchung des kommerziell bezogenen Hämagglutinins.....	50

3.7	Analyse der dargestellten Verbindungen.....	53
3.7.1	STD-NMR Experimente.....	53
3.7.2	SPR-Experimente	69
3.7.3	STD NMR Experimente mit 41 und abschließende Diskussion	92
3.8	Synthetische Studien zur möglichen Erhöhung der Valenz der Liganden	95
4	Zusammenfassung	99
5	Summary	101
6	Experimentalteil	103
6.1	Geräte, Software und Chemikalien.....	103
6.2	Handhabung des Hämagglutinins H5	105
6.3	NMR Experimente	105
6.3.1	Akquisition der NMR Daten	105
6.3.2	Vorbereitung der Proben für die STD Messungen	106
6.3.3	Akquisition und Prozessierung der STD-NMR Daten	106
6.3.4	Auswertung der STD-Daten.....	107
6.4	SPR-Experimente	107
6.5	Allgemeine Arbeitsvorschriften	108
6.6	Durchgeführte Synthesen	112
7	Toxikologische Daten.....	144
8	Literaturverzeichnis.....	147
9	Danksagung.....	153
10	<i>Curriculum vitae</i>	155

Abkürzungsverzeichnis

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
AA	<i>amino acid</i>
Ac	Acetyl
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
AcOH	Essigsäure
Ala	Alanin
aq	aquatisch
Äq	Äquivalent
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Boc ₂ O	Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat
CD	Circulardichroismus
CMC	<i>critical micelle concentration</i>
COSY	<i>correlated spectroscopy</i>
CRD	<i>carbohydrate recognition domain</i>
d	Dublett
Da	Dalton
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DIC	Di- <i>iso</i> -propylcarbodiimid
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DLS	<i>dynamic light scattering</i>
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimidhydrochlorid
EE	Ethylacetat
es	<i>excitation sculpting</i>
ESI	<i>electron spray ionisation</i>
FA	Ameisensäure
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
Gly	Glycin
HATU	2-(1 <i>H</i> -7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HSQC	<i>heteronuclear single-quantum correlation</i>
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
<i>J</i>	Kopplungskonstante
<i>K_D</i>	thermodynamische Dissoziationskonstante
<i>K_I</i>	inhibitorische Konstante
Lys	Lysin
m	Multipllett
m/z	Masse/Ladung
MD	Molekulardynamik
Me	Methyl
MeCN	Acetonitril

MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
<i>MTL</i>	<i>mass transfer limitation</i>
Neu5Ac	Neuraminsäure
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NOESY	<i>nuclear Overhauser enhancement and exchange spectroscopy</i>
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PDB	<i>protein data bank</i>
PE	Petrolether
PG	<i>protecting group</i>
Pip	Piperidin
Piv	Pivaloyl
ppm	<i>parts per million</i>
Pyr	Pyridin
R_f	Retentionsfaktor
rmsd	<i>root mean square deviation</i>
RP	reversed phase
RT	Raumtemperatur
R_t	Retentionszeit
RU	<i>response unit</i>
s	Singulett
Ser	Serin
SPPS	<i>solid phase peptide synthesis</i>
SPR	<i>surface plasmon resonance</i>
<i>ssRNA</i>	<i>single stranded ribonucleic acid</i>
STD	Sättigungstransfer Differenz
t	Triplett
TBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumtetrafluoroborat
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIPS	Triisopropylsilan
TOCSY	total correlated spectroscopy
v/v	Volumen per Volumen
δ	chemische Verschiebung

1 Einleitung

1.1 Kohlenhydrat Erkennung viraler Oberflächenproteine

Die Glycosylierung der Oberfläche eukaryotischer Zellen dient dem Schutz der Zelle, der Zell-Zell Kommunikation und ist an vielen zellulären Erkennungsprozessen beteiligt^[1]. Dabei sind die Zellen mit verschiedenen Glykanstrukturen dekoriert. Diese können geladen oder ungeladen sein und bis zu wenige Mikrometer in das Lumen hineinragen^[2]. In Abbildung 1 ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme der Glycocalyx einer Endothelzelle gezeigt.

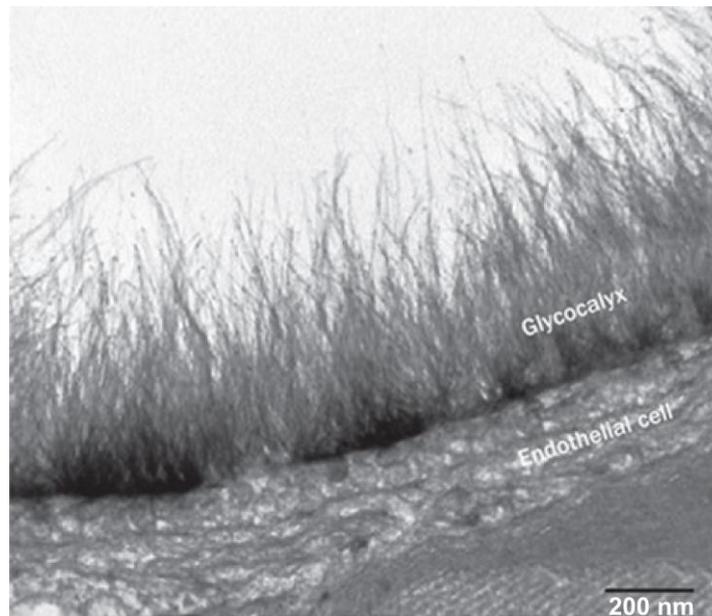


Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Glycocalyx einer Endothelzelle^[2]. Der untere Teil zeigt die Oberfläche einer Endothelzelle. An der Grenzfläche zwischen Zelloberfläche und Lumen bilden die Oligosaccharidstrukturen von Glycoproteinen und Glycolipiden die Glycocalyx, welche diverse Funktionen erfüllt. Hierzu gehört der Schutz der Zelle, Zell-Zell Kommunikation und Adhärenz im Zellverbund^[1]. Die Glycocalyx kann mehrere hundert Nanometer bis hin zu einigen, wenigen Mikrometern in das Lumen hineinragen^[3,4].

In dem viralen Replikationszyklus ist die Bindung an die Wirtszelle ein essentieller Schritt. In Folge der elaborierten Struktur der zellulären Glycocalyx mussten Viren Strategien im Umgang mit den präsentierten Kohlenhydratstrukturen entwickeln, um ihre Vermehrung zu gewährleisten. Dies führte dazu, dass viele Viren durch Ausbildung kohlenhydraterkennender Oberflächenproteine bestimmte Kohlenhydratstrukturen bei der Invasion der Wirtszellen aktiv nutzen, um so zum Beispiel ihre Wirtszellen zu lokalisieren^[5]. Ein genaues Verständnis dieser Erkennungsprozesse ist für eine gezielte Entwicklung von potentiellen Wirkstoffen gegen virale Infektionskrankheiten von großer Bedeutung.

Heute sind etliche virale, kohlenhydraterkennende Oberflächenproteine als potentielle *targets* für die Entwicklung von Medikamenten gegen klinisch relevante Infektionskrankheiten identifiziert und

untersucht^[6]. Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte die dreidimensionale Struktur einiger dieser viralen Lektine mittels NMR-Spektroskopie oder röntgenkristallographisch aufgeklärt werden. Die dabei gewonnenen Strukturinformationen stellen eine exzellente Basis für das computergestützte Design von Inhibitoren dar^[5].

1.2 Influenza Hämagglutinin

Die Influenza, auch Grippe genannt, stellt seit Jahrhunderten eine Bedrohung für die Menschheit dar^[7]. Neben der saisonal auftretenden Grippewelle kommt dabei wiederkehrenden pandemischen Ausbrüchen mit Millionen von Toten besondere Bedeutung zu^[8, 9]. Erreger der Influenza ist das Influenzavirus, welches zu der Gruppe der Orthomyxoviridae gehört und phylogenetisch weiter diversifiziert ist. Für die Infektion des Menschen sind vor allem Influenza-A-Viren verantwortlich^[7, 10]. Das Virus besitzt ein segmentiertes Genom, bestehend aus acht ssRNA Molekülen negativer Polarität, welches für zehn virale Proteine kodiert. Dazu gehören das Transmembranprotein M2, welches ein Ionenkanal ist und als Protonenpumpe fungiert, die Neuraminidase (NA), welche als Glycohydrolase die Abspaltung von Neuraminsäureresten von zellulären Glycoproteinen katalysiert und das Hämagglutinin (HA, Abbildung 2), welches durch das Binden von Kohlenhydratstrukturen auf der Wirtszelloberfläche für den Primärkontakt verantwortlich ist^[7, 10].

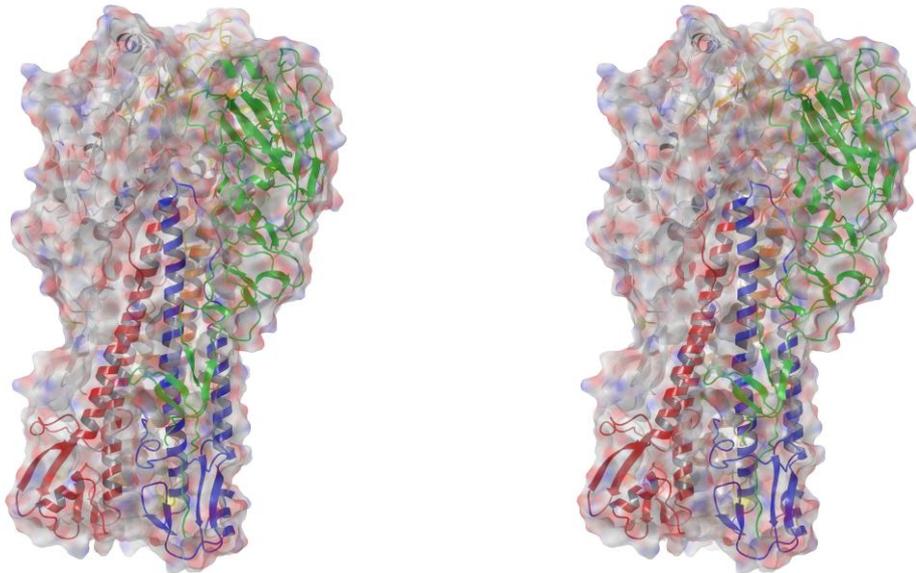


Abbildung 2: *Crossed eye* Darstellung der Sekundärstrukturelemente eines Influenza Hämagglutinins auf Basis zweier Röntgenkristallstrukturen (pdb: 1JSO^[11] und 2IBX^[12]). Das Bändermodell ist von einer transluzenten Oberfläche umgeben. Bei dem Oberflächenprotein handelt es sich um einen Homotrimer. Jedes Monomer besteht aus zwei Untereinheiten, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Die Virusmembran befindet sich in dieser Darstellung am unteren Ende des Proteins. Die *carbohydrate binding domain (CRD)* befindet sich distal zur Virusmembran am Kopf der globulären Domäne.

Bei dem Hämagglutinin handelt es sich um ein homotrimeres Lektin. Jedes Monomer besteht aus zwei Untereinheiten, welche über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Am Kopf der globulären Domäne, distal zur Virusmembran, befindet sich die Kohlenhydratbindungsstelle (*carbohydrate recognition domain, CRD*)^[11, 13]. Durch die Bindung von Neuraminsäure terminaler Glycanstrukturen wird der Primärkontakt zur Wirtszelle hergestellt^[14].

In Folge der Veröffentlichung der ersten HA Kristallstruktur 1981^[15] wurden während der 1980er und der frühen 90er Jahre viele Anstrengungen unternommen, kleine Moleküle mit hoher Affinität für das HA zu entdecken. Wie sich jedoch herausstellte, konnte auf Grund der niedrigen Affinität der *CRD* kein geeignetes Molekül mit ausreichend starker Affinität zu HA entwickelt werden^[5]. Dies führte zu der nach wie vor anhaltenden Entwicklung multivalenter Liganden, unter denen aber bislang kein Kandidat für ein geeignetes Medikament gefunden werden konnte^[16, 17].

1.3 Multivalenz in biologischen Systemen

Mit einer thermodynamischen Dissoziationskonstante (K_D) im Bereich von 0.1-10 mM ist die monovalente Wechselwirkung zwischen einem Protein und einem Kohlenhydrat eine vergleichsweise schwache Wechselwirkung. Hoch affide Wechselwirkungen im nanomolaren Bereich an einer Zelloberfläche entstehen durch multivalente Wechselwirkungen, häufig durch lokale Anhäufung von Bindungstaschen in oligomeren Proteinstrukturen^[18]. Dabei beschreibt Multivalenz, auch Polyvalenz genannt, die gleichzeitig stattfindende Interaktion mehrerer Untereinheiten einer Obereinheit mit mehreren Untereinheiten eines oder mehrerer Rezeptoren. In der Natur finden sich viele Beispiele für das Nutzen multivalenter Wechselwirkungen^[19].

Die thermodynamische Betrachtung multivalenter Wechselwirkung ist sehr komplex. Auf Grund dieser Komplexität sowohl der Wechselwirkung an sich, als auch der zu Grunde liegenden Mathematik findet sich in der Literatur ein uneinheitlicher Gebrauch der thermodynamischen Modelle^[19-23], wobei das von Kitov *et al.*^[20] vorgeschlagene Modell das detaillierteste ist. Diesem Modell liegt die von Jencks^[21] formulierte Additivität der freien Energien zu Grunde (Gleichung 1).

$$\Delta G^\circ_{multi} = i\Delta G^\circ_{mono} + \Delta G^\circ_{interaction}$$

Gleichung 1: Die von Jencks formulierte Gleichung zur Berechnung der Additivität der freien Energien^[21]. ΔG°_{mono} beschreibt die Bindungsenergie der korrespondierenden monovalenten Bindung und i den Valenzgrad der Bindung. $\Delta G^\circ_{interaction}$ ist ein von Jencks eingeführter Faktor, um Defekte in der Additivität zu korrigieren, die aus Unterschieden in der Bindungsenergie zwischen der ersten und den folgenden Bindungen resultieren.

Um eine thermodynamische Analyse zu ermöglichen, passen Kitov *et al.* Gleichung 1 für den Fall uniformer Bindung für ihr thermodynamisches Modell zu Gleichung 2 an. Dabei werden die Terme

entsprechend des Ursprungs der Interaktion umformuliert, so dass der Beitrag des initialen Bindungsereignisses zu der intermolekulare freien Energie $\Delta G^{\circ}_{mono} = \Delta G^{\circ}_{inter}$ wird und von allen folgenden Wechselwirkungen separiert wird $(i-1)\Delta G^{\circ}_{intra} = (i-1)\Delta G^{\circ}_{interaction}$.

$$\Delta g^{\circ}_i = i\Delta G^{\circ}_{inter} + (i-1)\Delta G^{\circ}_{intra}$$

Gleichung 2: Anpassung der Gleichung 1 für die Vereinfachung, dass alle mikroskopischen Rezeptor-Ligand-Komplexe $rl(i)$ identische freie Bindungsenergien haben.

Alle mikroskopisch gebildeten Rezeptor-Ligand-Komplexe $rl(i)$ verfügen über identische Bindungscharakteristika und können kollektiv durch den makroskopischen Komplex $RL(i)$ wiedergegeben werden. Es wird ein Degenerationsfaktor Ω_i eingeführt, um zu reflektieren, dass es sich bei $RL(i)$ nicht um ein einzelnes Molekül, sondern um eine Ansammlung von mikroskopisch unterscheidbaren Komplexen $rl(i)$ handelt. Für die freie Energie des Komplexes $RL(i)$ ergibt sich aus Gleichung 2 dann Gleichung 3.

$$\Delta G^{\circ}_i = \Delta G^{\circ}_{inter} + (i-1)\Delta G^{\circ}_{intra} - RT \ln \Omega_i$$

Gleichung 3: Formel zur Berechnung der freien Energie des Komplexes $RL(i)$. Die isothermale Gleichgewichtsverteilung wird durch die Boltzmannverteilung beschrieben. Der Degenerationsfaktor Ω_i resultiert aus der Eigenschaft des multivalenten Systems, sich nicht aus einem individuellen Molekül, sondern aus einer Ansammlung mikroskopisch unterscheidbarer Komplexe $rl(i)$ zusammensetzen.

Der Beitrag jeder gebundenen Spezies $RL(i)$ zu der gesamten freien Energie des Komplexes RL ist proportional zu dem Gewichtungsfaktor w_i (Gleichung 4).

$$w_i = \frac{e^{-\Delta G^{\circ}/RT}}{\sum_{i=1}^{i_{max}} e^{-\Delta G^{\circ}/RT}}$$

Gleichung 4: Gewichtungsfaktor w_i . Dieser beschreibt die Wahrscheinlichkeit des Beitrages einer individuellen i -ten Bindung zu der gesamten freien Energie des Komplexes $RL(i)$.

Für die freie Energie der Avidität $\Delta G^{\circ}_{avidity}$ ergibt sich nach einigen Umformungen ein Term, in dem die beitragenden Energien ihrem Ursprung nach in Terme für inter- und intramolekulare freie Energie und in einen Degenerationsterm getrennt sind (Gleichung 5).

$$\Delta G^{\circ}_{avidity} = \Delta G^{\circ}_{inter} + \Delta G^{\circ}_{intra} \sum_{i=1}^{i_{max}} w_i(i-1) + RT \sum_{i=1}^{i_{max}} w_i \ln \left(\frac{w_i}{\Omega_i} \right)$$

Gleichung 5: Gleichung zur Beschreibung der freien Energie der Avidität $\Delta G^{\circ}_{avidity}$. Alle enthalpischen Effekte der multivalenten Wechselwirkung werden durch die ersten beiden Terme der Gleichung beschrieben. Der zweite Term reflektiert zusätzliche spezifische Interaktionen und der dritte Term einen Statistikfaktor.

Der erste Term der Gleichung ΔG°_{inter} ähnelt der freien Energie einer monovalenten Bindung ΔG°_{mono} . Der zweite Term reflektiert die zusätzlichen Interaktionen und ist somit von der maximalen Anzahl weiterer intramolekularer Wechselwirkungen abhängig. Die praktische Bedeutung dieses Terms ist in Abbildung 3 für einen dimeren, pentameren und dekameren Rezeptor graphisch gezeigt.

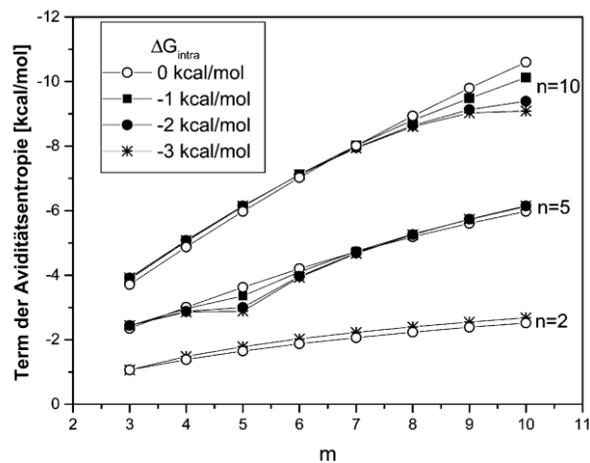


Abbildung 3: Einfluss der intramolekularen freien Energie ΔG°_{intra} , der Valenz des Rezeptors n und der Anzahl der Arme m eines multivalenten Liganden für einen dimeren, pentameren und dekameren Rezeptor. Die Größe der Aktivitätssteigerung durch intramolekulare Interaktionen erreicht asymptotisch $(n-1)\Delta G^{\circ}_{intra}$.

Der dritte Term in Gleichung 5 ist ein Statistikfaktor und stimmt mit der Boltzmann-Gibbs Definition der Entropie überein. Er repräsentiert die Wahrscheinlichkeit der Bindung und weniger ihre Stärke und wird von Kitov *et al.* als Aviditätsentropie bezeichnet^[20]. Die Größe des Degenerationsfaktors Ω_i hängt von der Topologie der multivalenten Interaktion ab. In Abbildung 4 sind die verschiedenen Topologien multivalenter Liganden gezeigt.

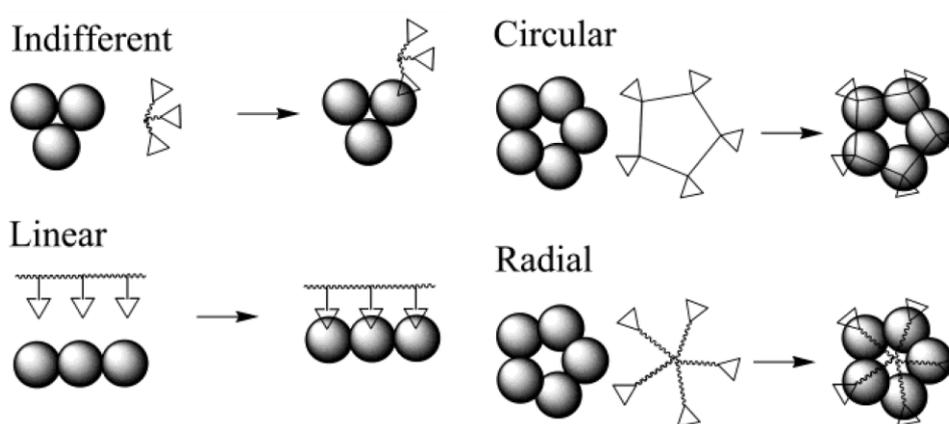


Abbildung 4: Gezeigt sind die verschiedenen Topologien multivalenter Bindung. Im Falle indifferenter Topologie kann nur ein Arm zurzeit mit dem Rezeptor spezifisch wechselwirken. Bei linearer und circularer Topologie können mehrere Arme eine spezifische Wechselwirkung eingehen. Nach Ausbildung der initialen Wechselwirkung hat hier jeder Arm einen vorbestimmten Bindungspartner, mit dem nur noch er interagieren kann. Für einen radialen Liganden gibt es keine Einschränkungen der Topologie, so dass jede Bindungsstelle für jeden Arm gleich erreichbar ist.

Die Größe des Degenerationsfaktors ist für die radiale Topologie maximal, das heißt, dass hier die Wahrscheinlichkeit einer Bindung für alle potentiellen Interaktionen gleich groß ist.

Die Terme zwei und drei von Gleichung 5 beschreiben somit die spezifischen Charakteristika einer multivalenten Wechselwirkung. Term 2 beschreibt den positiven Einfluss des Valenzgrades auf die Stärke der Interaktion. Aber auch Arme, die nicht zur Bindung beitragen, erhöhen die Wahrscheinlichkeit einer Bindung und wirken sich so indirekt positiv auf die Interaktion aus. Dieser statistische Aspekt wird von dem dritten Term beschrieben und ist neben der Gesamtzahl der Arme von der Topologie des Liganden abhängig. Der Einfluss von Term zwei und drei steigt mit der Valenz des Rezeptors. Interessant an dem thermodynamischen Modell von Kitov *et al.* ist^[20], dass hier die Konformationsentropie des Liganden deutlich in den Hintergrund tritt, wohingegen in den deutlich einfacheren Modellen dieser eine große Bedeutung zukommt^[19, 24].

1.4 Multivalente Inhibitoren in der medizinischen Chemie

Seit dem 1998 veröffentlichten Übersichtsartikel zur Multivalenz von Whitesides *et al.*^[19] wurden multivalente Systeme für biologische Anwendungen intensiv untersucht. Medizinisch werden dennoch nur monovalente Wirkstoffe eingesetzt, auch wenn diese in manchen Fällen erst bei sehr hohen Konzentrationen die gewünschte Wirkung zeigen. Das in der Pharmaindustrie weit verbreitete Dogma der „*small molecules*“ hat zur Folge, dass sich bislang „kein großes Pharmaunternehmen ernsthaft mit dem potential multivalenter Wechselwirkungen“ auseinandergesetzt hat^[25]. Das noch junge Konzept multivalenter Wirkstoffe wird daher eher von Unternehmen kleiner und mittlerer Größe aufgegriffen. Im Mausmodell zeigte ein dendritisches Polyglycerinsulfat die gleiche hochaktive anti-inflammatorische Wirkung wie das bereits verwendete Glucocorticoid Prednisolon (Abbildung 5, a)^[26]. In Phase II einer klinischen Studie befindet sich zurzeit das multivalente Mikrobiozid VivaGel[®] der Firma Starpharma. Dabei handelt es sich um ein Vaginalgel, welches die Übertragung von viralen Geschlechtskrankheiten verhindern soll^[27, 28].

Multivalente Liganden lassen sich in statistische und strukturbasierte Liganden unterscheiden. Bei den statistischen Liganden werden häufig funktionalisierte, lineare Polymere verwendet. So berichten Whitesides *et al.*^[29] von einer 10^3 - 10^6 stärkeren Affinität pro Neuraminsäure zur Oberfläche von Influenza-Viren bei einem Neuraminsäure funktionalisiertem Polyacrylamid im Vergleich zum monovalenten α -Methylglycosid der Neuraminsäure (Abbildung 5, b). Biopolymere finden hier ebenso Anwendung. Bekannter Vertreter ist die Poly-L-glutaminsäure (PGA), deren Seitenketten mit Liganden funktionalisiert werden. Wong *et al.* berichten durch Funktionalisierung einer PGA mit Sialyllactose von einem Polymer zur Inhibierung des Influenza Hämagglutinin, dass im ELISA einen IC_{50} im pikomolaren Bereich aufweist^[30]. Ebenfalls zu der Gruppe statistischer Liganden gehören funktionalisierte Dendrimere. Diese verfügen über eine definierte Architektur und ein hohes Maß an

Funktionalisierung^[31]. Landers *et al.* berichten von der *in vivo* Inhibition der Infektion mit pulmonaler Influenza-A durch neuraminsäurefunktionalisierten Polyamidoamin (PAMAM) Dendrimere^[32].

Beispiele für strukturbasierte Liganden sind seltener. Kane *et al.* berichteten 2011 von einem heptavalenten Inhibitor des Anthraxtoxins. Dieser verfügt über ein β -Cyclodextrin-Grundgerüst, an das über Linker inhibitorisch wirksame Peptide gekuppelt wurden. Der Ligand konnte *in vitro* wie *in vivo* das Anthraxtoxin neutralisieren^[33]. In der Literatur viel beachtete Beispiele sind die von Bundle *et al.* 2000 und 2003 publizierten dekameren Inhibitoren der von *E. coli* sekretierten Shigatoxine Stx1 und Stx2 Starfish^[34] und Daisy (Abbildung 5, c)^[35]. Im Maus Modell zeigten diese einen effektiven Schutz gegen Shigatoxine. Weiter konnten sie durch Cokristallisation mit Stx1 den Bindungsmodus von Starfish mit Shigatoxin aufklären.

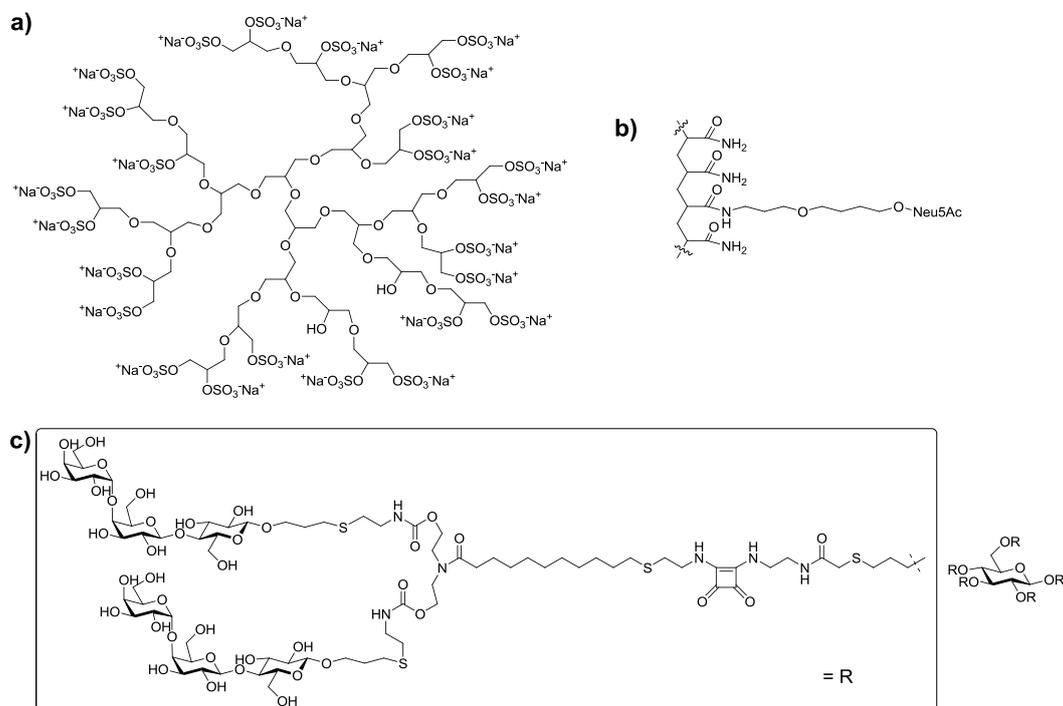


Abbildung 5: Übersicht einiger Beispiele multivalenter Liganden. a) Von Haag *et al.* publizierter dendritischer Ligand auf Polyglycerinbasis. Dieser zeigte im Maus Modell eine hoch anti-inflammatorische Wirkung^[26]. b) Von Whitesides *et al.* publiziertes Polyacrylamid. Bei einer radikalischen Polymerisation wurde 10%ig neuraminsäurefunktionalisiertes Polyacrylamid umgesetzt. Der lineare Inhibitor zeigte eine 10^3 - 10^6 gesteigerte Affinität zu Influenza-Viren pro Neuraminsäure. c) Von Bundle *et al.*^[35] publizierter dekavalenter Inhibitor von Shigatoxinen namens Daisy. Das Design entstammt einem strukturbasierten Ansatz. Im Maus Modell konnte Daisy die lethalen Folgen der Intoxikation mit Stx1 und Stx2 verhindern.

1.5 Glykokonjugate und Neoglycopeptide

Auf Grund der biologischen Bedeutung der Bindung von Kohlenhydraten durch kohlenhydraterkennende Proteine (Lektine) in zellulären Erkennungsprozessen sind hoch affine

Lektinliganden von großem medizinischen Interesse^[23, 36]. Die schwache Wechselwirkung zwischen Kohlenhydraten und Proteinen und der Umstand, dass viele Membranproteine in oligomerer Struktur vorliegen^[18, 37], führte zu der Entwicklung von monovalenten und multivalenten Kohlenhydratderivaten, um diese Lektine effektiv zu binden^[24, 29, 34, 35, 38-40]. Im weitesten Sinn werden diese Verbindungen als Glykokonjugate bezeichnet, wie alle Verbindungen von Kohlenhydraten mit anderen Strukturelementen^[41]. Werden Kohlenhydrate an Peptide konjugiert, werden sie als Neoglycopeptide bezeichnet. Hier findet eine Abgrenzung zwischen natürlich vorkommenden Glycopeptiden, und den artifiziellen Neoglycopeptiden statt.

Die Darstellung solcher Neoglycopeptide erfolgt dabei stets in einer konvergenten Vorgehensweise. Dabei wird das Kohlenhydrat derart derivatisiert, dass es um die gewünschten Strukturelemente und um eine leicht zu aktivierende Funktionalität erweitert wird, über die folgend die kovalente Bindung an das Peptid erfolgt. Bei einfachen Kohlenhydratstrukturen kann dieser Baustein dann in einer automatisierten, linearen Festphasenpeptidsynthese (*SPPS*) verwendet werden. Bei komplexen Kohlenhydratstrukturen, die entweder aufwendig dargestellt wurden oder nur in geringen Mengen isoliert wurden, erfolgt die Inkorporation in aller Regel am Ende der Synthese. Hier wird parallel ein Peptid, dargestellt, welches über funktionelle Gruppen verfügt, die eine Verknüpfung mit dem Kohlenhydratbaustein erlauben^[36]. In Abbildung 6 sind einige der bei der Darstellung von Neoglycopeptiden zum Einsatz kommenden Bausteine gezeigt.

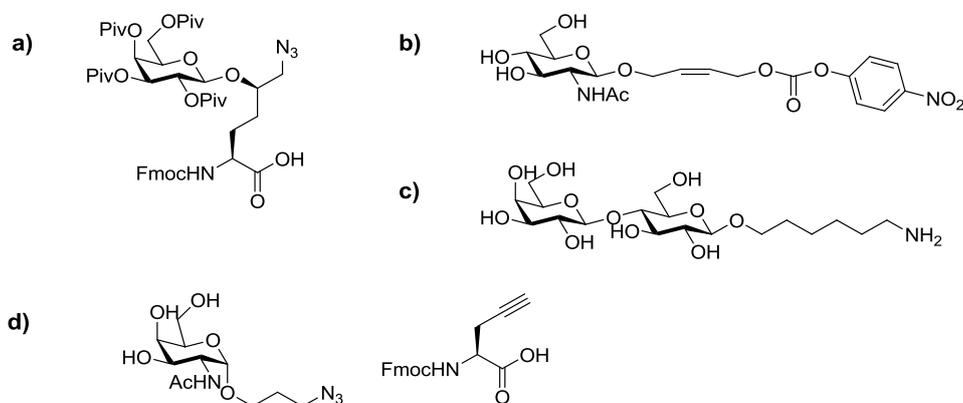


Abbildung 6: Darstellung einiger Bausteine für die Synthese von Neoglycopeptiden. a) Von Guichard *et al.* dargestellter Baustein für die Inkorporation eines Galaktose funktionalisierten 5-Hydroxylysin Derivats in einer linearen Peptidsynthese^[42]. b) Von Wittmann *et al.* dargestellter *p*-Nitrophenylcarbonat aktivierter Baustein. Dieser wurde nach Synthese eines Peptids in einem Reaktionsschritt an mehrere freie Aminofunktionen kovalent gebunden^[43]. c) Von Ogata *et al.* verwendetes Laktosederivat. Dieses wurde in einer Aktivestersynthese mit BOP und HOBT mehrfach amidisch an γ -Polyglutaminsäure gebunden^[16]. d) Von Brimble *et al.* verwendete Bausteine zur multiplen Funktionalisierung eines Peptids mit Galaktoseeinheiten. Mittels *SPPS* wurden propargylierte Aminosäuren in die Peptidsequenz integriert. An diese wurde mittels 1,3 dipolarer Cycloaddition der derivatisierte Galaktosebaustein gebunden^[44].

Eine häufig verwendete Vorgehensweise ist die Darstellung glycosylierter Aminosäuren (Abbildung 6, a). Diese werden dann in einer automatisierten Festphasenpeptidsynthese zu dem gewünschten Glykokonjugat umgesetzt. Diese Methode eignet sich sowohl für die Darstellung von Neoglycopeptiden^[42], sowie für die Darstellung von *N*- und *O*-Typ Glycopeptiden^[45-48]. Bei der Darstellung von Bausteinen für die *N*- und *O*-Typ Glycopeptidsynthese leisteten in den 80er Jahren vor allem Akira Hasegawa^[49-52], Hans Paulsen^[53-55] und Horst Kunz^[45, 56, 57] Pionierarbeit.

Eine weitere Strategie zur Darstellung von Neoglycopeptiden ist die Darstellung von Kohlenhydratderivaten, die über leicht zu aktivierende Gruppen an das fertige Peptid gekuppelt werden (Abbildung 6, b und c). So synthetisierten Wittmann *et al.* einen p-Nitrophenylaktiviertes *N*-Acetylglukosaminderivat (Abbildung 6, b) zur Darstellung eines multivalenten Neoglycopeptids. Dieser wurde durch Aktivierung mit DIPEA amidisch an freie Aminofunktionen des Peptids gebunden. Ogata *et al.* funktionalisierten über die Aktivestermethode mit BOP und HOBT γ -Polyglutaminsäure, wobei die Carboxylgruppen des Polypeptids amidisch an den Alkylamin Linker des Kohlenhydrats gebunden wurde (Abbildung 6, c)^[16].

Daneben werden noch viele weitere Strategien zur Darstellung von Neoglycopeptiden durchgeführt, die hier nicht im Detail aufgeführt sind. Dazu zählen unter anderem die Staudinger Ligation^[58, 59], die Addition an Michael-Akzeptoren^[58] und die Intein vermittelte Synthese (*native chemical ligation*)^[60]. Die mit Abstand am weitesten verbreitete Strategie nicht nur zur Darstellung von Glykokonjugaten, sondern für diverse kovalent verknüpfte Konjugate, ist die 1967 von Huisgen *et al.* publizierte 1,3-dipolare Cycloaddition eines Azids mit einem Alkin unter Ausbildung eines Triazols^[61]. Vermutlich auf Grund von Sicherheitsbedenken im Umgang mit organischen Aziden blieb diese Reaktion lange unbeachtet, bis Barry Sharpless 2001 das Konzept der Klick-Chemie formulierte und die 1,3-dipolare Cycloaddition zwischen einem Azid und einem Alkin 2002 auch für Biochemiker und medizinische Chemiker wieder attraktiv machte^[62, 63]. Die Vorteile der Reaktion bestehen in der einfachen Einführbarkeit und der hohen Toleranz dieser Funktionalitäten gegenüber vielen anderen Reaktionsbedingungen, den günstigen Ausgangsmaterialien, der leichten und milden Aktivierbarkeit auch im wässrigen Medium und den guten Ausbeuten, die mit dieser Reaktion meist erhalten werden können^[62, 63]. Ein Beispiel für die Anwendung zur Darstellung von Neoglycopeptiden ist in Abbildung 6, c gezeigt. Brimble *et al.* synthetisierten ein mehrfach propargyliertes Peptid, an welches sie nach Aufarbeitung mehrere azidofunktionalisierte Kohlenhydrateinheiten knüpften^[44]. Heute wird der Begriff Klick-Chemie häufig irrtümlicherweise synonym für die Reaktion zwischen Azid und Alkin verwendet.

1.6 Inhibitoren des Influenza Hämagglutinin

Die Suche nach potenten Inhibitoren des Influenza Hämagglutinin zur Entwicklung eines *entry*-Inhibitors gegen die Influenza begann Anfang der 1980er Jahre^[5]. Tatsächlich gestaltete sich die Entwicklung eines potenten monovalenten Inhibitors als schwierig, da für eine therapeutische Anwendung keine ausreichend starke, spezifische Wechselwirkung zum Rezeptor hergestellt werden konnte. Einer der nach wie vor stärksten bekannten kompetitiven monovalenten Binder ist in Abbildung 7, links gezeigt^[17].

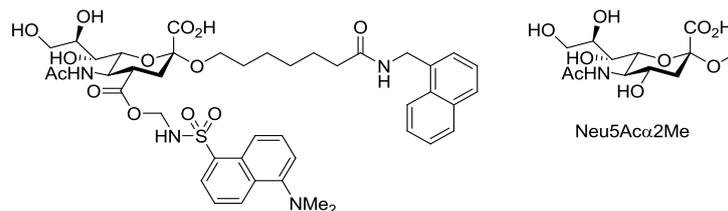


Abbildung 7: Darstellung des von Knowles *et al.* 1992 publizierten Liganden des Influenza Hämagglutinin (links). Dieser wies eine Dissoziationskonstante zu HA von 3.7 μM auf und ist damit nach wie vor einer der stärksten monovalenten Binder des Hämagglutinins^[17, 64]. Im Vergleich zum Methylglycosid der Neuraminsäure (Neu5Ac α 2Me) weist dieser einer 1000fach gesteigerte Affinität zu HA auf.

Der von Knowles *et al.* publizierte Ligand weist eine Dissoziationskonstante von 3.7 μM zu Hämagglutinin auf und verfügt damit über eine Faktor 1000 gesteigerte Affinität zu HA im Vergleich mit dem Methylglycosid der Neuraminsäure (Neu5Ac α 2Me)^[64]. Gleichzeitig konnten gute monovalente Liganden der Neuraminidase gefunden werden, welche Dissoziationskonstanten im pikomolaren Bereich zeigten. Dabei handelt es sich um Übergangszustandsanaloge, auf denen die heute kommerziell verfügbaren Influenzamedikamente Zanamivir und Oseltamivir basieren^[65]. Während der 2008-2009 auftretenden H1N1 Pandemie zeigten ~100% der Influenza-Viren dieses Stammes eine Resistenz gegenüber Oseltamivir^[66, 67]. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit alternativer Medikamente gegen die Influenza. Neben den bereits erwähnten Medikamenten ist seit 2010 ein 7-Methoxyderivat (Laninamivir) des Zanamivir auf dem japanischen Markt und befindet sich in der klinischen Phase III der FDA^[68]. Für eine Übersicht der aktuell auf dem Markt oder in der Entwicklung befindlichen antiviralen Influenza Medikamente siehe Yen *et al.*^[140].

Beispiele für einige Influenza *entry*-Inhibitoren sind in Abbildung 8 gezeigt. Dabei wird zwischen Fusionsinhibitoren und kompetitiven Inhibitoren differenziert. Fusionsinhibitoren verhindern im Gegensatz zu kompetitiven Inhibitoren nicht den Kontakt zu der Wirtszelle, sondern die Fusion mit der Zelle. Der von Naesens *et al.* publizierte Ligand (Abbildung 8,a) zeigte bei der Inhibition der Infektion mit Influenza-A/H3 einen EC_{50} von 9.6 μM . Dieser Ligand inhibierte nicht die Virus bedingte Agglutination von Erythrozyten während eines Hämagglutinationsassay, zeigte aber dafür eine starke Inhibition der virusinduzierten Hämolyse. Mittels *molecular modelling* wurde die

Bindungsstelle für den Liganden am Übergang der beiden Untereinheiten des HA's vorausgesagt, wodurch die Präsentation des für den *entry* benötigten Fusionspeptids inhibiert wird^[69]. Durch *screening* Verfahren entdeckten Yoshimoto *et al.* Stachyflin (Abbildung 8, b) als subtypspezifischen Inhibitor. Dieser hatte einen EC_{50} Wert im mikromolaren Bereich gegenüber H1 und H2, nicht jedoch gegenüber H3. Durch Inhibition der virusinduzierten Hämolyse konnte auch hier HA als *target* identifiziert werden^[70]. Jones *et al.* berichten von einem Dodecapeptid, welches spezifisch die Agglutination von Erythrozyten durch Influenza-Viren unterdrücken konnte. Damit gehört dieses Peptid in die Gruppe der kompetitiven Inhibitoren. Der IC_{50} wurde in einem Zellassay zu 4.5 μM bestimmt. In einem Maus Modell überlebten 100% der Mäuse die intranasale Gabe von 2 mM des Peptids zusammen mit Influenza-A/H5N1 Viren, wohingegen alle Mäuse, die ohne die gleichzeitige Gabe des Peptids mit H5N1 infiziert wurden, starben. Die genaue Bindungsstelle konnte nicht geklärt werden^[71]. In einem multivalenten Ansatz konnte von Marra *et al.* ein Ligand (Abbildung 8, d) identifiziert werden, welcher die Hämagglutinin bedingt Agglutination von Erythrozyten inhibierte. Dieser Ligand verfügt über ein Calix[4]aren Grundgerüst, an das über 1,3-dipolare Cycloaddition das Thioglycosid der Neuraminsäure gebunden wurde. Dieser konnte bei einer Konzentration von 250 μM die Hämagglutination unterbinden und zeigt damit eine etwa 400fach höhere Aktivität als Neu5Ac^[17].

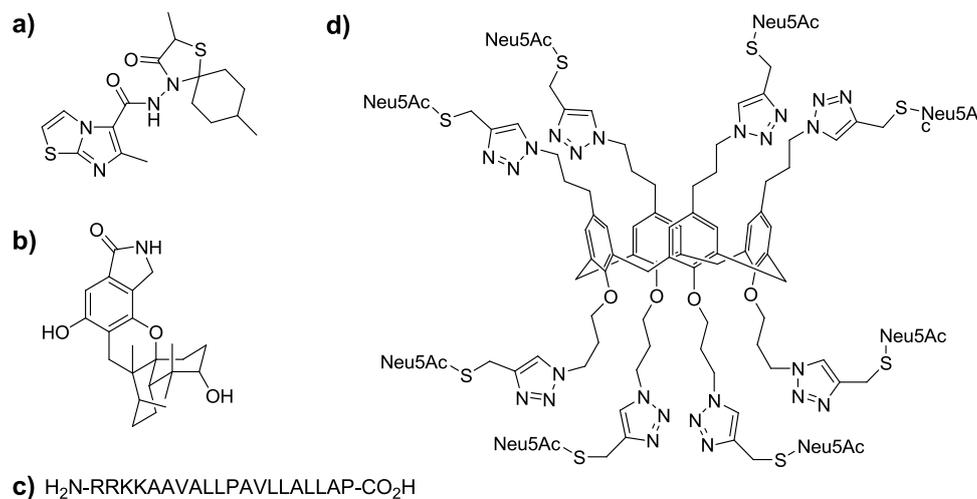


Abbildung 8: Beispiele einiger Influenza *entry*-Inhibitoren. Die von Naesens *et al.*^[69] (a) und von Yoshimoto *et al.*^[70] (b) untersuchten Liganden zeigten keinen Effekt auf die Hämagglutinin bedingte Agglutination von Erythrozyten, konnten aber die virusbedingte Hämolyse bei Gabe im niedrig mikromolaren Konzentrationsbereich unterdrücken. Bei diesen Verbindungen handelt es sich um Fusionsinhibitoren, die nicht den Kontakt zu der Wirtszelle, sondern die Fusion des Virus mit der Zelle unterbinden. Das von Jones *et al.*^[71] untersuchte Dodecapeptid (c), sowie der von Marra *et al.*^[17] dargestellte oktavalente Ligand auf Calix[4]aren Basis (d), konnten die Hämagglutination unterbinden. Der IC_{50} Wert für das Dodecapeptid wurde dabei von Jones *et al.* im Zellassay zu 4.5 μM bestimmt. Das Peptid konnte bei gleichzeitiger Gabe mit H5N1 Viren im Maus Modell diese vor einer Infektion schützen. Der multivalente Ligand konnte ab einer Konzentration von 250 μM die Hämagglutination vollständig unterbinden.

Doch trotz der über 30jährigen Suche nach *entry*-Inhibitoren gegen die Influenza befindet sich noch kein einziger Inhibitor des Influenza Hämagglutinin in einer klinischen Phase^[72]. Da eine nächste Influenzapandemie kommen wird und Resistenzen gegen die auf dem Markt befindlichen Medikamente schon heute vielfach beobachtet werden, ist weitere Forschung auf diesem Gebiet von vitaler Bedeutung^[73, 74].

2 Zielsetzung

Multivalente Wechselwirkungen sind in der Natur ubiquitär und erfüllen vielfältige Aufgaben. Sie erlauben in biologischen Systemen durch eine stufenweise Bindung eine differenzierte Signaltransduktion, können definierte geometrische Strukturen induzieren und steigern sowohl die Affinität wie auch die Spezifität molekularer Wechselwirkungen. Eine solche Steigerung der Affinität findet bei molekularen Erkennungsprozessen statt, wie zum Beispiel der rezeptorvermittelten Bindung von Viren an ihre Wirtszellen. Auf Grund der Glycosylierung eukaryotischer Zellen findet ein solcher Erkennungsprozess häufig kohlenhydratvermittelt statt. Da die Protein-Kohlenhydrat-Interaktion eine vergleichsweise schwache Wechselwirkung ist, nutzen Viren häufig multivalente Wechselwirkung für den Primärkontakt zur Wirtszelle. Ein besseres Verständnis multivalenter Wechselwirkungen oder das gezielte Nutzen dieser stellt damit in vielen biologisch relevanten Bereichen einen Nutzen dar und könnte bei der Bekämpfung von Pathogenen helfen.

Ziel der Arbeit war das strukturbasierte Design, die Synthese und die Untersuchung eines multivalenten Liganden am Beispiel des Hämagglutinins H5 des Vogelgrippevirus. Ein wichtiger Aspekt war die experimentelle Validierung der Eignung von *in silico* Methoden beim Design multivalenter Liganden. Die computergestützte Untersuchung von Protein-Ligand Interaktion ist ein hochkomplexer Prozess. In wie weit ein *in silico* Modell bei einer multivalenten Wechselwirkung zu experimentell bestätigbaren Daten führen kann, war unklar und sollte überprüft werden. Hierzu sollte eine Leitstruktur¹ gefunden und von dieser abgeleitet eine Substanzbibliothek zur Überprüfung der *in silico* Voraussagen dargestellt werden. Die erfolgreiche Synthese, Reinigung und Charakterisierung dieser Liganden sollte optimiert und in ein auf andere Systeme leicht zu übertragendes Konzept eingepflegt werden. Die Untersuchung der Liganden bezüglich ihrer Wechselwirkung zu H5 sollte mittels zweier analytischer Verfahren erreicht werden. Zum einen sollte die STD-NMR Spektroskopie als statisches Messverfahren dienen. Zum anderen wurde die SPR-Spektroskopie als Messverfahren im strömenden Medium gewählt, da dies einem biologisch relevanten System nahe kommt. Abschließend sollten die *in vitro* Experimente in eine ganzheitliche Betrachtung mit den *in silico* Ergebnissen eingehen und so die allgemeine Eignung computergestützter Methoden zur Entwicklung multivalenter Inhibitoren determinieren.

¹ Im engeren industriell pharmakologischen Sinn handelt es sich bei der hier in der Arbeit beschriebenen Struktur nicht um eine Leitstruktur. Diese Struktur diente aber für weitere Liganden im Rahmen dieser Arbeit als Leitstruktur und wird zur Vereinfachung hier auch als solche bezeichnet.

3 Ergebnisse und Diskussion

Das virale Oberflächenprotein Hämagglutinin (HA) ist unter allen Influenza Typen für den Primärkontakt mit der Wirtszelle verantwortlich und stellt damit ein potentielles *target* für einen Inhibitor dar. Die Struktur des Influenza-Hämagglutinin ist gut untersucht und eine pdb-Suche nach „*influenza hemagglutinin*“ liefert derzeit 183 *hits*^[75], wobei sich die Treffer aus den verschiedenen HA Typen (H1-H16) aus verschiedenen Influenza-Stämmen, den unterschiedlichen Reifungsstadien, kleineren und größeren Fragmenten des HA oder aus Komplexen zwischen Antikörpern und HA zusammensetzen. Zehn Einträge befassen sich mit dem in dieser Arbeit thematisiertem H5, von denen zwei Strukturen die Basis dieser Arbeit bilden.

Die vorliegende Arbeit lässt sich in fünf Abschnitte gliedern. Basis dieser Arbeit stellt eine vorausgegangene Arbeit dar^[76], welche im Rahmen einer Diplomarbeit angefertigt wurde. Für einen besseren Einstieg wird diese Arbeit in Kapitel 3.1 kurz zusammengefasst. In Kapitel 3.2 werden Versuche zur Optimierung der Synthese des in Kapitel 3.1 beschriebenen Liganden vorgestellt, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden. Da diese Synthesen mit nur mäßigem Erfolg durchgeführt werden konnten, wird in Kapitel 3.3 die Weiterentwicklung und in Kapitel 3.4 und 3.5 die Synthese der neuen Leitstruktur beschrieben. Die Kapitel 3.6 und 3.7 beschreiben die Bindungsstudien der dargestellten Verbindungen zum H5. Im letzten Kapitel (3.8) werden kurz synthetische Studien vorgestellt, die zur Erweiterung des Valenzgrades des Liganden mit der besten Bindungsenergie unternommen wurden.

3.1 Entwicklung der Leitstruktur

Die Grundlage der vorausgehenden Arbeit zum Design und Synthese multivalenter Inhibitoren des Influenza H5 bildeten die Kristallstrukturen 1JJO^[11] und 2IBX^[12]. Die Kristallstruktur 1JJO zeigt ein HA Monomer kokristallisiert mit Neuraminsäure, 2IBX zeigt HA als Trimer, jedoch in schlechterer Auflösung und ohne nativen Liganden. Diese Strukturen wurden in Sybyl aufeinander gefittet und mittels des *structure preparation tools* und durch energetische Minimierung für die weiteren Arbeiten vorbereitet. Ein Trimer in guter Auflösung mit nativem Liganden wurde erhalten und ist in Abbildung 9 gezeigt.

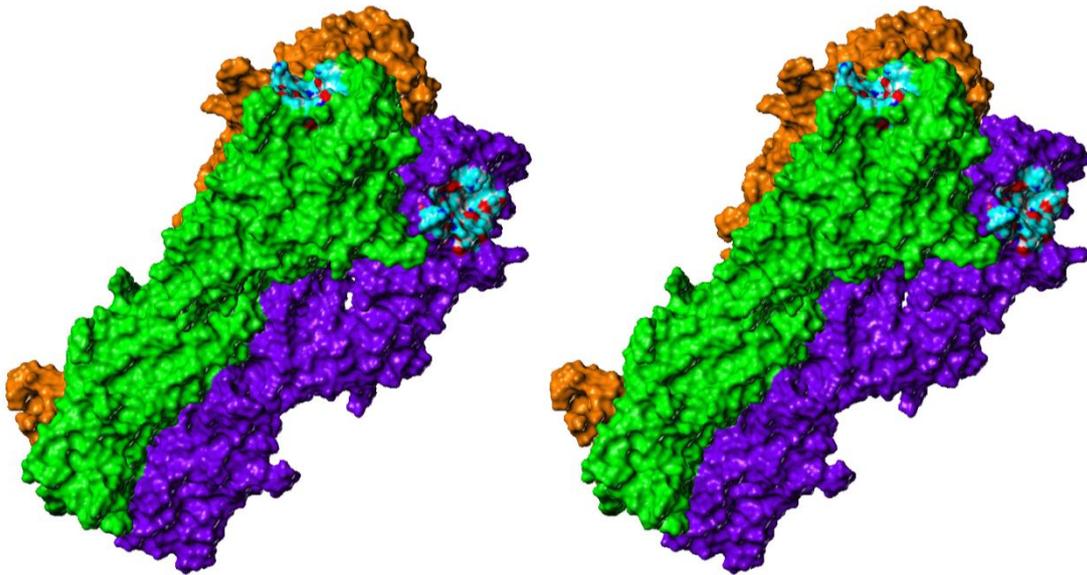


Abbildung 9: *Crossed eye* Darstellung des homotrimeren Hämagglutinins. Die Oberflächen der einzelnen Monomere sind unterschiedlich farblich dargestellt. Jedes Monomer ist aus zwei Untereinheiten aufgebaut, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Das Molekül hat eine stabchenförmige Geometrie, wobei sich die Bindungstaschen - hier atomtypspezifisch eingefärbt - distal zur Virusmembran am Kopf der globulären Domäne der HA₁-Untereinheit befindet.

Die primäre Bindungstasche befindet sich am Kopf der globulären Domäne der HA₁-Untereinheit distal zur Virusmembran und ist für das Binden sialyierter Kohlenhydratstrukturen der Wirtszelloberfläche verantwortlich. Durch diese exponierte Lage bot sich das Design eines multivalenten Liganden an, der über eine zentral positionierte *core*-Struktur die einzelnen Bindungstaschen zeitgleich erreichen kann. Es wurde eine Struktur entworfen, die über radiale Topologie^[20] mit C₃-Symmetrie verfügt und sich aus einer aromatischen *core*-Struktur, peptidischen Linkern und einem Neuraminsäurederivat zusammensetzt. Diese Struktur motive wurden über flexible Alkylketten miteinander verbunden. Auf Grund dieses Designs ergab sich ein ambivalenter Charakter für den Liganden. So verfügte dieser zum einen über einen peptidischen Linker mit eingeschränkter Flexibilität und zum anderen über Alkyl linker mit maximaler Flexibilität. Diese Motive entstammen

Überlegungen zur Natur multivalenter Effekte. So sollte das starre Peptid einen Verlust an Konformationsentropie im Bindungsfall gering halten, wobei die Alkylketten gleichzeitig für die Kompensation sterischer Diskrepanzen sorgen sollten^[19, 20]. Der angestrebte Bindungsmodus eines potentiellen Binders ist in Abbildung 10 gezeigt.

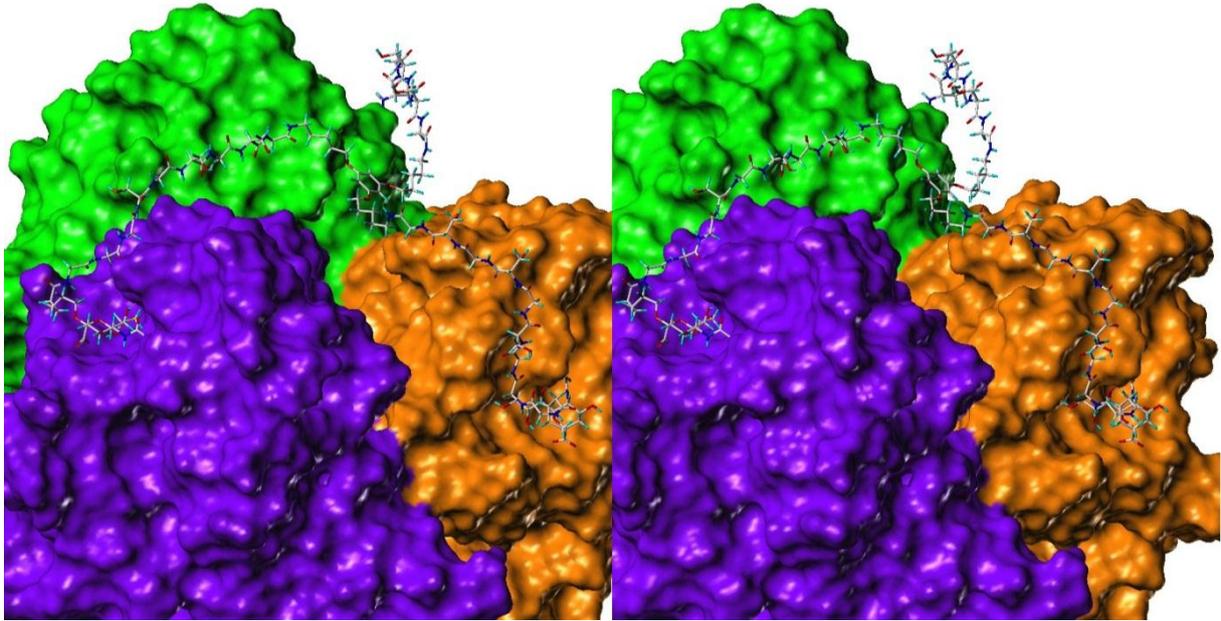
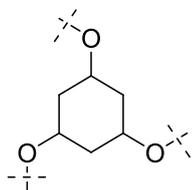
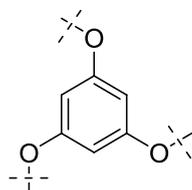
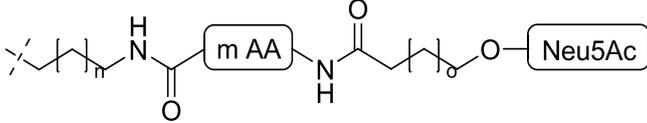


Abbildung 10: *Crossed eye* Darstellung der globulären Domäne des HAs zusammen mit einem potentiellen Liganden aus den *in silico* Studien. Die Oberfläche der einzelnen Monomereinheiten ist unterschiedlich farbig, der Ligand atomtypspezifisch dargestellt. Der Ligand, bestehend aus einer zentral positionierten *core*-Struktur, peptidischen Linkern und einem Neuraminsäurederivat, belegt in dem hier angestrebten Bindungsmodus alle drei Bindungstaschen eines HA-Trimers gleichzeitig.

Für die *in silico* Studien wurden Liganden mit verschiedenen *core*-Strukturen (Benzen, Cyclohexan, Adamantan), verschieden langen Linkern und verschieden langen Alkylkettenlängen *in silico* auf ihre Bindungsenergie zum Hämagglutinin hin untersucht. Der peptidische Linker sollte keine weiteren Wechselwirkungen generieren und daher aus einer möglich einfachen Sequenz aus Glycinen und Serinen bestehen, welche sich positiv auf die Löslichkeit des Liganden in Wasser auswirken sollten.

Die Ergebnisse des *molecular modellings* sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Aus den *in silico* Studien ging der Ligand mit der von Phloroglucinol abgeleiteten *core*-Struktur und Pentylketten zu beiden Seiten des peptidischen Linkers als Verbindung mit der niedrigsten Bindungsenergie hervor.

Tabelle 1: Zusammenfassung der Ergebnisse des *molecular modellings* aus der vorausgegangenen Diplomarbeit. Der Ligand **I**, mit einer Pentylkette zu beiden Seiten eines neun Aminosäuren langen Peptidlinkers und der von Phloroglucinol abgeleiteten *core*-Struktur ging als Ligand mit der niedrigsten Bindungsenergie hervor. Die berechneten Energien der anderen Strukturen sind relativ zu der Energie des Liganden **I** angegeben.

			
			
kalk. Bindungsenergie		kalk. Bindungsenergie	
n = 3		n = 3	
m = 8	79 [kcal/mol]	m = 8	76 [kcal/mol]
o = 0		o = 0	
n = 3		n = 3	
m = 8	76 [kcal/mol]	m = 8	87 [kcal/mol]
o = 2		o = 2	
n = 3		n = 3	
m = 9	78 [kcal/mol]	m = 9	68 [kcal/mol]
o = 1		o = 1	
n = 3		n = 3	
m = 9	10 [kcal/mol]	m = 9	0 [kcal/mol]
o = 2		o = 2	Ligand I

Da eine NMR spektroskopische Auswertung und damit eine erfolgreiche Sequenzierung einer alternierenden Gly/Ser Sequenz sich als schwierig erwies, wurde ein Alanin der Sequenz hinzugefügt, um das Maß an Symmetrie aufzuheben. Der gesamte Ligand **I** ist in Abbildung 11 gezeigt.

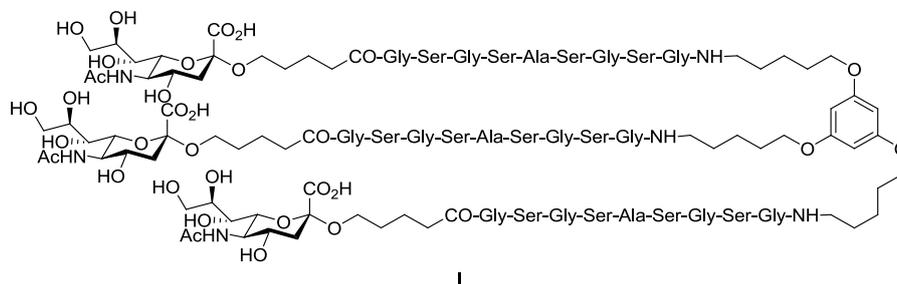


Abbildung 11: Darstellung des Liganden **I**, welcher aus den *in silico* Studien als Ligand mit der niedrigsten Bindungsenergie zum H5 hervor ging. Eine benzenische *core*-Struktur ist über eine etherisch gebundene Pentylkette mit dem peptidischen Linker verbunden. Dieser ist amidisch über eine weitere Pentylkette α -glycosidisch mit der Neuraminsäure verbunden ist.

Die retrosynthetische Analyse sah eine konvergente Synthesestrategie, bestehend aus drei Syntheseäquivalenten, vor. Diese sollten in zwei Stufen amidisch miteinander verknüpft werden, wobei zuerst der Peptidlinker an die *core*-Struktur und folgend das Neuraminsäurefragment gekuppelt werden sollte. Abschließend sollten die Schutzgruppen entfernt werden (Abbildung 12).

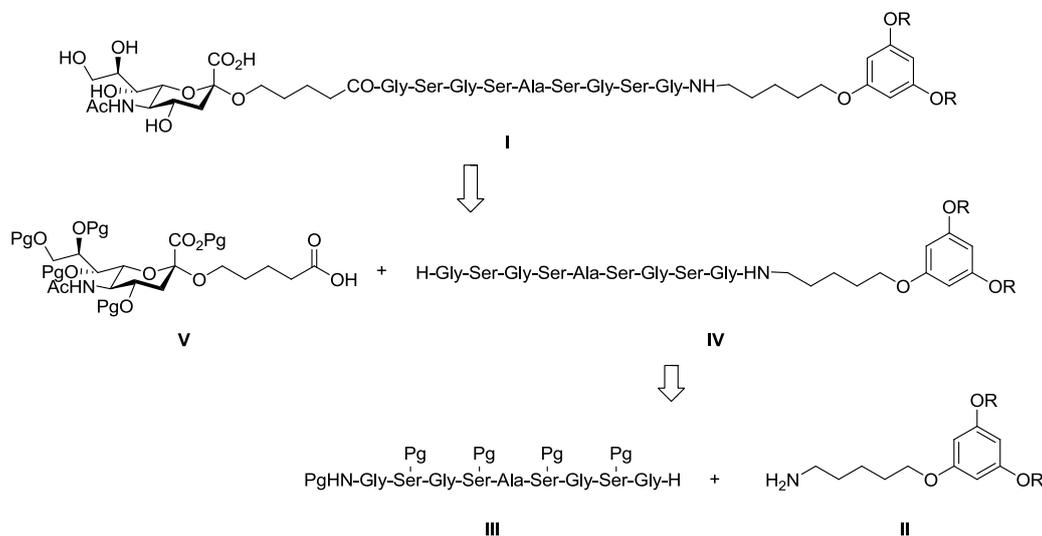


Abbildung 12: Retrosynthetische Analyse des Liganden **I**. Die konvergente Synthese sollte sich aus drei Bausteinen zusammensetzen, die über die Aktivestermethode amidisch miteinander verknüpft werden sollten. Dabei sollte zunächst die *core*-Struktur **II** mit dem Peptidlinker **III** zu **IV** verknüpft werden, bevor das Neuraminsäurefragment **V** an **IV** gekuppelt wird. Nach Entfernung der Schutzgruppen sollte Ligand **I** erhalten werden.

Es wurde die Synthese einer Substanzbibliothek angestrebt, da davon ausgegangen wurde, dass bereits geringe räumliche Fehlanordnungen zu einer vollständigen Inhibierung der Wechselwirkung mit H5 führen könnten. Angestrebte Derivatisierungen betrafen die beiden Alkylketten und die Länge des Peptids.

3.2 Synthetische Studien zur Darstellung der Leitstruktur I

Die in Kapitel 3.1 beschriebene Synthesestrategie schien einen unkomplizierten Zugang zu den Liganden zu ermöglichen. Bei der praktischen Umsetzung ergaben sich synthetische Schwierigkeiten an mehreren Stellen, die letztendlich zu der in Kapitel 3.3 beschriebenen Weiterentwicklung der Leitstruktur führten. Die sich ergebenden Schwierigkeiten und die Versuche, die unternommen wurden, diese zu beseitigen, sind in diesem Kapitel beschrieben.

Ausgangsverbindung für die aromatische *core*-Struktur stellte Phloroglucinol (1,3,5-Trihydroxybenzen) **VII** dar. Dieses wurde in einer dreifachen Williamson'schen Ethersynthese mit einem dem Dihalogen **VI** umgesetzt (Abbildung 13).

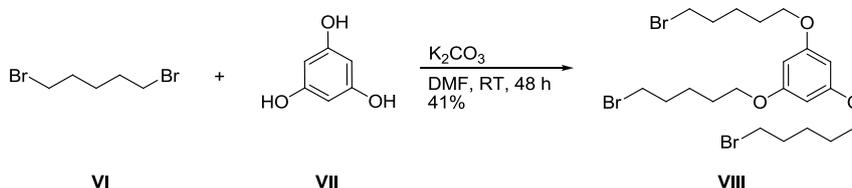


Abbildung 13: Darstellung der *core*-Struktur. In einer dreifachen Williamson'sche Ethersynthese wurde das Dihalogen **VI** mit Phloroglucinol **VII** umgesetzt. Die Synthese verlief auch nach Optimierung in niedriger Ausbeute bei hohem Reinigungsaufwand.

Diese Stufe ist mehrfach in der Literatur beschrieben, verlief aber auch nach Optimierung in unbefriedigenden Ausbeuten von 21-41% und zeigte sich vor allem bei der Aufarbeitung als problematisch, da das verwendete Dihalogen nur durch eine Kombination aus Destillation und zweifacher Reinigung an Kieselgel quantitativ entfernt werden konnte^[77-79]. Im Rahmen der Darstellung einer Substanzbibliothek wurde die Synthese auch mit Kettenlängen von 4, 6 und 7 Methyleneinheiten durchgeführt, wobei sich stets die gleichen Schwierigkeiten ergaben.

Der darauffolgende Schritt bestand in einer dreifachen nucleophilen Substitution des Broms durch Einführung eines Azids und konnte in guten Ausbeuten durchgeführt werden^[79]. Anschließend sollte das Azid **IX** durch Reduktion zum Amin und damit in den Baustein **II** überführt werden.

Die Reduktion zum Triamin wurde sowohl hydrogenolytisch an Palladium/Aktivkohle als auch durch Staudinger Reduktion versucht^[79] (Abbildung 14). In einem 5 mg Testansatz konnte die Hydrierung erfolgreich durchgeführt werden. In einem größeren Ansatz konnte aber auf Grund der schlechten Löslichkeit des Triazids keine Umsetzung beobachtet werden. Die Reduktion nach Staudinger konnte in guten Ausbeuten durchgeführt werden, brachte aber Schwierigkeiten bei der Entfernung des Triphenylphosphinoxids aus dem Reaktionsgemisch mit sich, da **II** ein sehr schlechtes Löslichkeitsverhalten in den meisten organischen Lösungsmitteln zeigte. Die Reduktion mit

polymergebundenem Triphenylphosphin versprach zwar eine erleichterte Aufarbeitung, führte aber zu keinem Produkt.

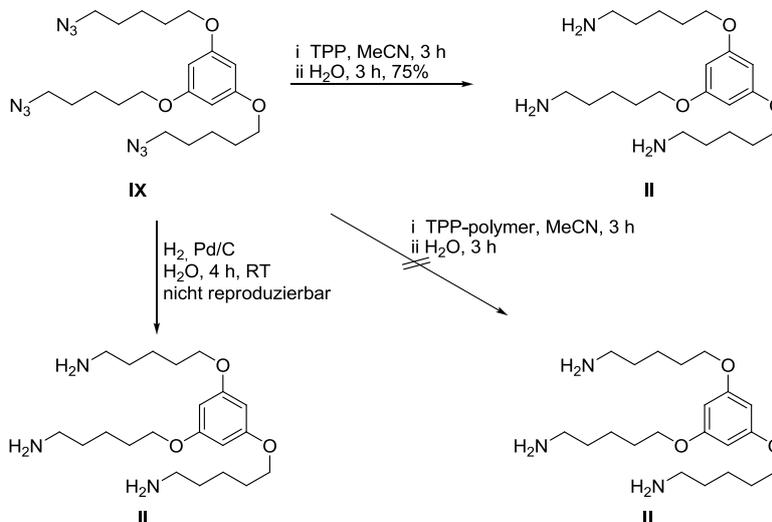


Abbildung 14: Synthesen zur Darstellung der *core*-Struktur **II**. Die Reduktion des Azids nach Staudinger mit TPP konnte in guten Ausbeuten durchgeführt werden, wobei die Entfernung des TPP=O sich als problematisch erwies. Eine Umsetzung mit polymer gebundenem TPP konnte nicht erfolgreich und die Hydrierung mit H₂ an Pd/C nicht reproduzierbar durchgeführt werden.

Auf Grund der geringen Löslichkeit von **II** in vielen organischen Lösungsmitteln wurde auf den Einsatz verlässlicher, aber reinigungsintensiver Reduktionsmittel wie Lithiumaluminiumhydrid verzichtet, da von Schwierigkeiten bei der Reinigung auszugehen war.

Um diese Löslichkeitsprobleme zu umgehen, wurden zwei weitere Strategien verfolgt. Zum einen wurde eine lineare Strategie an der festen Phase angestrebt. Dazu sollte ein Derivat der *core*-Struktur an ein Chlortriptylharz gebunden werden und hieran folgend alle weiteren Syntheseschritte durchgeführt werden. Der geplante Reaktionsweg ist in Abbildung 15 dargestellt.

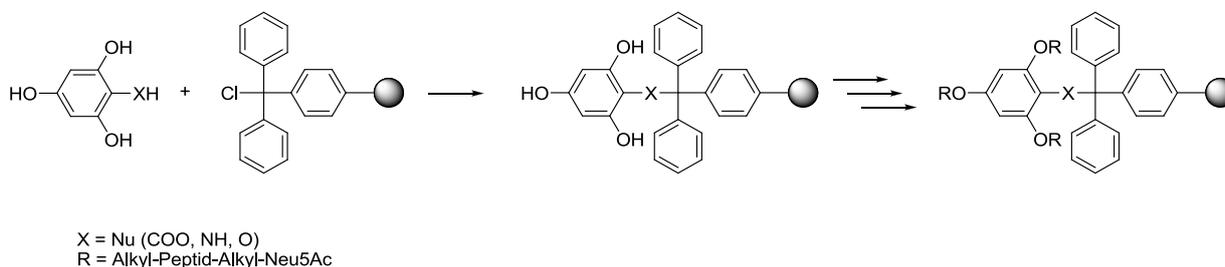


Abbildung 15: Konzept für einen linearisierten Zugang zu den *in silico* entworfenen Liganden an der festen Phase. Nach Kupplung der modifizierten *core*-Struktur an die feste Phase sollten die folgenden Syntheseschritte hieran durchgeführt werden. Die Kupplung muss je nach gewähltem X ungeschützt oder unter Schützung der phenolischen Hydroxyfunktionen erfolgen.

Die Kupplung an ein Chlortritylharz kann über verschiedene nukleophile Gruppen wie Carboxylate, Alkohole und Amine erfolgen^[80]. Um bereits etablierte Syntheseschritte inkorporieren zu können, wurde die Verwendung eines um eine dieser funktionellen Gruppen erweitertes Phloroglucinol Derivats versucht. Die funktionelle Gruppe mit der höchsten Nukleophilie wäre hier ein Amin, jedoch gab es nach Literaturrecherche weder eine Darstellung von 2-Amino-1,3,5-benzentriol noch einen in Europa oder den USA ansässigen kommerziellen Anbieter dieser Verbindung. Als Alternative bot sich die kommerziell verfügbare 2,4,6-Trihydroxybenzoesäure an, die aus Spaltung flavonoider Naturstoffe wie dem Quercetin erhalten werden kann^[81]. Auf Grund der geringeren Nukleophilie der Säurefunktion mussten die phenolischen Hydroxyfunktionen vor Kupplung an die feste Phase geschützt werden. Die versuchten Schützungen sind in Abbildung 16 zu sehen.

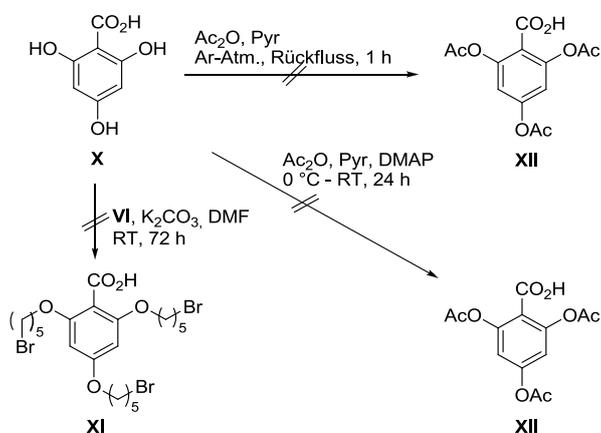


Abbildung 16: Versuche zur Schützung der phenolischen Hydroxyfunktionen von **X**. Die Schützung von **X** mit der in der weiteren Synthesestrategie vorgesehenen Alkylhalogenid **VI** führte ebenso wie eine Acetylierung sowohl mit DMAP als Katalysator, wie auch unter Rückfluss und Schutzgas mit frisch destillierten Reagenzien zu keinem Produkt.

Zunächst wurde versucht, die Hydroxyfunktionen mit den im Reaktionsverlauf vorgesehenen Alkylhalogenid **VI** in einer dreifachen Ethersynthese zu schützen. Dies führte zu keinem Produkt, so dass eine Acetylierung der Hydroxyfunktionen versucht wurde. Die Acetylierung der Phloroglucincarbonsäure (2,4,6-Trihydroxybenzoesäure) mit Essigsäureanhydrid und Pyridin konnte weder mit DMAP als Katalysator, noch unter Schutzgas und Rückfluss erfolgreich durchgeführt werden. Stattdessen wurde IR spektroskopisch eine quantitative Decarboxylierung des Edukts beobachtet. Eine Literaturrecherche nach Reaktionen mit Phloroglucincarbonsäure als Edukt lieferte lediglich zwei Veröffentlichungen und steht somit im Gegensatz zu der einfachen Struktur und des günstigen Preises der Verbindung^[82, 83]. Grund für die Diskrepanz ist vermutlich die starke Tendenz der Phloroglucincarbonsäure zu decarboxylieren. Die Decarboxylierung lässt sich durch das Keto-Enol Gleichgewicht der Phloroglucincarbonsäure erklären (Abbildung 17)^[81, 84].

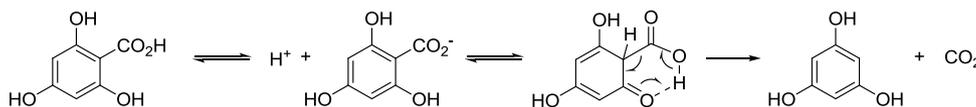


Abbildung 17: Der von Brown *et al.* postulierte Mechanismus zur Decarboxylierung von Phloroglucincarbonensäure^[84].

Da eine einfache Strategie zur Immobilisierung an der festen Phase ausgehend von Phloroglucincarbonensäure nicht möglich war, wurde auf die weitere Verfolgung einer vollständig linearisierten Synthesestrategie an der festen Phase verzichtet.

Eine weitere Möglichkeit, die schlechte Löslichkeit von **II** zu umgehen, bestand in der direkten Umsetzung des Triazids mit dem geschützten Peptid in einer Staudinger-Ligation. Diese Umsetzung wurde nach einer Vorschrift von Lindhorst *et al.* ohne positives Ergebnis durchgeführt (Abbildung 18)^[59]. Ein analoger Ansatz in DMF und mit DCC und HATU als Aktivatoren führte ebenfalls zu keinem Produkt. Gründe für das Nichtgelingen der Darstellung von **IV** mittels Staudinger Ligation sind in der schlechten Löslichkeit von **XIII** und **IX** in dem verwendeten Lösungsmittel und in der Verwendung von **XIII** als Rohprodukt zu sehen.

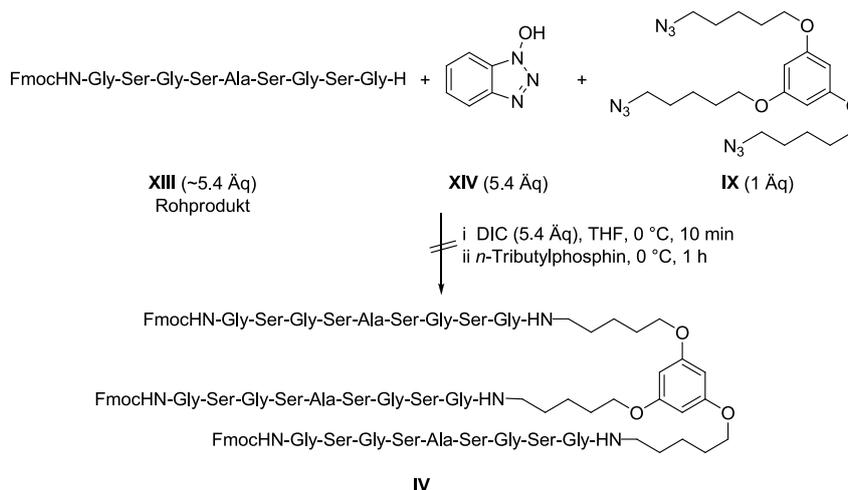


Abbildung 18: Versuch der Darstellung von **IV** aus dem geschütztem Peptid **XIII** und **IX** mittels Staudinger Ligation nach einer Vorschrift von Lindhorst *et al.*^[59]. Die schlechte Löslichkeit von **XIII** und **IX** in dem verwendeten Lösungsmittel, sowie der Einsatz von **XIII** als Rohprodukt sind die Hauptgründe, wegen derer die Reaktion zu keinem Produkt führte.

Die Verwendung des sowohl in organischen Lösungsmitteln wie auch in Wasser schlecht löslichen und damit nicht zu reinigenden Peptids **XIII** erwies sich auch in der Amidsynthese mit **II** als problematisch (Abbildung 19).

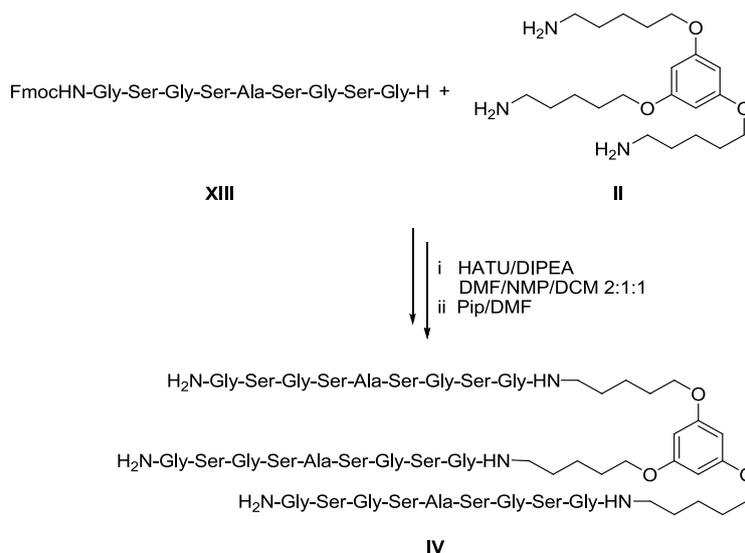


Abbildung 19: Synthese von **IV** ausgehend von **II** und dem Rohprodukt von **XIII** mit HATU als Aktivator in einem optimierten Lösungsmittelgemisch aus DMF/NMP/DCM 2:1:1 mit anschließender Entschützung. Auf Grund der uneinheitlichen Reinheit verlief die Reaktion in stark schwankender Ausbeute mit bis zu 35%.

Durch die Verwendung von **XIII** als Rohprodukt wirkten sich bei dreifacher Verknüpfung Verunreinigungen mit dritter Potenz auf die Ausbeute der Reaktion aus. Die starke Abhängigkeit der Ausbeute von der Qualität von **XIII** erklärt die schwierige Reproduzierbarkeit dieser Reaktion.

In Folge dessen wurden Reinheit und Ausbeute der Peptidsynthese an den Peptiden **XIV** und **XV** untersucht. Unter Standardbedingungen wurden die Peptide in einem 500 μmol Ansatz unter Verwendung der Aktivestermethode nach der Fmoc-Strategie an einem Mikrowellensynthesizer dargestellt (Abbildung 20). Für die Reinigung mittels *RP*-HPLC musste die *N*-terminale Fmoc Gruppe entfernt werden, da sie maßgebenden Einfluss auf die Löslichkeit der Peptide **XIV** und **XV** in wässrigen Systemen hat.

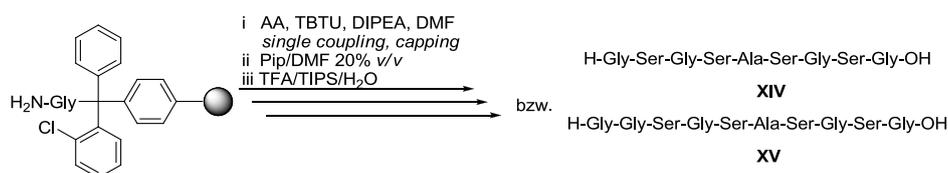


Abbildung 20: Darstellung der vollständig entschützten Peptide **XIV** und **XV** zur exemplarischen Bestimmung der Ausbeute. Die Peptide wurden an einem Mikrowellensynthesizer in einem 500 μmol Ansatz unter Standardbedingungen (CEM default cycles, single coupling, capping) an einem mit Glycin vorbeladenem 2-Chloro-tritylharz dargestellt und mittels *RP*-HPLC gereinigt.

Die Auswertung ergab eine Ausbeute von 49% für **XIV**, beziehungsweise von 60% für **XV**. Wie sich später heraus stellte, war die Ausbeute abhängig von der gewählten Ansatzgröße, wobei sich eine höhere Ansatzgröße positiv auf die Ausbeute auswirkt. Für die Untersuchung wurde die Ansatzgröße

sehr hoch gewählt. Für die häufiger dargestellten, kleineren Ansätze ist also von einer schlechteren Ausbeute auszugehen. Eine falsche Volumenzugabe sowie ein unvollständiges Entfernen der benötigten Reaktanden aus der Reaktionskammer des Mikrowellensynthesizers führten zu einer hohen Anzahl an Nebenprodukten^[85]. Für die hier durchgeführten Darstellungen ist die durchschnittliche Ausbeute von 91%, beziehungsweise von 94% pro Kupplungsschritt in Anbetracht der einfachen und kurzen Sequenz dennoch unbefriedigend.

In einem später durchgeführten 250 μmol Ansatz wurde die Reinheit von **XIV** untersucht. Hierzu wurde das Peptid unter analogen Bedingungen dargestellt. Nach Abspaltung vom Harz wurden wasserunlösliche Bestandteile mittels Zentrifugation entfernt und **XIV** mittels *RP*-HPLC gereinigt. Hier betrug die Ausbeute nur 15% Prozent bei einer gravimetrisch bestimmten Reinheit von nur 25% bezüglich der wasserlöslichen Bestandteile. Da das Peptid also trotz der einfachen Sequenz weder in zufriedenstellender Ausbeute noch in ausreichender Reinheit aus der automatisierten Synthese zu erhalten war, wurde geprüft, ob eine Reinigung nach Entschützung mit anschließender erneuter Schützung des *N*-Terminus mit (9-Fluorenylmethyl)-chloroformiat (Fmoc-Cl) nach Carpino *et al.* praktikabel war (Abbildung 21)^[86].

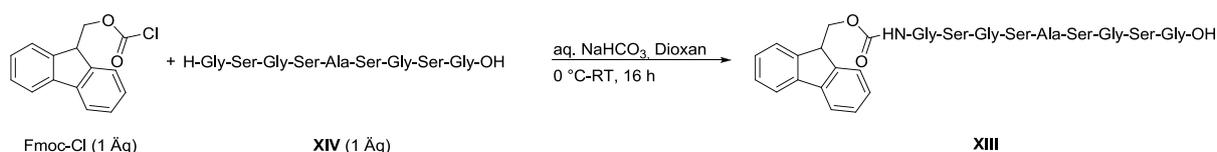


Abbildung 21: Schützung des *N*-Terminus von **XIV** nach Carpino *et al.* nach Reinigung von **XIV** mittels *RP*-HPLC^[86]. Bei Verwendung von nur einem Äquivalent Fmoc-Cl sollte auf Grund der hohen Nukleophilie des *N*-terminalen Stickstoffs dieser selektiv vor den Seitenkettenhydroxyfunktionen der Serine reagieren.

Bei Verwendung von nur einem Äquivalent Fmoc-Cl sollte durch die hohe Nukleophilie des Stickstoffs dieser selektiv vor den Seitenkettenhydroxyfunktionen reagieren. In der Literatur sind gute bis sehr gute Ausbeuten für einfache Systeme wie Glycin oder Tryptophan bei der Schützung durch Fmoc-Cl beschrieben. In einem komplexeren, wie dem hier untersuchten, System führte die Schützung durch Fmoc-Cl zu unbefriedigenden Ergebnissen und wurde als nicht praktikable Strategie verworfen. Zur Veranschaulichung ist in Abbildung 22 der amidisch/aromatische Bereich des NMR-Spektrums des gereinigten Peptids in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1 pH 3 (blau) im Vergleich zu dem gleichen Bereich des Rohprodukts nach Schützung durch Fmoc-Cl in $\text{DMSO}-d_6$ gezeigt.

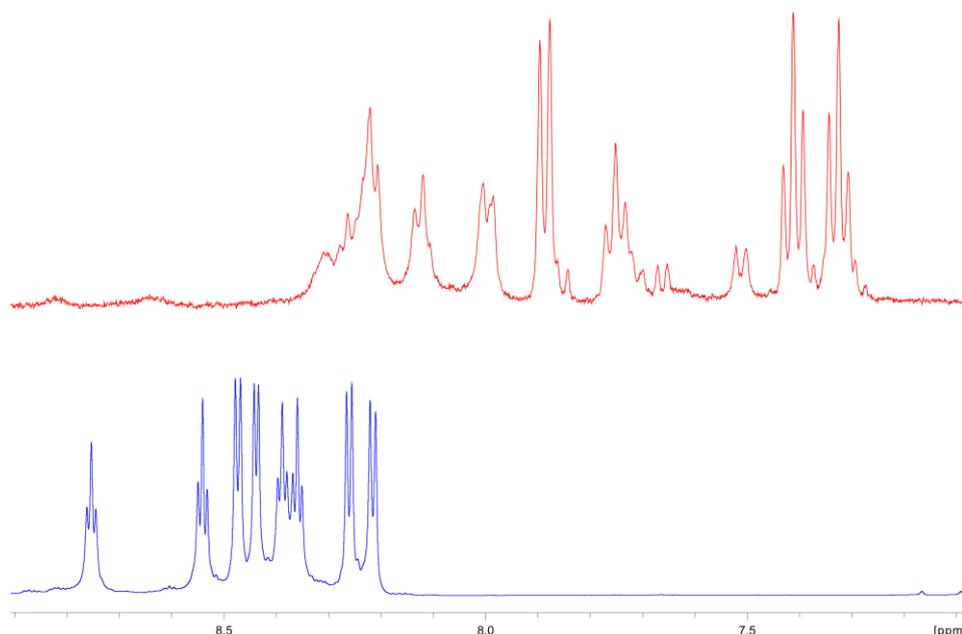


Abbildung 22: Auszug des amidisch/aromatischen Bereichs aus dem NMR-Spektrum von **XIV** in H₂O/D₂O 9:1 pH 3 (blau) und von **XIII** in DMSO-*d*₆ (rot). Es handelt sich um ein Spektrum des Rohprodukts, da eine Reinigung auf Grund der schlechten Löslichkeit in den meisten organischen Lösungsmitteln und wässrigen Systemen nicht möglich war. In dem Produktspektrum von **XIII** wären neben den bereits zuvor vorhanden amidischen Protonen zusätzlich vier transe entsprechend den aromatischen Protonen der Fmoc Schutzgruppe zu erwarten gewesen.

In dem Spektrum von **XIII** wären neben den bereits vorhandenen amidischen Protonen zusätzlich vier weitere Signale durch die aromatischen Protonen der Fmoc-Schutzgruppe zu erwarten gewesen. Potentielle Amidsignale treten jedoch im Vergleich zu den Fmoc Signalen mit deutlich geringerer Intensität auf. Auch wenn bei dieser Reaktion das gewünschte Produkt entstanden sein sollte, konnte kein synthetischer Vorteil durch die Einführung der zwei zusätzlichen Stufen erzielt werden.

Diese Versuche zeigten, dass neben den synthetisch handhabbaren Schwierigkeiten bei der Darstellung der *core*-Struktur **II** die Synthese des Peptids einen immanenten Schwachpunkt der Synthesestrategie² darstellt und so die gesamte Synthesestrategie überarbeitet werden muss.

² Das bereits erwähnte Hardware-Problem bedingte, dass es durch Zugabe falscher Volumina und durch ein unvollständiges Entfernen der überschüssigen Reagenzien zu einer unkontrollierten Vermischung der Reaktanden und in Folge dessen auch zu einer hohen Anzahl an Nebenprodukten kam.

3.3 Weiterentwicklung zu den in dieser Arbeit untersuchten Strukturen

Zunächst wurde nach einer Möglichkeit gesucht, die synthetischen Schwierigkeiten bei der Darstellung der *core*-Struktur zu vereinfachen. Ein potentiell interessantes synthetisches Äquivalent zur Darstellung einer C_3 -symmetrischen aromatischen *core*-Struktur schien Trimesoylchlorid (1,3,5-Benzentricarbonyltrichlorid) zu sein. Dieses könnte in einer Schotten-Baumann Reaktion mit einem einfach geschützten Diamin in nur einem Reaktionsschritt zu der geschützten *core*-Struktur umgesetzt werden. Bei entsprechender Wahl der Schutzgruppe sollte auch die Reinigung der geschützten Stufe und eine quantitative Umsetzung zum Triamin ohne weitere Aufarbeitung möglich sein. Die Schutzgruppe würde auch die Lagerstabilität positiv beeinflussen, so dass die Vorstufe erst unmittelbar vor Gebrauch zum Triamin umgesetzt werden könnte.

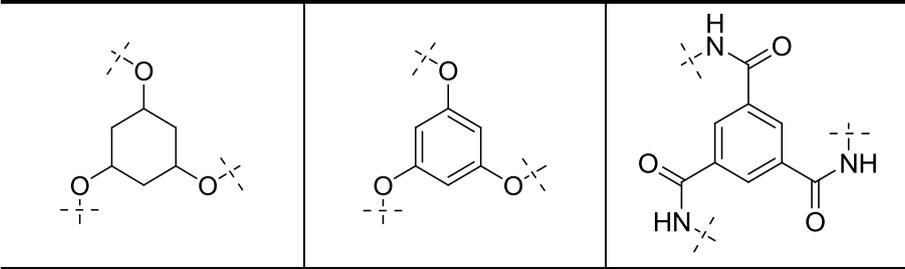
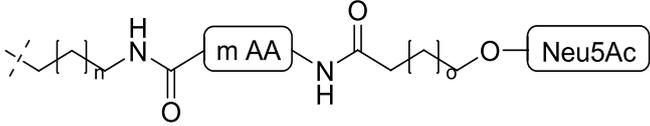
Die Eignung der modifizierten Struktur als potentieller Inhibitor des Influenza-Hämagglutinins-H5 wurde *in silico* überprüft. Um eine gute Vergleichbarkeit zu gewährleisten und um anwenderbedingte Heterogenität bei der Durchführung der *in silico* Studien für die einzelnen Strukturen auszuschließen, wurden alle Strukturen bezüglich ihrer Bindungsenergie zum H5 in Sybyl erneut berechnet. Die Berechnung der Bindungsenergie erfolgte nach Gleichung 6.

$$E_{\text{Bindung}} = E_{\text{PL}} - E_{\text{P}} - E_{\text{L}}$$

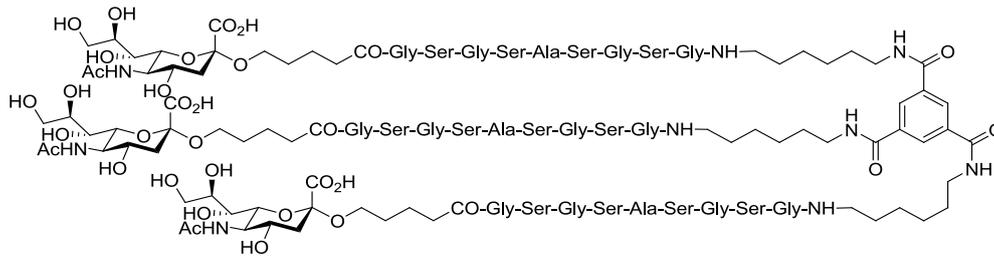
Gleichung 6: Berechnung der erwarteten Bindungsenergie bei Bindung des Liganden an das Protein, mit E_{PL} = Energie des minimierten Protein-Ligand Komplexes, E_{P} = Energie des Protein und E_{L} = Energie des Liganden.

Basis der Berechnungen blieb weiterhin das bereits beschriebene Trimer^[76] aus den Kristallstrukturen 2IBX^[12] und 1JSO^[11]. Es zeigte sich, dass das System sehr sensibel auf die verwendete Peptidlänge reagierte. Hier führte das Verkürzen um eine Aminosäure zu einem drastischen Verlust in der Bindungsenergie. Auch die Natur der verwendeten *core*-Struktur schien einen leichten Einfluss auf die Bindungsenergie zu haben. So zeigt die vom 1,3,5-Benzoltricarbonsäure (Trimesinsäure) abgeleitete *core*-Struktur bei ansonsten gleicher Alkylketten- und Peptidlänge eine leicht schlechtere Bindungsenergie. Dies ist nicht weiter verwunderlich, da sie über geringere Flexibilität auf Grund der Amid-Iminol-Tautomerie am *core* verfügt. Um diesen strukturellen Nachteil zu kompensieren, wurde die Vergleichbarkeit durch eine zusätzliche Methyleneinheit bei der triamidischen Struktur wieder hergestellt. Die Ergebnisse der *in silico* Studien sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Zusammenfassung der Ergebnisse der *in silico* Studien. Verschiedene Strukturen wurden bezüglich ihrer potentiellen Bindungsenergie zu H5 untersucht. Dabei wurden die bereits in der vorausgegangenen Arbeit untersuchten *core*-Strukturen erneut berechnet und um eine synthetisch vermutlich gut zugängliche *core*-Struktur, die sich vom Trimesoylchlorid ableitet, erweitert. Des Weiteren wurde die Energie bezüglich unterschiedlicher Peptidlängen *m*, sowie unterschiedliche Alkylkettenlängen zur Seite der Neuraminsäure *o* und zur Seite der *core*-Struktur *n* untersucht. Die Energien sind relativ zu dem Liganden **1** mit der niedrigsten Bindungsenergie angegeben.

		
		
kalk. Bindungsenergie	kalk. Bindungsenergie	kalk. Bindungsenergie
n = 3 m = 8 o = 1 7.0 [kcal/mol]	n = 3 m = 8 o = 1 8.5 [kcal/mol]	n = 4 m = 8 o = 1 18.0 [kcal/mol]
n = 3 m = 8 o = 2 14.0 [kcal/mol]	n = 3 m = 8 o = 2 15.7 [kcal/mol]	n = 4 m = 8 o = 2 17.0 [kcal/mol]
n = 3 m = 9 o = 2 1.1 [kcal/mol]	n = 3 m = 9 o = 2 1.3 [kcal/mol]	n = 4 m = 9 o = 2 0.0 [kcal/mol] Ligand 1
n = 2 m = 9 o = 2 1.5 [kcal/mol]	n = 2 m = 9 o = 2 2.3 [kcal/mol]	n = 3 m = 9 o = 2 3.4 [kcal/mol]
n = 4 m = 9 o = 2 0.2 [kcal/mol]	n = 4 m = 9 o = 2 1.1 [kcal/mol]	n = 5 m = 9 o = 2 4.4 [kcal/mol]

Aus den *in silico* Studien ging der von Trimesinsäure abgeleitete Ligand **1** als Verbindung mit der niedrigsten Bindungsenergie zu H5 hervor. Dieser besitzt sechs Methyleinheiten in der dem *core* proximalen Alkylkette, eine neun Aminosäuren lange Peptidsequenz und fünf Kohlenstoffatome in der Alkylkette zu Seiten der Neuraminsäure (Abbildung 23).



1

Abbildung 23: Struktur des Liganden mit der besten *in silico* Bindungsenergie zum H5. Die triamidische Struktur ist flankiert von Hexylaminen, die amidisch mit dem Peptidlinker, welcher sich aus neun Aminosäuren zusammensetzt, verbunden sind. Ebenfalls amidisch ist *N*-Terminal an das Peptid die Neuraminsäure α -glycosidisch über einen Pentyllinker gebunden.

Um eine gute Löslichkeit in wässrigen Systemen zu gewährleisten und so eine Analyse der Bindungseigenschaften zu H5 mittels SPR und NMR-Spektroskopie zu ermöglichen, wurde auch hier eine möglichst einfache, alternierende GSGS-Sequenz gewählt. Um das hohe Maß an Symmetrie einer alternierenden GSGS-Sequenz aufzuheben, wurde ein Alanin hinzugefügt.

Hier sei anzumerken, dass das untersuchte System sehr komplex ist und dass die Energieunterschiede zum Teil sehr gering waren. Zwar wird in der Literatur zum Beispiel über MD Simulationen des Bindungsmodus zwischen HA und den Zelloberflächenrezeptoren LSTa und LSTc berichtet^[87], jedoch gibt es keine Algorithmen oder *scoring* Funktionen, die in der Lage sind, speziell den statistischen Einfluss der Aviditätsentropie zu berücksichtigen^[24]. Dies bedeutet, dass in diesem Fall in die energetische Betrachtung vor allem elektrostatische, sterische und konformative Effekte einfließen. Die erhaltenen Ergebnisse ermöglichten eine eindeutige Vorhersage einer Tendenz, erlauben aber keine genaue Diskriminierung zum Beispiel auf Grund einer zusätzlichen CH₂-Gruppe. Gleichzeitig kann das Auftreten des multivalenten Effekts sensibel auf sterische Unstimmigkeiten reagieren. Aus diesem Grund wurde von Beginn an auf die Darstellung einer kleinen Substanzbibliothek Wert gelegt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf eine MD-Untersuchung verzichtet, da in der vorausgegangenen Diplomarbeit mittels MD-Simulation gezeigt werden konnte, dass ein gleichzeitiges Binden aller drei Neuraminsäuren möglich ist und dass sich dabei die einzelnen Neuraminsäuren nicht aus der Bindungstasche heraus bewegen^[76]. Der postulierte Bindungsmodus des Liganden **1** ist in Abbildung 24 und Abbildung 25 gezeigt^[76].

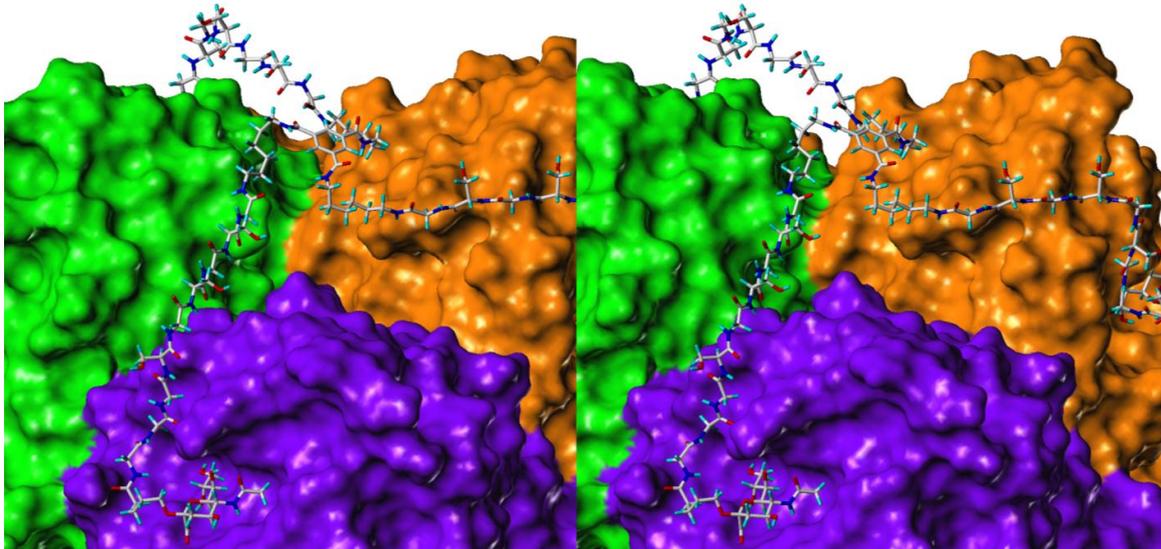


Abbildung 24: *Crossed eye* Darstellung des angestrebten Bindungsmodus zwischen Ligand **1** und H5 nach energetischer Minimierung. Zu sehen ist ein Ausschnitt der globulären Domäne des H5 in gebundenem Zustand mit dem Liganden. Die Oberflächen der einzelnen H5-Monomere sind verschiedenfarbig, der Ligand atomtypspezifisch eingefärbt. Die zentrale Positionierung der *core*-Struktur und eine Neuraminsäure in der Bindungstasche des violetten Monomers sind sehr gut zu erkennen.

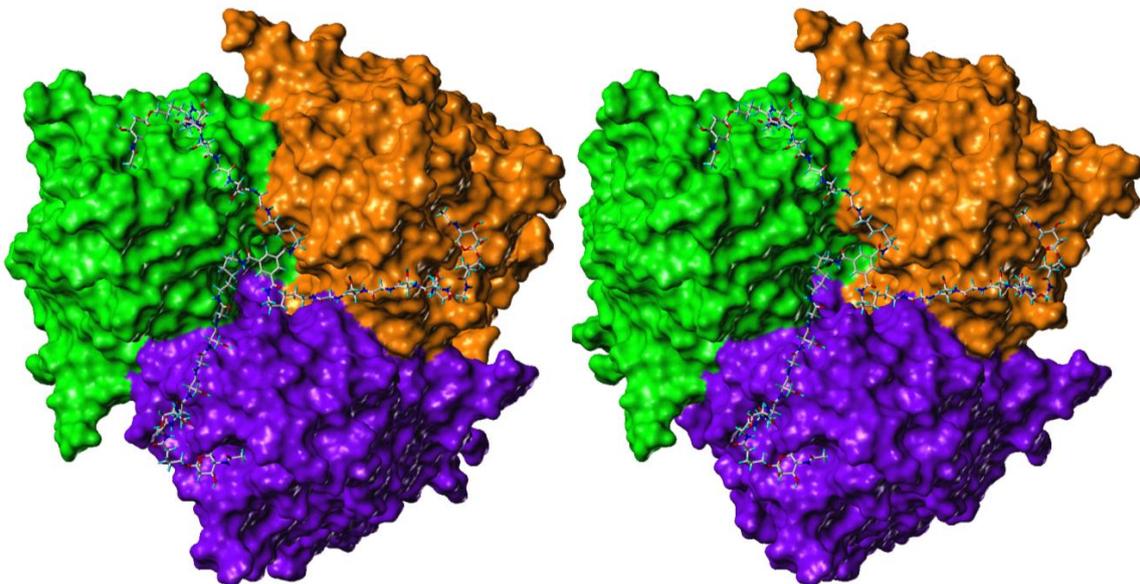


Abbildung 25: *Crossed eye* Darstellung eines H5 Trimers in gebundenem Zustand mit Ligand **1** von oben nach energetischer Minimierung. Die H5-Monomere sind verschiedenfarbig, der Ligand **1** atomtypspezifisch eingefärbt. Wie in Abbildung 24 ist auch hier die zentrale Positionierung des *cores* oberhalb des Proteins zu erkennen. Die drei Arme binden alle drei primären Bindungstaschen gleichzeitig. Linker- und Alkylkettenlänge erlauben dabei Freiraum für das Erreichen der Bindungstaschen.

In Abbildung 24 lässt sich erkennen, dass sowohl die der Neuraminsäure proximale Alkylkette, sowie Teile des Peptids in relativer Nähe zu dem Protein stehen. Um diesen Einfluss zu untersuchen, wurde

mit Hilfe von Maestro ein *LigPlot* (*ligand interaction plot*) angefertigt. Das Ergebnis ist in Abbildung 26 exemplarisch an einem Arm eines trimeren Liganden zu sehen.

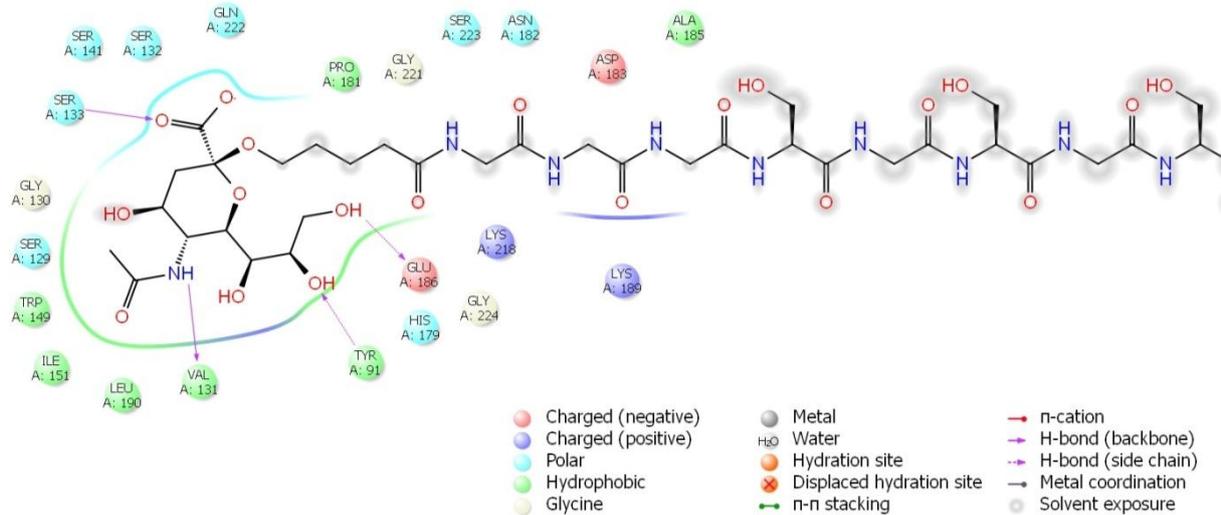


Abbildung 26: In Maestro generierter *LigPlot* eines trimeren Liganden in Kontakt mit H5. Gut zu sehen sind die starken Kontakte zwischen dem H5 und der Neuraminsäure, speziell der Säurefunktion in Position 1, der NHAc-Gruppe und der Glycerolseitenkette. Dies entspricht dem erwarteten Bindungsmodus bedingt durch die ausgeprägte Bindungskavität. Des Weiteren bestehen schwache Kontakte mit der Alkylkette und den ersten beiden Aminosäuren, welche aber in Vergleich zu den Kontakten zu der Neuraminsäure gering sein sollten.

Der angefertigte *LigPlot* zeigt in leicht unterschiedlich starker Ausprägung für die einzelnen Arme neben den Kontakten aus der Bindungskavität mit dem Neuraminsäurefragment leichte Kontakte zu Teilen der Alkylkette und zu der ersten und/oder zweiten Aminosäure. Für eine isolierte Untersuchung des multivalenten Effektes wäre ein völliges Ausbleiben der über die entsprechenden Monomere hinausgehenden Wechselwirkungen zwar wünschenswert, ist aber bei einer so ausgeprägten Kavität kaum realisierbar.

Mittels *molecular modellings* konnte die Funktionalität der von Trimesinsäure abgeleiteten *core*-Struktur bezüglich der Bindung zu H5 *in silico* überprüft und bestätigt werden. Dabei wies Ligand **1** nicht nur eine berechnete Bindungsenergie in ähnlicher Größenordnung im Vergleich zu den anderen *core*-Strukturen auf, sondern zeigte von allen *in silico* untersuchten Verbindungen die niedrigste Bindungsenergie. Es zeigte sich weiter, dass die Bindungsenergie sensibel auf die Länge des Peptidlinkers und der Alkylketten reagierte. Durch Darstellung einer Substanzbibliothek könnten die *in silico* beobachteten Tendenzen experimentell überprüft werden und so einen Beitrag zu der Überprüfung der Eignung des *molecular modellings* beim Design multivalenter Liganden leisten.

3.4 Entwicklung der neuen Synthesestrategie

Nach Neudefinition der Zielstruktur wurde eine geeignete Synthesestrategie entworfen. Die Synthese der *core*-Struktur ist für Alkylketten mit zwei und vier Methyleinheiten literaturbekannt und wurde analog zu Vorschriften von Trouche *et al.*^[88] und Matsuura *et al.*^[89] durchgeführt (Abbildung 27).

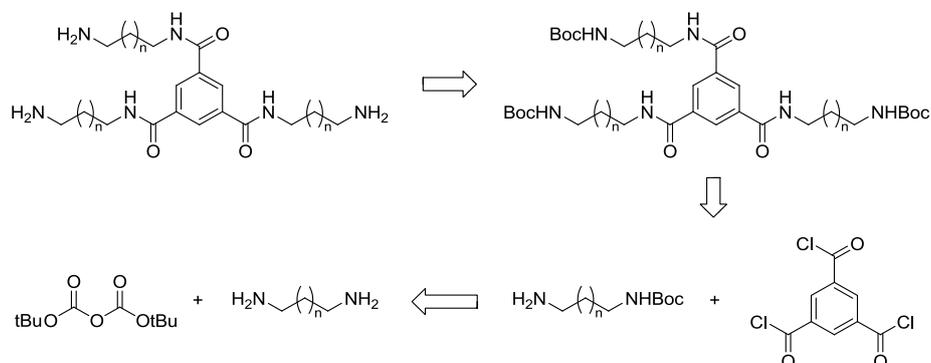


Abbildung 27: Retrosynthetische Analyse der *core*-Struktur^[88, 89]. Die Synthese beginnt mit der Darstellung eines einfach geschützten 1, ω -Diamins. Dieses synthetische Äquivalent ist kommerziell erhältlich, kann aber einfach aus dem entsprechenden Diamin mit kinetischer Kontrolle dargestellt werden. Das einfach geschützte Diamin kann dann in einer Schotten-Baumann-Reaktion mit Trimesoylchlorid zu der geschützten Verbindung umgesetzt werden, welche durch saure Hydrolyse der Boc-Schutzgruppe zu der Zielverbindung umgesetzt werden kann^[90].

Die Synthese des Neuraminsäurebausteins blieb weitestgehend unverändert. Es wurde lediglich der Methylester dem Benzylester als Schutzgruppe der Säurefunktion der Neuraminsäure vorgezogen, da dieser in quantitativen Ausbeuten sehr einfach darzustellen ist. In der vorausgegangenen Arbeit wurde der Benzylester gewählt, da befürchtet wurde, dass die Hydrolysebedingungen des Methylesters zu harsch für die im Molekül befindlichen Amidbindungen der stereogenen Aminosäuren sind. In der Literatur ist die Entschützung des Methylesters der Neuraminsäure in reinen Glycopeptiden jedoch beschrieben und kann mit großer Vorsicht durchgeführt werden^[47, 48, 91-93].

Auf Grund der in Kapitel 3.2 beschriebenen Schwierigkeiten wurde die konvergente Synthese modifiziert. Ein Problem bestand in der schlechten Löslichkeit des Fmoc geschützten Peptids **XIII**. Ein weiteres in der löslichkeitsbedingten Verwendung von **XIII** als Rohprodukt bei der dreifachen Kupplung an die *core*-Struktur. Hier war die Qualität des Rohprodukts von **XIII** nach Synthese im Synthesizer und Abspaltung vom Harz nicht ausreichend, um zu reproduzierbaren Ergebnissen zu führen. Eine mögliche Lösung dieser Probleme ist das Entfernen der *N*-terminalen Schutzgruppe und die Kupplung des Neuraminsäurebausteins an das Peptid noch an der festen Phase. Anschließend könnte dieses Glycokonjugat mittels *RP*-HPLC gereinigt werden und als sauberes Edukt in der Umsetzung mit der *core*-Struktur verwendet werden. Die Verwendung sauberer Edukte in einer Reaktion, in der mehrere äquivalente Reaktionszentren umgesetzt werden, ist, wie bereits erwähnt, von fundamentaler Bedeutung. Von dieser Strategie wurde auch eine einfachere Reinigung erwartet,

da Verunreinigungen sich auf Abbruchpeptide und Linkerfragmente aus der Abspaltung von der festen Phase beschränken sollten.

Durch die modulare Aufteilung in drei Bausteine - Neuraminsäurederivat, Peptid, *core*-Struktur - ist die Darstellung einer kleineren Substanzbibliothek durch Variation einzelner synthetischer Äquivalente leicht möglich. Des Weiteren kann die Verwendung der peptidischen Struktur durch Variation einzelner Aminosäuren zum Beispiel für die Erweiterung des trivalenten Konzepts durch weitere oder andere Bausteine genutzt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle Bausteine in verschiedenen Varianten synthetisiert, jedoch nur Variationen in der Peptidlänge und in der der *core*-Struktur proximalen Alkylkette im Rahmen eines vollständigen Liganden bezüglich ihrer Wechselwirkung mit H5 untersucht. Eine retrosynthetische Betrachtung der überarbeiteten Synthese-strategie ist in Abbildung 28 gezeigt.

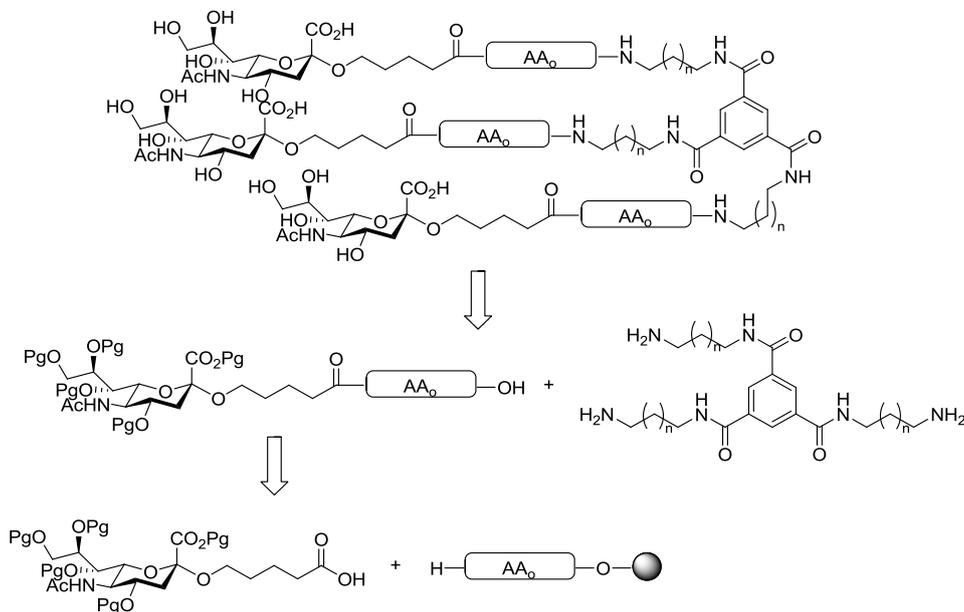


Abbildung 28: Die Synthese des Liganden erfolgt über die Darstellung eines Glycokonjugate an der festen Phase. Dieses sollte nach Reinigung mittels *RP*-HPLC mit der *core*-Struktur zu dem geschützten Liganden umgesetzt werden. Zum Erhalt des Zielliganden müssen abschließend die Schutzgruppen der Neuraminsäure entfernt werden.

3.5 Durchgeführte Synthesen

3.5.1 Darstellung der *core*-Struktur

Die Synthese der *core*-Struktur erfolgte nach Vorschriften von Matsuura *et al.*^[89] und Trouche *et al.*^[88]. Der Syntheseweg ist in Abbildung 29 beschrieben.

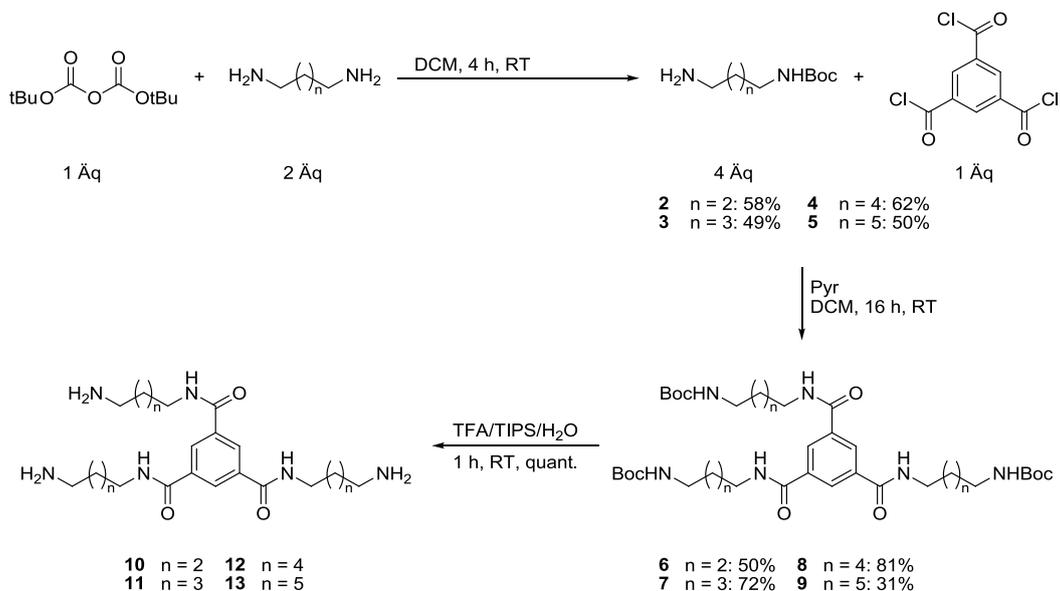


Abbildung 29: Synthesen der *core*-Struktur nach Trouche *et al.*^[88] und Matsuura *et al.*^[89]. In der Literatur sind Synthesen für $n = 0$ und $n = 2$ beschrieben. Die einfache Schützung des 1, ω -Diamins erfolgte kinetisch kontrolliert durch einen Überschuss an Diamin und die gewählten Reaktionsbedingungen. Die Schotten-Baumann-Reaktion erfolgte mit Pyridin als Base zur Neutralisation des sich bildenden HCl. Die Entschützung erfolgte mittels TFA/TIPS/H₂O 95:5:2 und lieferte nach Evaporation quantitativ das reine Produkt.

Die Synthesen sind für Kettenlängen von $n = 0$ und $n = 2$ in der Literatur beschrieben und konnten in ähnlichen bis besseren Ausbeuten durchgeführt werden. Die erhaltenen, einfach geschützten 1, ω -Diamine (**2-5**), sowie die Triamide (**6-9**) ließen sich säulenchromatographisch an Kieselgel reinigen. Die Boc-Gruppe bot den Vorteil, dass sie schnell und quantitativ entfernt werden konnte und sowohl die dafür benötigten Reagenzien, als auch die sich bildenden Spaltprodukte, CO₂ und Isobuten, volatil sind und durch Evaporation quantitativ entfernt werden konnten, wobei das Triamin (**10-13**) zurückblieb. Die geschützten Vorstufen (**6-9**) konnten im Grammaßstab hergestellt werden und wurden bis zur weiteren Umsetzung bei -20 °C gelagert. Zur weiteren Umsetzung wurde die entsprechende Menge der Verbindungen **6-9** in den Kolben überführt, in dem die Kupplung mit dem Glycokonjugaten erfolgen sollte, mittels TFA/TIPS/H₂O 95:5:2 entschützt und über Nacht im Vakuum getrocknet. Nach vollständiger Trocknung besaß das jeweilige Triamin eine glasartige Viskosität und wurde für die folgende Reaktion ohne weitere Aufarbeitung verwendet.

3.5.2 Darstellung des Neuraminsäurederivats

Für die Darstellung von carboxyfunctionalisierten Neuraminsäureglycosiden sind in der Literatur diverse Beispiele zu finden^[94-98]. Hierbei handelt es sich um Beispiele für $\alpha = 1, 3$ und 7 , wobei die Einführung der Säurefunktion durch Oxidation mit Kaliumpermanganat, Hydrolyse des entsprechenden Esters oder durch Kreuzmetathese erreicht wird. Der in dieser Arbeit gewählte Weg ist in Abbildung 30 gezeigt.

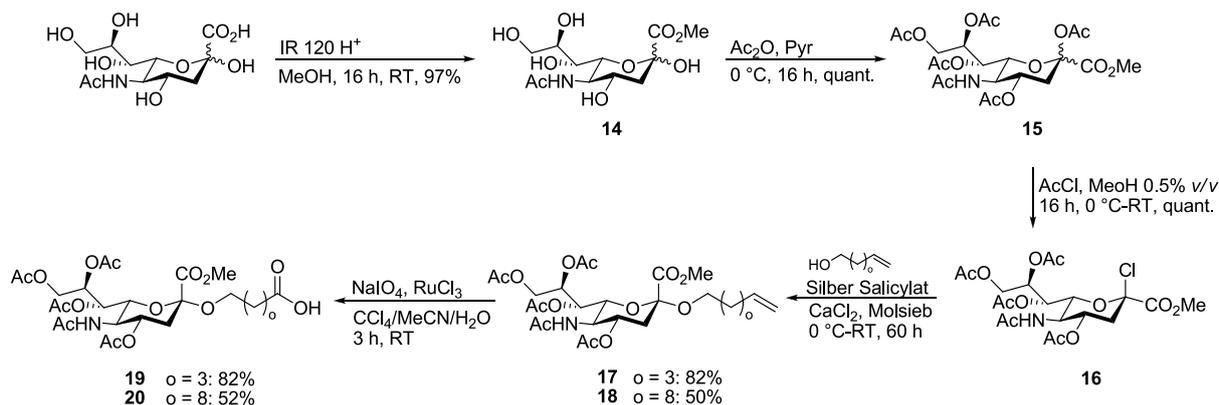


Abbildung 30: Darstellung des Neuraminsäurederivats. Ausgehend von Neuraminsäure wurde in drei Stufen in sehr guten Ausbeuten der Glycosyldonor **16** erhalten^[99-101]. Die Glycosylierung erfolgte mit Silbersalicylat als Promotor und mit dem Glycosylakzeptor als Lösungsmittel^[102, 103]. Die Oxidation der terminalen Doppelbindung mit *in situ* erzeugtem Rutheniumtetraoxid^[104, 105] lieferte unter Verkürzung der Alkylkette um einen Kohlenstoff den Baustein **19**, beziehungsweise **20**.

Die Darstellung des Neuraminsäurechlorids **16** als Glycosyldonor über die Darstellung des Methylesters **14** mit anschließender Acetylierung der Hydroxyfunktion zu **15** und Einführung des Chlorids am anomeren Zentrum zu **16** sind klassische Stufen der Neuraminsäurechemie und vielfach beschrieben^[99-101]. Es ist auch der direkte Weg von **14** zu **16** möglich und konnte erfolgreich durchgeführt werden. Allerdings wurden hier trotz Verwendung frisch destillierter Reagenzien Verunreinigungen wie die Bildung des Neuraminsäureglycals beobachtet, weshalb die mit geringem Mehraufwand verbundene Acetylierung als Zwischenstufe eingeführt wurde. Bei der Acetylierung wurde ein NMR spektroskopisch bestimmtes Anomerenverhältnis von α zu β von 1:4 erhalten. Der Einfluss des Promotors in der Königs-Knorr-artigen Reaktion wurde von Munasinghe *et al.* gut untersucht^[97]. Der dort beschriebene, positive Einfluss des von Veinberg *et al.*^[102] eingeführten und von Vliegthart *et al.*^[103] etablierten Promotors Silbersalicylat konnte auch im Rahmen dieser Arbeit bezüglich Ausbeute und α -Selektivität bestätigt werden. Silbersalicylat wurde selber hergestellt^[103] und unter Licht- und Feuchtigkeitsausschluss bei 4 °C gelagert. Zusätzlich wirkte sich die Verwendung des Glycosylakzeptors als Lösungsmittel in der Glycosylierungsreaktion positiv auf die Kinetik und die α -Selektivität aus. Die Oxidation der terminalen Doppelbindung erfolgte mit *in situ* erzeugtem Rutheniumtetraoxid nach Varianten von Engh *et al.*^[104] und Sharpless *et al.*^[105] unter

Freisetzung von Formaldehyd und damit einhergehender Verkürzung des Aglycons um einen Kohlenstoff.

Insgesamt konnte der Neuraminsäurebaustein in guten bis sehr guten Ausbeuten dargestellt werden. Die Synthese von **19** konnte in kurzer Zeit im Grammmaßstab ohne weiteres durchgeführt werden. Die schlechteren Ausbeuten bei dem Neuraminsäurederivat **20** könnten durch eine Mizellbildung hervorgerufen sein, die durch die längere Alkylkette begünstigt sein könnte.

3.5.3 Darstellung der Glykokonjugate 21-26

Die Darstellung der verschiedenen Glykokonjugate erfolgte mehrfach und es wurde in verschiedenen Ansätzen versucht, die optimalen Reaktionsbedingungen für die Kupplung des Neuraminsäurebausteins an das Peptid zu finden. Untersuchte Reaktionsparameter waren dabei die Temperatur, sowie die Konzentration und das Verhältnis der eingesetzten Reagenzien.

Die Synthese des Peptids erfolgte mittels Aktivestermethode mit TBTU und DIPEA unter Verwendung der Fmoc-Strategie an einem mikrowellengestützten Peptidsynthesizer. Die Kupplungsschritte wurden zweifach vorgenommen und es wurden *capping* Schritte durchgeführt. Es wurden die vom Hersteller optimierten *default cycles* für die einzelnen Schritte (*deprotection*, *coupling*, *capping*) sowie die Standardbedingungen bezüglich Konzentration der Reaktanden verwendet. Ein Fmoc-monitoring mittels eines vom Hersteller angebotenen Zusatzgerätes erwies sich auf Grund paradoxer Werte und ungenauer Angaben als wertlos. Die N-terminale Fmoc Gruppe wurde manuell abgespalten und eine Dibenzofulvenbestimmung durchgeführt, welche als Bezugsgröße für die folgende Kupplung des Neuraminsäurebausteins **19/20** diente.

Vor Kupplung des Neuraminsäurebausteins wurde das Harz in DMF gequollen. Dadurch wurde eine optimale Verfügbarkeit der terminalen Aminofunktion des Peptids gewährleistet, um so einen möglichst hohen Umsatz von Beginn an zu erreichen. Dies war wichtig, da der deutlich reaktivere Aktivator in der O-Acyluroniumsalz Form im Vergleich mit der Guanidiniumspezies im Falle von HATU über eine Halbwertszeit von lediglich zwei Minuten (Guanidiniumspezies $t_{1/2} = 7$ min) verfügt. Die Halbwertszeit der aktivierenden Spezies ist für TBTU nicht untersucht, sollte aber in der Größenordnung des vergleichbaren HBTU liegen, bei dem beide Spezies über eine Halbwertszeit von über einer Stunde verfügen^[106]. Folglich wurde die Präaktivierung der Säure möglichst kurz gehalten, da auch hier die reaktivere Spezies des O-Acyluroniumderivats in einer ähnlichen Zeitskala zur unreaktiveren Guanidiniumspezies isomerisiert^[107].

Neuraminsäurebaustein und Aktivator, welche zuvor im Feinvakuum getrocknet wurden, wurden in einem definierten Volumen Lösungsmittel gelöst, mit Aktivator Base versetzt und direkt zu dem

gequollen und das Peptid tragendem Harz gegeben und über Nacht geschwenkt. Ein signifikanter Einfluss einer N₂-Inertatmosphäre auf die Reaktionsausbeute konnte nicht beobachtet werden. Die Abspaltung vom Harz erfolgte zweifach mit TFA/DCM/TIPS/H₂O 20:20:1:1 oder mit TFA/TIPS/H₂O 95:5:2. Dabei wurde das Harz ausgiebig zunächst mit Abspatlösung, später mit Wasser gespült, da das Produkt mit seinem amphiphilen Charakter gut mit dem Polymer des Harzes in Wechselwirkung treten kann. Die Abspatlösung wurde eingengt, in H₂O/MeCN 7:3 aufgenommen, von unlöslichen Bestandteilen befreit und nach Gefriertrocknung mittels *RP*-HPLC an einer C₁₈ Säule gereinigt. Der Syntheseweg ist schematisch in Abbildung 31 gezeigt.

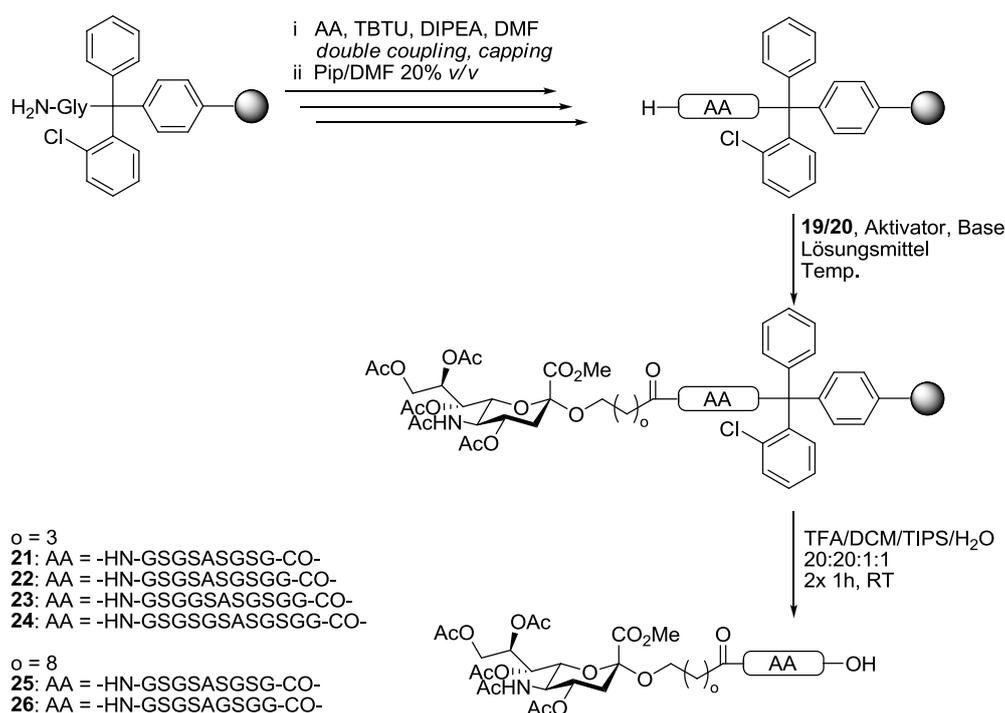


Abbildung 31: Schematische Darstellung der Synthese der Glycokonjugate **21-26**. Nach mikrowellengestützter Synthese des Peptids am Synthesizer wurde eine Dibenzofulvenbestimmung manuell durchgeführt. Das Ergebnis dieser Bestimmung diente für die eingesetzten Mengen an **19** beziehungsweise **20**, Aktivator und Aktivatorbase als Bezugsgröße. Die Abspaltung erfolgte zweifach unter ausgiebigem Spülen des Harzes mit Abspatlösung unter gleichzeitiger Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen der Serine.

Zunächst wurde der Einfluss der Temperatur, sowie der Konzentration und der Äquivalenzmenge des Neuraminsäurebausteins **20** an Hand der Glycokonjugate **25** und **26** untersucht. Es wurden zwei Nona- und zwei Dekapeptide in 250 µmol Ansätzen dargestellt und konnten laut Dibenzofulvenbestimmung in Ausbeuten zwischen 47% und 54% erhalten werden. Als Kupplungsreagenzien wurden in allen Ansätzen TBTU und DIPEA mit 5 Äquivalenten und einer Konzentration von 250 mM eingesetzt. **20** wurde in unterschiedlichen Konzentrationen und Äquivalenzverhältnissen eingesetzt. Da in vorausgegangenen Versuchen ein negativer Einfluss bei Erhöhung der Temperatur auf 40 °C

beobachtet wurde, wurde ein Ansatz bei 5 °C durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Untersuchung des Einflusses von der verwendeten Konzentration sowie der Äquivalenzmenge von Neuraminsäurebaustein **20** und der Temperatur. Die neun bzw. 10 Aminosäuren langen Peptide wurden am Synthesizer dargestellt und konnten nach manueller Dibenzofulvenbestimmung in Ausbeuten zwischen 47% und 54% erhalten werden. Die Zugabe von **20** erfolgte in Konzentrationen von 100, 150 und 200 mM und in Äquivalenzverhältnissen von 2 und 4 bezogen auf die Dibenzofulvenbestimmung. Des Weiteren wurde ein Ansatz bei 5 °C unter ansonsten analogen Bedingungen durchgeführt. Die angegebene Ausbeute bezieht sich auf die manuelle Dibenzofulvenbestimmung und damit auf die Kupplung des Neuraminsäurederivats an das Peptid.

20	25		26	
	2 Äq	4 Äq	2 Äq	2 Äq
c (20) [mM]	100	200	150	150
Temperatur	RT	RT	RT	5 °C
Ausbeute	21%	25%	22%	23%

Nach Reinigung mittels *RP*-HPLC konnte aus allen vier Ansätzen erfolgreich das gewünschte Produkt isoliert werden. Der Unterschied in der Ausbeute war im Rahmen der untersuchten Parameter gering, jedoch ließ sich eine gewisse Tendenz hin zu einem erhöhten relativen Überschuss und zu höherer Konzentration feststellen. Höhere Konzentrationen wurden nicht untersucht, da bei Konzentrationen des Neuraminsäurebausteins um 200 mM in DMF die Viskosität der Lösung stark zunahm. Die Erniedrigung der Temperatur zeigte keinen signifikant positiven Einfluss auf die Reaktionsausbeute.

In einer weiteren Messreihe wurde der Einfluss des verwendeten Lösungsmittels und der Aktivatorbase untersucht, da die Halbwertszeit der sich bildenden Intermediate auch von dem verwendeten Lösungsmittel und von der Menge und Natur der eingesetzten Base abhängt^[106]. Verglichen wurde das System DIPEA/DMF mit dem System NMM/NMP. Diese Messreihe wurde exemplarisch für die Verbindungen **23** und **24** durchgeführt. Es wurden 4 Peptide am Synthesizer in 250 µmol Ansätzen dargestellt und konnten nach manueller Dibenzofulvenbestimmung in Ausbeuten zwischen 34% und 42% erhalten werden. Neuraminsäurebaustein **19** wurde mit 2.5 Äquivalenten bezogen auf die Dibenzofulvenbestimmung in einer Konzentration von 100 mM eingesetzt, HATU und Aktivatorbase mit je 5 Äquivalenten. Die Reaktionsansätze wurden bei Raumtemperatur über Nacht geschwenkt. Die Ergebnisse dieser Messreihe sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Vergleich des Einflusses der verwendeten Aktivatorbase und des Lösungsmittels an Hand der Systeme DIPEA/DMF und NMM/NMP. Neuraminsäurebaustein **19** wurde mit 2.5 Äquivalenten bezogen auf die manuelle Dibenzofulvenbestimmung in einer Konzentration von 100 mM eingesetzt. HATU diente als Aktivator und lag wie die verwendete Aktivatorbase zu 5 Äquivalenten vor.

Produkt	DIPEA/DMF	NMM/NMP
	Ausbeute	Ausbeute
23	33%	49%
24	18%	20%

Auch hier konnte nach Reinigung mittels *RP*-HPLC aus allen vier Ansätzen das gewünschte Produkt isoliert werden. Für das Glycokonjugate **23** konnte durch die Verwendung von NMM als Aktivatorbase und NMP als Lösungsmittel eine deutlich Ausbeutesteigerung von 50% erzielt werden. Auch für das Glycokonjugat **24** konnte eine Ausbeutesteigerung festgestellt werden. Diese beläuft sich jedoch auf nur 10%. Weiter konnte festgestellt werden, dass die Länge der Peptidsequenz einen starken Einfluss auf die Reaktionsausbeute hat.

Die in dieser Untersuchung beste Reaktionsausbeute konnte unter Verwendung von 2.5 Äquivalenten Neuraminsäurebaustein **19** bei einer Konzentration von 100 mM erhalten werden. Als Lösungsmittel diente hier NMP, als Aktivator HATU und als Aktivatorbase NMM, welche zu je 200 mM vorlagen. Die Verwendung des Neuraminsäurebausteins in für die *SPPS* üblichen, hohen Überschüssen ist nicht effizient, da der Neuraminsäurebaustein aus dem Überstand nicht erfolgreich reisoliert werden konnte. Eine Zweifachkupplung des Bausteins bei Raumtemperatur an das Peptid mit je zwei Äquivalenten in dem System NMM/NMP scheint am effizientesten. Ein immanentes Problem der Synthese stellte erneut die Ausbeute und die Reinheit der Peptidsynthese dar. Die Dibenzofulvenbestimmung lieferte hier nur eine unbefriedigende Bezugsgröße für eine Optimierung. Die schlechten Ausbeuten der Peptidsynthese sowie die bei der Reinigung unerwartet hohe Anzahl an Nebenprodukten könnten auf die bereits in Kapitel 3.2 beschriebenen Hardware-Probleme zurückzuführen sein. Zur Veranschaulichung ist in Abbildung 32 exemplarisch das bei der Reinigung von **21** erhaltene UV-Chromatogramm bei einer Wellenlänge von 215 nm gezeigt.

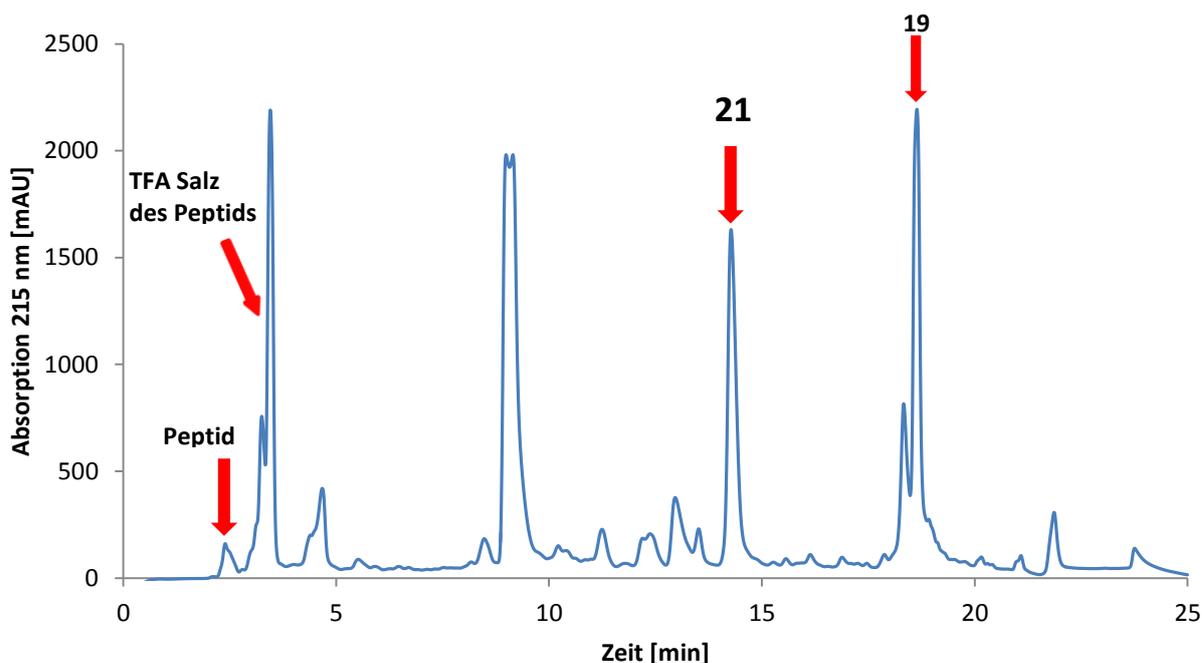


Abbildung 32: Das bei der Reinigung von **21** erhaltene UV Chromatogramm bei einer Wellenlänge von 215 nm. Aufgetragen ist die Absorption gegen die Zeit. **21** konnte basisliniensepariert isoliert werden. Daneben konnte eine für eine Festphasensynthese ungewöhnlich hohe Anzahl an Nebenprodukten beobachtet werden. Zu erwarten wäre neben dem Produkt lediglich nicht umgesetztes Peptid und Abbruchpeptide. Viele der Signale konnten auch mittels des ebenfalls akquirierten MS-Spektrums nicht zugeordnet werden.

Aus dem Chromatogramm geht die erfolgreiche, basisliniengetrennte Isolierung von **21** hervor. Daneben sind Signale zu beobachten, die auch mit Hilfe der akquirierten Massenspektren nicht zugeordnet werden konnten. Dies ist ungewöhnlich für eine Festphasensynthese mit nur neun Kupplungsschritten. Neben dem Produkt wäre hier nur unreaktiertes Peptid und Abbruchpeptide zu erwarten gewesen. Grund hierfür könnten die bereits erwähnten Hardware-Probleme sein, welche auch die schlechten Ausbeuten bei der Darstellung des Peptids erklären. Unbekannter Ursache ist das Vorhandensein von **19** im Chromatogramm. Durch die Waschschrte bei der Festphasensynthese sollten überschüssige Reagenzien nach Abspaltung von der festen Phase nicht im Rohprodukt vorhanden sein.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Glycokonjugate **21-26** erfolgreich dargestellt und die Reaktionsparameter optimiert werden konnten. Auf Grund der automatisierten Peptidsynthese bestand der synthetisch anspruchsvollste Teil in der Darstellung des Neuraminsäurebausteins **19**, beziehungsweise **20**. Da die Darstellung dessen im Grammaßstab möglich ist, konnte die eigentliche Darstellung der Glycokonjugate schnell durchgeführt werden. Die Reinigung mittels *RP*-HPLC konnte ebenfalls nach Optimierung des Gradienten erfolgreich und in guter Reinheit erreicht werden. Mit denen in dieser Arbeit gesammelten Erfahrungen lassen sich Varianten dieses Glycokonjugats innerhalb von 4-5 Tagen ohne großen Aufwand darstellen und reinigen, vorausgesetzt, dass der Neuraminsäurebaustein bereits vorhanden ist.

3.5.4 Darstellung der geschützten Liganden 27-32

Die Synthesen der Verbindungen **27-32** wurden wiederholt durchgeführt. Dabei wurde der Einfluss des Aktivators, die verwendete Menge und Konzentration an Glycokonjugat und der Einfluss von Mikrowellenstrahlung auf die Ausbeute untersucht.

Für die Darstellung der geschützten Verbindungen **27-32** wurden die *core*-Strukturen **6**, beziehungsweise **8** in den Kolben überführt, in dem folgend die Kupplung stattfinden sollte und mittels TFA/TIPS/H₂O zu dem entschützten Triamin **10**, beziehungsweise **12** umgesetzt. Die bei der Entfernung der Boc-Gruppe entstehenden Produkte wurden im Feinvakuum entfernt. Anschließend wurden Glycokonjugat und Aktivator in einem definierten Volumen DMF gelöst, mit DIPEA versetzt und zu **10** beziehungsweise **12** gegeben. Die Ansätze wurden 16 h gerührt. Der Einfluss von Mikrowellenstrahlung auf die Reaktionsausbeute wurde ebenfalls untersucht. Die Darstellung der geschützten Liganden ist in Abbildung 33 schematisch gezeigt.

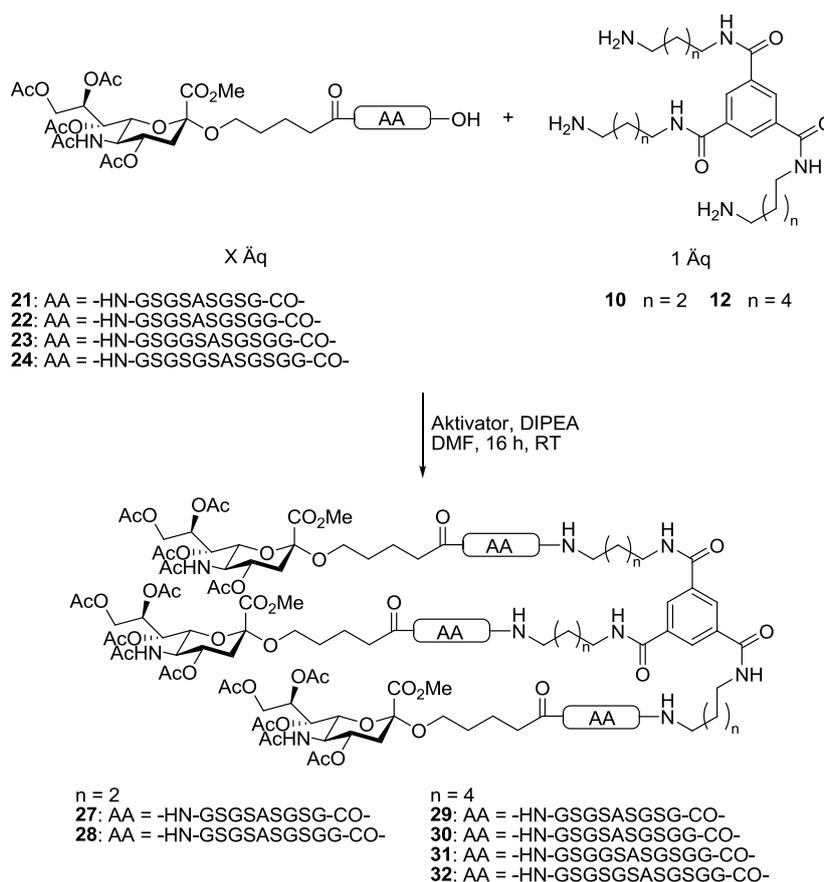


Abbildung 33: Schematische Darstellung der Synthese der geschützten Liganden **27-32**. Die Glycokonjugate **21-24** wurden zusammen mit dem Aktivator und DIPEA in einem definierten Volumen DMF gelöst und zu dem unmittelbar zuvor entschützten Triamin **10**, beziehungsweise **12** gegeben. Dabei wurden bei allen Versuchen pro Äq. Glycokonjugat 2 Äq. Aktivator und DIPEA verwendet. Die Kupplung erfolgte meist über Nacht bei Raumtemperatur, es wurden aber auch Ansätze in der Mikrowelle durchgeführt.

Am Beispiel von Verbindung **27** wurde zunächst der Einfluss des verwendeten Aktivators auf die Reaktionsausbeute untersucht. Unter ansonsten analogen Bedingungen wurde TBTU mit HATU als Aktivator verglichen. Glycokonjugat **21** wurde mit 4.5 Äquivalenten und einer Konzentration von 6.6 mM verwendet, Aktivator und Aktivatorbase entsprechend mit 9 Äquivalenten. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Tabelle 5 gezeigt.

Tabelle 5: Vergleich des Einflusses des eingesetzten Aktivators auf die Reaktionsausbeute bei der Synthese von **27**. **21** wurde mit 4.5 Äq. und einer Konzentration von 6.6 mM verwendet, Aktivator und Aktivatorbase mit je 9 Äq.. Die Reaktion erfolgte bei Raumtemperatur unter Rühren mit DMF als Lösungsmittel für 16 h.

Produkt 27	HATU	TBTU
Ausbeute	73%	48%

Aus dem Vergleich geht eine bessere Reaktionsausbeute für den unter Verwendung von HATU durchgeführten Ansatz hervor. In einer weiteren Versuchsreihe wurde am Beispiel der Darstellung von **29** versucht, dieses Ergebnis zu bestätigen. Daneben wurde der Einfluss der Konzentration und des relativen Überschusses des Glycokonjugats **21** untersucht. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: Untersuchung des Einflusses des Aktivators, sowie des relativen Überschusses und der Konzentration von **21** auf die Ausbeute bei der Synthese von Verbindung **29**. Aktivator und Aktivatorbase wurden mit je zwei Äquivalenten relativ zu **21** eingesetzt. Die Kupplung erfolgte bei Raumtemperatur in DMF für 16 h.

Produkt 29	HATU				TBTU	
	4.5	4.5	4.5	3.6	4.5	4.5
Äq (21)	4.5	4.5	4.5	3.6	4.5	4.5
c (21) [mM]	6.6	5.0	1.3	4.0	6.6	5.0
Ausbeute	65%	94%	67%	67%	50%	96%

Bei einer Glycokonjugatkonzentration von 5 mM ließ sich für beide Aktivatoren von einer quantitativ ablaufenden Reaktion ausgehen. Die geringen Verluste sind hier präparativer Natur und durch die Reinigung bedingt. Aussagekräftiger ist die Differenz von 15% bei den Ansätzen mit der höheren Konzentration von **21**. Hier konnte ein signifikanter Unterschied in der Reaktionsausbeute zu Gunsten von HATU als Aktivator festgestellt werden. Die im Vergleich zu den Ansätzen mit 5 mM **21** geringere Ausbeute ist auf das Löslichkeitslimit von **21** in DMF zurückzuführen. Bei Konzentrationen größer 5 mM stieg die Viskosität der Lösung sprunghaft und führte zu einer gelartigen Konsistenz,

welche sich negativ auf die Kinetik und somit auf die Reaktionsausbeute auswirkt. Die zu erwartende Tendenz zeigte sich folglich bei niedrigeren Konzentrationen und konnte experimentell bestätigt werden. Eine Erniedrigung des relativen Überschusses von **21** von 1.5 Äquivalenten pro Reaktionszentrum auf 1.2 Äquivalente pro Reaktionszentrum bei ansonsten ähnlicher Konzentration (aus praktischen Gründen konnte die angestrebte Konzentration von 5 mM bei dem Ansatz mit geringerem relativen Überschuss nicht erreicht werden) führte zu einem Verlust der Ausbeute von etwa einem Drittel. Gleiches konnte bei Erniedrigung der Konzentration von 5 mM auf 1.3 mM bei ansonsten gleichem relativen Überschuss festgestellt werden. Für das hier untersuchte System waren die Reaktionsbedingungen von 5 mM und 4.5 Äquivalenten **21** optimal.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Einfluss von Mikrowellenstrahlung auf die Reaktionsausbeute bei der Synthese von **31** und **32** untersucht. Dazu wurde je ein Ansatz bei Raumtemperatur für 16 h und ein Ansatz in der Mikrowelle durchgeführt. Die für die Mikrowelle gewählten Parameter sind in Kapitel 6.5.1.1 aufgeführt. Die für die Untersuchung verwendeten Glycokonjugate **23** und **24** wurden mit 4.5 Äquivalenten, HATU und DIPEA mit neun, beziehungsweise zehn Äquivalenten eingesetzt. **23** und **24** wurden in einer Konzentration von 2 mM verwendet, da sie in DMF bereits bei niedrigeren Konzentrationen als das kürzere Glycokonjugat **21** zu einer gelartigen Konsistenz führten. In Tabelle 7 sind die Ergebnisse der Untersuchung zusammengefasst.

Tabelle 7: Untersuchung des Einflusses von Mikrowellenstrahlung auf die Reaktionsausbeute bei der Synthese von **31** und **32**. Die Glycokonjugate **23**, beziehungsweise **24** wurden mit 4.5 Äq., HATU und DIPEA mit 9 beziehungsweise 10 Äq. relativ zu der *core*-Struktur **12** eingesetzt. Als Lösungsmittel diente DMF. Die verwendeten Mikrowellenparameter sind in Kapitel 6.5.1.1 aufgeführt.

Bedingungen	31		32	
	RT, 16 h	Mikrowelle	RT, 16 h	Mikrowelle
Ausbeute	25%	37%	26%	27%

Auch hier konnte aus allen vier Ansätzen nach Reinigung mittels *RP*-HPLC das gewünschte Produkt isoliert werden. Aus der mikrowellenbeschleunigten Reaktion geht für Verbindung **31** eine um 50% verbesserte Ausbeute hervor. Welche Effekte bei mikrowellenunterstützten Reaktionen zu der häufig gesteigerten Ausbeute führen, ist in der Wissenschaft umstritten. Eine neuere Veröffentlichung, in der die Effekte bei Peptidsynthesen systematisch untersucht wurden, legt einen rein thermischen Effekt nahe und schließt den positiven Einfluss durch das elektromagnetische Feld weitestgehend aus^[108]. Für Verbindung **32** konnte keine signifikante Zunahme der Ausbeute festgestellt werden. In beiden Fällen konnte durch den Einsatz von Mikrowellenstrahlung eine deutliche Verkürzung der Reaktionszeit

erreicht werden. Auf eine Untersuchung des Einflusses der verwendeten Aktivatorbase und des Lösungsmittels (DIPEA/DMF oder NMM/NMP) wurde hier verzichtet, da in dieser nasschemischen Reaktion von erheblichen Schwierigkeiten bei der destillativen Entfernung des hochsiedenden NMPs auszugehen war.

Bei der Darstellung der Liganden **27-32** konnte noch eine weitere Beobachtung gemacht werden. Beim Vergleich der mit den unterschiedlichen Glycokonjugaten **21-24** erzielten Ausbeuten fällt auf, dass diese mit länger werdendem Peptidanteil deutlich abnehmen. In Tabelle 8 sind die durchschnittlichen Ausbeuten über alle durchgeführten Ansätze zur Darstellung der Verbindungen **27-32** in Abhängigkeit der Anzahl an Aminosäuren der Glycokonjugate **21-24** aufgeführt.

Tabelle 8: Durchschnittlich erzielte Ausbeute über alle durchgeführten Ansätze zur Darstellung der geschützten Zielliganden **27-32** in Abhängigkeit von der Anzahl an Aminosäuren der eingesetzten Glycokonjugate **21-24**.

	9 AS (27/29)	10 AS (28/30)	11 AS (31)	12 AS (32)
Mittelwert Ausbeute	66%	47%	31%	27%

Es zeigt sich eine deutliche Abnahme der Ausbeute um mehr als die Hälfte bei der Verlängerung des Peptids um nur zwei Aminosäuren. Grund hierfür könnte eine stärkere Aggregation und somit eine verminderte Konzentration an Reaktionspartnern bei einer längeren Aminosäuresequenz sein. Dies zeigte sich auch in der verminderten Löslichkeit in DMF bei länger werdendem Peptidanteil der Glycokonjugate.

Die Reinigung der Rohprodukte erfolgte mittels *RP*-HPLC. Nach Optimierung des Gradienten konnten alle dargestellten Verbindungen basisliniengetrennt aus dem Reaktionsgemisch erhalten werden. Dass es sich bei der Darstellung um eine komplexe Reaktion handelt, wird an einem exemplarisch gewähltem UV-Chromatogramm deutlich, welches bei der Isolierung von Verbindung **27** erhalten wurde (Abbildung 34).

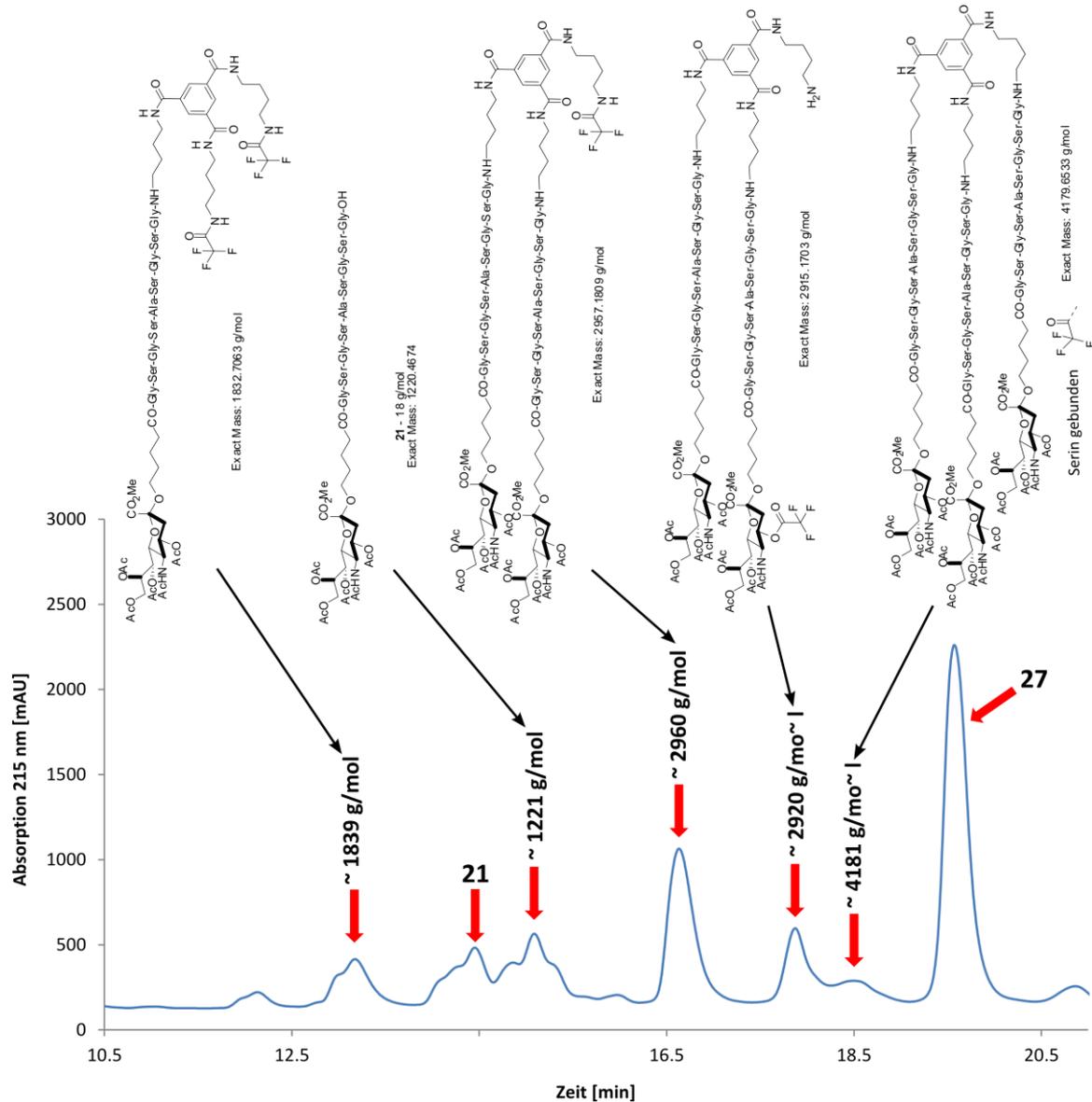


Abbildung 34: Ausschnitt eines während der Reinigung von **27** erhaltenen UV-Chromatogramms bei einer Wellenlänge von 215 nm. Mit Hilfe des MS-Spektrums wurden den UV-Signalen Massen zugeordnet. Neben dem Produktsignal **27** und dem Edukt Signal **21** wurden weitere Massen detektiert, die nicht eindeutig zugeordnet werden konnten. Die über dem Chromatogramm abgebildeten Strukturen stellen Vorschläge zur Erklärung der detektierten Massen dar, weisen jedoch mitunter einen deutlichen Massenunterschied auf.

Neben dem Produkt und Edukt Signal **27** und **21** sind in dem gezeigten Spektrum noch weitere Signale zu sehen. Mit Hilfe des Massenspektrogramms wurden den UV-Signalen Massen zugeordnet, wobei sich auf Signale mit relevanter Intensität beschränkt wurde. Auf Grund der geringen Auflösung des Massenspektrometers und des begrenzten Messfensters von bis zu 2000 Da erfolgte die Auflösung der mehrfach geladenen Ionen durch manuelle Dekonvolution der zu dem entsprechenden Zeitpunkt detektierten Massen über gemeinsame Vielfache. Dies ist natürlich fehlerbehaftet, so dass die hier angegebenen Massen einen ungefähren Bereich bedeuten. Dennoch konnten nicht alle Massen eindeutig im Rahmen eines Massenunterschiedes von ≤ 2 Da erklärt werden.

Kurze Zeit nach dem Edukt eluiert eine Verbindung mit der Eduktmasse des Glycokonjugats minus 18 Da. Dies konnte auch während der Reinigung der anderen geschützten Liganden **27-32** beobachtet werden, unabhängig von dem verwendeten Aktivator. Mögliche Erklärungen könnten eine Kondensation von H₂O durch Eliminierung einer Hydroxyfunktion in einem der Serine oder die intramolekulare Veresterung eines C-Terminus mit einer der freien Hydroxyfunktionen eines Serins sein. Nach Reaktion mit der *core*-Struktur konnte aber weder eine Eliminierung einer Hydroxyfunktion oder eine Veresterung über diese beobachtet werden, was für eine intramolekulare Kondensation spricht. Ein in der Seitenkette geschütztes Glycokonjugat war auf Grund der geringen Löslichkeit in Wasser nicht isolierbar und der Einsatz damit nicht praktikabel.

Daneben konnten Massen detektiert werden, die möglicherweise durch die Bildung von TFA-Amiden erklärt werden könnten (hier ist eine Massendifferenz zwischen detektierter und für die entsprechende Struktur erwarteter Masse von ≥ 2 Da festzustellen). Nach Abspaltung der Boc-Gruppe mittels TFA können TFA Salze mit dem Triaminen **10**, beziehungsweise **12** gebildet werden (massenspektrometrisch wurden die reinen Triamine detektiert). Auf Grund der höheren Basizität der Aktivatorbase sollten diese unter den verwendeten Kupplungsbedingungen die Reaktion von **10**, beziehungsweise **12** nicht stören. Auf Grund der höheren Nukleophilie des deprotonierten C-Terminus der Glycokonjugate gegenüber dem TFA-Anion sollten diese bevorzugt den für die Amidarstellung notwendigen Aktivester ausbilden. Es ist möglich, dass der Überschuss des Aktivators über das Glycokonjugat eine Aktivierung des TFA-Anions mit folgender Amidbildung bedingt. Eine solche Veresterung von TFA mit einer Hydroxyfunktion eines Serins könnte auch die im Vergleich zum Produkt um knapp 100 Da größere Masse erklären. Dennoch blieb ein Massendefekt zwischen den vorgeschlagen Strukturen und der beobachteten Masse bestehen.

Die Umsetzung der *core*-Struktur **12** mit den Glycokonjugaten **25** und **26** wurde einmal versucht, wobei jedoch kein Produkt isoliert werden konnte. Grund für die erschwerte Kupplung könnte der stärker ausgeprägte amphiphile Charakter der Verbindungen **25** und **26** auf Grund der längeren Alkylkette sein. Dieser könnte eine Mizellbildung begünstigen und somit die lokale Konzentration an verfügbarem Glycokonjugat erniedrigen.

Die Verbindungen **27-32** konnten in guten bis sehr guten Ausbeuten erfolgreich dargestellt werden. Mit Hilfe von Mikrowellenstrahlung gelang es, die Reaktionszeit deutlich zu verkürzen. Die Reinigung der Produkte mittels RP-HPLC konnte nach Optimierung des verwendeten Gradienten basisliniengetrennt erreicht werden. Vorbereitung, Kupplung und Reinigung der Verbindungen ist in etwa zwei Tagen möglich.

3.5.5 Entschützung der Liganden

Der abschließende Schritt in der Synthese sah die Entfernung der Schutzgruppen der Neuraminsäure vor. Die Deacetylierung der Hydroxyfunktionen erfolgte katalytisch unter milden Bedingungen nach Zemplén, gefolgt von der Hydrolyse des Methylresters durch wässrige NaOH. Das Reaktionsschema ist in Abbildung 35 gezeigt^[109].

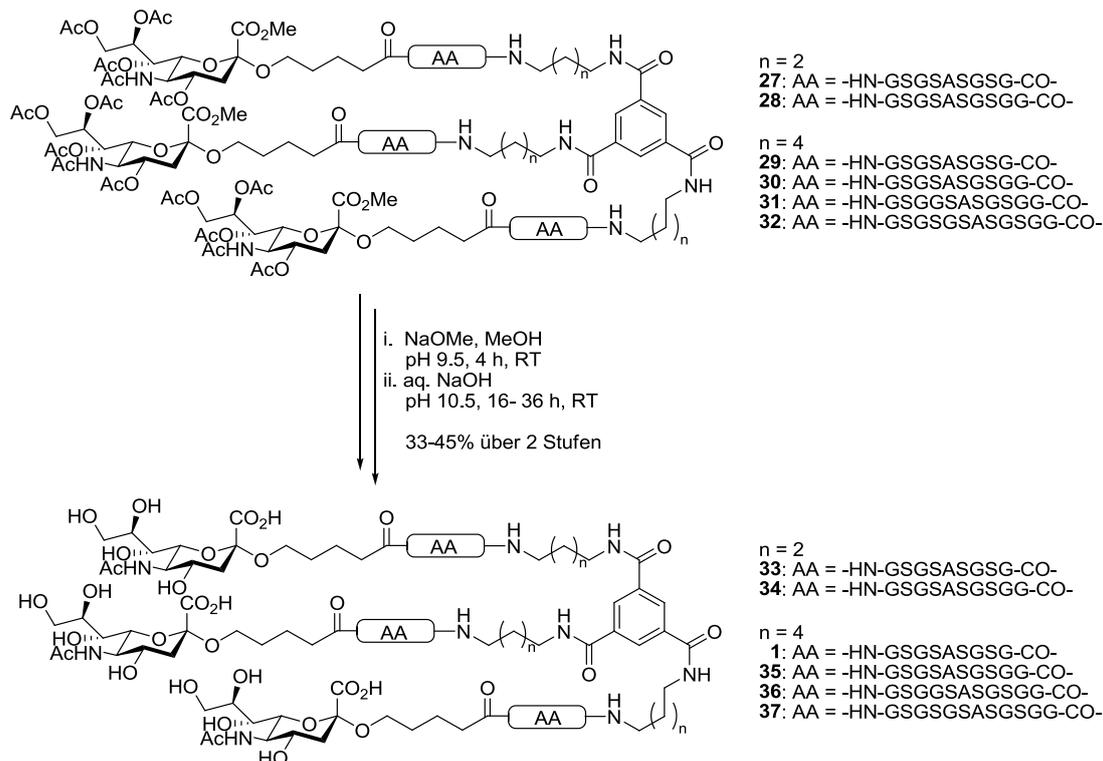


Abbildung 35: Darstellung der Zielliganden durch Deacetylierung der Hydroxyfunktionen nach Zemplén mit anschließender Hydrolyse des Methylresters mit wässriger NaOH. Der pH Wert muss bei der Reaktion sorgfältig kontrolliert werden, da es sonst zur Racemisierung der Aminosäuren^[110] oder zur β -Eliminierung der Hydroxyfunktionen der Serine^[111, 112] kommen kann.

Die katalytische Deacetylierung nach Zemplén wurde unter Schlenkbedingungen durchgeführt. Die methanolische NaOMe-Lösung wurde auf einen apparenten pH-Wert von 9.5 gestellt, wobei der pH-Wert mit feuchtem pH-Papier kontrolliert wurde. Die Neutralisation erfolgte mit 1 M Essigsäure. Die Lösung wurde anschließend mit Wasser verdünnt und gefriergetrocknet. Die Hydrolyse des Methylresters erfolgte bei pH 10-10.5. Der pH Wert wurde sorgfältig eingehalten und die quantitative Hydrolyse nach Reinigung mittels *RP*-HPLC durch HSQC-NMR Experimente verifiziert. Dieser Schritt stellte einen neuralgischen Punkt am Ende einer 21 bis 24-stufigen Synthese dar, konnte aber bei gegebener Vorsicht durchgeführt werden^[113]. Ein nur wenig niedrig liegender pH-Wert führte zu einer unvollständigen Hydrolyse des Methylresters auch nach 36 h. Auf Grund der geringen Hydroxidkonzentration bei pH 10.5 musste in großen Volumina gearbeitet werden. NaOH wurde

dabei mit 10-30 fachen Überschuss bezogen auf **27-32** eingesetzt und die Reaktion 16-36 h gerührt. Die Neutralisation erfolgte mit saurem Ionentauscher, welcher nach Filtration gründlich mit Wasser gespült wurde. Die erhaltenen Rohprodukte wurden mittels *RP*-HPLC gereinigt und konnten in Ausbeuten zwischen 33-45% über zwei Stufen erhalten werden. Eine Erklärung für die mäßige Ausbeute kann mit Hilfe des in Abbildung 36 gezeigten Chromatogramms geben werden.

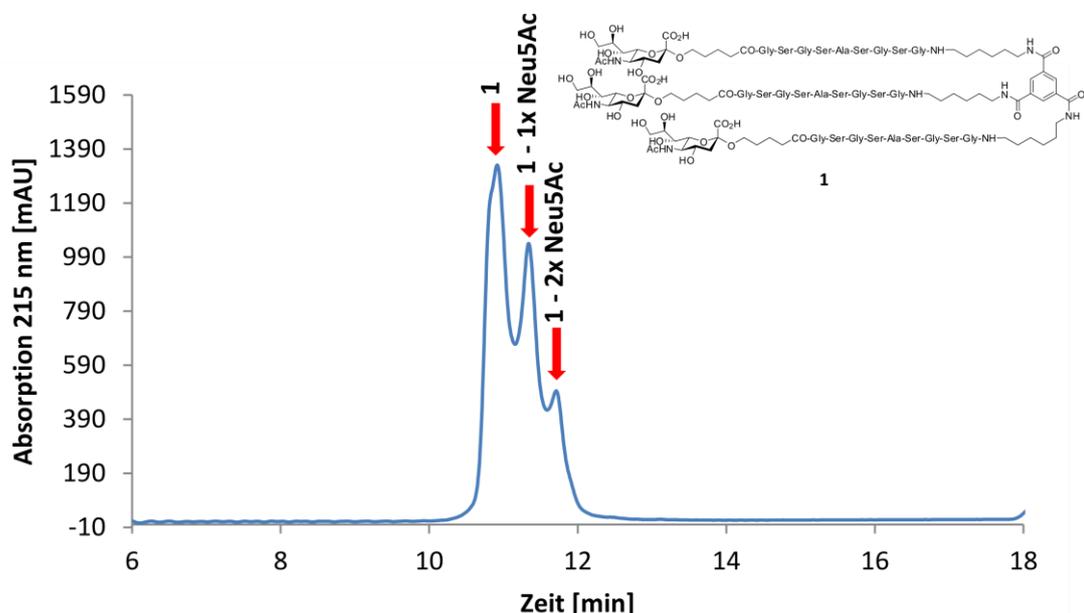


Abbildung 36: Ausschnitt des während der Reinigung von **1** erhaltenen UV-Chromatogramms bei einer Wellenlänge von 215 nm. Mit Hilfe des parallel akquirierten Massenspektrums konnten neben dem Produktsignal die Signale mit etwas höherer Retentionszeit als Nebenprodukte identifiziert werden, bei denen ein oder zwei Neuraminsäuren abgespalten sind.

Es ist exemplarisch das bei der Reinigung von **1** erhaltene UV-Chromatogramm gezeigt. Neben dem Produktsignal lassen sich zwei weitere Signale mit leicht erhöhter Retentionszeit detektieren. Mit Hilfe des aufgezeichneten Massenspektrums konnten den Signalen Massen zugeordnet werden, die dem Verlust von einer oder zwei Neuraminsäuren entsprechen. Eine Eliminierung des Glycans während der Hydrolyse des Methylrestes wäre ungewöhnlich, da Neuraminsäureglycoside eher gegenüber sauren Bedingungen labil sind. Als potentielle Fehlerquelle kann auch die im Elutionsmittel enthaltene Ameisensäure in Betracht gezogen werden, wobei auch dies unerwartet wäre. So hydrolysiert zum Beispiel das Methylglycosid der Neuraminsäure bei 10 mM HCl nach nur 20 min zu 95%. Dies geschieht aber erst bei einer erhöhten Temperatur von 80 °C^[114]. Warum die glycosidische Bindung unter den durchgeführten Bedingungen gespalten zu werden scheint, ist unklar.

Insgesamt konnte die Entschützung erfolgreich durchgeführt und das Produkt mittels *RP*-HPLC gereinigt werden. In dem ¹H-NMR Spektrum war nur ein einfacher Datensatz für die drei Arme der Zielverbindungen zu sehen, was für eine symmetrische, dreifache Substitution des Aromaten spricht.

Die Umsetzung des neuen Synthesekonzeptes ließ sich nach Optimierung erfolgreich durchführen. Dabei bewährte sich das Bausteinkonzept und erlaubte einen einfachen Zugang zu einer kleinen Substanzbibliothek. Die Bausteine konnten dabei in guten bis sehr guten Ausbeuten schnell und im Grammaßstab aus günstigen Edukten dargestellt werden. Die Synthese von sechs verschiedenen Glycokongugaten konnte erfolgreich und schnell durchgeführt werden. Die Darstellung des Peptidteils stellt dabei den quantitativen Flaschenhals auf dem Weg zu den Zielliganden dar. Vier der Glycokongugate konnten erfolgreich zu insgesamt sechs trimeren Liganden in Ausbeuten zwischen 28-97% umgesetzt werden. Dabei zeigte sich, dass sich eine längere Peptidkette negativ auf den Erfolg der Reaktion auswirkte. Abschließend konnten die Schutzgruppen des Kohlenhydrateils erfolgreich in Ausbeuten zwischen 33-45% entfernt werden. Die entschützten Liganden konnten in Mengen von 3-8 mg erhalten werden. Eine Racemisierung der stereogenen Aminosäuren, sowie eine β -Eliminierung der Hydroxyfunktionen der Serine wurde unter den gewählten Bedingungen nicht beobachtet.

3.6 Vorbereitende Untersuchungen

3.6.1 CD spektroskopische Analyse des Linkers

Auf Grund der peptidischen Natur des Linkers konnte eine Sekundärstrukturausbildung und einer damit einhergehenden Verkürzung des Linkers, welche zu einer Inhibierung der multivalenten Wechselwirkung hätte führen können, nicht ausgeschlossen werden. Dies wurde bereits in der vorausgegangenen Arbeit^[76] mit Hilfe des in Sybyl implementierten „*predict secondary structure tools in silico*“ ausgeschlossen, wurde aber im Rahmen dieser Arbeit dennoch experimentell CD-spektroskopisch untersucht. Dazu wurde die verwendete neun Aminosäuren lange Peptidsequenz **41** am Synthesizer unter Standardbedingungen mit einem als Amid vorliegenden C-Terminus synthetisiert und per RP-HPLC gereinigt. Die Vermessung des Peptids erfolgte in Wasser bei einer Konzentration von 200 μM . Die Werte der gemessenen Elliptizität wurden mit Hilfe von Gleichung 7 in die *mean residue ellipticity*^[115] umgerechnet und als Funktion der Wellenlänge aufgetragen. Die erhaltene Kurve ist in Abbildung 37 gezeigt.

$$[\Theta] = \Theta * \frac{M \left[\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right]}{10 * c \left[\frac{\text{mol}}{\text{L}} \right] * l[\text{cm}] * n}$$

Gleichung 7: Berechnung der *mean residue ellipticity* mit Θ = gemessene Elliptizität, M = Molgewicht des Peptids/Proteins, c = Konzentration der vermessenen Lösung, l = Schichtdicke der Küvette und n = Anzahl der Amidbindungen im Molekül^[115].

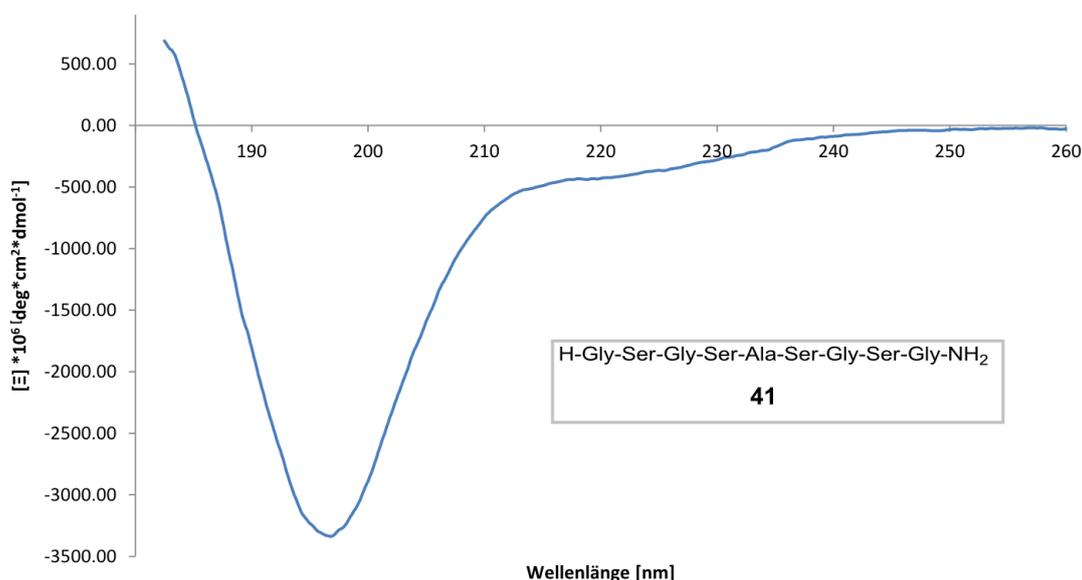


Abbildung 37: Die für Verbindung **41** aus CD-spektroskopischen Untersuchungen erhaltene Differenzkurve der Absorption aus links- und rechts-polarisiertem Licht. Aufgetragen wurde die Differenz als Funktion der Wellenlänge (hier als *mean residue ellipticity* gegen die Wellenlänge)^[116]. Die Kurve zeigt einen für *random coil* typischen Verlauf und bestätigt somit die *in silico* erhaltenen Ergebnisse.

Der Kurvenverlauf zeigt den für eine unbestimmte Sekundärstruktur typischen Verlauf und bestätigt damit die *in silico* Vorhersage. Neben der qualitativen Auswertung der Messkurve wurde eine quantitative Auswertung mit Hilfe der Software CD-Tool durchgeführt^[117]. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Quantitative Analyse der erhaltenen Funktion mit Hilfe der Software CD-Tool^[117]. Angezeigt ist die relative Häufigkeit der Sekundärstrukturelemente und die Standardabweichung des dafür angefertigten *fits*. Mit 90% ist die unbestimmte Sekundärstruktur das prägende Strukturelement. Das Peptid liegt folglich weder als α -Helix, β -Faltblatt noch als β -turn vor.

$[\alpha\text{-r} + \alpha\text{-d}]$	$[\beta\text{-r} + \beta\text{-d}]$	turn	other	refit rmsd
0.02	0.02	0.02	0.90	0.0001

Die in Tabelle 9 gezeigten Ergebnisse bestätigen die qualitative Analyse der CD spektroskopisch erhaltenen Kurve. Mit Hilfe von CD-Tool konnte der Anteil an *random coil* auf 90% quantifiziert werden und stellt somit das dominante Strukturmotiv dar. Die quadratische Standardabweichung des zur Quantifizierung gefitteten Kurvenverlaufs liegt 10^{-4} und ist damit sehr gut.

3.6.2 Untersuchung des kommerziell bezogenen Hämagglutinins

Das für die Analysen benötigte Hämagglutinin H5 wurde kommerziell bezogen und musste für die Untersuchungen mittels STD-NMR und SPR vorbereitet werden. Es standen mehrere Chargen älteren sowie neuen Proteins zur Verfügung. Diese wurde mittels Gelelektrophorese unter stark reduzierenden Bedingungen auf ihre Reinheit hin untersucht. Dazu wurde aus jeder Charge ca. 1 μg H5 auf ein 12%-SDS-PAA-Gel aufgetragen und nach gelelektrophoretischer Trennung mittels Silbernitrat angefärbt. Als Marker diente der *PageRuler Unstained Protein Ladder* der Firma Fermentas. Eine Anfärbung mit Coomassie blieb bei der beschriebenen Proteinmenge erfolglos. Auf Grund der begrenzten Verfügbarkeit des Proteins wurde die Silberfärbung einem Mehreinsatz an Protein vorgezogen.

In der in Abbildung 38 gezeigten SDS-PAGE sind in den Bahnen 1 und 2 deutlich die Banden für das HA Monomer bei circa 72 kDa und weiter die Banden der Untereinheiten HA₁ und HA₂ bei circa 45, beziehungsweise 27 kDa zu erkennen. Die qualitative Analyse zeigt also hier intaktes Protein. Bei den verwendeten Proben handelt es sich um etwa 3 Jahre alte, ungeöffnete Proteinlösungen. In den Bahnen 3 und 4 konnten trotz der hohen Empfindlichkeit der Silberfärbung keine Banden detektiert werden. Hier wurden ca. fünf Jahre alte Proteinlösungen aus bereits geöffneten Vorratsgefäßen aufgetragen. Das Protein ist vollständig degradiert.

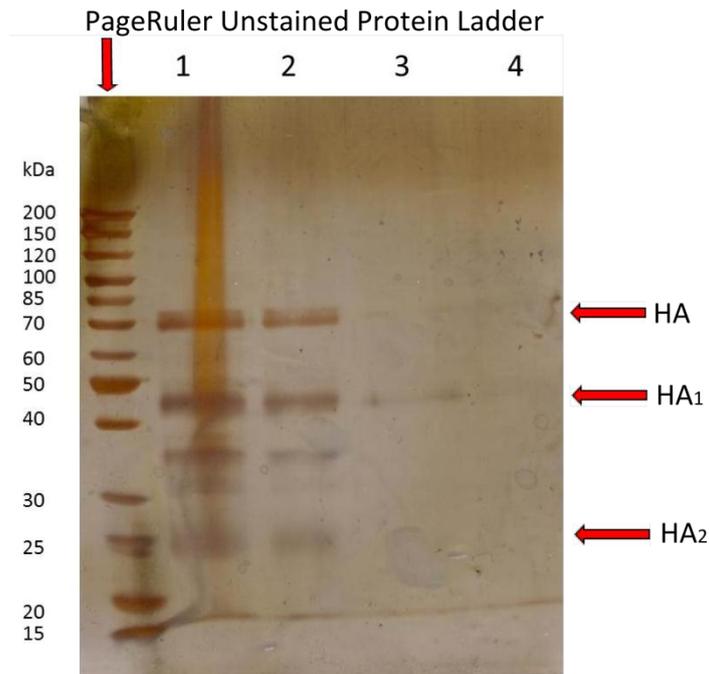


Abbildung 38: SDS-PAGE Analyse der zur Verfügung stehenden H5-Chargen. Es wurde je 1 µg H5 aufgetragen, gelelektrophoretisch getrennt und mit Silbernitrat angefärbt. In den Bahnen 1 und 2 sind die erwarteten Banden bei ca. 72 kDa für das HA Monomer und bei 45, beziehungsweise 27 kDa die Banden der Untereinheiten des H5 zu erkennen. Die Bahnen 3 und 4, in denen ältere Proteinchargen aufgetragen wurden, zeigten keine Banden.

Es wurde weiter versucht, die für die Untersuchung der multivalenten Liganden essentielle trimere Struktur des Proteins zu verifizieren. Auf Grund großer hydrophober *patches* der HA Monomere ist die trimere Struktur zwar anzunehmen, doch ist in der Literatur mehrfach auch das Auftreten monomerer Hämagglutinine in Lösung beschrieben^[118-121]. Dazu wurde eine Gelelektrophorese unter nicht denaturierenden Bedingungen durchgeführt, welche aber zu keinem Ergebnis führte. Eine massenspektrometrische Analyse mittels MALDI-TOF im linearen Modus zeigte die bereits zuvor in der SDS-PAGE detektierten Massen für das Monomer und dessen Untereinheiten. Ein Signal um die 190 kDa konnte nicht beobachtet werden. Eine weitere Untersuchung mittels *dynamic light scattering* (DLS) lieferte zwar reproduzierbare Werte, jedoch zeigte sich die Interpretation dieser ohne Referenz mit bekannter Struktur auf Grund des stäbchenförmigen Charakters des Proteins und seiner vollständigen Glycosylierung als nicht möglich. Beim DLS wird die durch Brown'sche Molekularbewegung verursachte Taumelgeschwindigkeit von Molekülen in Lösung in Abhängigkeit der Zeit gemessen und kann mit Hilfe der Stokes-Einstein-Beziehung in den hydrodynamischen Radius umgerechnet werden^[122]. Dieser entspricht im Falle sphärischer, unglycosylierter Proteine in etwa ihrem Durchmesser. Bei einem stäbchenförmigen, glycosylierten Protein ist hingegen der Beitrag der einzelnen Raumdimensionen und der stark Wasser aggregierenden Kohlenhydratreste aus dem erhaltenen Durchschnittswert für den hydrodynamischen Radius nicht zu quantifizieren. In Abbildung 39 ist die durchschnittliche Größenverteilung des erhaltenen Radius gegen die Intensität aufgetragen.

Die Messung ergab einen hydrodynamische Radius von 19 ± 2 nm, bei einer tatsächlichen Länge von 13 nm und einem ungefähren Durchmesser für den Trimer zwischen 4 nm und 6.5 nm. Aus den beschriebenen Gründen kann keine Aussage über die Struktur des Proteins getroffen werden.

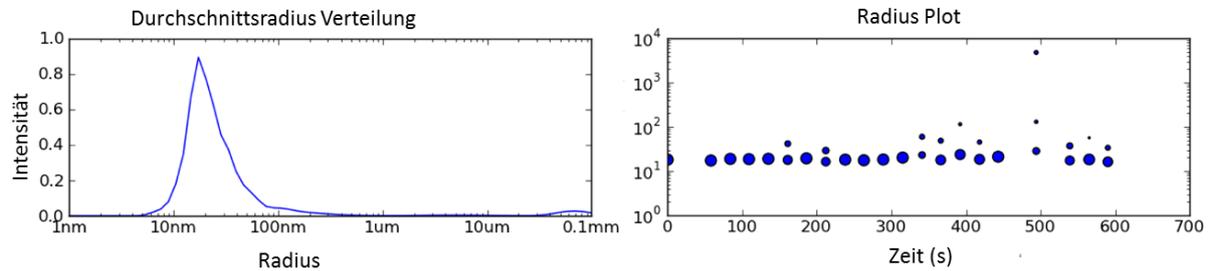


Abbildung 39: DLS Analyse einer H5 Proteinlösung in PBS. Es ist der durchschnittliche hydrodynamische Radius gegen seine relative Intensität aufgetragen (links). Der rechte Graph zeigt die Güte der Messung. Hier ist der durchschnittliche Radius gegen den zeitlichen Verlauf der Mehrfachmessungen aufgetragen. Mit Hilfe der verwendeten Software konnte der hydrodynamische Radius auf 19 ± 2 nm bestimmt werden. Welchen Anteil die einzelnen Raumdimensionen und die Glycosylierung an diesem Wert haben, lässt sich nicht quantifizieren. Daneben ist ein weiteres Signal bei 100 µm zu erkennen, welches sich durch die Aggregation von H5 erklären lassen könnte^[123].

Es konnte jedoch eine interessante Beobachtung gemacht werden, die in der Literatur sonst nur einmal beschrieben ist. Neben dem bereits beschriebenen Wert lässt sich noch ein weiteres Signal bei knapp 100 µm beobachten. Crawford *et al.*^[123] berichten für rekombinant hergestelltes H5 und H7 eine Mizellformation, die mittels Elektronenmikroskopie beobachtet werden konnte. Das aus den DLS Messungen erhaltene Signal bei 100 µm könnte das Produkt eines solchen H5 Multimers sein. Ob diese Mizellbildung Einfluss auf die folgenden Messungen hat, ist unklar.

Mit den hier verwendeten Methoden ließ sich die trimere Struktur weder sicher bestätigen noch widerlegen. Crawford *et al.* berichten, dass der HA *precursor* HA₀, welcher normalerweise als Trimer vorliegt, bei Behandlung mit Trypsin unter Abspaltung eines einzelnen Arginins pro Monomer die HA₁ und HA₂ Domäne generiert. Liegt das HA₀ als Monomer vor, wird es bei Behandlung mit Trypsin weitestgehend degradiert, so dass die Trypsin Sensitivität als *assay* für die Trimer Bildung herangezogen werden kann^[123]. Es ist anzunehmen, dass für ein gereiftes H5 die gleiche Degradation für den Fall, dass es als Monomer vorliegt, beobachtet werden kann. Für einen qualitativen Nachweis von Trimeren könnte alternativ ein denaturierendes Gel nach *cross linking* von H5 durchgeführt werden, wie es Gething *et al.*^[118] berichten. Wie eindeutig dieses Ergebnis bezüglich der intramolekularen Verknüpfung gegenüber der intermolekularen Verknüpfung von Hämagglutininen jedoch ist, ist kaum vorhersehbar. Trotz dem eine eindeutige Verifikation der trimere Struktur nicht erbracht werden konnte, ist von der trimere Struktur auf Grund der großen elektrostatischen Anziehung der Monomere untereinander auszugehen.

3.7 Analyse der dargestellten Verbindungen

3.7.1 STD-NMR Experimente

3.7.1.1 Validierung des STD-NMR Systems mit Neu5Aca2Me (39)

Vor der Untersuchung der dargestellten Liganden wurde das System mit dem bekannten Liganden des H5-Proteins Neu5Aca2Me (**39**) validiert. Dieser konnte ausgehend von **16** in einer Ausbeute von 77% über zwei Stufen dargestellt werden^[124]. Die Artefaktmessung erfolgte bei einer Konzentration von 577 μM Neu5Aca2Me in *d*PBS. Dabei wurden die Artefakte zwischen 0.4-1.7% bestimmt, wobei der Großteil der Artefaktssignale im subprozent Bereich lagen.

Im Anschluss wurde eine STD-Titration mit Neu5Aca2Me gegen H5 durchgeführt. Die Proteinkonzentration betrug dabei 1.29 μM und es wurden Konzentrationen an Neu5Aca2Me von 34-619 μM vermessen. Die relativen STD% wurden für die einzelnen Protonensignale für jede Konzentration berechnet und mit dem relativen Überschuss von Ligand zu Protein zu den STD Amplifikationsfaktoren multipliziert^[125]. Abbildung 40 zeigt exemplarisch die bei der Analyse der erhaltenen Messpunkte nach dem *one site binding* Modell erhaltenen Kurven für das Methylsignal der NHAc Gruppe und für die Protonen H-8 und H-9a.

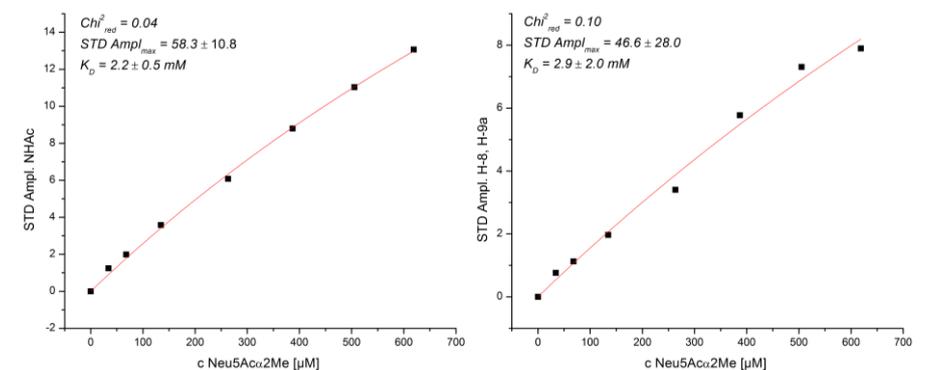


Abbildung 40: Exemplarisch sind die aus der STD-NMR Titration von Neu5Aca2Me erhaltenen Kurven für die Methylgruppe des NHAc und für die Protonen H-8, H-9a gezeigt. Aufgetragen ist der STD Amplifikationsfaktor gegen die Konzentration von Neu5Aca2Me. Die Berechnung nach dem *one site binding* Modell ergab für H-8, H-9a einen K_D von 2.9 mM und für die Methylgruppe des NHAc von 2.2 mM.

Auf Grund von Überlagerung mit Glycerin-Signalen konnte eine detaillierte Auswertung nicht für alle Signale des Neu5Aca2Me erfolgen³.

³ Hier wurde frisches, undialysiertes Protein verwendet. Dass der Ursprung des Glycerins die Dialysemembran ist, kann daher ausgeschlossen werden.

In Tabelle 10 sind die Ergebnisse der Analyse nach dem *one site binding* Modell zusammengefasst.

Tabelle 10: Die aus der Analyse der Daten nach dem *one site binding* Modell erhaltenen K_D Werte für die Protonen des Neu5Ac α 2Me bei der Bindung an H5. Die erhaltenen Werte stimmen gut mit der in der Literatur beschriebenen Werte für die Bindung von Neu5Ac α 2Me an H3 überein^[126].

Signal	H-8/H-9a	-OMe	H-3eq	NHAc	H-3ax
K_D [mM]	2.9 ± 2.0	1.6 ± 1.0	1.8 ± 7.7	2.2 ± 0.5	1.1 ± 0.3

Die für die einzelnen Protonen bestimmten K_D -Werte zwischen 1.1 – 2.9 mM stimmen sehr gut mit dem in der Literatur beschriebenen Wert für die Bindung von Neu5Ac α 2Me an ein H3 von 2.8 mM überein^[126]. In der Literatur sind keine Werte für die Bindung von Neu5Ac α 2Me an H5 beschrieben, es ist auf Grund der Ähnlichkeit der Proteine jedoch anzunehmen, dass sich die Dissoziationskonstante nicht wesentlich von der zu H3 unterscheidet. Ungewöhnlich sind die niedrigeren Dissoziationskonstanten der Protonen, die aus der Bindungstasche herauszeigen (-OMe und H-3ax/eq), im Vergleich zu denen, die von der Bindungstasche fast vollständig umgeben sind (NHAc, H-8/H-9a; Abbildung 41). Die Ergebnisse sind mit denen von Martin Hollinger ebenfalls mittels STD-NMR ermittelten Dissoziationskonstanten für die einzelnen Protonen konsistent^[127].

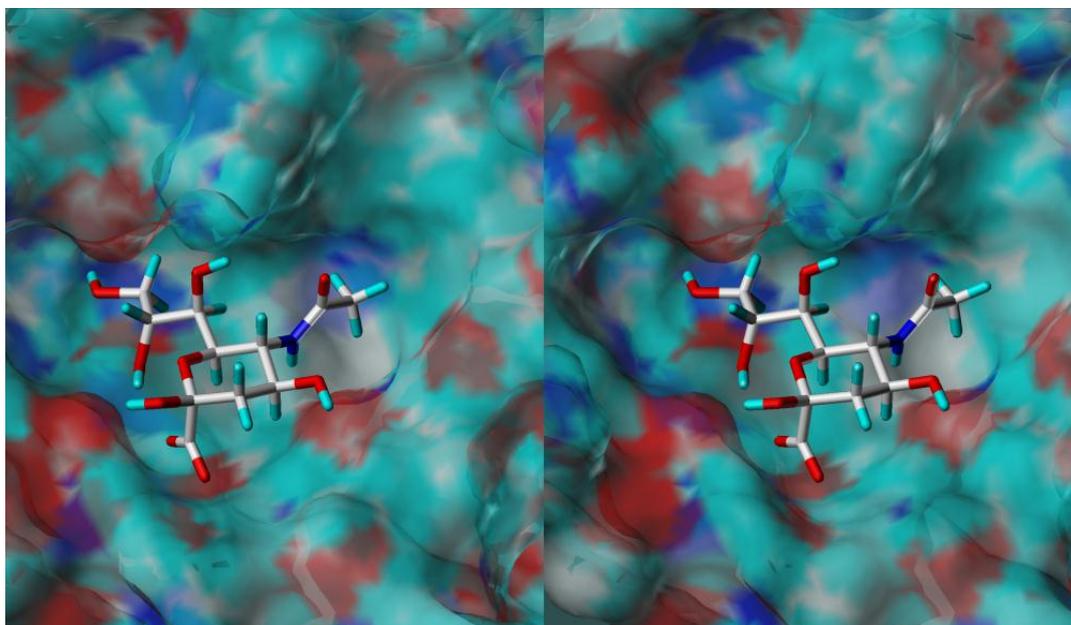


Abbildung 41: *Crossed eye* Darstellung von Neu5Ac in der Bindungstasche des H5. Gut zu erkennen ist die tiefe Positionierung der Methylgruppe des NHAc, sowie der Protonen H-8 und H-9 in der Bindungstasche, wohingegen die Hydroxygruppe des Halbacetals sowie die Protonen in der 3-Position eher aus der Bindungstasche herauszeigen.

3.7.1.2 Kompetitive STD-NMR Experimente mit den Verbindungen 1, 33-37

Ein Charakteristikum der multivalenten Wechselwirkung ist eine im Vergleich zu der äquivalenten monovalenten Bindung deutlich verlangsamte Kinetik. Auf Grund von *rebinding* Effekten wirkt sich dies vor allem stark auf die *off rate* der Liganden aus. Der STD Effekt beruht auf dem Sättigungstransfer der Proteinsättigung auf den Liganden, welche dann in Lösung beobachtet werden kann. Für kleine Moleküle liegt die Zeitkonstante der T_1/T_2 -Relaxation in der Größenordnung von einer Sekunde, der Transfer der Sättigung vom Protein zum Liganden erfolgt in circa 100 ms. Bei einer schnellen Kinetik und einem großen Ligandüberschuss kann durch mehrmaliges Belegen derselben Bindungstasche mit unterschiedlichen Liganden Sättigung in Lösung akkumuliert und detektiert werden^[125]. Dies erklärt auch die besondere Eignung von STD-NMR-Spektroskopie für die Untersuchung schwacher Wechselwirkungen und die hohe Empfindlichkeit auch bei geringen Proteinmengen. Im Falle einer multivalenten Wechselwirkung der Liganden 1, 33-36 war von einer starken Wechselwirkung mit langsamer Kinetik auszugehen, was zu Problemen bei der Analyse mittels STD-NMR führen könnte. Die Durchführung der Experimente als kompetitive STD-NMR Titration umgeht diese Problematik, da hier nur die Kinetik des vorgelegten Kompetitors für die beobachteten Signale von Bedeutung ist. Als bekannter Binder wurde Neu5Aca2Me vorgelegt (Kompetitor) und dieser durch schrittweise Zugabe des Liganden aus der Bindungstasche verdrängt.

Um bei der Zugabe des Liganden unmittelbar das Verdrängen des Kompetitors aus der Bindungstasche durch Abnahme des STD-Effektes detektieren zu können, müssen die vorhandenen Bindungstaschen des Proteins durch eine geeignete Wahl der KompetitorKonzentration gesättigt sein. Dazu wurde die Rezeptorbelegung bei gegebener KompetitorKonzentration berechnet (Formel siehe Kapitel 6.3.2)^[125]. Bei einem K_D des Kompetitors von 2 mM und einer KompetitorKonzentration von 20 mM wurde eine Rezeptorbelegung von 91% bei einer Proteinkonzentration von 1 μ M vorausgesagt.⁴

Die für die folgenden Messungen verwendeten Kompetitor- und Proteinkonzentrationen sind in Tabelle 11 aufgeführt. Der Bereich der untersuchten Ligandkonzentration wurde so gewählt, dass nur von signifikant stärkeren Bindern als das Neu5Aca2Me ein kompetitives Verhalten beobachtet werden konnte. Bei einem stärkeren Angleich der Konzentrationen von Kompetitor und untersuchtem Liganden ist von Schwierigkeiten bei der Zuordnung des Ursprungs beobachteter STD-Signale auszugehen, da die Signalsätze des Kompetitors und des Liganden weitestgehend identisch sind.

⁴ Der erste Term der Gleichung zur Berechnung des Anteils an Protein-Kompetitor-Komplexes bedingt ein dominantes Gewichten von numerisch hohen Werten. Ein Kompetitorüberschuss von knapp 20.000 wurde dabei nicht angestrebt, sondern war Folge der niedrigen, zur Verfügung stehenden Proteinkonzentration und der relativ hohen Dissoziationskonstante im millimolaren Bereich des Kompetitors.

Tabelle 11: Übersicht der für die kompetitiven STD-Titrations verwendeten Kompetitor- (K_0), Ligand- (L_0) und Proteinkonzentrationen (P_0), sowie der daraus resultierenden Rezeptorbelegung r bei einem globalen K_D von 2 mM für das System Neu5Aca2Me/H5. Durch schrittweise Zugabe wurden Ligandkonzentrationen von 0 bis 283 μM untersucht.

Ligand	K_0 [mM]	P_0 [μM]	r	L_0 [μM]
1	20	0.90	91%	0 bis 289
33	20	0.42	91%	0 bis 283
34	20	0.59	91%	0 bis 283
35	20	0.59	91%	0 bis 283
36	20	0.90	91%	0 bis 260

Für die STD Messungen wurde nach photometrischer Bestimmung der Proteinkonzentration ein definiertes Volumen der Proteinlösung in ein 3 mm NMR-Röhrchen überführt, 12 μL einer 300 mM Stammlösung von Neu5Aca2Me in $d\text{PBS}$ hinzugegeben und mit $d\text{PBS}$ auf ein Gesamtvolumen von 182 μL aufgefüllt. Anschließend wurde eine Nullwertmessung durchgeführt und folgend der entsprechende Ligand schrittweise hinzugegeben und STD-Spektren akquiriert. In Abbildung 42 sind exemplarisch Spektren gezeigt, die während der kompetitiven Titration von **1** erhalten wurden.

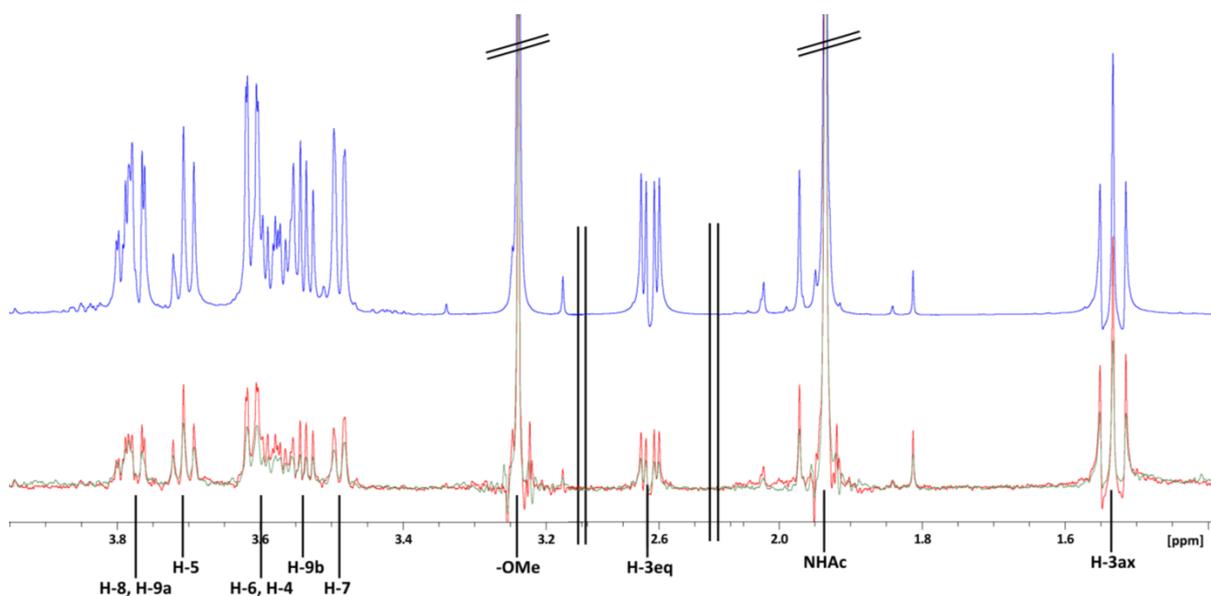


Abbildung 42: Ausschnitt aus den STD-NMR-Spektren, die während der kompetitiven Titration von **1** erhalten wurden. In *blau* ist das *off resonance* Spektrum zu Beginn der Titration gezeigt und in *rot* das dazugehörige Differenzspektrum. In *grün* ist das Differenzspektrum, welches am Ende der Titration erhalten wurde, gezeigt. Eine Abnahme der Signalintensität in den Differenzspektren von Beginn der Messung bis zum letzten Titrationspunkt ist deutlich zu erkennen. Die beiden Differenzspektren sind hier in 64-facher Intensitätssteigerung relativ zum *off resonance* Spektrum dargestellt. Die Protonensignale des Kompetitors sind in allen drei Spektren deutlich zu erkennen und wurden für die Auswertung entsprechend integriert.

In *blau* dargestellt ist das *off resonance* Spektrum zu Beginn der Titration. Es zeigt alle Protonen des Kompetitors, wobei zwei Signalsätze (H-8, H-9a und H-4, H-6) auf Grund der ähnlichen chemischen Verschiebung der Protonen als Summeneffekt behandelt wurden. In *rot* dargestellt ist das Differenzspektrum, welches zu Beginn der Titration erhalten wurde und in *grün* das Differenzspektrum, welches am Ende der Titration erhalten wurde. Zur besseren Veranschaulichung sind hier die beiden Differenzspektren in 64-facher Vergrößerung dargestellt. Bei einem Signal zu Rausch Verhältnis von 630 im Differenzspektrum, bestimmt auf das Singulett der Methylgruppe des NHAc, sind alle Signale deutlich zu erkennen.

Die absoluten STD% wurden für alle Signale eines jeden Titrationspunktes bestimmt und gegen den dekadischen Logarithmus der Konzentration des Liganden aufgetragen. Nach Anpassung der Daten an das *one site competition* Modell wurde der IC_{50} Wert des entsprechenden Systems erhalten. Dieser wurde mit Hilfe der Cheng-Prusoff-Gleichung (Gleichung 8) in die konzentrationsunabhängige inhibitorische Konstante K_I umgerechnet^[128].

$$K_I = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[K]}{K_D}}$$

Gleichung 8: Die Cheng-Prusoff-Gleichung beschreibt den Zusammenhang zwischen der konzentrationsunabhängigen inhibitorischen Konstante K_I und des konzentrationsabhängigen IC_{50} Wertes. Unter Kenntnis der Kompetitorkonzentration $[K]$ und der Dissoziationskonstante K_D kann der K_I für das beobachtete System ermittelt werden.

Zusätzlich zu der halblogarithmischen Anpassung der Daten an das *one site competition* Modell wird im Folgenden die Auftragung der normierten STD-Prozente des Kompetitors gegen die Ligandkonzentration gezeigt, da eine qualitative Beurteilung von Daten in einer logarithmischen Auftragung im Zweifelsfall nicht trivial ist. Die Fehler wurden aus der logarithmierten Form des Fehlers für den IC_{50} -Wert unter der Annahme bestimmt, dass die Fehlergrenzen im linearen Bereich des sigmoiden Kurvenverlaufs liegen und durch Ableitung der Formel 10^x nach den Gesetzen der Fehlerfortpflanzung durch Einsetzen ermittelt. Des Weiteren wurde für die Analyse nach dem *one site competition* Modell der Datensatz um einen virtuellen Nullpunkt (Abnahme der STD Antwort auf null) ergänzt, welcher bei $\log c = -1$ gewählt wurde. Dies entspricht einer Ligandkonzentration von 100 mM, bei der von einer vollständigen Verdrängung des Kompetitors auszugehen ist, da der Ligand selber das Strukturelement des Neu5Aca2Me enthält. Für die Berechnung der K_I -Werte wurden nur Werte angegeben, die auch beim Verschieben des virtuellen Nullpunktes einen stabilen Wert für den IC_{50} ergaben.

3.7.1.3 Analyse der Bindung von Ligand **33** (4-9-5)⁵

Bei Auftragung der normierten STD-Prozente der Kompletorsignale gegen die Konzentration von Ligand **33** ist in dem untersuchten Konzentrationsbereich keine eindeutige Tendenz zwischen der Abnahme der STD-Antwort und der Ligandkonzentration zu erkennen. Die Auftragung der STD-Prozente gegen die logarithmische Konzentration des Liganden mit anschließender Anpassung an das *one site competition* Modell konnte entweder nicht erfolgreich durchgeführt werden oder ergab eine dominante Gewichtung des virtuellen Nullpunktes. Lediglich für den Signalsatz der Protonen H-4, H-6 konnte eine Anpassung durchgeführt werden, bei der auch beim Verschieben des virtuellen Nullpunktes ein stabiler IC_{50} -Wert erhalten wurde. In Abbildung 43 ist die Auftragung der normierten STD-Prozent gegen die Konzentration von **33** (links) und die halblogarithmische Anpassung an das *one site competition* Modell (rechts) für das Protonenpaar H-4, H-6 gezeigt. Für die anderen Signale war eine erfolgreiche Anpassung nicht möglich.

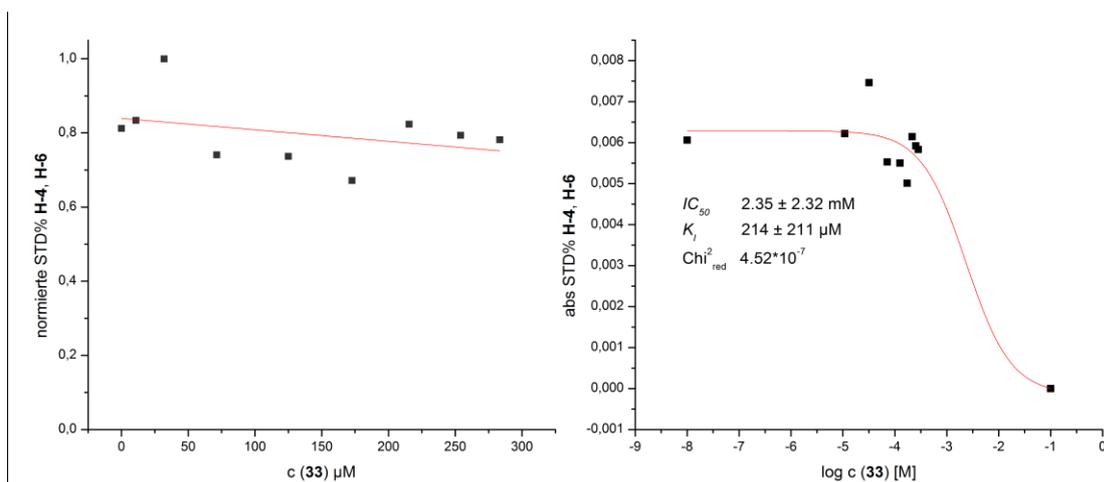


Abbildung 43: Links: Auftragung der normierten STD% der Protonen H-4, H-6 des vorgelegten Kompletors Neu5Acα2Me gegen die Konzentration des Liganden **33** mit Trendlinie. Aus dem Kurvenverlauf geht kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Konzentration von **33** und der Intensität der gemessenen STD% hervor. Rechts: Auftragung der absoluten STD% gegen die logarithmische Konzentration von **33**. Die Daten wurden dem *one site competition* Modell angepasst und der IC_{50} -Wert bestimmt, der mit Hilfe der Cheng-Prusoff-Gleichung in den K_I umgerechnet wurde. Der virtuelle Nullpunkt wurde bei -1 gesetzt. Der bestimmte IC_{50} -Wert ist gegenüber einem Verschieben des virtuellen Nullpunktes stabil.

Die Auftragung der normierten STD-Prozent gegen die Konzentration von **33** zeigte keinen klaren Zusammenhang zwischen steigender Konzentration des Liganden und einer kontinuierlichen Abnahme der STD-Signale des Kompletors. Im Falle einer deutlichen Affinitätssteigerung des

⁵ Der Übersichtlichkeit halber sind die strukturellen Eigenschaften der Liganden kurz beschrieben: Die erste Zahl steht für die Anzahl der Kohlenstoffatome in der Alkylkette der *core*-Struktur, die zweite für die Anzahl an Aminosäuren in dem Peptidlinker und die dritte für die Anzahl an Kohlenstoffatomen in der Alkylkette der Neuraminsäure.

untersuchten Liganden zu H5 im Vergleich zu Neu5Ac α 2Me hätte eine Abnahme der STD Antwort beobachtet werden müssen.

Die Anpassung der Daten an das *one site competition* Modell mit anschließender Umrechnung des bestimmten IC_{50} in den K_I mit Hilfe der Cheng-Prusoff-Gleichung ergab einen K_I -Wert von $213 \pm 211 \mu\text{M}$ für die Protonen H-4, H-6. Der große Fehler ist auf den nicht kontinuierlichen Verlauf der beobachteten STD-Antwort zurückzuführen, welcher dem für diesen Liganden zu niedrig gewählten Konzentrationsbereich geschuldet ist. Bei den einzelnen Titrationspunkten kommt es so nur zu einer geringen relativen Änderung der STD-Signale und damit zu einem großen Fehler. Dieses bedeutet nicht, dass der bestimmte K_I -Wert völlig falsch ist, sondern lediglich, dass der gewählte Konzentrationsbereich für eine verlässliche Aussage zu gering ist. Bei diesem Liganden konnte keine signifikante Steigerung der Bindungsaffinität zu der primären CRD erzielt und in dessen Folge auch in dem untersuchten Konzentrationsbereich keine kompetitive Wechselwirkung beobachtet werden.

3.7.1.4 Analyse der Bindung von Ligand 34 (4-10-5)

Die Auswertung der STD-Daten von **34** lieferte zu der Auswertung von **33** analoge Ergebnisse. Auch hier konnte in dem untersuchten Konzentrationsbereich keine eindeutig kompetitive Wechselwirkung beobachtet werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 44 exemplarisch für die Protonen H-4, H-6 des Kompetitors gezeigt. In Tabelle 12 sind die Ergebnisse für die Signale zusammengefasst, für die eine Anpassung an das *one site competition* Modell erfolgreich durchgeführt und ein gegenüber Verschiebung des virtuellen Nullpunktes stabiler IC_{50} -Wert erhalten wurde.

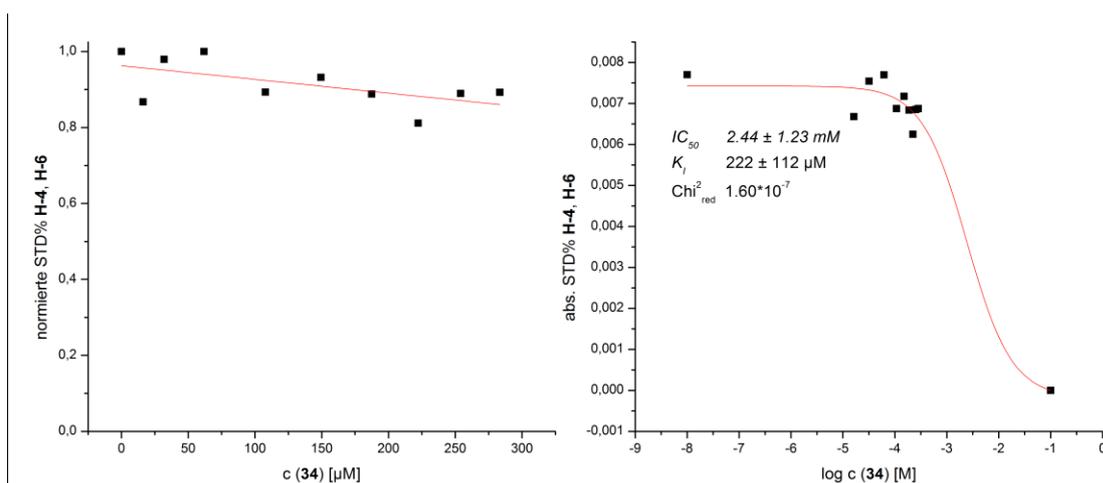


Abbildung 44: Links: Auftragung der normierten STD% der Protonen H-4, H-6 des vorgelegten Kompetitors Neu5Ac α 2Me gegen die Konzentration des Liganden **34** mit Trendlinie. Aus dem Kurvenverlauf geht kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Konzentration von **34** und der Intensität der gemessenen STD% hervor. Rechts: Auftragung der absoluten STD% gegen die logarithmische Konzentration von **34**. Die Daten wurden dem *one site competition* Modell angepasst und der IC_{50} -Wert bestimmt, der mit Hilfe der Cheng-Prusoff-Gleichung in den K_I umgerechnet wurde. Der virtuelle Nullpunkt wurde bei -1 gesetzt. Der bestimmte IC_{50} -Wert ist gegenüber einer Verschiebung des virtuellen Nullpunktes stabil.

Tabelle 12: Zusammenfassung der bei der Analyse von **34** nach dem *one site competition* Modell erhaltenen Ergebnisse für die einzelnen Signale von Neu5Aca2Me. Angegeben sind hier die K_I - und als Statistikparameter $\text{Chi}_{\text{red}}^2$ -Werte. Für die anderen Signale des Neu5Aca2Me konnte eine Anpassung nicht erfolgreich durchgeführt werden.

Signal	H-4, H-6	H-7	H-9b
K_I [μM]	222 ± 112	364 ± 277	157 ± 94
$\text{Chi}_{\text{red}}^2$ [$\cdot 10^{-7}$]	1.6	0.8	2.6

3.7.1.5 Analyse der Bindung von Ligand 1 (6-9-5)

Bei der Analyse von Ligand **1** konnte bei allen beobachteten Kompetitorsignalen ein sprunghafter Anstieg der gemessenen STD-Prozente bei Konzentrationen größer 150 μM beobachtet werden. Dies ist in Abbildung 45 exemplarisch für das H-3eq des vorgelegten Kompetitors Neu5Aca2Me gezeigt.

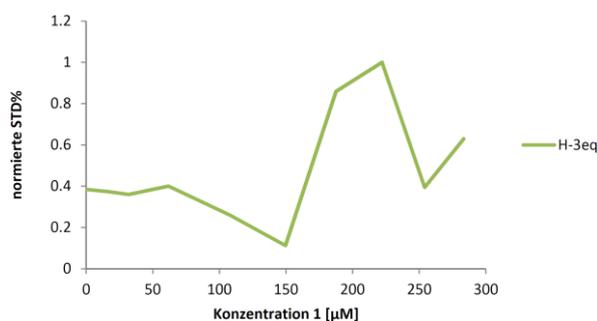


Abbildung 45: Auftragung der normierten STD% für das H-3eq des vorgelegten Kompetitors Neu5Aca2Me gegen die Konzentration von **1**. Ein sprunghafter Anstieg der beobachteten STD% ist bei Konzentrationen größer 150 μM zu beobachten. Dieser Anstieg wurde auch für alle anderen Protonensignale des Neu5Aca2Me beobachtet, was vermutlich auf eine Aggregation, d.h. ein Überschreiten der CMC, hindeutete.

Da dieses bei allen Signalen beobachtet wurde, schien dies ein systematisches Problem zu sein. In Anbetracht der Struktur der untersuchten Verbindung war eine Mizellbildung, die den beobachteten Kurvenverlauf erklären könnte, nicht auszuschließen. Es wurde daher mittels DLS untersucht, ob eine Mizellbildung vorlag. Dazu wurde Ligand **1** in *d*PBS gelöst und ein Teil der Lösung bei einer Konzentration von 312 μM direkt vermessen (Abbildung 46, a). Um eine Verfälschung der Messergebnisse durch Kontaminanten wie zum Beispiel Staubpartikel auszuschließen, wurde die Lösung 30 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, aus dem oberen Flüssigkeitsstand etwas abgenommen und erneut vermessen (Abbildung 46, b). Da mögliche Mizellen bei der Zentrifugation in niedrigere Lagen diffundieren können, wurde die bereits vermessene Lösung sieben Stunden ruhen gelassen und anschließend erneut vermessen (Abbildung 46, c). Ein Teil der Ursprungslösung wurde währenddessen 1:1 verdünnt und direkt vermessen (Abbildung 46, d). Eine weitere Verdünnung war

nicht möglich, da hier die beobachteten Signale eine zu geringe Intensität für eine Auswertung der DLS-Messung aufwiesen.

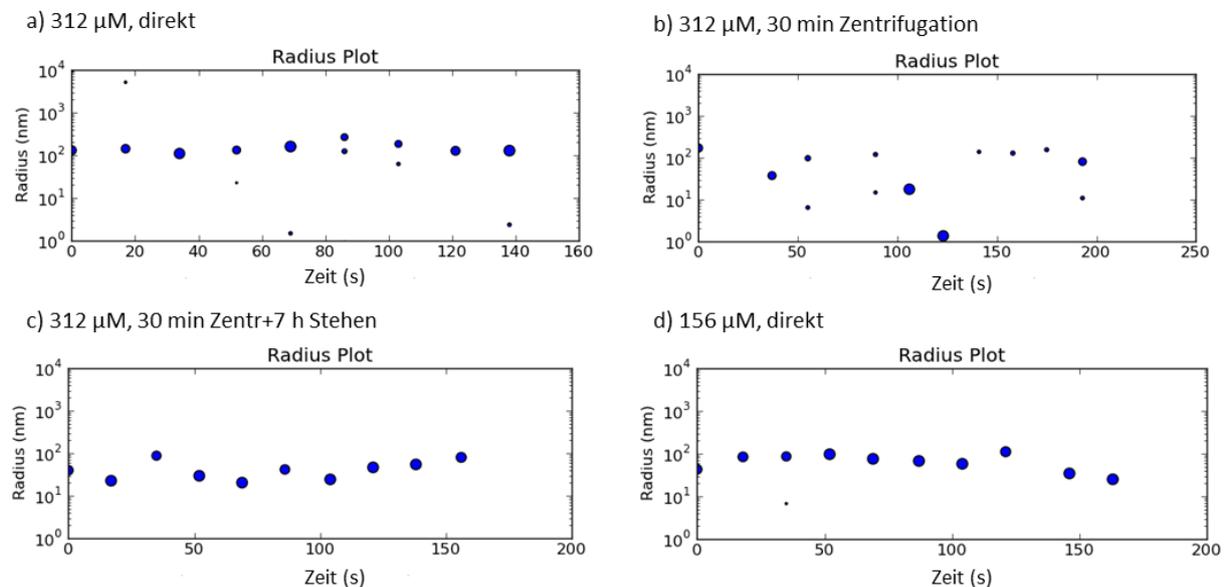


Abbildung 46: Untersuchungen von Ligand **1** mittels DLS auf Mizellbildung. Aufgetragen ist der mittels DLS bestimmte hydrodynamische Radius gegen die Mehrfachmessungen im zeitlichen Verlauf. a) Für die Untersuchung wurde Ligand **1** in *d*PPBS gelöst, so dass er in einer Konzentration von 312 µM vorlag. Ein Teil der Lösung wurde abgenommen und direkt untersucht. In dem Spektrogramm waren deutlich Teilchen mit einer homogenen Größenverteilung um 100 nm zu beobachten. b) Um auszuschließen, dass es sich um Staubpartikel handelte, wurde ein Teil der Lösung 30 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, etwas aus der obersten Flüssigkeitsschicht abgenommen und direkt vermessen. Hier war eine deutliche Abnahme von Teilchengröße und Abundanz zu erkennen. c) Diese Lösung wurde anschließend 7 h ruhen gelassen und erneut vermessen. Die Bildung von Teilchen mit homogener Größenverteilung um 75 nm war zu beobachten. d) Die Lösung aus a) wurde 1:1 verdünnt und erneut vermessen. Auch bei einer Konzentration von 156 µM waren deutlich Teilchen bei einer etwas geringeren Größe als in a) zu erkennen.

Mit Hilfe der DLS Messung konnte eine Mizellbildung eindeutig nachgewiesen werden. Bei einer Konzentration von 312 µM zeigten sich kurz nach dem Lösen Teilchen mit einer homogenen Größenverteilung um 100 nm. Auch eine Verdünnung dieser Lösung um die Hälfte zeigte deutlich Mizellen mit einer etwas geringeren Größe. Nach Zentrifugation waren weniger Mizellen zu beobachten, bildeten sich nach einiger Zeit erneut. Durch die Zentrifugation und Neubildung konnte eine Verfälschung der Messung durch Kontaminanten ausgeschlossen werden. Des Weiteren sprach die homogene Größenverteilung bei der direkten Messung gegen einen Ursprung der beobachteten Messergebnisse durch zum Beispiel Staubpartikel. Die Mizellbildung ist insofern problematisch, da die Ligandlösung zwar vor der Untersuchung mit dem Protein sonifiziert und Mizellen somit zerstört werden können, zusammen mit dem Protein jedoch ist dies im Verlauf der Messung nicht mehr möglich.

Für die Untersuchung der inhibitorischen Konstante wurden folglich nur die Werte bis einschließlich 150 μM berücksichtigt. In Abbildung 47 sind die normierten STD-Prozente gegen die Konzentration von **1** aufgetragen. Es ist gut zu erkennen, dass für alle Protonen des Neu5Ac α 2Me eine klare Abhängigkeit zwischen dem beobachteten STD-Effekt und der Konzentration von **1** besteht.

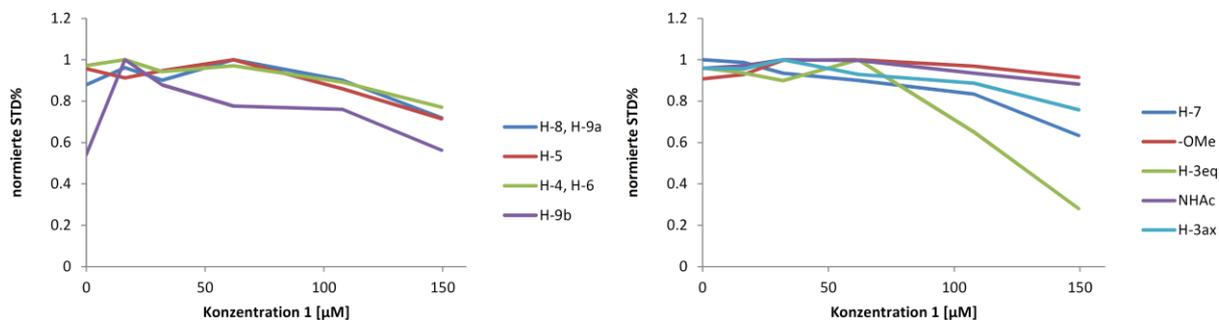


Abbildung 47: Auftragung der normierten STD% der Protonensignale des vorgelegten Kompetitors Neu5Ac α 2Me gegen die Konzentration von Ligand **1**. Es lässt sich eine eindeutige Korrelation zwischen der Abnahme der STD-Signale des Kompetitors und der Konzentration von **1** erkennen.

Eine Anpassung an das *one site competition* Modell konnte für die Datenpunkte der Konzentrationen bis einschließlich 150 μM durchgeführt werden. Der IC_{50} -Wert war für alle bestimmten Signale unabhängig gegenüber der Lage des virtuellen Nullpunktes. In Abbildung 48 sind exemplarisch die Anpassungen gezeigt, für die der niedrigste K_i und ein sehr guter $\text{Chi}_{\text{red}}^2$ -Wert erhalten wurden.

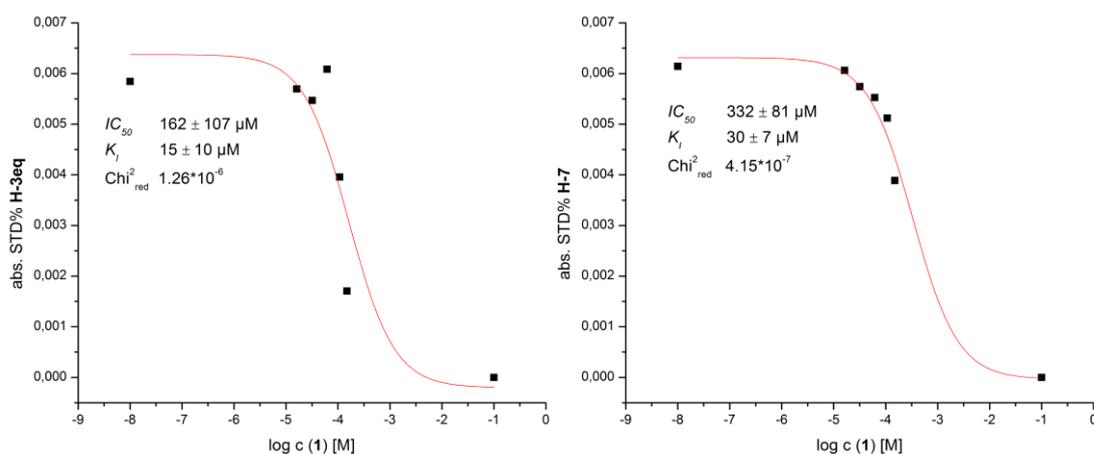


Abbildung 48: Anpassung der aus der kompetitiven Titration von **1** gegen den vorgelegten Kompetitor Neu5Ac α 2Me erhaltenen Daten für die Protonen H-3eq (links) und H-7 (rechts) an das *one site competition* Modell. Aufgetragen wurden die absoluten STD% der Protonensignale des Kompetitors gegen den dekadischen Logarithmus der Konzentration von **1**. Virtuelle Nullpunkte wurden bei -1 gesetzt. Beide Funktionen liefern auf Grund der ausgewogenen Datenverteilung entlang des *fits* unabhängig ihres $\text{Chi}_{\text{red}}^2$ -Wertes belastbare Daten zur Berechnung der inhibitorischen Konstante.

Trotz der Trunkierung des Datensatzes zeigen die gemessenen Datenpunkte eine gute Verteilung entlang des *fits*. Die Statistikparameter der anderen Protonensignale sind gut bis sehr gut. In Tabelle 13 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

Tabelle 13: Zusammenfassung der bei der Analyse von **1** nach dem *one site competition* Modell erhaltenen Ergebnisse für die einzelnen Signale des Neu5Ac α 2Me. Angegeben sind die K_I - und als Statistikparameter die $\text{Chi}_{\text{red}}^2$ -Werte. Lediglich für die Methylsignale des Aglycons und der NHAc Funktion konnte eine erfolgreiche Anpassung nicht durchgeführt werden.

Signal	H-8, H-9a	H-5	H-4, H-6	H-9b	H-7	H-3eq	H-3ax	Mittelwert
K_I [μM]	79 ± 63	55 ± 27	60 ± 18	18 ± 5	30 ± 7	15 ± 10	59 ± 19	45 ± 22
$\text{Chi}_{\text{red}}^2$ [* 10^{-7}]	2.6	4.5	1.2	1.5	4.1	12.6	11.2	

Die für Ligand **1** bestimmten K_I -Werte der einzelnen Protonen des Kompetitors liegen zwischen 15 und 80 μM . Die Daten zeigen eine hohe Konsistenz, die durch eine geringe Varianz der K_I -Werte, sowie geringe Fehler belegt werden. In dem untersuchten Konzentrationsbereich konnte eine eindeutig kompetitive Wechselwirkung beobachtet werden. Der für Ligand **1** gemittelte K_I -Wert beträgt 45 μM .

3.7.1.6 Analyse der Bindung von Ligand 35 (6-10-5)

Bei der Analyse von Ligand **35** konnte für die Protonen H-4 – H-9 des vorgelegten Kompetitors Neu5Ac α 2Me ebenfalls eine Abhängigkeit zwischen der Abnahme der beobachteten STD-Antwort und der Konzentration von **35** beobachtet werden (Abbildung 49).

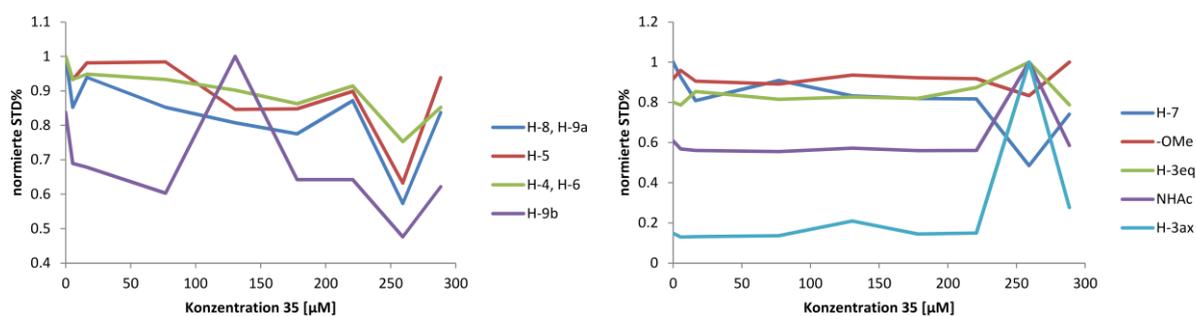


Abbildung 49: Auftragung der normierten STD% der einzelnen Protonensignale des vorgelegten Kompetitors Neu5Ac α 2Me gegen die Konzentration von **35**. Für die Signale H-4 – H-9 kann eine konzentrationsabhängige Abnahme der STD Antwort beobachtet werden. Dies ist für die Methylgruppen der NHAc Funktion und des Aglycons, sowie für die Protonen an C-3 nicht der Fall.

Eine Anpassung an das *one site competition* Modell konnte für diese Signale erfolgreich durchgeführt werden. Dabei war der bestimmte IC_{50} -Wert stabil gegenüber der Lage des virtuellen Nullpunktes. In

Abbildung 50 sind exemplarisch die Anpassungen gezeigt, für die der niedrigste und der höchste K_I bestimmt wurden.

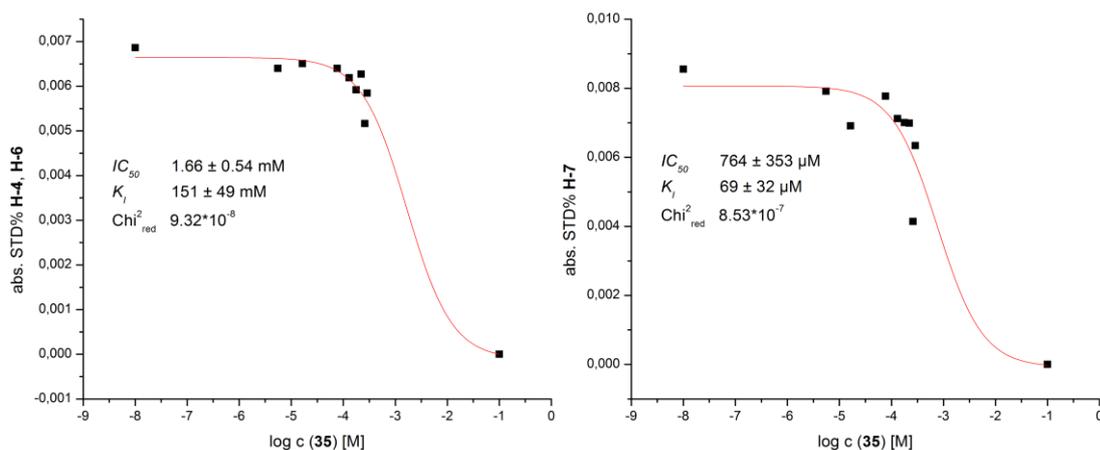


Abbildung 50: Anpassung der aus der kompetitiven Titration von **35** gegen den vorgelegten Kompetitor Neu5Aca2Me erhaltenen Daten für die Protonen H-4, H-6 (links) und H-7 (rechts) an das *one site competition* Modell. Aufgetragen wurden die absoluten STD% der Protonen des Kompetitors gegen den dekadischen Logarithmus der Konzentration von **35**. Virtuelle Nullpunkte wurden bei -1 gesetzt. Für das Signal des H-7 zeigen die Datenpunkte eine gute Verteilung entlang des *fits* und es wurde hierfür der niedrigste K_I bestimmt. Die größte Übereinstimmung der Datenpunkte mit dem *fit* zeigt sich bei den Signalen für H-4 und H-6.

Die Kurven zeigen eine befriedigende Verteilung der Datenpunkte entlang des *fits*. Auch wenn hier nicht für alle Signale eine Anpassung an das *one site competition* Modell erfolgreich durchgeführt werden konnte, sind die bestimmten Werte belastbar. Die Ergebnisse der Anpassung sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tabelle 14: Zusammenfassung der bei der Analyse von **35** nach dem *one site competition* Modell erhaltenen Ergebnisse für die einzelnen Signale von Neu5Aca2Me. Angegeben sind die K_I - und als Statistikparameter die $\text{Chi}^2_{\text{red}}$ -Werte. Für die Methylsignale der NHAc Funktion und des Aglycons, sowie für die Protonen an C-3 konnte keine Anpassung an das *one site competition* Modell erfolgreich durchgeführt werden.

Signal	H-8, H-9a	H-5	H-4, H-6	H9b	H-7	Mittelwert
K_I [μM]	96 ± 48	120 ± 66	151 ± 49	107 ± 107	69 ± 32	109 ± 27
$\text{Chi}^2_{\text{red}}$ [$\cdot 10^{-7}$]	4.6	8.8	0.9	6.7	8.5	

Für Ligand **35** konnte ein kompetitives Verhalten in dem untersuchten Konzentrationsbereich beobachtet werden. Die K_I -Werte wurden zwischen 70 und 150 μM bestimmt. Für die H-3 Protonen, sowie für das Methylsignal des Aglycons und der NHAc Funktion konnte eine Anpassung an das *one site competition* Modell nicht erfolgreich durchgeführt werden.

3.7.1.7 Analyse der Bindung von Ligand 36 (6-11-5)

Die Analyse der Bindung von Ligand **36** an H5 ist analog der Auswertung von Ligand **33**. Für einige Signale konnte eine Anpassung an das *one site competition* Modell erfolgreich durchgeführt werden. Exemplarisch ist dies in Abbildung 51 für das H-4, H-6 des Kompetitors gezeigt. In Tabelle 15 sind die Ergebnisse für die Signale zusammengefasst, für die eine Anpassung erfolgreich durchgeführt und ein gegen Verschiebung des virtuellen Nullpunktes stabiler IC_{50} -Wert erhalten werden konnte.

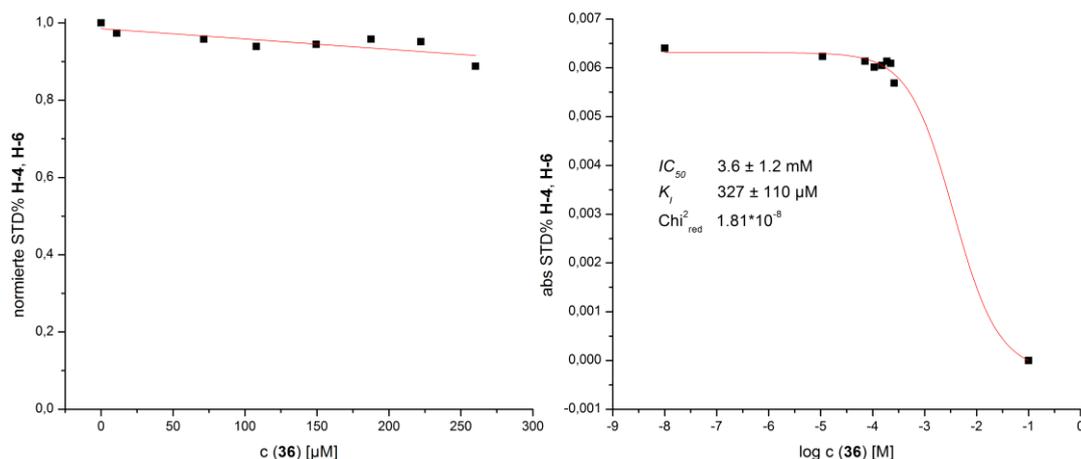


Abbildung 51: Links: Auftragung der normierten STD% des H-7 des vorgelegten Kompetitors Neu5Aca2Me gegen die Konzentration des Liganden **36** mit Trendlinie. Aus dem Kurvenverlauf geht kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Konzentration von **36** und der Intensität der gemessenen STD% hervor, da der Kurvenverlauf von nur 2 Messpunkten mit nicht kontinuierlichem Verlauf bestimmt ist. Rechts: Auftragung der absoluten STD% gegen die logarithmische Konzentration von **36**. Die Daten wurden dem *one site competition* Modell angepasst und der IC_{50} -Wert bestimmt, der mit Hilfe der Cheng-Prusoff-Gleichung in den K_I umgerechnet wurde. Der virtuelle Nullpunkt wurde bei -1 gesetzt. Der bestimmte IC_{50} -Wert ist gegenüber einem Verschieben des virtuellen Nullpunktes stabil.

Tabelle 15: Zusammenfassung der bei der Analyse von **36** nach dem *one site competition* Modell erhaltenen Ergebnisse für die einzelnen Signale von Neu5Aca2Me. Angegeben sind die K_I - und als Statistikparameter die χ^2_{red} -Werte. Für die übrigen Signale konnten eine Anpassung nicht erfolgreich durchgeführt werden.

Signal	H-5	H-4, H-6	H9b	H-7	H-3eq
K_I [μM]	885 ± 1531	327 ± 110	301 ± 302	98 ± 68	130 ± 103
χ^2_{red} [$\cdot 10^{-7}$]	6.2	0.2	1.9	6.6	6.2

Trotzdem eine Anpassung an das *one site competition* Modell für einige Signale durchgeführt werden konnte, ist auf Grund der mäßigen Verteilung der Datenpunkte entlang des *fits*, der Varianz der bestimmten K_I -Werte und der großen Fehler in dem untersuchten Konzentrationsbereich nicht von einer kompetitiven Wechselwirkung auszugehen.

3.7.1.8 Untersuchung des Einflusses der Multivalenz

Um den Einfluss des multivalenten Effekts gegenüber dem Einfluss neu eingeführter, elektrostatischer Wechselwirkung besser quantifizieren zu können, wurde ausgehend von Verbindung **21** ein einzelner Arm des Liganden **1** dargestellt (Abbildung 52) und bezüglich seines inhibitorischen Potentials zum H5 untersucht.

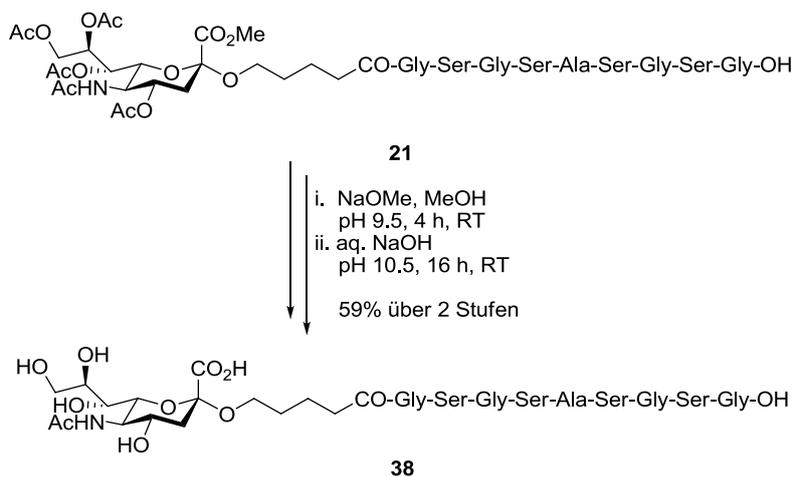


Abbildung 52: Darstellung von Verbindung **38** ausgehend von **21** in zwei Stufen. Verbindung **38** entspricht einem Arm von Ligand **1**. Die Reaktion konnte mit einer Ausbeute von 59% über zwei Stufen erfolgreich durchgeführt werden.

Die für die STD-Titration gewählten Bedingungen waren denen von **1** analog ($[K]_0 = 20 \text{ mM}$, $[P]_0 = 2.7 \text{ }\mu\text{M}$, $r = 91\%$, $[L] = 0 \text{ bis } 390 \text{ }\mu\text{M}$), wobei etwas höhere Ligandkonzentrationen vermessen wurden. Die Analyse der Bindung gestaltete sich analog zu der Auswertung von **33**. Eine schwache, konzentrationsabhängige Abnahme der STD Antwort konnte für die Protonen H-5 bis H-9 beobachtet werden. In Abbildung 53 ist die Auftragung der normierten STD-Prozent gegen die Konzentration von **38** (links) und die logarithmische Anpassung an das *one site competition* Modell (rechts) für das Protonenpaar H-4, H-6 gezeigt. In Tabelle 16 sind die Ergebnisse für die Signale zusammengefasst, für die eine Anpassung an das *one site competition* Modell erfolgreich durchgeführt und ein gegen Verschiebung des virtuellen Nullpunktes stabiler IC_{50} -Wert erhalten wurde.

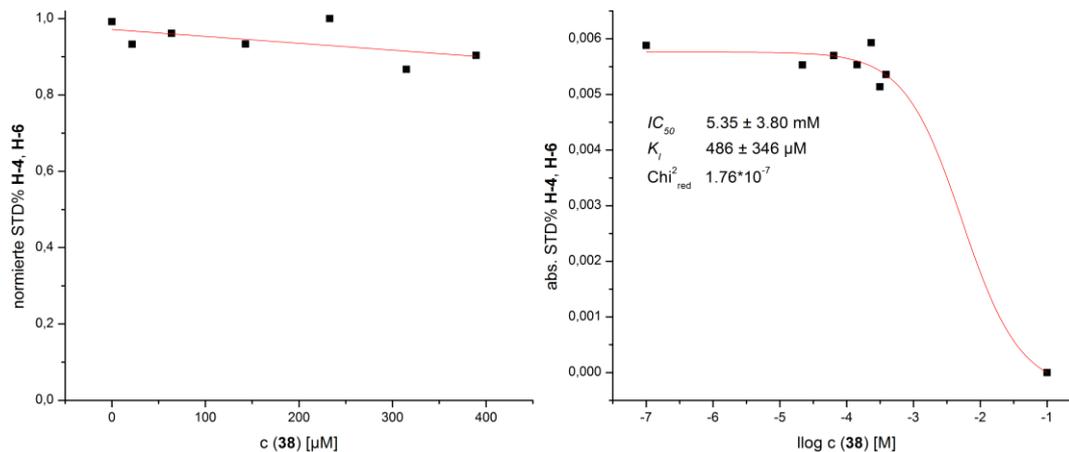


Abbildung 53: Links: Auftragung der normierten STD% der Protonen H-4, H-6 des vorgelegten Kompetitors Neu5Aca2Me gegen die Konzentration des Liganden **38**. Aus dem Kurvenverlauf geht kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Konzentration von **38** und der Intensität der gemessenen STD% hervor. Rechts: Auftragung der absoluten STD% gegen die logarithmische Konzentration von **38**. Die Daten wurden dem *one site competition* Modell angepasst und der IC_{50} -Wert bestimmt, der mit Hilfe der Cheng-Prusoff-Gleichung in den K_I umgerechnet wurde. Der virtuelle Nullpunkt wurde bei -1 gesetzt. Der bestimmte IC_{50} -Wert ist gegenüber einem Verschieben des virtuellen Nullpunktes stabil.

Tabelle 16: Zusammenfassung der bei der Analyse von **38** nach dem *one site competition* Modell erhaltenen Ergebnisse. Angegeben sind die K_I -Werte und als Statistikparameter χ^2_{red} . Für die Protonen des C-3, sowie für die NHAc Funktion konnte eine Anpassung nicht erfolgreich durchgeführt werden.

Signal	H-8, H-9a	H-5	H-4, H-6	H9b	H-7	Mittelwert
K_I [μM]	441 ± 398	784 ± 353	486 ± 346	274 ± 214	201 ± 111	437 ± 202
χ^2_{red} [$\cdot 10^{-7}$]	1.2	0.2	0.6	2.3	1.8	

Auf Grund der geringen Datenverteilung entlang des *fits* und der Trendanalyse konnte in dem untersuchten Konzentrationsbereich keine kompetitive Wechselwirkung eindeutig festgestellt werden.

3.7.1.9 Diskussion der kompetitiven STD Ergebnisse

In den kompetitiven STD-NMR-Experimenten konnte für die Liganden **33**, **34**, **36** sowie für die Verbindung **38**, die das monovalente Fragment von **1** ist, in dem untersuchten Konzentrationsbereich keine kompetitive Wechselwirkung festgestellt werden. Dies bedeutet, dass die Affinität der Liganden zu H5 zu gering ist, um eine Verdrängung des Kompetitors in dem untersuchten Konzentrationsbereich beobachten zu können. Eine Titration mit höheren Konzentrationen wurde nicht vorgenommen, da die angestrebte, deutliche Steigerung der Affinität zu H5 im Vergleich mit Neu5Aca2Me für diese Liganden nicht erzielt wurde. Eine Angleichung der Ligandkonzentration an

die Konkurrentorkonzentration hätte zudem Schwierigkeiten mit sich gebracht, da eine Bestimmung auf das Alleinstellungsmerkmal des Konkurrentors, der Methylgruppe des Aglycons, hätte erfolgen müssen. Wie aus den vorausgegangenen Kapiteln hervorgeht, lässt sich auf die -OMe Gruppe der K_I -Wert nicht verlässlich bestimmen. Für die übrigen Signale ist bei Angleich der Konzentrationen bei der Zuordnung und der Quantifizierung einer beobachteten STD-Antwort auf Grund des nicht zu differenzierenden Ursprungs mit großen Schwierigkeiten zu rechnen.

Für die Liganden **1** und **35** konnte in dem untersuchten Konzentrationsbereich eindeutig eine kompetitive Wechselwirkung zu H5 beobachtet werden. Der gemittelte K_I -Wert wurde für **1** zu 45 μM und für **35** zu 109 μM bestimmt. Für Ligand **1** konnte bei weniger als 1/100 der Konzentration des vorgelegten Konkurrentors eine Verdrängung des Neu5Aca2Me beobachtet werden. Daraus geht eine deutliche Steigerung der Affinität, beziehungsweise Avidität, im Vergleich zu dem monovalenten Neu5Aca2Me hervor. Dass der Ursprung dieser Steigerung auf neu eingeführte Struktur motive und damit auf elektrostatische Wechselwirkungen zurückzuführen ist, konnte durch die Untersuchung des monovalenten Liganden **38** ausgeschlossen werden. Dieser zeigte in dem untersuchten Konzentrationsbereich bis 500 μM keine kompetitive Wechselwirkung, wohingegen **1** bereits bei Konzentrationen bis 150 μM eindeutig kompetitiv interagiert. Im Vergleich dazu fiel für Ligand **35** die Stärke der Konkurrenz geringer aus. Dies könnte aus einer für die Interaktion ungünstigeren räumlichen Anordnung resultieren, die zu höheren Entropieverlusten bei der Bindung führt.

Die hier gefundenen Ergebnisse stehen in gutem Einklang mit den Ergebnissen aus dem *molecular modellings*. Aus dem Vergleich von **1** mit Verbindung **33** geht eine tragende Rolle der der *core*-Struktur proximalen Alkylkettenlänge hervor. Eine Verkürzung um zwei C-Atome scheint multivalente Effekte weitestgehend zu unterbinden und kann auch nicht durch Ersatz einer Aminosäure und der damit einhergehenden Verlängerung um drei Atomlängen wie in Verbindung **34** kompensiert werden. Dies verdeutlicht die Sensitivität der multivalenten Wechselwirkung bezüglich der räumlichen Anordnung des Liganden.

Über den Grad der Valenz, beziehungsweise um welchen Faktor die Affinität durch Multivalenz gesteigert werden konnte, kann durch die indirekte Messung als kompetitive Titration keine eindeutige Aussage getroffen werden. Das für die beobachtbare Verdrängung benötigte Verhältnis von Konkurrentor zu Ligand legt jedoch nahe, dass die beobachtete Steigerung eher der einer bivalenten Wechselwirkung entspricht. Hier wäre im Idealfall von einer Steigerung der Affinität um den Faktor 1000 auszugehen. Dieses muss mit Hilfe anderer analytischer Verfahren geprüft werden. Da die Länge der Alkylketten relativ zu der Länge des peptidischen Linkers einen dominanten Einfluss zu haben scheint, ist nicht auszuschließen, dass hier durch Verlängerung einiger weniger C-Atome der trivalente Bindungsmodus erreicht werden kann. Auch die Inkorporation einer peptidomimetischen Struktur, die die Flexibilität der Linker erhöht, könnte den trivalenten Bindungsmodus begünstigen.

3.7.2 SPR-Experimente

Um die aus den kompetitiven STD-NMR Studien erhaltenen Ergebnisse weiter zu stützen, wurde die Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) als zweites analytisches Verfahren zur Bestimmung der Bindungseigenschaften gewählt. Die SPR hat den Vorteil, sehr starke Wechselwirkungen untersuchen zu können. Die Messung findet in einem strömendem Messsystem statt, was einem biologisch relevantem System näher kommt als ein statisches.

Für die Untersuchung der Bindungseigenschaften wurde H5 auf CM5 Chips der Firma Biacore unter Standardbedingungen mit EDC/NHS bei einer Flussrate von 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ gekuppelt. Ein *capping* mit Ethanolamin nach ausreichender Proteinimmobilisierung wurde bei gleicher Flussrate während 10 min durchgeführt. Für die Immobilisierung des H5 wurde der pI aus der Proteinsequenz Software-gestützt berechnet und zu 5.8 bestimmt^[129]. Das Protein wurde in Maleat-Puffer (pH 5.5) dialysiert und auf eine Konzentration von etwa 0.005 mg/mL eingestellt. Jedes H5 Monomer verfügt über 24 Lysine, von denen sich drei in unmittelbarer Nähe der Bindungstasche befinden. Für eine optimale Aktivität des Proteins wurde dem Immobilisierungspuffer daher 20 mM Neu5Ac α 2Me als bekanntem Binder beigelegt, um eine Bindung über ein der Bindungstasche proximales Lysin zu unterdrücken.

Als Laufpuffer diente kommerziell bezogener HBS-Puffer mit 3 mM EDTA und 0.05% Surfactant P20 als Additive (HBS-EP). Zur Äquilibration des Systems wurden zwei *startup cycles* den Messreihen voran gestellt. Die Messungen selber erfolgten bei einer Flussrate von 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ und ohne Regeneration. Die Kontaktzeit betrug 120 s und die Dissoziationszeit 600 s. Vor jeder Immobilisierung wurde neben einem „*desorb*“ Reinigungsprozess auch der umfangreichere „*super clean*“ Reinigungsprozess durchgeführt, was sich positiv auf die erhaltenen Messkurven auswirkte. Auf Grund der kurzen Halbwertszeit des Proteins auf dem Chip erfolgten die Messungen auf verschiedenen Chips. Welcher Ligand bei welcher Proteinimmobilisierung untersucht wurde, findet sich in Kapitel 6.4.

Die Bestimmung der Bindungseigenschaften mittels SPR kann kinetisch in einer Einpunktmessung erfolgen oder thermodynamisch mittels einer Titrationsreihe. Für die hier angestellten Untersuchungen wurden Titrationsreihen aufgenommen, die thermodynamisch ausgewertet wurden. Eine kinetische Analyse der einzelnen Titrationspunkte wurde ebenfalls durchgeführt. Die benötigte Flussrate von 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ ist für eine kinetische Analyse etwas zu niedrig, da hier Massentransporteffekte (*mass transfer limitation, MTL*) zu tragen kommen und die Assoziationskonstante k_{on} verfälschen können. Eine thermodynamische Analyse ist gegenüber niedrigen Flussraten stabil. Kritisch für eine kinetische Analyse ist auch die multivalente Natur des untersuchten Systems, da der Erhalt verlässlicher, kinetischer Daten auf monovalente Systeme beschränkt ist. Die kinetische Auswertung wird hier als Ergänzung der thermodynamischen Daten aufgeführt.

3.7.2.1 Methodenentwicklung für die SPR Messungen

Die Untersuchung mittels SPR brachte unerwartet viele Schwierigkeiten mit sich, deren Ursachen nicht eindeutig geklärt werden konnten. Dazu gehörte ein unsteter Verlauf der Bindungskurven, ungenügende RU-Antworten, sowie eine massive Abnahme der Signalintensität im Verlauf der Analyse mehrerer Messreihen. Des Weiteren konnte bei höheren Konzentrationen immer wieder ein sprunghafter Abfall der RU-Antwort beobachtet werden. In der Literatur sind SPR-Messungen mit Influenza Hämagglutininen zwar beschrieben^[130-132], doch nur in einer Literaturstelle wurde das Hämagglutinin auf dem Chip immobilisiert^[133]. Hier wurden Seren, das heißt Antikörper mit hoher Masse, in einer kompetitiven Studie mit ganzen Viren untersucht. Dies gewährleistete eine hohe RU Antwort.

Die Immobilisierung des Proteins verlief auch bei kurzer Kontaktzeit mit hohen RU-Werten. Bereits verwendetes und dialysiertes Protein konnte unter ansonsten analogen Bedingungen nur bei deutlich längeren Kontaktzeiten mit deutlich niedrigeren RU-Werten immobilisiert werden. Die Ursache hierfür bleibt unklar.

Ein einmal immobilisierter Chip verfügte über eine begrenzte Halbwertszeit von circa 4-6 h. Im Verlauf einer Messreihe konnte eine kontinuierliche Abnahme der RU-Antwort beobachtet werden, die dazu führte, dass nach 30-40 Messungen die erhaltenen Kurven auf Grund eines zu schlechten Signal-zu-Rausch Verhältnisses nicht mehr interpretierbar waren. Dies konnte ebenfalls durch Vergleich des theoretischen RU_{max} -Wertes mit dem bestimmten RU_{max} -Wert beobachtet werden. Wurden zu Beginn einer Messung, bestehend aus mehreren Titrationsreihen verschiedener Liganden, circa 50% des theoretischen RU_{max} erreicht, nahm dieses Verhältnis im Lauf der Messung kontinuierlich ab. Dieser Prozess trat auch auf, wenn auf eine Regeneration verzichtet wurde und schien sogar durch die bei Nilsson *et al.* beschriebenen Regenerationsbedingungen beschleunigt zu werden^[133].

Verschiedene Flussraten von 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ bis 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ wurden auf ihre Eignung hin untersucht. Dabei zeigte die Flussrate von 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ die besten Ergebnisse, wohingegen sich höhere Flussraten äußerst ungünstig auf die Halbwertszeit des Proteins auf dem Chip auswirkten. Hohe Flussraten zeigten sich für die Untersuchung der trivalenten Liganden selbst bei einem frisch immobilisierten Chip als ungeeignet, wohingegen Neu5Ac α 2Me bei 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ erfolgreich analysiert werden konnte. Diese Beobachtungen führten zu der Annahme, dass sich die Monomere voneinander scheren, so dass mit den Messungen direkt nach der Immobilisierung begonnen wurde. Einen positiven Einfluss auf die Messungen hatte eine erneute Injektion von EDC/NHS nach der Immobilisierung des Proteins und vor dem *capping* mit Ethanolamin. Dies verbesserte zwar nicht die Halbwertszeit des Chips, führte aber zu

höheren Signalantworten. Auf ein *primen* des Chips wurde verzichtet, da hier Laufpuffer mit hoher Flussrate über den Chip geleitet wird.

Da die Absolutwerte der *response units* der Basislinie zu Beginn einer jeden Messung kontinuierlich fielen, wurde eine unvollständige Dissoziation des Liganden vom Protein ausgeschlossen. Dies wurde durch eine qualitative Analyse der Dissoziationsphase gestützt, da hier der vor Injektion des Liganden bestimmte Wert schnell wieder erreicht und im weiteren Verlauf unterschritten wurde. Da die *baseline response* nicht im gleichen Umfang wie das Signal-zu-Rausch Verhältnis abnahm, ist eine Überlagerung der Effekte, Scheren von Monomereinheiten des Proteins vom Chip und unvollständige Dissoziation der Liganden, nicht auszuschließen.

Die immer wieder beobachtete sprunghafte Abnahme der RU-Antwort bei höheren Ligandkonzentrationen schien auf eine Mizellbildung bei längerem Stehen der Liganden in Lösung zurückzuführen zu sein und konnte durch ein Lösen der Liganden unmittelbar vor der Messung mit anschließender Sonifikation der Lösungen unterbunden werden.

3.7.2.2 Validierung des SPR Systems mit Neu5Aca2Me (39)

Auf Grund der kurzen Halbwertszeit des Proteins auf dem Chip wurde nicht jedem Messzyklus eine Messreihe mit einem bekanntem Binder wie dem Neu5Aca2Me voran und hintendran gestellt. Stattdessen wurde für die späteren Messungen unter analogen Bedingungen ein Machbarkeitsnachweis mit Neu5Aca2Me (39) durchgeführt. Die Sensorgramme, sowie die Anpassung an das *one site binding* Modell sind in Abbildung 54 gezeigt.

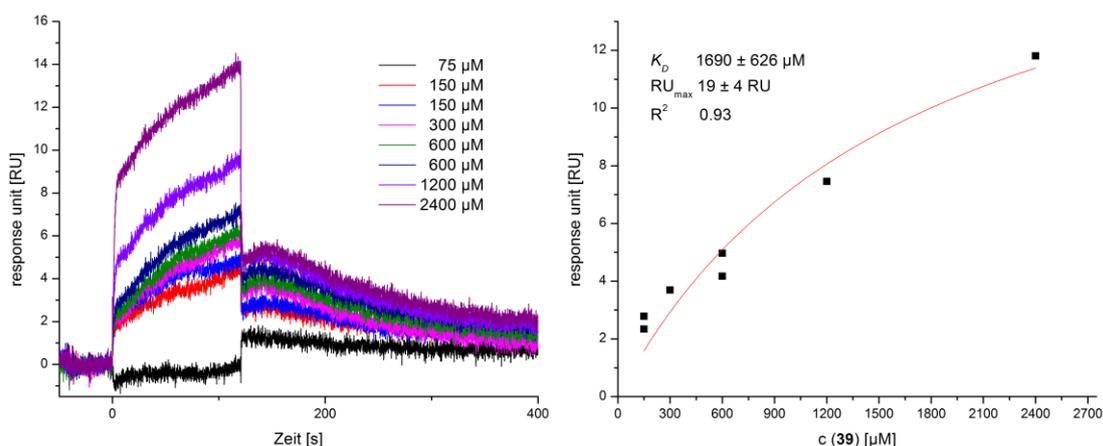


Abbildung 54: Darstellung der bei der Analyse von Neu5Aca2Me erhaltenen Sensorgramme (links) und der Anpassung der Datenpunkte an das *one site binding* Modell (rechts). Der RU_{\max} von 19 RU ist in guter Übereinstimmung mit dem theoretischen RU_{\max} von 21 RU. Der K_D von 1.8 mM stimmt gut mit den Werten aus den STD-NMR-Experimenten, sowie mit den Literaturwerten überein.

In den Sensorgrammen lässt sich der blockartige Verlauf, der für schwache Wechselwirkungen mit schnellen Kinetiken charakteristisch ist, erkennen. Bei den Messungen wurde der RU_{\max} -Wert zu 19 ± 4 RU bestimmt und stimmt mit dem theoretischen RU_{\max} von 21 gut überein. Der bestimmte K_D -Wert stimmt sowohl mit dem für eine Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkung erwarteten Wert im niedrig millimolaren Bereich, als auch mit dem durch STD-NMR-Spektroskopie bestimmten Wert von 1.9 mM überein. Somit eignen sich die verwendeten Meßparameter für die Analyse des untersuchten Systems.

In Abbildung 55 ist exemplarisch die Anpassung an die Langmuir-Isotherme gezeigt, die bei der kinetischen Auswertung der Konzentration von 2400 μM erhalten wurde.

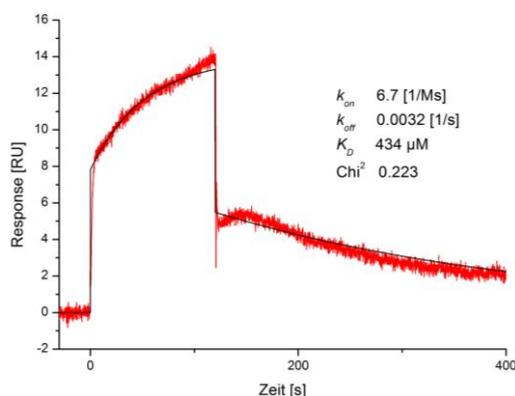


Abbildung 55: Exemplarisch gezeigte kinetische Analyse von **39** bei einer Konzentration von 2400 μM . Der bestimmte K_D liegt mit 400 μM etwa viermal niedriger als der mittels thermodynamischer Analyse bestimmte Wert von 1700 μM .

Die Ergebnisse der kinetischen Analyse für die einzelnen Konzentrationen sind in Tabelle 17 zusammengefasst.

Tabelle 17: Zusammenfassung der kinetischen Analyse von **39** nach Anpassung der einzelnen Konzentrationen an die Langmuir-Gleichung. Die beobachtete Assoziationskonstante k_{obs} wurde durch Multiplikation der Assoziationskonstante k_{on} mit der Konzentration und anschließender Addition der Dissoziationskonstante k_{off} berechnet. Der K_D wurde durch Division von k_{off} durch k_{on} erhalten.

c [μM]	k_{on} [1/Ms]	k_{obs} [1/s]	t_{on} [s]	k_{off} [1/s]	t_{off} [s]	K_D [μM]	Chi ²
150	59	0.0125	80.22	0.0018	550.36	31	0.0780
150	108	0.0204	48.92	0.0023	431.97	21	0.0836
300	30	0.0098	102.12	0.0046	215.84	156	0.0679
600	19	0.0064	156.78	0.0033	304.14	176	0.0848
600	19	0.0063	158.81	0.0030	336.36	158	0.2230
1200	12	0.0053	187.29	0.0033	301.93	283	0.1430
2400	7	0.0032	312.89	0.0032	312.89	434	0.2230
Mittelwert	36	0.0091	149.58	0.0031	350.50	180	

Die kinetische Analyse ergab eine niedrigere Dissoziationskonstante als die thermodynamische Analyse. Ob die zweite Neuraminsäurebindungstasche am Übergang der beiden Untereinheiten des Hämagglutinin, für die eine etwa Faktor 4 niedrigere Affinität zu Neu5Ac α 2Me im Vergleich zu der primären CRD postuliert wird, Einfluss auf die kinetische Analyse hat, ist unklar^[134]. Bei höheren Konzentrationen von **39** näherte sich der K_D -Wert dem der thermodynamischen Analyse an. Die abweichenden Werte der kinetischen Analyse können auf die Schwierigkeiten hindeuten, die bei der kinetischen Analyse kleiner Liganden bei niedriger Flussrate entstehen. Hier liefert die thermodynamische Analyse verlässlichere Ergebnisse. Die Werte für *on-* und *off rate* dienen für die im Folgenden bestimmten Kinetikparameter als Bezugsgröße.

3.7.2.3 SPR Analyse der Bindung von Ligand **33** (4-9-5) an H5

Die Untersuchung des Liganden **33** erfolgte zweifach in einem Konzentrationsbereich zwischen 0.0375-24 μM . Für die höchste Konzentration wurde eine unspezifische Wechselwirkung beobachtet. Diese wurde für die Auswertung nicht berücksichtigt. In Abbildung 56 sind die Sensorgramme (links) und die Anpassung an das *one site binding* Modell (rechts) gezeigt.

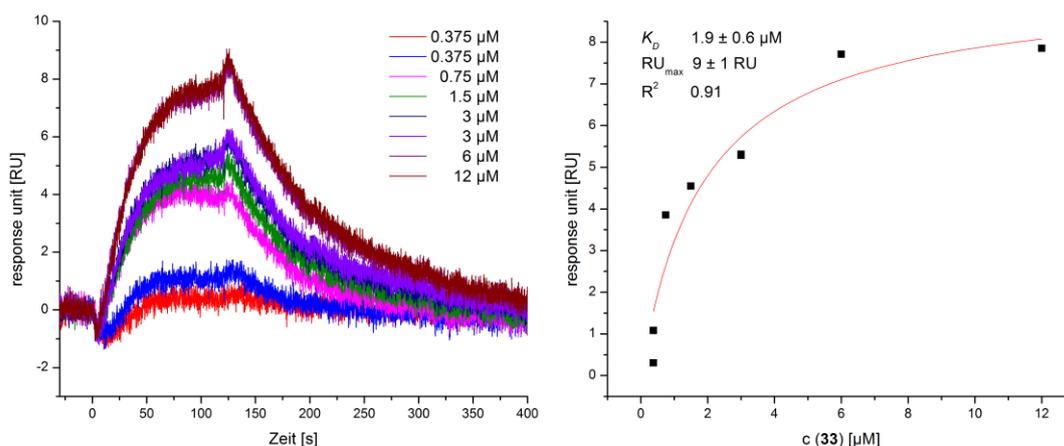


Abbildung 56: Darstellung der bei der Analyse von **33** erhaltenen Sensorgramme (links) und der dazugehörigen Anpassung an das *one site binding* Modell (rechts). Der RU_{max} wurde zu 9 RU bestimmt. Der theoretische RU_{max} liegt hier bei etwa 90. Das Signal-zu-Rausch Verhältnis erlaubte dennoch eine Auswertung der Daten. Der K_D wurde bei einem R^2 -Wert von 0.91 zu 2 μM bestimmt.

Die Analyse der Bindung von Ligand **33** ergab einen K_D von $1.9 \pm 0.6 \mu\text{M}$ bei einem guten R^2 -Wert von 0.91. Die Auswertung der Daten ergab weiter, dass der bestimmte RU_{max} bei nur etwa zehn Prozent des theoretischen RU_{max} -wertes liegt. Dies bedeutet, dass zum Zeitpunkt der Datenakquisition nur zehn Prozent des immobilisierten Proteins als aktives Trimer vorlagen. Dennoch ließ das beobachtete Signal-zu-Rausch Verhältnis eine Auswertung zu. Der bestimmte K_D konnte in einer weiteren Titrationsreihe bestätigt werden.

In Abbildung 57 ist exemplarisch die Anpassung an die Langmuir-Isotherme gezeigt, die bei der kinetischen Auswertung der Konzentration von 6 μM erhalten wurde.

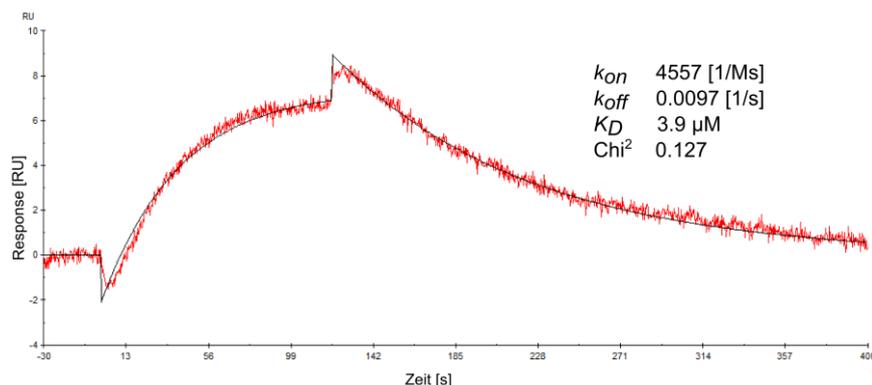


Abbildung 57: Exemplarisch gezeigte kinetische Analyse von **33** bei einer Konzentration von 6 μM . Der bestimmte K_D liegt mit 3.9 μM in der gleichen Größenordnung wie der mittels thermodynamischer Analyse bestimmte Wert von 1.9 μM .

Die Ergebnisse der kinetischen Analyse für die einzelnen Konzentrationen sind in Tabelle 18 zusammengefasst. Eine Anpassung an die Langmuir-Gleichung war nicht für alle Konzentrationen möglich.

Tabelle 18: Zusammenfassung der kinetischen Analyse von **33** nach Anpassung der einzelnen Konzentrationen an die Langmuir-Gleichung. Die beobachtete Assoziationskonstante k_{obs} wurde durch Multiplikation der Assoziationskonstante k_{on} mit der Konzentration und anschließender Addition der Dissoziationskonstante k_{off} berechnet. Der K_D wurde durch Division von k_{off} durch k_{on} erhalten.

c [μM]	k_{on} [1/Ms]	k_{obs} [1/s]	t_{on} [s]	k_{off} [1/s]	t_{off} [s]	K_D [μM]	Chi ²
0.375	4057	0.022	46.44	0.020	49.97	4.9	0.0663
3	4204	0.024	42.38	0.011	91.07	2.6	0.0822
6	2512	0.025	40.27	0.010	102.47	3.9	0.127
12	1126	0.023	44.33	0.009	110.53	8.0	0.104
Mittelwert	2975	0.023	43.36	0.012	88.51	4.8	

Die kinetische Analyse bestätigt die aus der thermodynamischen Analyse erhaltenen K_D -Werte im niedrig mikromolaren Bereich. Dabei zeigt der Ligand **33** verglichen mit **39** eine schnelle Assoziations- und Dissoziationsrate. Dies ist ungewöhnlich, da für den Fall einer multivalenten Wechselwirkung ein k_{on} in der Größenordnung des k_{on} von **39** (36 1/Ms) und ein deutlich langsamerer k_{off} (0.0031 1/s) erwartet wurde.

3.7.2.4 SPR Analyse der Bindung von Ligand 34 (4-10-5) an H5

Die Untersuchung von **34** erfolgte zweifach in einem Konzentrationsbereich zwischen 0.0375-24 μM . Für die höchste Konzentration wurde auch hier eine unspezifische Wechselwirkung beobachtet. Diese wurde für die Auswertung nicht berücksichtigt. In Abbildung 58 sind die Sensorgramme und die Anpassung an das *one site binding* Modell gezeigt, die bei der Analyse von **34** erhalten wurden.

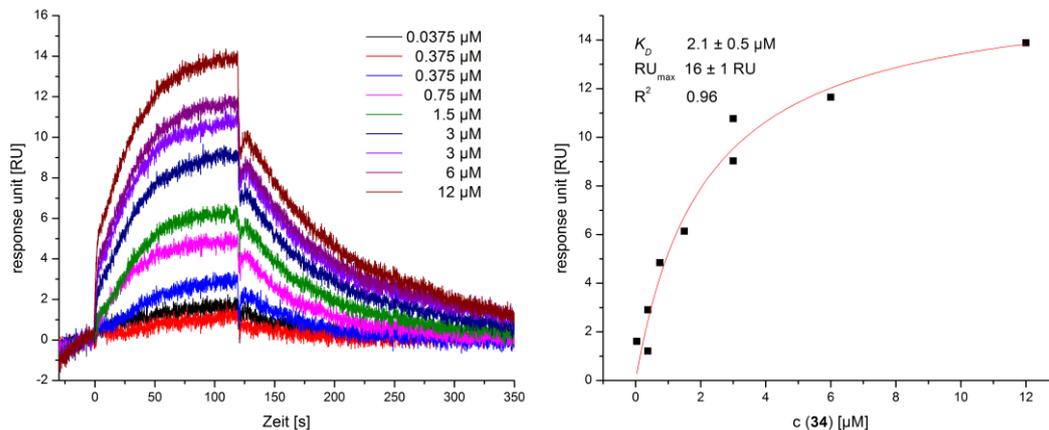


Abbildung 58: Darstellung der bei der Analyse von **34** erhaltenen Sensorgramme (links) und der dazugehörigen Anpassung an das *one site binding* Modell (rechts). Der bestimmte RU_{max} beträgt etwa 20% des theoretischen RU_{max} -Wertes. Das gute Signal-zu-Rausch Verhältnis erlaubte eine Auswertung der akquirierten Daten. Der K_D wurde bei gutem R^2 -Wert von 0.96 zu 2 μM bestimmt.

Die Daten ließen sich gut an das *one site binding* Modell anpassen, auch wenn der bestimmte RU_{max} -Wert bei nur 20% des erwarteten RU_{max} -Wertes liegt. Dennoch wiesen die Sensorgramme ein gutes Signal-zu-Rausch Verhältnis auf. Der bestimmte K_D von $2.1 \pm 0.5 \mu\text{M}$ konnte in einer weiteren Titrationsreihe bestätigt werden.

In Abbildung 59 ist exemplarisch die Anpassung an die Langmuir-Isotherme gezeigt, die bei der kinetischen Auswertung der Konzentration von 12 μM erhalten wurde.

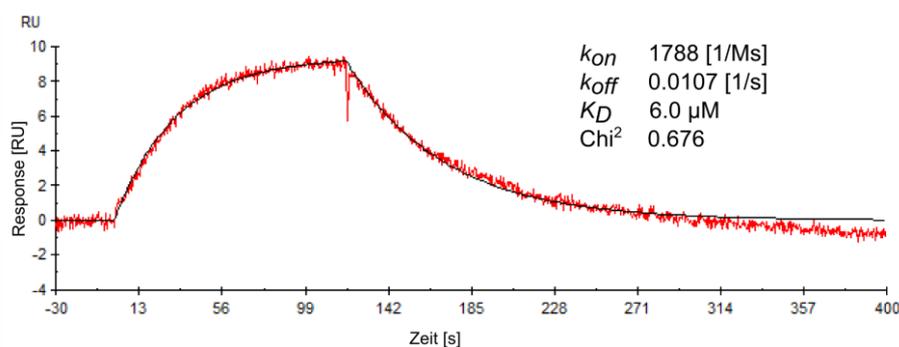


Abbildung 59: Exemplarisch gezeigte kinetische Analyse von **34** bei einer Konzentration von 12 μM . Der bestimmte K_D liegt mit 6.0 μM in der gleichen Größenordnung wie der mittels thermodynamischer Analyse bestimmte Wert von 2.1 μM .

Die Ergebnisse der kinetischen Analyse sind in Tabelle 19 zusammengefasst. Eine Anpassung an die Langmuir-Gleichung war nicht für alle Konzentrationen möglich.

Tabelle 19: Zusammenfassung der kinetischen Analyse von **34** nach Anpassung der einzelnen Konzentrationen an die Langmuir-Gleichung. Die beobachtete Assoziationskonstante k_{obs} wurde durch Multiplikation der Assoziationskonstante k_{on} mit der Konzentration und anschließender Addition der Dissoziationskonstante k_{off} berechnet. Der K_D wurde durch Division von k_{off} durch k_{on} erhalten.

c [μM]	k_{on} [1/MS]	k_{obs} [1/s]	t_{on} [s]	k_{off} [1/s]	t_{off} [s]	K_D [μM]	Chi ²
0.375	724	0.021	48.68	0.020	49.33	28	0.735
0.75	20020	0.032	30.83	0.017	57.40	0.9	0.204
1.5	8329	0.027	37.19	0.014	69.49	1.7	0.235
3	6531	0.030	32.81	0.011	91.91	1.7	0.334
12	1788	0.032	31.11	0.011	93.55	6.0	0.676
Mittelwert	7478	0.028	36.13	0.015	72.34	7.6	

Die kinetische Analyse bestätigt weitestgehend die thermodynamische Betrachtung. Wird die niedrigste Konzentration der kinetischen Analyse ausgelassen, stimmt der gemittelte K_D -Wert mit 2.5 μM fast perfekt mit dem K_D -Wert der thermodynamischen Analyse überein. Die große Varianz der Werte für die Assoziationsrate könnte auf Massentransfer-Limitierungen (*MTL*) zurückzuführen sein, die durch die niedrige Flussrate von 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ bedingt sind. Genau wie bei Ligand **33** ist auch hier die schnelle Kinetik verglichen mit **39** ungewöhnlich.

3.7.2.5 SPR Analyse der Bindung von Ligand 1 (6-9-5) an H5

Die Untersuchung von Ligand **1** erfolgte zweifach in einem Konzentrationsbereich zwischen 0.01875-24 μM . Dabei zeigten die Konzentrationen 12 μM und 24 μM eine unspezifische Wechselwirkung und wurden für die Auswertung nicht berücksichtigt. In Abbildung 60 sind die Sensorgramme und die Anpassung an das *one site binding* Modell gezeigt, die bei der Analyse von **1** erhalten wurden.

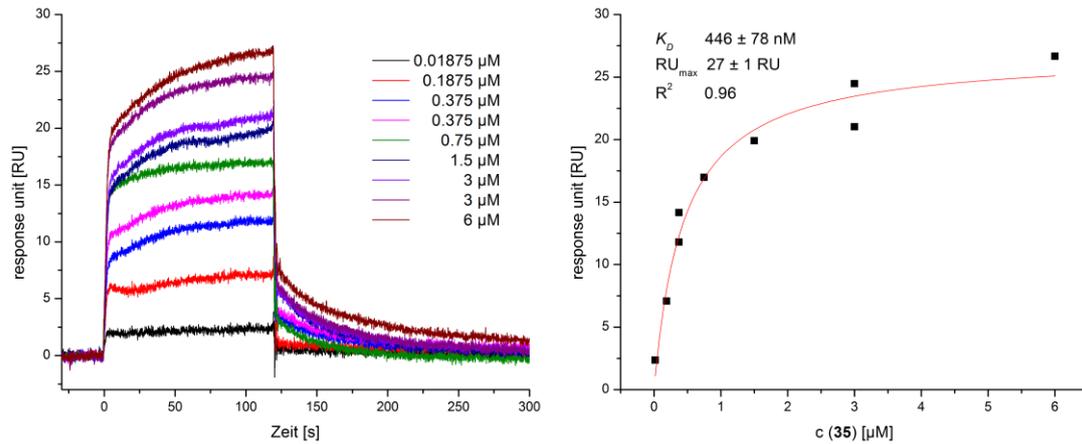


Abbildung 60: Darstellung der bei der Analyse von **1** erhaltenen Sensorgramme (links) und der dazugehörigen Anpassung an das *one site binding* Modell (rechts). Der bestimmte RU_{max} beträgt etwa 30% des theoretischen RU_{max} -Wertes. Das gute Signal-zu-Rausch Verhältnis erlaubte die Auswertung der Daten. Der K_D konnte mit einem geringen Fehler und gutem R^2 -Wert von 0.96 zu 450 nM bestimmt werden.

Der bestimmte RU_{max} -Wert beträgt knapp 1/3 des theoretische RU_{max} -Wertes. Die Sensorgramme weisen dennoch ein sehr gutes Signal-zu-Rausch Verhältnis auf und ließen sich an das *one site binding* Modell anpassen. Der K_D wurde zu $446 \pm 78 \text{ nM}$ bestimmt und konnte in einer weiteren Titrationsreihe bestätigt werden. Damit ist der für Ligand **1** bestimmte K_D signifikant niedriger als der der Liganden **33** und **34**. Diese Beobachtung ist in guter Übereinstimmung mit den *in silico* Daten und den Ergebnissen der kompetitiven STD-Experimente.

In Abbildung 61 ist exemplarisch die Anpassung der Konzentration von 0.375 μM an die Langmuir-Isotherme gezeigt.

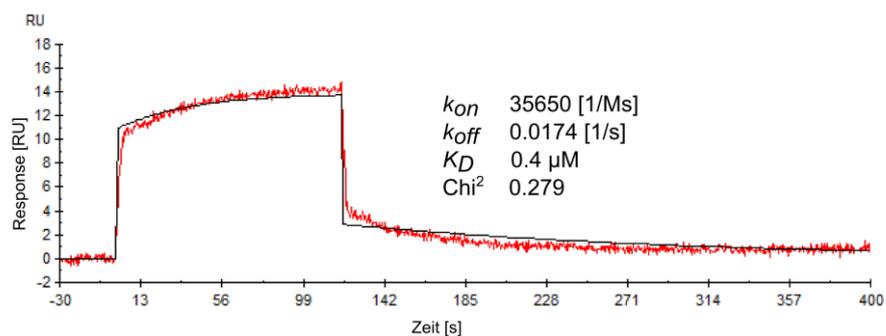


Abbildung 61: Exemplarisch gezeigte kinetische Analyse von **1** bei einer Konzentration von 0.375 μM . Der bestimmte K_D liegt mit 0.4 μM in der gleichen Größenordnung wie der mittels thermodynamischer Analyse bestimmte Wert von 0.4 μM .

Die Ergebnisse der kinetischen Analyse sind in Tabelle 20 zusammengefasst.

Tabelle 20: Zusammenfassung der kinetischen Analyse von **1** nach Anpassung der einzelnen Konzentrationen an die Langmuir-Gleichung. Die beobachtete Assoziationskonstante k_{obs} wurde durch Multiplikation der Assoziationskonstante k_{on} mit der Konzentration und anschließender Addition der Dissoziationskonstante k_{off} berechnet. Der K_D wurde durch Division von k_{off} durch k_{on} erhalten.

c [μM]	k_{on} [1/MS]	k_{obs} [1/s]	t_{on} [s]	k_{off} [1/s]	t_{off} [s]	K_D [μM]	Chi ²
0.1875	40130	0.009	108.80	0.002	599.88	0.04	0.257
0.375	35650	0.031	32.49	0.017	57.44	0.37	0.279
0.375	53520	0.026	39.20	0.005	183.76	0.10	0.546
0.75	54640	0.096	10.47	0.055	18.34	0.99	0.323
1.5	16620	0.052	19.11	0.027	36.51	1.60	0.506
3	6825	0.044	22.98	0.023	43.40	3.40	0.567
6	3635	0.029	34.01	0.008	131.68	2.10	1.100
Mittelwert	30146	0.041	38.15	0.020	153.00	1.23	

Die kinetische Analyse ergab einen höheren K_D als die thermodynamische. Besonders auffällig ist hier die für die niedrigen Konzentration sehr schnelle Assoziation und die hohe Varianz der Werte für Assoziations- und Dissoziationsrate. Die beobachtete Kinetik ist deutlich schneller als die für **39** bestimmte Kinetik. Die *on rate* ist dabei etwa Faktor 1000, die *off rate* Faktor 10 schneller. Wie bereits beschrieben, liefert die thermodynamische Analyse bei kleinen Liganden und niedriger Flussrate den verlässlicheren Wert für die thermodynamische Dissoziationskonstante, der in einer weiteren Messreihe auf einer anderen Flusszelle bestätigt werden konnte. Bei der kinetischen Analyse liefern Konzentrationen um den K_D normalerweise die besten k_{on} - und k_{off} -Werte, da genügend Signal zu Rausch Abstand vorhanden ist und Aggregationsphänomene und sekundäre Bindung, die bei höheren Konzentrationen auftreten können, keine Bedeutung haben. Bei diesen Konzentrationen findet sich eine exzellente Übereinstimmung der Werte von ca. 400 nM.

3.7.2.6 SPR Analyse der Bindung von Ligand 35 (6-10-5) an H5

Die Untersuchung von Ligand **35** erfolgte zweifach in einem Konzentrationsbereich zwischen 0.01875-24 μM . Auch hier zeigten die Konzentrationen 12 μM und 24 μM eine unspezifische Wechselwirkung und wurden für die Auswertung nicht berücksichtigt. In Abbildung 62 sind die Sensorgramme und die Anpassung an das *one site binding* Modell gezeigt, die bei der Analyse von **35** erhalten wurden.

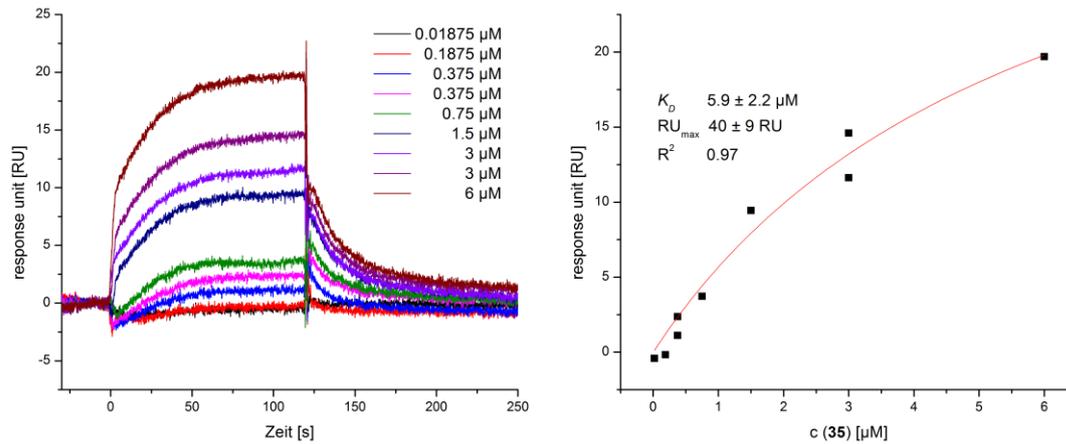


Abbildung 62: Darstellung der bei der Analyse von **35** erhaltenen Sensorgramme (links) und der dazugehörigen Anpassung an das *one site binding* Modell (rechts). Der bestimmte RU_{max} beträgt etwa 50% des theoretischen. Die Sensorgramme weisen ein sehr gutes Signal-zu-Rausch Verhältnis auf. Der K_D konnte bei einem gutem R^2 -Wert von 0,97 zu 6 μM bestimmt werden.

Bei dieser Titrationsreihe wurden etwa 50% des theoretischen RU_{max} -Wertes erreicht. Die Sensorgramme weisen ein sehr gutes Signal-zu-Rausch Verhältnis auf und ließen sich mit einem guten R^2 -Wert von 0,97 dem *one site binding* Modell anpassen. In einer weiteren Titrationsreihe wurde der K_D zu $1,2 \pm 0,3 \mu\text{M}$ bestimmt. Die in Abbildung 62 dargestellten Sensorgramme wurden auf Grund der besseren Übereinstimmung mit dem theoretischen RU_{max} -Werten gezeigt.

In Abbildung 63 ist exemplarisch die Anpassung der Konzentration von 3 μM an die Langmuir-Isotherme gezeigt.

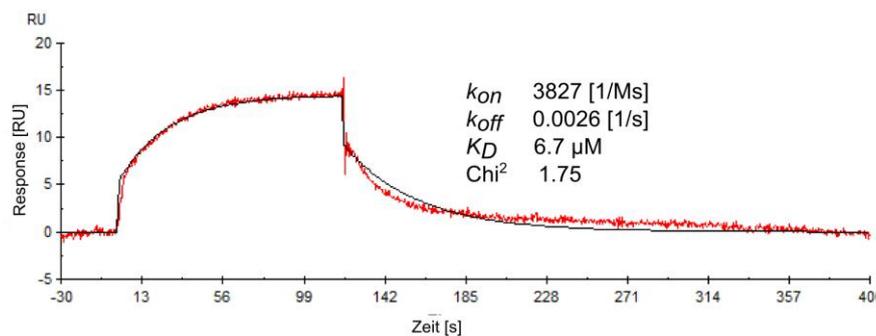


Abbildung 63: Exemplarisch gezeigte kinetische Analyse von **35** bei einer Konzentration von 3 μM . Der bestimmte K_D liegt mit 1,7 μM in der gleichen Größenordnung wie der mittels thermodynamischer Analyse bestimmte Wert.

Die Ergebnisse der kinetischen Analyse sind in Tabelle 21 zusammengefasst. Eine Anpassung an die Langmuir-Gleichung war nicht für alle Konzentrationen möglich.

Tabelle 21: Zusammenfassung der kinetischen Analyse von **35** nach Anpassung der einzelnen Konzentrationen an die Langmuir-Gleichung. Die beobachtete Assoziationskonstante k_{obs} wurde durch Multiplikation der Assoziationskonstante k_{on} mit der Konzentration und anschließender Addition der Dissoziationskonstante k_{off} berechnet. Der K_D wurde durch Division von k_{off} durch k_{on} erhalten.

c [μM]	k_{on} [1/MS]	k_{obs} [1/s]	t_{on} [s]	k_{off} [1/s]	t_{off} [s]	K_D [μM]	Chi ²
0.75	5142	0.039	25.73	0.035	28.56	6.8	3.17
1.5	3767	0.041	24.68	0.035	28.68	9.2	2.39
3	1966	0.038	26.66	0.032	31.64	16.1	2.60
3	3827	0.037	26.95	0.026	39.02	6.7	1.75
6	2434	0.038	26.17	0.024	42.35	9.7	1.89
Mittelwert	3427	0.038	26.04	0.030	34.05	9.7	

Auch wenn die kinetische Analyse einen etwas höheren K_D als die thermodynamische ergab, bestätigt sie doch den Wert im niedrig mikromolaren Bereich. Die Varianz der Werte für *off* und *on rate* fällt hier niedriger aus als bei den anderen Liganden. Die beobachteten Werte für Assoziation und Dissoziation liegen in der Größenordnung der Liganden **33** und **34** und sind damit höher als die des Neu5Ac α 2Me.

3.7.2.7 SPR Analyse von Ligand 36 (6-11-5)

Die Vermessung von Ligand **36** erfolgte zweifach in einem Konzentrationsbereich zwischen 0.0375-24 μM , wobei die höchste Konzentration eine unspezifische Wechselwirkung zeigte und für die Auswertung nicht berücksichtigt wurde. In Abbildung 64 sind die bei der Analyse von **36** erhaltenen Sensorgramme und die dazugehörige Anpassung an das *one site binding* Modell gezeigt.

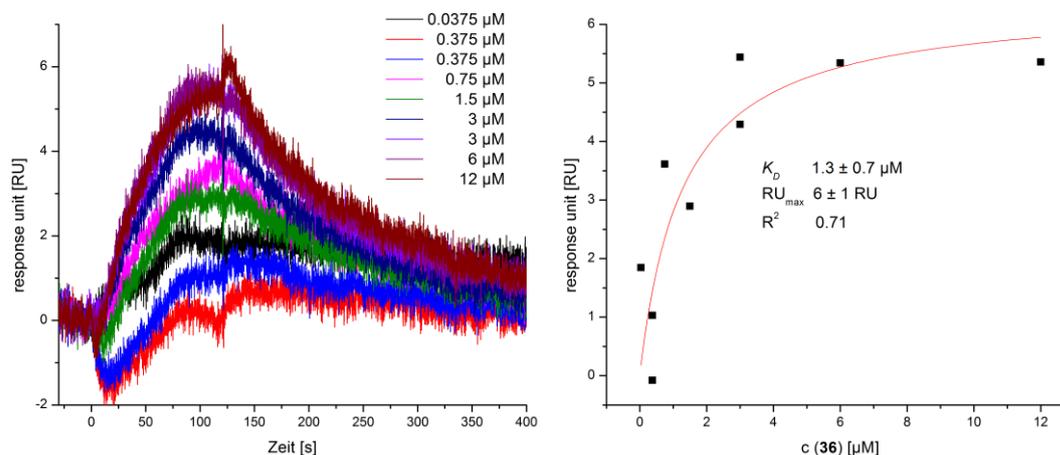


Abbildung 64: Darstellung der bei der Analyse von **36** erhaltenen Sensorgramme (links) und der dazugehörigen Anpassung an das *one site binding* Modell (rechts). Der bestimmte RU_{max} liegt bei nur 6% des theoretischen RU_{max} -Wertes. Das Signal-zu-Rausch Verhältnis ist an der Grenze für eine Auswertung der Daten. Der K_D konnte zu 1.3 μM bestimmt werden.

Die rechnerische Bestimmung des RU_{\max} -Wertes aus den SPR Daten ergab nur 6% des theoretischen RU_{\max} -Wertes. Zu Beginn der Messungen wurde auf diesem Chip knapp 50% des theoretischen RU_{\max} -Wertes erreicht. Dieses Verhältnis nahm kontinuierlich ab, was für die bereits in Kapitel 3.7.2.1 beschriebene Degradation des Proteins im Verlauf der Messungen spricht. In einer weiteren Titrationsreihe konnte die Dissoziationskonstante bestätigt werden. Die Dissoziationskonstante liegt damit in der gleichen Größenordnung wie die für **33**, **34** und **35** bestimmten K_D -Werte.

In Abbildung 65 ist exemplarisch die Anpassung der Konzentration von 6 μM an die Langmuir-Isotherme gezeigt.

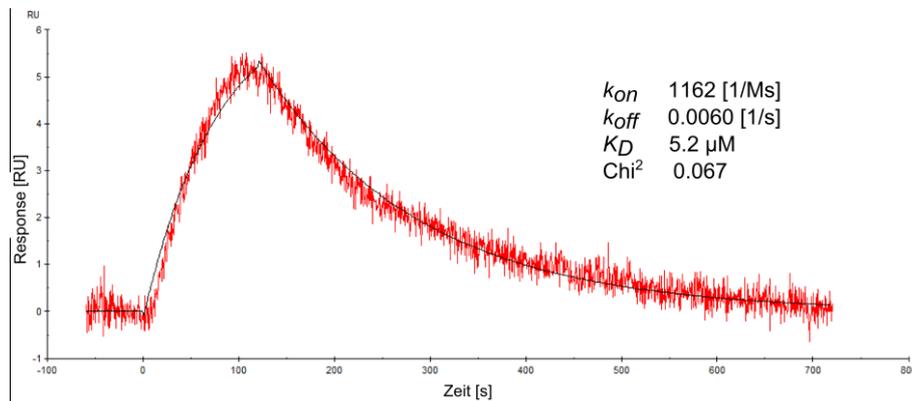


Abbildung 65: Exemplarisch gezeigte kinetische Analyse von **36** bei einer Konzentration von 6 μM . Der bestimmte K_D liegt mit 5.2 μM etwas höher als der mittels thermodynamischer Analyse bestimmte Wert von 1.3 μM . Auffällig ist hier die langsame Dissoziation.

Die Ergebnisse der kinetischen Analyse sind in Tabelle 22 zusammengefasst. Eine Anpassung an die Langmuir-Gleichung war nicht für alle Konzentrationen möglich.

Tabelle 22: Zusammenfassung der kinetischen Analyse von **36** nach Anpassung der einzelnen Konzentrationen an die Langmuir-Gleichung. Die beobachtete Assoziationskonstante k_{obs} wurde durch Multiplikation der Assoziationskonstante k_{on} mit der Konzentration und anschließender Addition der Dissoziationskonstante k_{off} berechnet. Der K_D wurde durch Division von k_{off} durch k_{on} erhalten.

c [μM]	k_{on} [1/Ms]	k_{obs} [1/s]	t_{on} [s]	k_{off} [1/s]	t_{off} [s]	K_D [μM]	Chi ²
0.75	5752	0.010	101.83	0.006	181.62	1.0	0.054
1.5	1650	0.008	118.96	0.006	168.61	3.6	0.060
3	1658	0.011	93.21	0.006	173.76	3.5	0.065
6	1162	0.013	76.80	0.006	165.34	5.2	0.066
12	778	0.015	66.74	0.006	177.09	7.2	0.067
Mittelwert	2200	0.011	91.51	0.006	173.28	4.1	

Auch hier bestätigte die kinetische Analyse den mittels thermodynamischer Analyse bestimmten K_D -Werte im niedrig mikromolaren Bereich. Auffällig ist hier die im Vergleich mit den Liganden **1** und **33-35** langsamere Dissoziationsrate, die etwa Faktor 5 niedriger ist als bei Ligand **35**.

3.7.2.8 SPR Analyse der Bindung des monovalenten Fragments **38** (9-5) an H5

Für eine Diskriminierung zwischen elektrostatischer Wechselwirkung und multivalenten Effekt wurde wie bei den STD-NMR Messungen zuvor auch das monovalente Pendant zu **1** untersucht. Der vermessene Konzentrationsbereich lag zwischen 0.78 – 25 μM . In Abbildung 66 sind die bei der Analyse von **38** erhaltenen Sensorgramme, sowie die dazugehörige Anpassung an das *one site binding* Modell, gezeigt.

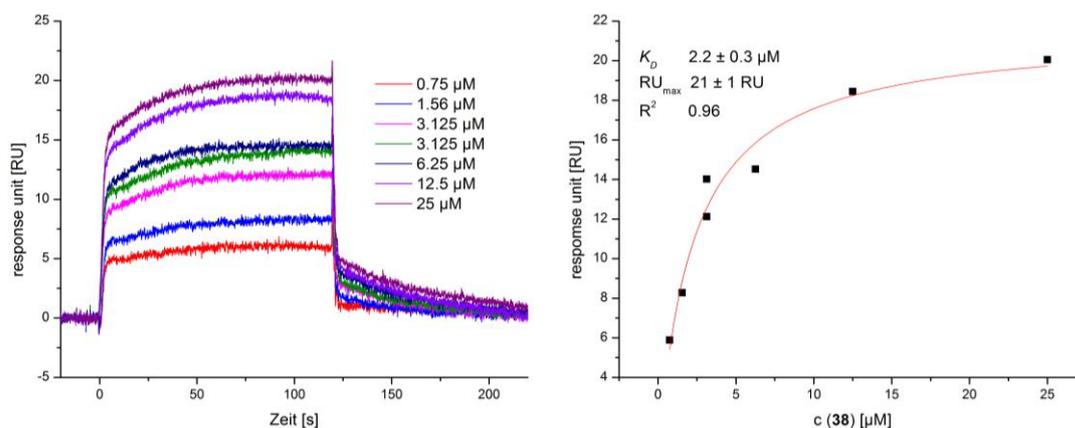


Abbildung 66: Darstellung der bei der Analyse von **38** erhaltenen Sensorgramme (links) und der dazugehörigen Anpassung der Daten an das *one site binding* Modell (rechts). Der bestimmte RU_{max} -Wert beträgt ca. 1/3 des theoretischen RU_{max} -Wertes. Dennoch weisen die Kurven ein gutes Signal-zu-Rausch Verhältnis auf. Die Dissoziationskonstante wurde zu 2.2 μM bestimmt.

Die erhaltenen Sensorgramme zeigen ein gutes Signal-zu-Rausch Verhältnis und die Anpassung an das *one site binding* Modell konnte mit gutem R^2 -Wert von 0.96 erfolgreich durchgeführt werden. Der bestimmte RU_{max} -Wert beträgt nur 1/3 des theoretischen RU_{max} Wertes. Der ermittelte K_D von 2.2 μM konnte in einer weiteren Titrationsreihen bestätigt werden.

In Abbildung 67 ist exemplarisch die Anpassung der Konzentration von 6.25 μM an die Langmuir-Isotherme gezeigt.

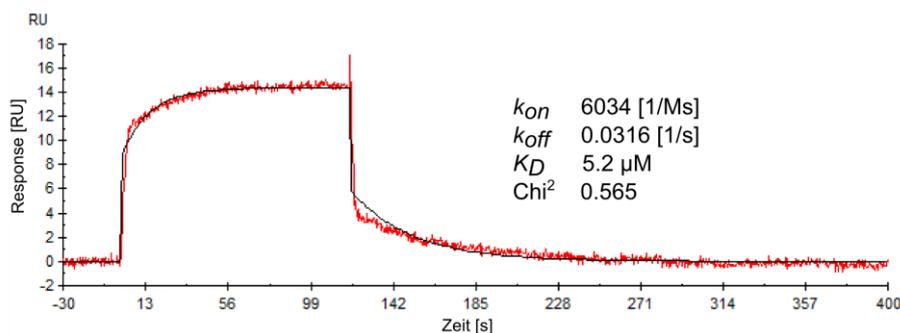


Abbildung 67: Exemplarisch gezeigte kinetische Analyse von **38** bei einer Konzentration von 6.25. Der bestimmte K_D liegt mit 5.2 μ M etwas höher als der mittels thermodynamischer Analyse bestimmte Wert von 2.2 μ M.

Die Ergebnisse der kinetischen Analyse sind in Tabelle 23 zusammengefasst. Eine Anpassung an die Langmuir-Gleichung war nicht für alle Konzentrationen möglich.

Tabelle 23: Zusammenfassung der kinetischen Analyse von **38** nach Anpassung der einzelnen Konzentrationen an die Langmuir-Gleichung. Die beobachtete Assoziationskonstante k_{obs} wurde durch Multiplikation der Assoziationskonstante k_{on} mit der Konzentration und anschließender Addition der Dissoziationskonstante k_{off} berechnet. Der K_D wurde durch Division von k_{off} durch k_{on} erhalten.

c [μ M]	k_{on} [1/Ms]	k_{obs} [1/s]	t_{on} [s]	k_{off} [1/s]	t_{off} [s]	K_D [μ M]	Chi ²
1.56	3180	0.059	17.02	0.054	18.58	17.0	0.168
3.125	3560	0.052	19.10	0.041	24.26	11.6	0.338
3.125	1509	0.047	21.42	0.042	23.83	27.8	0.397
6.25	6034	0.069	14.43	0.032	31.67	5.2	0.436
25	1421	0.060	16.68	0.024	40.95	17.2	0.565
Mittelwert	3141	0.057	17.73	0.039	27.86	15.8	

Die kinetische Analyse ergab einen fast zehnfach höheren K_D als thermodynamische Analyse und könnte durch die niedrige Flussrate bedingt sein. Die Kinetikparameter k_{on} und k_{off} liegen in derselben Größenordnung wie die der Liganden **33-35**, was für einen ähnlichen Bindungsmodus spricht. Der mittels thermodynamischer Analyse bestimmte K_D von 2 μ M liegt in der Größenordnung der K_D -Werte der Liganden **33, 34, 35** und **36**.

3.7.2.9 SPR Analyse des derivatisierten Neuraminsäurefragments **40**

Um den Einfluss der zur Neuraminsäure proximalen Alkylkette auf die Bindung zu H5 zu untersuchen, wurde das Neuraminsäurefragment **40** ausgehend von **19** in vier Stufen dargestellt.

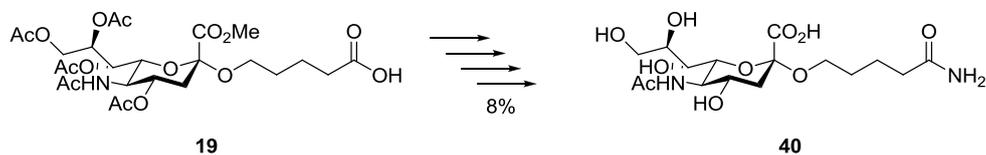


Abbildung 68: Darstellung des Neuraminsäurefragments **40** ausgehend von **19** in vier Stufen in einer Gesamtausbeute von 8%. Auf Grund der basenlabilen Schutzgruppen konnte bei der Darstellung nicht der direkte Weg über eine aktivierte Säurefunktion und Ammoniak gegangen werden. Stattdessen wurde **19** an ein Rink-Amid-Harz gekuppelt und anschließend unter Generierung der terminalen Amidfunktion abgespalten, bevor in zwei Stufen die Schutzgruppen entfernt wurden. Die Darstellung erfolgte, um den Einfluss der Alkylkette auf die Bindungsaffinität zu H5 zu quantifizieren.

Verbindung **40** konnte in 4 Stufen ausgehend von **19** erfolgreich dargestellt werden. Auf Grund der basenlabilen Schutzgruppen von **19** konnte nicht der direkte Weg zu **40** über eine aktivierte Säure und Ammoniak gegangen werden. Auf Grund der kleinen Ansatzgröße wurde sich für das Anbringen von **19** an ein Rink Amid Harz entschieden, von dem unter Ausbildung einer terminalen Amidfunktion unter sauren Bedingungen abgespalten wurde. Anschließend wurden die Schutzgruppen in zwei Stufen hydrolysiert. Die Kupplung an das Harz konnte nur in schlechter Ausbeute durchgeführt werden und erklärt die schlechte Gesamtausbeute. Von einer Optimierung der Reaktion wurde abgesehen.

In mehreren Titrationsreihen wurden Konzentrationen zwischen 3.125-500 μM vermessen. In **Abbildung 69** sind exemplarisch die bei der Analyse von **40** auf Chip 3 erhaltenen Sensorgramme und die Anpassung an das *one site binding* Modell gezeigt.

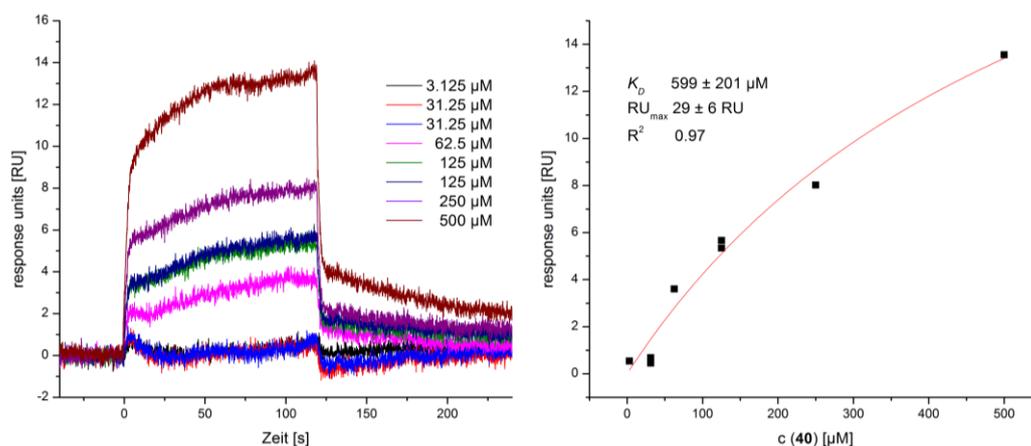


Abbildung 69: Darstellung der bei der Analyse von **40** auf Chip 3 erhaltenen Sensorgramme (links) und der dazu gehörigen Anpassung der Daten an das *one site binding* Modell (rechts). Der K_D wurde zu 600 μM bestimmt und liegt damit um den Faktor 3 niedriger als der für Neu5Aca2Me bestimmte K_D . Der bestimmte RU_{max} stimmt im Rahmen seiner Fehlergenauigkeit mit dem theoretischen RU_{max} von 25 gut überein.

Die Analyse der Titrationsreihe ergab einen K_D von 599 μM bei einem berechneten RU_{max} von 29, der im Rahmen seiner Fehlergenauigkeit mit dem theoretischen RU_{max} von 25 übereinstimmt. Die Ergebnisse der Titrations sind in Tabelle 24 zusammengefasst.

Tabelle 24: Übersicht der aus der Anpassung an das *one site binding* Modell erhaltenen Dissoziationskonstanten für die Interaktion zwischen **40** und H5. Die bestimmten K_D -Werte liegen alle in der gleichen Größenordnung und indizieren eine verbesserte Bindung durch Einführung der Alkylkette um den Faktor 0.5-3 im Vergleich zu Neu5Aca2Me.

Chip	K_D [μM]	R^2
1	920 ± 746	0.98
2	1260 ± 861	0.94
3	599 ± 201	0.96
4	1050 ± 858	0.97

Der Durchschnittswert für den K_D für die Bindung von **40** an H5 errechnet sich zu $960 \pm 280 \mu\text{M}$. Die geringe Varianz der berechneten Dissoziationskonstanten untereinander spricht neben den guten R^2 -Werten für die Belastbarkeit der Werte. Aus den Messungen geht eine Steigerung der Bindungsaffinität zu H5 im Vergleich zu Neu5Aca2Me um den Faktor 2 hervor.

In Abbildung 70 ist exemplarisch die Anpassung der Konzentration von 62.5 μM an die Langmuir-Isotherme gezeigt.

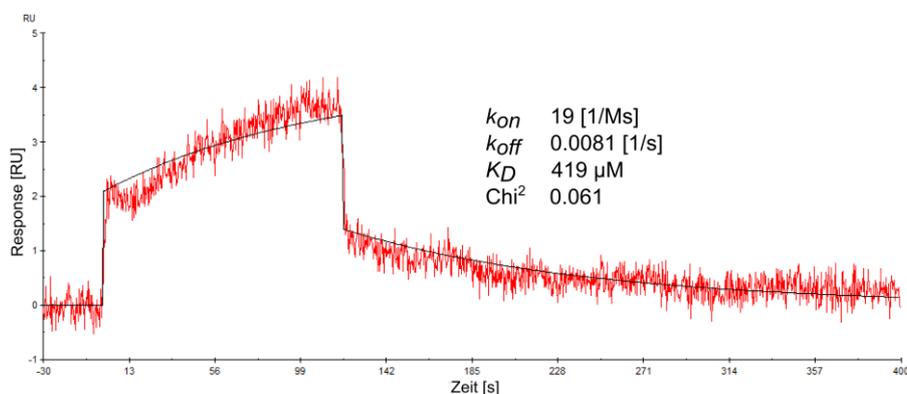


Abbildung 70: Exemplarisch gezeigte kinetische Analyse von **40** bei einer Konzentration von 62.5 μM . Der bestimmte K_D liegt mit 419 μM niedriger als der mittels thermodynamischer Analyse bestimmte Wert von 960 μM .

Die Ergebnisse der kinetischen Analyse sind in Tabelle 25 zusammengefasst. Eine Anpassung an die Langmuir-Gleichung war nicht für alle Konzentrationen möglich.

Tabelle 25: Zusammenfassung der kinetischen Analyse von **40** nach Anpassung der einzelnen Konzentrationen an die Langmuir-Gleichung. Die beobachtete Assoziationskonstante k_{obs} wurde durch Multiplikation der Assoziationskonstante k_{on} mit der Konzentration und anschließender Addition der Dissoziationskonstante k_{off} berechnet. Der K_D wurde durch Division von k_{off} durch k_{on} erhalten.

c [μ M]	k_{on} [1/MS]	k_{obs} [1/s]	t_{on} [s]	k_{off} [1/s]	t_{off} [s]	K_D [μ M]	Chi ²
62.5	19	0.0093	107.23	0.0081	123.23	419	0.061
125	102	0.0168	59.41	0.0041	245.04	40	0.075
250	69	0.0209	47.89	0.0036	275.41	53	0.101
500	64	0.0367	27.26	0.0047	213.58	73	0.195
Mittelwert	64	0.0209	60.45	0.0051	214.31	146.25	

Die kinetische Analyse ergab einen deutlich niedrigeren K_D -Wert als der mittels thermodynamischer Analyse bestimmte Wert. Dies entspricht den für **39** gemachten Beobachtungen und könnte auch hier auf die zweite Neuraminsäurebindungstasche des HA zurückzuführen sein. Auch die Kinetikparameter für k_{on} und k_{off} entsprechen denen von **39** und deuten auf einen ähnlichen Bindungsmodus hin. Die beobachtete Affinitätssteigerung von **40** zu H5 kann die niedrigen Dissoziationskonstanten, die für **38** beobachtet wurden, nicht allein erklären. In einer weiteren Titrationsreihe wurde das Peptidfragment von **38** untersucht.

3.7.2.10 SPR Analyse des Peptidfragments **41**

Da für den monovalenten Liganden, bestehend aus dem derivatisierten Neuraminsäurefragment **40** und dem peptidischen Linker, eine Dissoziationskonstante im niedrig mikromolaren Bereich bestimmt wurde, welche alleine durch das Neuraminsäurefragment nicht erklärt werden kann, wurde der peptidische Linker einzeln dargestellt und untersucht.

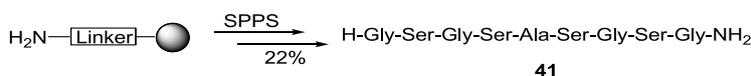


Abbildung 71: Synthese von **41** mittels Festphasenpeptidsynthese. Die Darstellung erfolgte automatisiert an einem mikrowellenunterstützten Synthesizer nach Fmoc-Strategie mit TBTU als Aktivator. Nach Reinigung mittels RP-HPLC konnte **41** in 22% Ausbeute erhalten werden.

Das Peptidfragment **41** wurde unter Standardbedingungen mittels Festphasenpeptidsynthese an einem mikrowellenunterstützten Synthesizer dargestellt. Die Synthese erfolgte nach der Fmoc-Strategie mit TBTU als Aktivator. Nach Reinigung mittels RP-HPLC konnte **41** mit 22% Ausbeute erhalten werden.

Für die Titration wurden Konzentrationen zwischen 3.125-500 μM vermessen, wobei bei Konzentrationen ab 250 μM ein deutlicher Abfall der RU Antwort beobachtet wurde. Dies ist vermutlich auf die Ausbildung von Mizellen, wie sie auch für Ligand **1** beobachtet werden konnten (Kapitel 3.7.1.5) oder einer kolloidalen Form von **41** mit veränderter Brechzahl zurückzuführen. Diese Messpunkte wurden für die Auswertung nicht berücksichtigt. In Abbildung 72 sind die erhaltenen Sensorgramme und die Anpassung an das *one site binding* Modell gezeigt.

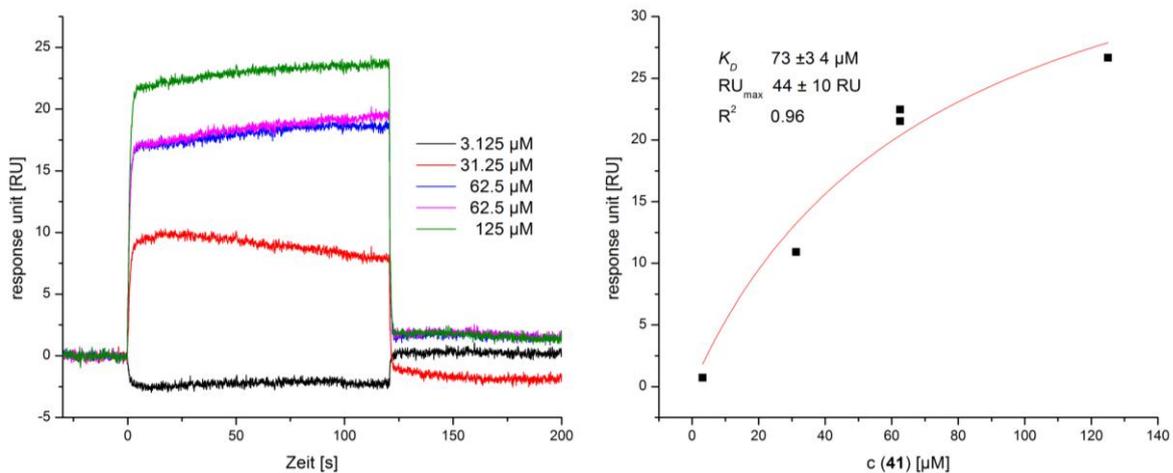


Abbildung 72: Darstellung der bei der Analyse von **41** erhaltenen Sensorgramme (links) und der dazu gehörigen Anpassung an das *one site binding* Modell (rechts). Die Sensorgramme weisen ein gutes Signal-zu-Rausch auf und die Datenpunkte ließen sich gut anpassen. Der K_D wurde zu 73 μM bestimmt. Ungewöhnlich für eine Affinität im mittleren mikromolaren Bereich ist der blockartige Verlauf der Sensorgramme, der für eine sehr schnelle Kinetik spricht.

Durch Anpassung an das *one site binding* Modell wurde der K_D zu 73 μM bestimmt. Auffällig ist der blockartige Verlauf der Sensorgramme zu Beginn der Kontakt- und der Dissoziationsphase, welcher charakteristisch für eine sehr schnelle Kinetik ist. Grund für eine schnelle Kinetik ist häufig eine für die Bindung an das Protein gut geeignete Geometrie des Liganden, so dass im Bindungsfall keine größeren konformativen Änderungen erfolgen müssen.

In Abbildung 73 ist exemplarisch die Anpassung der Konzentration von 125 μM an die Langmuir-Isotherme gezeigt.

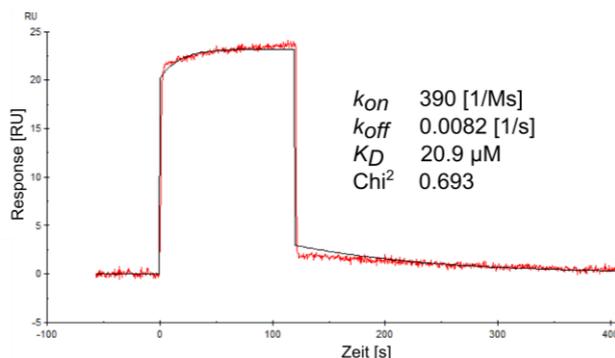


Abbildung 73: Exemplarisch gezeigte kinetische Analyse von **41** bei einer Konzentration von 125 μM . Der bestimmte K_D liegt mit 21 μM in der gleichen Größenordnung wie der mittels thermodynamischer Analyse bestimmte Wert von 44 μM .

Die Ergebnisse der kinetischen Analyse sind in Tabelle 26 zusammengefasst. Eine Anpassung an die Langmuir-Gleichung war nicht für alle Konzentrationen möglich.

Tabelle 26: Zusammenfassung der kinetischen Analyse von **41** nach Anpassung der einzelnen Konzentrationen an die Langmuir-Gleichung. Die beobachtete Assoziationskonstante k_{obs} wurde durch Multiplikation der Assoziationskonstante k_{on} mit der Konzentration und anschließender Addition der Dissoziationskonstante k_{off} berechnet. Der K_D wurde durch Division von k_{off} durch k_{on} erhalten.

c [μM]	k_{on} [1/Ms]	k_{obs} [1/s]	t_{on} [s]	k_{off} [1/s]	t_{off} [s]	K_D [μM]	Chi ²
62.5	452	0.017	60.02	0.004	266.95	8.3	0.462
62.5	370	0.016	61.38	0.006	175.99	15.3	0.504
125	390	0.021	48.75	0.008	122.31	20.9	0.693
250	601	0.029	34.79	0.005	188.61	8.8	0.369
Mittelwert	453	0.021	51.23	0.006	188.47	13.3	

Die kinetische Analyse ergab einen etwa Faktor 5 niedrigeren K_D -Wert als der mittels thermodynamischer Analyse bestimmte Wert. Die bestimmten Kinetikparameter liegen in der Größenordnung der für die Liganden **39** und **40** bestimmten, was unter Berücksichtigung des Kurvenverlaufs unerwartet ist. Hier wurde auf Grund des blockartigen Verlauf mit einer sehr schnellen Kinetik gerechnet.

3.7.2.11 Diskussion der SPR-Ergebnisse

Für die Analyse der Liganden **1**, **33-36** und **38-41** wurde H5 kovalent an die Carboxymethyldextranmatrix der SPR Chips gebunden und die Liganden durch Aufnahme von Konzentrationsreihen mittels thermodynamischer Analyse und mittels kinetischer Einpunktanalyse bezüglich ihrer Affinität zu H5 untersucht. Für jeden Liganden wurde eine zweite Messung durchgeführt. In Tabelle 27 sind die Ergebnisse der SPR-Experimente zusammengefasst.

Tabelle 27: Zusammenfassung der aus den SPR-Experimenten erhaltenen Ergebnisse für die Untersuchung der Bindungsaffinität der dargestellten Liganden zu H5. Angegeben sind hier die Mittelwerte der nach Anpassung an das *one site binding* Modell erhaltenen K_D -Werte für die thermodynamische Analyse, sowie die Mittelwerte der Kinetikparameter der Konzentrationen, die nach Anpassung an die Langmuir-Isotherme erhalten wurden. Für die Messungen wurde H5 kovalent an die Carboxymethyldextranmatrix der SPR Chips gebunden und die Liganden in verschiedenen Konzentrationen darüber geleitet.

Ligand	Thermodyn.		Kinetisch				
	K_D [μ M]	K_D [μ M]	k_{on} [1/MS]	k_{obs} [1/s]	t_{on} [s]	k_{off} [1/s]	t_{off} [s]
39 (Neu5Ac α 2Me)	1690	180	36	0.0091	150	0.0031	350
33 (4-9-5)	1.9	4.9	2975	0.0231	43	0.0124	89
34 (4-10-5)	2.1	7.6	7478	0.0285	36	0.0147	72
1 (6-9-5)	0.44	1.2	30146	0.0409	38	0.0196	153
35 (6-10-5)	3.5	9.7	3427	0.0384	26	0.0301	34
36 (6-11-5)	1.3	4.1	2200	0.0114	92	0.0058	173
38 (9-5)	2.2	15.8	3141	0.0574	18	0.0386	28
40 (Neu5Ac-Alk)	960	146.3	64	0.0209	60	0.0051	214
41 (Peptid)	73	13.3	453	0.0206	51	0.0057	188

Die kinetische Analyse für das beobachtete System bringt die Schwierigkeit mit sich, dass bei der für die Analyse benötigten Flussrate von 10 μ L/min Massentransfer-Effekte und die immobilisierte Proteinmenge Einfluss auf die Messergebnisse haben können. Beide Parameter konnten in dem untersuchten System mit H5 nicht für eine bessere kinetische Analyse angepasst werden, da für eine ausreichende Signalantwort der kleinen Liganden Proteinmengen um die 20 fmol benötigt wurden und die niedrige Flussrate für eine ausreichende Stabilität und somit auch Halbwertszeit des Proteins auf dem Chip erforderlich war. Des Weiteren ist die kinetische Analyse polyvalenter Systeme nicht trivial. Dennoch konnte eine gute Übereinstimmung der kinetisch mit den thermodynamisch bestimmten Dissoziationskonstanten beobachtet werden. Die Werte für *on-* und *off rate* zeigen unerwartete Größenverhältnisse zueinander auf. So wurde speziell für die kleinen monovalenten Liganden eine schnelle, für die großen Liganden eine langsame Kinetik erwartet. Dies konnte nicht beobachtet werden. Die Gründe für diese Unterschiede sind unklar. Im Folgenden wird daher nur auf die kinetisch bestimmte Dissoziationskonstante und nicht die einzelnen Werte für k_{on} und k_{off} eingegangen.

Die thermodynamische Analyse ist durch die Durchführung als Titration unabhängig von der verwendeten Flussrate und der Proteinbelegung und liefert auch bei multivalenten Systemen verlässliche Ergebnisse. Die Vermessung der Liganden erfolgte in Doppelbestimmungen, wobei fast identische Werte auf zwei verschiedenen Flusszellen erhalten wurden. Die mittels kinetischer und thermodynamischer Analyse bestimmten K_D -Werte sind in sich konsistent. Für die folgende Interpretation wird sich quantitativ auf die thermodynamisch bestimmten K_D -Werte bezogen

Bei der Analyse der Bindungseigenschaften konnte festgestellt werden, dass die trimeren Liganden **33**, **34**, **35** und **36** die gleiche Dissoziationskonstante im niedrig mikromolaren Bereich wie der monomere Ligand **38** aufweisen. Dies zeigt, dass die hier beobachtete gesteigerte Bindungsaffinität von etwa 1000 im Vergleich zu dem Methylglycosid der Neuraminsäure auf weitere Wechselwirkungen eines Armes und nicht auf das Wirken eines multivalenten Effektes zurückzuführen ist. Diese Liganden zeigten in den kompetitiven STD-NMR-Experimenten in dem untersuchten Konzentrationsbereich keine kompetitive Wechselwirkung gegenüber Neu5Ac α 2Me zu H5, so dass von einer schwachen Interaktion mit H5 ausgegangen wurde. Die beobachtete starke Affinität und das Ausbleiben einer kompetitiven Wechselwirkung während der STD-Experimente bei Ligandkonzentrationen, die Faktor 100 über den mittels SPR bestimmten K_D -Werten lagen, lässt darauf schließen, dass die beobachtete Affinität nicht ausschließlich an der primären CRD generiert werden kann. Dies warf die Frage auf, welcher Teil der Liganden für die starke Wechselwirkung verantwortlich ist. In der folgenden Untersuchung des Neuraminsäurefragments **40** wurde dessen K_D in der Größenordnung von 1 mM bestimmt. Die im Vergleich zu Neu5Ac α 2Me beobachtete Affinitätssteigerung um den Faktor 2 wird durch das eingeführte Pentylamidfragment hervorgerufen. Auf Grund der ausgeprägten Bindungskavität konnte nicht davon ausgegangen werden, dass eine Derivatisierung des Bindungsepitops ohne Auswirkung auf die Affinität bleibt. Da angenommen wurde, dass mit zunehmender Entfernung vom Epitop der Einfluss der weiteren Strukturelemente der Liganden abnimmt, wurde für **38** ein K_D in der Größenordnung des K_D -Wertes von **40** erwartet. Da die für **38** bestimmte Dissoziationskonstante ungefähr um den Faktor 300 niedriger liegt, wurde das Peptidfragment alleine dargestellt und untersucht. Durch die hohe Dichte funktioneller Gruppen und der damit verbundenen großen Anzahl an potentiellen Wasserstoffbrückendonoren und Akzeptoren in dem Peptid wurde zunächst von einer unspezifischen Wechselwirkung mit dem Lektin ausgegangen. Die Untersuchung ergab jedoch einen konzentrationsabhängigen Kurvenverlauf mit einem K_D von 73 μ M. Es konnte eine spezifische Wechselwirkung mit H5 festgestellt werden, welche durch Verknüpfung des Peptids mit dem Neuraminsäurefragment um den Faktor 20 weiter gesteigert wurde. Daraus folgt, dass es eine spezifische Bindungsstelle für das Peptidfragment **40** gibt. Diese Bindungsstelle könnte am Kopf der globulären Domäne des H5 nahe der primären CRD liegen. Eine für die Bindung an H5 suboptimale räumliche Anordnung des peptidischen Fragments mit dem Neuraminsäurefragment könnte synergetische Effekte, die durch Kombination eines millimolar

bindenden mit einem mikromolar bindenden Fragments zu erwarten wären, auf die beobachtete Affinitätssteigerung von Faktor 20 reduzieren. Eine zur primären *CRD* proximale Lage der Bindungsstelle für einen einzelnen Arm würde auch die sich in den kompetitiven STD-Experimenten abzeichnende, kompetitive Wechselwirkung der Liganden in höheren Konzentrationsbereichen erklären. Die Möglichkeit einer zweiten Bindungsstelle an einer anderen Position ist ebenfalls in Betracht zu ziehen. Da die Liganden **33-36** und **38** Affinitäten in der gleichen Größenordnung aufweisen, scheint die Bindung von dem Peptidfragment **40** getrieben und unabhängig von der restlichen Beschaffenheit des Liganden zu sein.

Genau wie zuvor in den NMR-Experimenten zeigte auch bei den SPR-Messungen Ligand **1** eine signifikant bessere Bindung zu H5 als die anderen untersuchten Liganden. Diese deutet darauf hin, dass Ligand **1** über eine geeignete räumliche Anordnung für das Wirken eines multivalenten Effektes verfügt. Dieser könnte sowohl additiv wie auch alternativ zu der Bindung des Peptidfragments wirken. Die Einschränkung der Flexibilität bei einer Bindung des peptidischen Fragments, die eine multivalente Wechselwirkung erschweren sollte, spricht jedoch gegen einen additiven und für einen multivalenten Effekt, generiert über das Neuraminsäurefragment. Die mittels STD-NMR beobachtete Competition deutet ebenfalls auf einen dominanten Anteil der Kohlenhydrateinheit zu der Wechselwirkung hin. Die multivalente Bindung der Neuraminsäure würde zu der beobachteten sprunghaften Steigerung der Affinität zu der primären *CRD* führen, für die der Ligand bezüglich seiner Struktur *in silico* optimiert wurde.

Spielt das Peptidfragment für die Affinität von **1** zu H5 tatsächlich eine untergeordnete Rolle, muss davon ausgegangen werden, dass die beobachtete Bindungssteigerung von fast 3000 verglichen mit **40** auf einen multivalenten Effekt zurückzuführen ist. Dieser Faktor lässt keine eindeutigen Rückschlüsse über die Valenz der Bindung zu, da sie knapp den Grenzbereich der idealen Bindungssteigerung für eine bivalente Wechselwirkung von etwa 1000 überschreitet.

Absolute Klarheit über den Bindungsmodus kann hier nur eine Cokristallisation des Liganden mit H5 schaffen. Für aussagekräftige *docking* Experimente ist das System zu groß und es stehen zu wenig Information über eine mögliche Peptidbindungsstelle auf Seiten des Proteins zur Verfügung. Gleiches gilt für NMR basierte Ansätze, die die Bindung auf Seiten des Proteins aufklären könnten.

Um herauszufinden, ob bereits **41** selber mit der primären *CRD* des Neu5Ac α 2Me interagiert, wurden mit **41** ebenfalls kompetitive STD-NMR-Experimente durchgeführt.

3.7.3 STD NMR Experimente mit **41** und abschließende Diskussion

Um weitere Informationen über die Bindungsstelle des Peptidfragments **41** zu erhalten, wurde zunächst eine STD NMR Titration mit **41** durchgeführt. Die Titration erfolgte unter den bereits beschriebenen Bedingungen mit 39 μg ($c_{\text{start}} = 1.3 \mu\text{M}$) frischem H5 und es wurden Konzentrationen von 0 bis 160 μM **41** vermessen. Auf Grund der geringen Strukturdiversität in dem Peptid war eine exakte Zuordnung einiger Signale nicht möglich, was für die Fragestellung aber auch unerheblich ist. Ein *group epitope mapping* wurde durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 74 gezeigt.

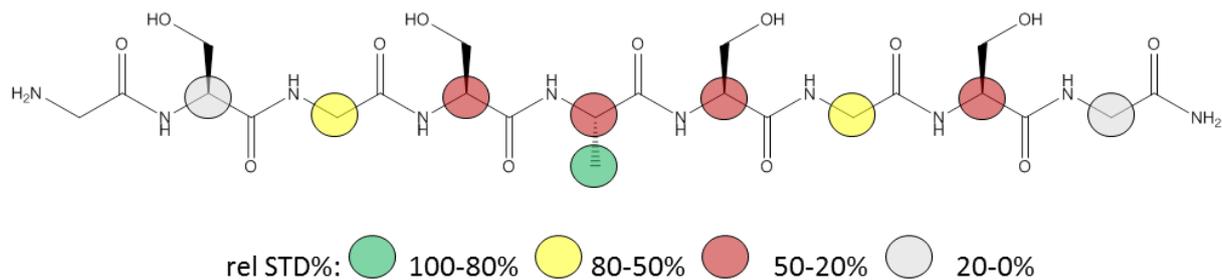


Abbildung 74: *Group epitope mapping* für Ligand **41**. Hierfür wurden die relativen STD% aus der STD Titration bestimmt. Starke STD Effekte sind auf der Methylgruppe des Alanins und auf den α -Protonen der Glycine 3 und 7 zu beobachten. Eine eindeutige Zuordnung der β -Protonen der Serine war nicht möglich. Als Summeneffekt wurde hier ein relativer STD Effekt von 35% bestimmt. Informationen über Heteroatom gebundene Protonen sind auf Grund ihres Austauschs mit dem Deuterium des Puffermediums nicht beobachtbar.

Aus dem *epitope mapping* geht ein enger Kontakt der Methylgruppe des Alanins sowie der α -Protonen der Glycine 3 und 7 zu dem Protein hervor. Für die β -Protonen der Serine konnten die relativen STD% nur als Summeneffekt zu 35% bestimmt werden. Die Berechnung der K_D -Werte erfolgte durch Anpassung der STD Amplifikationsfaktoren gegen die Konzentration von **41** nach dem *one site binding* Modell. Der niedrigste K_D wurde für die β -Protonen des Alanins zu $44 \pm 10 \mu\text{M}$ bestimmt und entspricht damit dem mittels SPR bestimmten K_D für **41** von $73 \mu\text{M}$. Die Anpassung an das *one site binding* Modell ist in Abbildung 75 gezeigt.

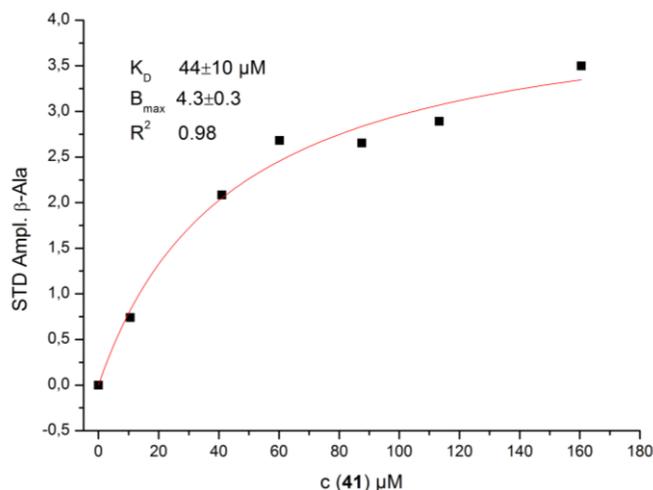


Abbildung 75: Anpassung der aus der STD Titration erhaltenen Datenpunkte der β -Protonen des Alanins an das *one site binding* Modell. Aufgetragen wurden die STD Amplifikationsfaktoren gegen die Konzentration von **41**. Aus der Anpassung geht ein K_D von 44 μM hervor.

In Tabelle 28 sind die Ergebnisse gezeigt, für die die Anpassung an das *one site binding* Modell erfolgreich durchgeführt werden konnte.

Tabelle 28: Analyse der Daten aus der STD Titration von **41** nach dem *one site binding* Modell. Für die β -Protonen des Alanins wurde der niedrigste K_D zu 44 μM bestimmt und entspricht damit dem Wert, der durch die Bestimmung mit anderen Messverfahren zu erwarten wäre. Für die α -Protonen der Glycine 3 und 7, sowie für die β -Protonen der Serine konnte der K_D als Summeneffekt zu 114, beziehungsweise 174 μM bestimmt werden. Die Übereinstimmungen der Datenpunkte mit dem *fit* der Anpassung war für alle bestimmten Werte sehr gut.

Signal	α -Gly 3&7	β -Ser	β -Ala
K_D [μM]	114 ± 24	174 ± 59	44 ± 10
R^2	0.99	0.99	0.98

Welches Serin mit seinen β -Protonen und welches Glycin für die bestimmten K_D -Werte verantwortlich ist, kann durch die Bestimmung als Summeneffekt nicht zugeordnet werden. Wichtig ist, dass die STD Ergebnisse eine eindeutig konzentrationsabhängige Dissoziationskonstante im niedrig mikromolaren Bereich ergaben und damit die SPR Ergebnisse für **41** bestätigen. Ob eine Substitution des Alanins, für das die stärkste STD-Antwort beobachtet wurde, zu einer deutlich schwächeren Bindung sowohl des Peptidfragments, als auch der Liganden **33-38** führt, sollte untersucht werden.

In einer kompetitiven Studie mit Neu5Aca2Me als vorgelegten Kompetitor und **41** als Verdränger unter den zuvor beschriebenen Bedingungen konnte keine Konkurrenz beobachtet werden. Dies bedeutet, dass es für das Peptidfragment **41** eine eigene Bindungsstelle gibt, an die es mit hoher

Affinität spezifisch bindet und die nicht identisch mit der primären *CRD* des H5 ist. Die Erweiterung des Peptids **41** um das Neuraminsäurefragment **40** zu dem monovalenten Glykokonjugat **38** hatte eine Steigerung der Affinität um den Faktor 20 zur Folge. Wie bereits beschrieben, kann eine ungünstige räumliche Anordnung des bindenden Peptidteils mit dem Neuraminsäurefragment die Steigerung der Affinität von **38** zu H5 geringer ausfallen lassen, als theoretisch möglich. Die Möglichkeit einer alternative Bindungsstelle an anderer Stelle des Proteins, die neben der Peptidbindungsstelle eine Bindungsstelle mit niedriger Affinität zu dem Neuraminsäurefragment aufweist, kann ebenfalls in Betracht gezogen werden.

Unabhängig der Lage der Bindungsstelle für die Liganden **33-38** konnte für Ligand **1** sowohl durch die kompetitiven STD-NMR-Studien, als auch durch die SPR-Experimente eine signifikant höhere Affinität zu der primären *CRD* des H5 beobachtet werden. In dem STD-Experimenten konnte bereits bei 1/100 der Konkurrentkonzentration ein eindeutig kompetitives Verhalten beobachtet werden. Dies zeigt, dass die Bindung zu H5 eindeutig über die primäre *CRD* erfolgt. Mittels SPR konnte für diesen Liganden eine Dissoziationskonstante im hohen nanomolaren Bereich bestimmt werden, was einer Bindungssteigerung um den Faktor 3000, verglichen mit dem Neuraminsäurefragment **40** entspricht. Ob und wie viel das Peptidfragment zu dieser Bindungssteigerung beiträgt, muss durch Verwendung einer alternativen Linkerstruktur oder durch eine Cokristallisation des Liganden mit dem Protein geklärt werden.

3.8 Synthetische Studien zur möglichen Erhöhung der Valenz der Liganden

Die Größe der Avidität einer multivalenten Wechselwirkung hängt von vielen Faktoren wie der Affinität der entsprechenden monovalenten Wechselwirkung, der Topologie des Liganden, sowie von enthalpischen und entropischen Faktoren ab. Den größten Einfluss auf die Avidität übt jedoch der Grad der Valenz aus, da sie eine statistische Bindungserhöhung bewirkt, auch wenn die Arme nicht aktiv an der Bindung beteiligt sind (siehe Kapitel 1.3)^[20].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden synthetische Studien zur Darstellung eines hexavalenten Liganden begonnen. Auf Grund der hohen strukturellen Flexibilität, die mit der Verwendung eines Peptids als Linker einhergeht, wurde versucht, ein weiteres Neuraminsäurefragment pro Arm einzuführen. Die Inkorporation eines in der Seitenkette um Neuraminsäure erweitertes Lysin erlaubte dabei die Verwendung bereits dargestellter Bausteine. Die Position für die Inkorporation des derivatisierten Lysins wurde dabei so gewählt, dass sich von dem Punkt der Verzweigung bis zum Epitop ungefähr die gleiche Distanz ergab. Die Erweiterung der Valenz des bestehenden Konzeptes ist schematisch in Abbildung 76 gezeigt.

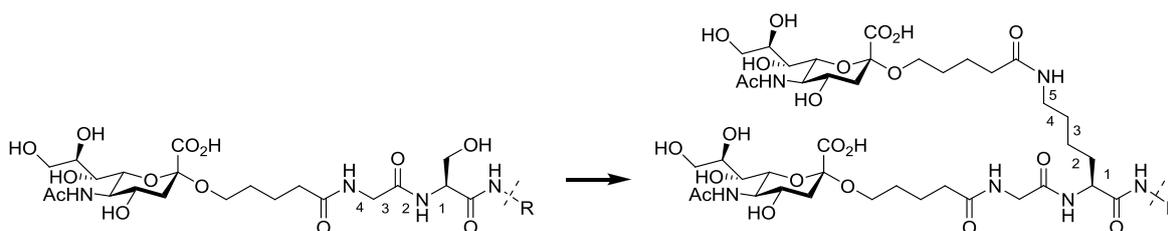


Abbildung 76: Mögliche Erweiterung des Valenzgrades von 3 auf 6 ausgehend von den bereits dargestellten, trivalenten Liganden. Aus Gründen der Übersicht sind hier je nur die Enden eines der drei Arme gezeigt. Durch die Verwendung eines Peptids als Linker eröffnet sich die Möglichkeit der Inkorporation eines in der Seitenkette um Neuraminsäure erweiterten Lysins. Bei vicinaler Positionierung des Lysins zur *N*-terminalen Aminosäure ergibt sich fast der gleiche Abstand für die neu eingeführte Neuraminsäure zum Punkt der Verzweigung wie der zu der bereits existierenden. Für die Darstellung können bereits synthetisierte Bausteine, beziehungsweise natürliche Aminosäurederivate verwendet werden.

Bei Positionierung des derivatisierten Lysins in Nachbarstellung der *N*-terminalen Aminosäure ergibt sich ab dem Verzweigungspunkt ein Abstand von fünf Atomlängen zu dem Stickstoff der amidischen Verknüpfungsstelle des Neuraminsäurefragments. Zu dem Glycin Stickstoff, der amidisch das bereits bekannte Neuraminsäurefragment trägt, beträgt die Distanz vier Atomlängen. Für die Validierung des Konzeptes ist die Ähnlichkeit des Abstandes ausreichend. Die Darstellung der Liganden sollte nach der bereits für die trivalenten Liganden etablierten Synthesestrategie erfolgen. Die Verknüpfung des neuraminsäuretragenden Lysinbausteins mit dem Peptid an der festen Phase sollte manuell erfolgen. Die Synthese des Lysinbausteins ist in Abbildung 77 gezeigt.

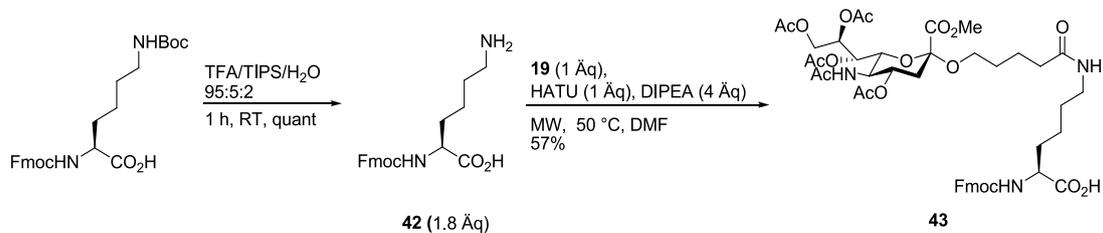


Abbildung 77: Synthese des Lysinbausteins **43**. Ausgehend von einem bereits vorhandenen Lysinderivat wurde nach saurer Entschützung der Seitenkette der Neuraminsäurebaustein **19** unter Einfluss von Mikrowellenstrahlung und unter Verwendung von HATU als Aktivator an die Aminofunktion der Seitenkette von **42** gekuppelt. Dabei musste durch sorgfältige Wahl der Reaktionsbedingungen eine Polymerisierung von Lysin vermieden werden. Eine Vorreinigung von **43** erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel. Anschließend wurde **43** mittels *RP*-HPLC gereinigt und konnte in 57%iger Ausbeute erhalten werden.

Ausgehend von einem Standardbaustein der Peptidchemie wurde nach Entschützung der Seitenkettenaminofunktion der Neuraminsäurebaustein **19** an **42** gekuppelt. Hierbei musste durch geeignete Wahl der Reaktionsbedingungen darauf geachtet werden, dass eine Polymerisation oder intramolekulare Cyclisierung von **42** möglichst vermieden wird. Versuche, bei denen **42** bei 0 °C zu einer Lösung von **19**, HATU und DIPEA in DMF zugetropft wurde oder die Reaktion 15 h bei Raumtemperatur gerührt wurde, ergaben wenig bis kein Produkt. Hierbei konnte aber auch kein Polymerisationsprodukt von **42** beobachtet werden, weswegen Ansätze unter Verwendung von Mikrowellenstrahlung durchgeführt wurden. Hierdurch konnte nach Optimierung die Ausbeute auf 57% gesteigert werden. Die Reinigung von **43** erfolgte zunächst säulenchromatographisch an Kieselgel. Zeitgleich zu **43** eluierte hier auch nach Überprüfung verschiedener Laufmittelgemische **19**, so dass im Anschluss der säulenchromatographischen Vorreinigung eine Trennung mittels *RP*-HPLC durchgeführt wurde.

Die Darstellung des Peptids erfolgte bis einschließlich der siebten Aminosäure automatisiert an der festen Phase unter Standardbedingungen an einem Mikrowellensynthesizer. Die finale Fmoc-Schutzgruppe wurde von Hand abgespalten und eine Dibenzofulvenbestimmung durchgeführt, wobei der ermittelte Wert zur Berechnung der Einwaagen der anderen Reaktionspartner diene. Anschließend wurde Verbindung **43** mikrowellenunterstützt an das Peptid gekuppelt. Aus dem filtrierten Überstand der Kupplung konnte **43** reisoliert werden. Eine Dibenzofulvenbestimmung wurde durchgeführt. Diese diene als Referenz für die Kupplung des terminalen Glycins, deren Erfolg ebenfalls photometrisch überprüft wurde, bevor **19** *N*-terminal an das Peptid gekuppelt wurde. Das Glycokonjugat wurde unter Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen der Serine vom Harz gespalten und mittels *RP*-HPLC gereinigt. In Abbildung 78 ist der Syntheseweg gezeigt.

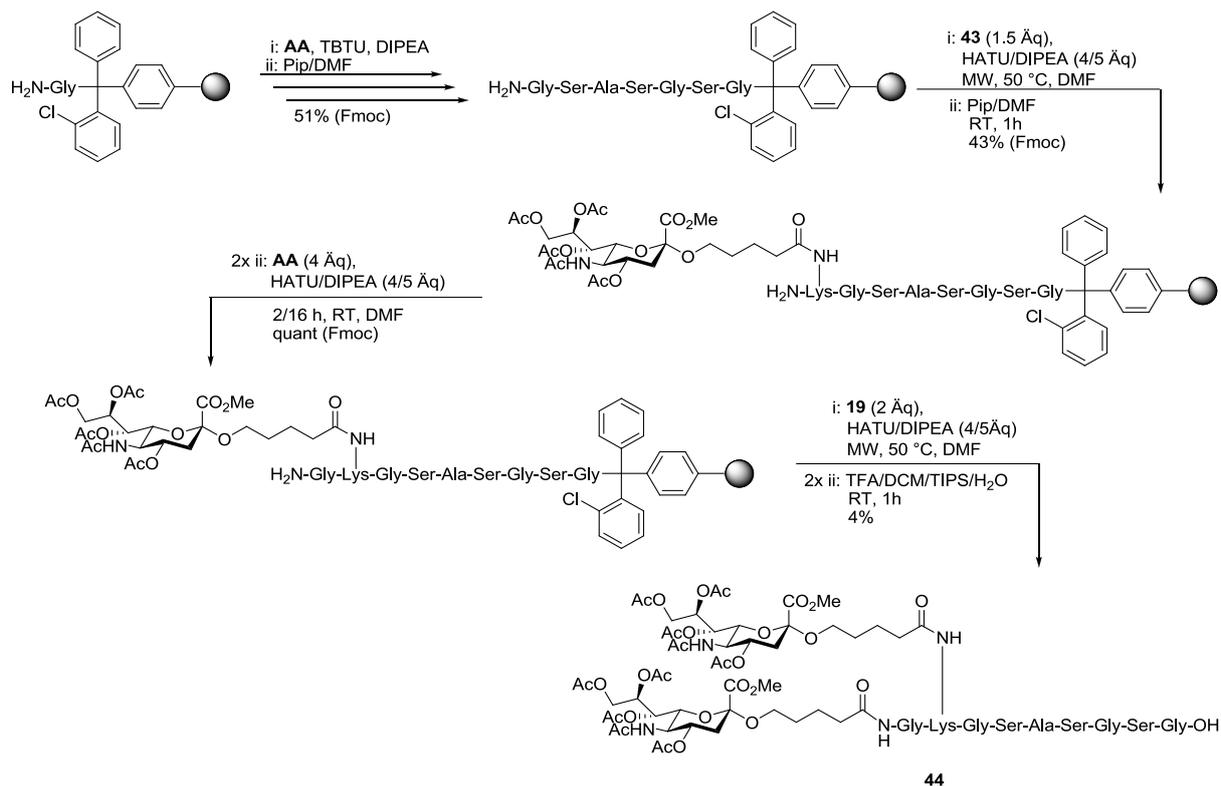


Abbildung 78: Darstellung von Verbindung **44**. Ausgehend von einem mit Glycin beladenem 2-Chloro-chlortrityl-Harz wurde ein Heptapeptid automatisiert unter Standardbedingungen an einem Mikrowellensynthesizer dargestellt. Die finale Fmoc Gruppe wurde manuell abgespalten und die Dibenzofulvenbestimmung ergab eine Ausbeute von 51%. Unter Verwendung von Mikrowellenstrahlung wurde **43** an das Peptid gekuppelt und erneut eine Dibenzofulvenbestimmung manuell durchgeführt. Diese ergab eine Ausbeute von 43%. In einer Doppelkupplung konnte Glycin anschließend bei Raumtemperatur laut anschließender manueller Dibenzofulvenbestimmung quantitativ an Lysin gekuppelt werden. Zuletzt wurde der Neuraminsäurebaustein **19** mikrowellenunterstützt *N*-terminal an Glycin gekuppelt. Verbindung **44** wurde anschließend unter sauren Bedingungen und unter Abspaltung der Serin-Seitenkettenschutzgruppen vom Harz gespalten. Die Abspaltung erfolgte zweifach, wobei jeweils gründlich gespült wurde. Die Reinigung erfolgte mittels *RP*-HPLC. Die Bestimmung der Ausbeute für den letzten Schritt erfolgte gravimetrisch und ergab eine Ausbeute von 4%.

Die Darstellung von **44** konnte erfolgreich durchgeführt werden. Sofern möglich, wurde der Erfolg der einzelnen Reaktionsschritte photometrisch bestimmt, wobei für die verfolgten Reaktionsschritte befriedigende Ausbeuten erzielt werden konnten. Die niedrige Ausbeute für den letzten Schritt kann wie folgt erklärt werden. Zum einen ist die gravimetrische Ausbeutebestimmung genauer als die photometrische Bestimmung des Dibenzofulvengehalts. Zum anderen können sterische Effekte bei der Kupplung der zweiten Neuraminsäure großen Einfluss haben. So kann die Neuraminsäure des Lysins den Halbraum um die Aminofunktion des terminalen Glycins abschirmen und sich so negativ auf die Reaktionsausbeute auswirken. Entscheidender ist aber, dass die Dibenzofulvenbestimmung nur Rückschlüsse auf die Gesamtzahl an abgespaltenen Fmoc Schutzgruppen unabhängig ihrer Herkunft erlaubt. Wie sich im Nachhinein heraus stellte, gab es an dem Mikrowellensynthesizer Hardware-Probleme, die zu geringen Ausbeuten bei gleichzeitig sehr hoher Anzahl peptidischer Nebenprodukte

fürten. Dies spiegelte sich bei der Reinigung mittels *RP*-HPLC wieder. Hier wurde eine Vielzahl von Produkten detektiert, die chromatographisch nicht durch einmaliges Auftragen zu trennen waren. Zu der Dibenzofulvenbestimmung trugen alle Fmoc tragenden Peptide bei, unabhängig ob sie die gewünschte oder eine fehlerhafte Sequenz aufwiesen. Es ist anzunehmen, dass diese Problematik nach Behebung der Hardware-Probleme deutlich in den Hintergrund tritt und zu einer deutlich besseren Gesamtausbeute führt.

Eine Umsetzung von **44** mit der *core*-Struktur **12** wurde ebenfalls versucht. Hier konnte nach Reinigung mittels *RP*-HPLC kein Produkt isoliert werden (Abbildung 79).

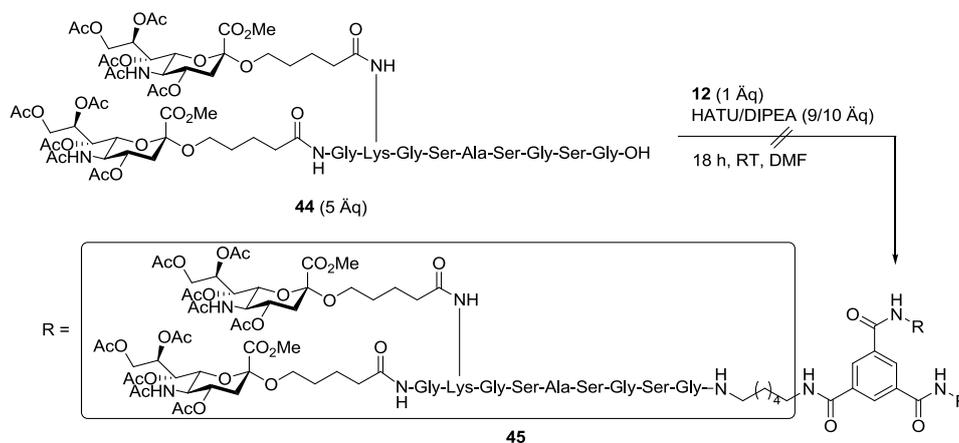


Abbildung 79: Versuchte Darstellung des hexavalenten Liganden **45**. Die Reaktion wurde mit 1.7 Äquivalenten **44** und 3 Äquivalenten HATU pro Reaktionszentrum an **12** versucht. Nach Reinigung mittels *RP*-HPLC konnte kein Produkt detektiert werden.

4 Zusammenfassung

Das Hämagglutinin H5 des Influenza-A-Virus bindet bei der Infektion vorzugsweise an α 2,3 glycosidisch verknüpfte Neuraminsäuren auf der Oberfläche von Epithelzellen des oberen respiratorischen Traktes. Durch die Vielzahl α 2,3 gebundener Neuraminsäuren auf der Oberfläche aviärer Zellen im oberen Respirationstrakt wird eine stabile Bindung des Virus zu der Wirtszelle hergestellt, die zur Infektion führt. Humane Epithelzellen des oberen Respirationstraktes präsentieren dominant α 2,6 verknüpfte Neuraminsäuren, so dass die Infektion von Menschen durch H5 Viren selten und erst bei hoher Viruslast erfolgt. Durch genetische Reassortierung hoch pathogener aviärer Influenza-Viren, welche eine hohe Mortalitätsrate beim Menschen zeigen, mit Influenza Typen wie H1N1, die sich durch eine effektive Mensch-zu-Mensch Übertragung auszeichnen, besteht großes, pandemisches Potential. Da der Primärkontakt des Virus mit der Wirtszelle über das Hämagglutinin erfolgt, stellt dies ein potentielles Target für die Entwicklung eines *entry*-Inhibitor dar.

Eine Möglichkeit zum Erhalt hoch affiner Binder des Hämagglutinin stellt die Entwicklung multivalenter Liganden dar. Die strukturbasierte Entwicklung multivalenter Liganden ist ein junges Forschungsgebiet der medizinischen Chemie. Auf Basis zweier Röntgenkristallstrukturen des Hämagglutinin H5 aviärer Influenzaviren wurden im Rahmen dieser Arbeit *in silico* mehrere potentielle Liganden entwickelt, synthetisiert und untersucht. Aufgrund der dreizähligen Rotationssymmetrie des H5 wurden drei-armige Liganden entworfen, die das homotrimere H5 vermutlich hoch affin multivalent binden. Mit Hilfe des *molecular modellings* konnten *in silico* gute Binder von schlechten Bindern differenziert werden.

Die Abstände der einzelnen Neuraminsäure-Bindungstaschen auf dem H5 wurden analysiert und Konstrukte, die eine trimere Interaktion ermöglichen könnten, hinsichtlich ihrer Bindungsaffinität *in silico* untersucht. Basierend auf unterschiedlichen Zentralfragmenten, die eine C_3 -symmetrische Derivatisierung erlauben, wurden verschiedene Substanzen an das H5 gedockt und deren Bindungsenergien berechnet. Verbindung **1**, bestehend aus einer von 1,3,5-Benzoltricarbonsäure (Trimesinsäure) abgeleiteten Zentraleinheit, flexiblen Alkylketten, einem peptidischen Linker und dem nativen Bindungsepitop, der Neuraminsäure, wurde als Ligand mit der besten Bindungsenergie identifiziert. Eine Synthesestrategie wurde entworfen, die die Verwendung mehrere Bausteine vorsah, welche in guten bis sehr guten Ausbeuten im Grammmaßstab dargestellt werden konnten. Für eine qualitative Beurteilung des *modellings* wurde die Darstellung einer kleinen Substanzbibliothek geplant und es konnten fünf Liganden erfolgreich dargestellt werden. Die Verknüpfung der Bausteine zu den Liganden und die anschließende Entschützung konnte in guten bis sehr guten Ausbeuten durchgeführt werden. Die Synthese konnte optimiert werden, so dass die Darstellung in kurzer Zeit möglich war.

Für Verbindung **1** wurde *in silico* die niedrigste Bindungsenergie berechnet. Die experimentellen Daten von **1** zeigen für diese Verbindung die effizienteste Bindung. Die Dissoziationskonstante von Ligand **1** konnte mittels SPR zu $K_D = 440$ nM bestimmt werden. Die mittels STD-NMR bestimmte inhibitorische Konstante K_I beträgt $45 \mu\text{M}$. Die weiteren Liganden **33-36**, die als Teil der Substanzbibliothek dargestellt wurden, unterscheiden sich dabei bezüglich der Anzahl der Aminosäuren des peptidischen Linkers sowie der Anzahl an Kohlenstoffatomen in der der *core*-Struktur proximalen Alkylkette von **1**. Die Liganden **33-36** zeigten in dem untersuchten Konzentrationsbereich kein inhibitorisches Potential für H5. Die Bestimmung der Dissoziationskonstante mittels SPR lieferte für diese Verbindungen einheitlich Werte im niedrig mikromolaren Bereich. Durch beide Messverfahren konnte für Ligand **1** eine signifikant bessere Bindung zu H5 als für die anderen Liganden festgestellt werden. Weitere Verbindungen, wie Ligand **38**, bestehend aus dem Neuraminsäurefragment und der neun Aminosäuren langen Peptidsequenz, konnten erfolgreich dargestellt und analysiert werden. Mit Hilfe dieser Verbindungen gelang es, Rückschlüsse über den Bindungsmodus der anderen Liganden zu treffen. Es zeigte sich, dass die Liganden **33-36** eine ähnliche Dissoziations- und ein ähnliches inhibitorisches Potential wie das monovalente Fragment **38** aufweisen. Die starke Affinität bei gleichzeitig fehlender kompetitiver Wechselwirkung mit Neu5Ac α 2Me führte zu der Annahme, dass die Bindung der Liganden **33-36** groÙtenteils über das Peptidfragment und nicht nur über die Neuraminsäure generiert wird. Dies konnte durch separate Analyse des Peptidfragments und des Neuraminsäurefragments experimentell bestätigt werden. Die sich in den NMR-Experimenten abzeichnende kompetitive Wechselwirkung bei höheren Ligandkonzentrationen für die Liganden **33-36** und **38** könnte auf eine Bindungsstelle des Peptids nahe der primären *carbohydrate recognition domain* (CRD) hindeuten. Die Möglichkeit einer alternativen Bindungsstelle für die Liganden **33-36** und **38** an einer anderen Stelle des Proteins kann nicht ausgeschlossen werden.

Die räumliche Anordnung von Ligand **1** scheint eine multivalente Wechselwirkung mit der primären CRD gegenüber einer weiteren Bindungsstelle zu bevorzugen, so dass eine signifikant gesteigerte Affinität beobachtet werden konnte. Mit Hilfe des *molecular modellings* konnte ein Ligand entworfen werden, dessen thermodynamische Dissoziationskonstante im hohen nanomolaren Bereich liegt und der bereits bei 1/100 der Neu5Ac α 2Me Konzentration eine deutliche Verdrängung in kompetitiven Studien zeigt. Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich mit Hilfe von *molecular modelling* wertvolle Informationen für das Design multivalenter Liganden treffen lassen. Trotz der Komplexität des Systems und der zum Teil nur geringen strukturellen Unterschiede der Liganden wurden die *in silico* Ergebnisse experimentell bestätigt.

Abschließend zeigten die in Kapitel 3.8 beschriebenen Studien zur Erweiterung des Valenzgrades, dass diese mit einfachen Mitteln in das bestehende Konzept eingearbeitet werden können. Durch die Steigerung des Valenzgrades ist mit einer deutlichen Zunahme der Avidität zu rechnen.

5 Summary

Hemagglutinin H5 of avian influenza predominantly binds α 2,3 linked sialic acid moieties present on the surface of epithelial cells in the upper respiratory tract. This is the dominant form found in the respiratory tract of birds, and by multiple bonding a strong interaction between virus and host cell is generated and the infection initiated. Human epithelial cells of the upper respiratory tract mainly present α 2,6 linked sialic acid moieties so that infection is rare and only occurs in the presence of a high viral load. The high pathogenic avian influenza is characterized by a high mortality rate among humans. Genetic reassortment of a high pathogenic avian influenza strain with an influenza strain with an effective human-to-human transmission represents a serious pandemic threat. As the initial contact of the virus with its host cell is mediated by hemagglutinin, this protein is a potential target for an entry inhibitor.

One way of obtaining high affinity binders for the hemagglutinin is to design multivalent ligands. The structure-based design of multivalent inhibitors is still new to medical chemistry. Based on two crystal structures of the hemagglutinin H5 of avian influenza several potential ligands were *in silico* designed, synthesized and analyzed. The ligands mimicked the C_3 -symmetry of the homotrimeric protein by presenting three arms, each carrying a terminal a sialic acid residue as the native ligand, bound to a C_3 -symmetric core structure.

The topology of the hemagglutinin was analyzed, and the binding energies of ligands capable of trimeric interaction were calculated. Different core structures as well as different linker and peptide lengths were tested. Ligand **1** was identified as the structure with the best binding energy for H5. Ligand **1** is composed of a trimesic acid (benzene-1,3,5-tricarboxylic acid) derived core structure and a long peptidic linker comprising nine amino acids, bound at both sides to alkyl chains. The alkyl chains were supposed to compensate steric mismatches allowing trimeric binding. Sialic acid was presented as terminal residue. A synthetic strategy was developed consisting of three building blocks which could be obtained in good to very good yields in a multigram scale. The connection of the building blocks and deprotection of the carbohydrate moieties was also achieved in good to very good yields. For a qualitative evaluation of the compounds a small substance library of five ligands was successfully synthesized. The synthesis was optimized and could be performed in a short time.

Ligand **1** had *in silico* the best binding energy, which was also found experimentally. The thermodynamic dissociation constant was determined by SPR to $K_D = 440$ nM and the STD-NMR experiments revealed a competitive behaviour at a concentration as low as 1/100 of the concentration of the primary ligand sialic acid ($K_I = 15$ μ M). Ligands **33-36**, which differed from **1** only by the length of the peptidic linker as well as by the length of the core structure proximal alkyl chain, showed no competitive behaviour in the analyzed concentration in range. The dissociation constant measured

by SPR for those molecules was consistently in the low millimolar range. Both STD-NMR and SPR showed a significantly better binding of **1** to H5 than that of sialic acid as well as of the ligands **33-36**.

Other molecules like ligand **38**, which is composed of the nine amino acid long peptide sequence connected to a sialic acid residue, were synthesized to elucidate the binding mode. It appeared, that the monovalent ligand **38** possessed the same thermodynamic binding constant as well as the same inhibitory potential as ligands **33-36**. The high affinity of **33-36** combined with the absence of an inhibitory potential lead to the assumption that the strong binding depends on the peptidic fragment. This could be validated by SPR and STD analysis of the peptidic fragment as well as the sialic acid fragment. The indicated inhibitory potential of ligands **33-36** and **38** at higher concentrations suggested a binding site near the primary carbohydrate recognition domain (CRD) at the top of the protein. A binding site at a different position of the protein can however not be excluded.

The topology of ligand **1** seems to prefer a multivalent interaction with the primary CRD over an alternative binding site and thus a significantly better binding was detected. Molecular modelling helped to develop a ligand for H5 with a thermodynamic binding constant in the high nanomolar range and a strong inhibitory potential for the system H5/Neu5Ac α 2Me. It could be shown that despite the complexity of the system and only small structural differences of the ligands molecular modelling yields precious information for the design of multivalent ligands.

The final chapter describes synthetic studies for increasing the degree of ligand valency. It could be shown that an expansion of the valency is possible by using the slightly modified building blocks. It is assumed that increasing the degree of valency will lead to significantly stronger binding.

6 Experimentalteil

6.1 Geräte, Software und Chemikalien

Gerät	Gerätetyp	Hersteller
ESI-TOF	6224 TOF LC/MS	Agilent Technologies
CD-Spektrometer	J-815	Jasco
DLS-Spektrometer	Spectrolight 201	X-tals Concept
Gefriertrocknungsanlage	Alpha 1-2, Alpha 1-4	Martin Christ
HPLC	Merck Hitachi LaChrom L-7000	Merck Hitachi
HPLC-MS	1200er Series mit Active Splitter G1986C und 6120 Quadrupol MS	Agilent Technologies
LC-ESI-TOF-MS	1200er Series mit 6224 TOF LC/MS	Agilent Technologies
Mikrowelle	Discover	CEM
Mikrowellensynthesizer	Liberty	CEM
NanoDrop	ND-1000	Thermo Scientific
NMR Spektrometer	DRX 500	Bruker Biospin
NMR Spektrometer	Avance 700 mit Cryoprobenkopf	Bruker Biospin
NMR Spektrometer	AMX 400	Bruker Biospin
NMR Spektrometer	Avance III HD 600	Bruker Biospin
pH-Meter	pH 526	WTW
Polarimeter	P8000	Krüß Optronic
Reinstwasseranlage	Ultra Clear UV 18.2 MΩ	SG Water
RP-HPLC Säule	Nucleodur C ₁₈ Isis EC250/4, 5 μm, 300 Å	Macherey&Nagel
RP-HPLC Säule	Nucleodur C ₁₈ Isis EC250/21 μm, 300 Å	Macherey&Nagel
RP-HPLC Säule	Nucleodur C ₁₈ Pyramid EC250/4, 5 μm, 300 Å	Macherey&Nagel
RP-HPLC Säule	Nucleodur C ₁₈ Pyramid EC250/21 μm, 300 Å	Macherey&Nagel
Schmelzpunktmessapparatur	Apotec	Otto Stein
Schwenker	Polymax 1040	Heidolph
	Inkubator 1000	Instruments
SPR Sensorchip	CM5	GE Healthcare
SPR	T100	GE Healthcare
Ultraschallbad	Sonorex Super, RK512H	Bandelin
UV/VIS Spektrometer	UV-160 A	Shimadzu
Zentrifuge	5804R	Eppendorf

Software	Hersteller
Biacore T100 Control (Vers. 1.1.1)	GE Healthcare
Biacore T100 Evaluation (Vers. 1.1.1)	GE Healthcare
CD-Tool	Lees <i>et al.</i>
ChemDraw Pro 11.0	CambridgeSoft
ChemStation	CEM
InkScape (Vers. 0.48)	Inkscape Community
LC/MSD Chemstation (Rev. B.04.03 [54])	Agilent Technologies
Maestro (Vers. 9.3.5)	Schrödinger
MassHunter (Vers. B.04.00)	Agilent Technologies
Origin 8.5G	Origin Lab
PepDriver (Vers. 2.6.6)	CEM
Sybyl X 1.1	Tripos
Topspin 3.1	Bruker Biospin

Hersteller	Chemikalie
ABCR	Silbernitrat, TIPS, Trimesoylchlorid
Acros	Amberlite IR120 H ⁺ , Natriumperiodat, TFA
Agilent	ESI <i>tuning mix</i>
AppliChem	Ameisensäure (MS <i>grade</i>)
Biesterfeld	Toluol (techn.)
Chempur	HATU, RuCl ₃ *xH ₂ O
Codexis	Neu5Ac
Deutero	D ₂ O, DMSO- <i>d</i> ₆ ,
Eurisotop	CHCl ₃ - <i>d</i> ₃ , MeOH- <i>d</i> ₄
Fluka	DCM (abs.), DMSO (abs.), Ethanolamin Hydrochlorid, MeOH (abs.), NMP, Pd/C (10%), Pyridin
Grüssing	Essigsäureanhydrid, NaOH, Salzsäure 37%, Triethylamin
Honeywell	Natriumsulfat
IRIS Biotech	DIPEA, DMF (<i>peptide grade</i>), Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-Gly-2-Chlortrityl Harz, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-L-Ser(<i>t</i> Bu)-OH, Fmoc-Rink-Amide AM PS Harz, H-Gly-2CT Harz; Piperidin, TBTU, TFA (HPLC <i>grade</i>)
Kraemer&Martin	Aceton (techn.), Chloroform (techn.), Dichlormethan (techn.), Diethylether (techn.), Ethylacetat (techn.), Methanol (techn.), Petrolether (techn.)
Merck	1,6-Diaminohexan, 1,7-Diaminoheptan, 5-Hexen-1-ol, Acetylchlorid, Boc ₂ O, CCl ₄ , Drierite, Kieselgel 60, Maleinsäure, Molekularsieb 4 Å, Natriumazid, NMM, <i>N</i> -Hydroxysuccinimid, Salicylsäure, Schwefelsäure 97%
Riedel de Haen	Natrium, Na ₂ CO ₃ , NaHCO ₃ ,
Sigma-Aldrich	1,4-Diaminobutan, 1,5-Diaminopentan, EDC-Hydrochlorid, Acetonitril (HPLC <i>grade</i>), Biogel P2
VWR	Acetonitril (HPLC <i>grade</i>)
Westphalen	H ₂

6.2 Handhabung des Hämagglutinins H5

Das kommerziell bezogene Hämagglutinin H5 (H5N1 A/Vietnam/1203/2004) wurde in PBS-Puffer (10 mM NaH₂PO₄, 10 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, 10 mM NaN₃, 0.005% Tween-20) bei 8 °C gelagert. Dialysiert wurde mit *slide-a-lyzer mini dialysis devices* (MWCO 20 kDa)⁶ und konzentriert in einem *float-a-lyzer dialysis device* (MWCO 7 kDa) mit Spectra/Gel Absorbent bei jeweils 6-8 °C. Während der Dialyse wurde zu Beginn eine drastische Abnahme der Proteinkonzentration festgestellt. Dies ist auf eine Sättigung der Membran mit Protein zurückzuführen, so dass für alle Dialysen dieselbe Membran verwendet wurde. Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde an einem NanoDrop UV Spektrometer vorgenommen. Dazu wurde der Extinktionskoeffizient aus der Primärsequenz zu $\epsilon_{280} = 242430 \text{ L/mol*cm}$ berechnet^[137] und die Masse des trimeren Proteins mit 170 kDa angenommen.

6.3 NMR Experimente

6.3.1 Akquisition der NMR Daten

NMR Daten von Proben in H₂O/D₂O 9:1, pH 3 wurden an einem 500 MHz Spektrometer bei 298 K oder 300 K akquiriert. Die Unterdrückung des Wassersignals erfolgte mittels der *excitation sculpting* Pulssequenz. Die Zuordnung der Signale wurde mit Hilfe von TOCSY, NOESY, H,H-COSY und HSQC Spektren erreicht. Die Kalibrierung erfolgte auf das Wassersignal nach der Näherungsformel: $\delta = 5.051 - 0.0111 * T^{[138]}$. Zusätzlich wurden zur besseren Aufklärung der nicht peptidischen Anteile H,H-COSY, HSQC und ¹³C-Pendent Spektren in D₂O aufgenommen. Die ¹³C Daten wurden auf Aceton kalibriert, welches zu 0.02% v/v dem D₂O beigesetzt war. Die Nummerierung bei der Zuordnung der Aminosäuren in peptidhaltigen Spektren erfolgte klassisch vom N- zum C-Terminus. Für die Verbindungen **31**, **32** und **36** war eine Sequenzierung des peptidischen Teils auf Grund von zu starker Überlagerungen der Signale nicht möglich.

⁶ Der molekulare *cut off* von 20 kDa ist bei der Untersuchung der hier dargestellten Verbindungen insofern wichtig, da nach Dialyse von mit Ligand vermessenem Protein mit einer Membran mit einem niedrigeren *cut off* von 7 kDa eine Entfernung der Liganden nicht erzielt werden konnte, trotzdem ihr Molekulargewicht bei nur etwa der Hälfte liegt. Dies ist vermutlich auf die ausgedehnte Struktur und den Kohlenhydratanteil oder auf eine Mizellbildung zurückzuführen.

6.3.2 Vorbereitung der Proben für die STD Messungen

Nach Dialyse in deuterierten PBS-Puffer (*d*PBS) und Bestimmung der Proteinkonzentration mittels NanoDrop wurde die Lösung bei einem Gesamtvolumen von 180 μ L auf die gewünschte Konzentration gestellt und in ein 3 mm NMR Röhrchen überführt. Die 3 mm Röhrchen wurden zuvor im Plasmaofen gereinigt. Für die STD Messungen wurden Proteinmengen zwischen 15.2-32.3 μ g ($c(\text{H5}) = 0.50\text{-}1.03 \mu\text{M}$) verwendet.

Bei den kompetitiven Experimenten wurde hier hinein der Kompetitor Neu5Aca2Me hinzugegeben und die Titration mit einer „Nullmessung“ begonnen. Das Methylglycosid der Neuraminsäure (Neu5Aca2Me, **39**) wurde in einer Konzentration von 20 mM vorgelegt. Bei der verwendeten Konzentration und einem K_D von 2 mM entspricht die Rezeptorbelegung $r = 91\%$ und wurde mit Hilfe folgender Gleichungen ermittelt:

$$[PL] = \frac{1}{2} (K_D + [P]_0 + [L]_0) - \sqrt{\frac{1}{4} (K_D + [P]_0 + [L]_0)^2 - [L]_0[P]_0} \text{ und } r = \frac{[PL]}{[P]_0}.$$

6.3.3 Akquisition und Prozessierung der STD-NMR Daten

STD-NMR Spektren wurden an einem 700 MHz Spektrometer mit *cryo*-Probenkopf unter Verwendung der „stddiffesgp“ Pulssequenz aufgenommen. Für eine optimale Sättigung des Proteins wurden die von M. Hollinger etablierten Parameter bezüglich Sättigungsleistung und Einstrahlpunkt verwendet^[127]. Einstrahlpunkt des Sättigungspulses lag im *off-resonance* Spektrum bei 40 ppm und im *on-resonance* Spektrum bei -0.5 ppm. Die Spektren wurden bei 298 K mit 256 oder 512 *scans* und mit einer Relaxations- und Sättigungszeit von je 2 s aufgenommen. Parameter der Pulse in F2 und F1 sind im Folgenden aufgeführt:

F2		F1	
P12	2000 μ s	P13	50000 μ s
PL1	-6 dB		
SP1	34.5 dB	SP13	30 dB

Für die Prozessierung der Daten wurden die pseudo 2D Spektren in 1D Spektren separiert (*off* und *on resonance*). Das *off resonance* Spektrum wurde kopiert und von dessen FID der FID des *on resonance* Spektrums zur Generierung des STD Spektrums subtrahiert. Alle FIDs wurden mit einem LB von 1 mittels des Befehls „efp“ (*exponential multiplication [em]*, *fourier transform [ft]*, *phase correction [pk]*) prozessiert und anschließend automatisch basislinienkorrigiert.

6.3.4 Auswertung der STD-Daten

Flächen ausgewählter Signale wurden über eine serielle Integration bestimmt und die so erhaltenen Integrale in Excel importiert. Hier wurden die absoluten STD% errechnet und bei den nicht kompetitiven Titrationen mit dem relativen Überschuss von Ligand zu Protein zum Erhalt der STD Amplifikationsfaktoren multipliziert. In Origin wurde die Ligand Konzentration gegen die STD Amplifikationsfaktoren aufgetragen und die Datenpunkte dem *one site binding* Model zum Erhalt der Dissoziationskonstante angepasst.

Für kompetitive Analysen wurden die erhaltenen STD Prozent gegen die logarithmische Konzentration des dazu titrierten Liganden aufgetragen und die Datenpunkte dem *one site competition* Model zum Erhalt der logarithmierten Form des IC_{50} Wertes angepasst. Der erhaltene, logarithmische Fehler wurde nach Fehlerfortpflanzung über die erste Ableitung der Formel zur Berechnung des IC_{50} -Wertes in den Fehler des IC_{50} umgerechnet. Über die Cheng-Prusoff Beziehung wurde bei bekannter Konzentration des Kompetitors (c_{Komp}) und der Dissoziationskonstante für das System Protein/Kompetitor (K_D) die inhibitorische Konstante K_I berechnet:

$$K_I = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{c_{Komp}}{K_D}}$$

6.4 SPR-Experimente

Die Messungen erfolgten unter den bereits in Kapitel 3.7.2 beschriebenen Bedingungen. Die Proteinimmobilisierungsraten der Chips für die jeweilige Untersuchung der Liganden findet sich im Folgenden.

Chip	Ligand	Flusszelle	RU _{immob}	n H5 [fmol]
1	39, 40	2-1	1450	9
2	1, 33, 34, 35, 36, 38, 40	2-1	4780	28
3	1, 33, 34, 35, 36, 38, 40	4-3	4210	25
4	40	3-1	4600	27

6.5 Allgemeine Arbeitsvorschriften

Glycosylierungsreaktion (AAV 1): Unter Schlenkbedingungen wurden zu gleichen Gewichtsteilen Molekularsieb, getrocknetes Calciumchlorid und Neuraminsäurechlorid in 15 mL frisch destilliertem ω 2-Alken-1-ol pro Gramm Glycosyldonor suspendiert. Bei $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ und unter Lichtausschluss wurden 4 Äq Silbersalicylat^[102, 103] bezogen auf das Neuraminsäurechlorid hinzu gegeben und das Reaktionsgemisch 60 h gerührt, wobei langsam auf Raumtemperatur erwärmt wurde. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit Dichlormethan verdünnt und filtriert. Der Filtrationsrückstand wurde mehrfach mit Dichlormethan gewaschen, und das Lösungsmittel destillativ entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 1:2) gereinigt.

Oxidation des terminalen Alkens (AAV2): Bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde 1 Äq des Alken funktionalisierten Neuraminsäurederivats, 5 Äq NaIO_4 und 0.1 Äq $\text{RuCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ in einer Mischung aus $\text{CCl}_4/\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$ 2:2:3 suspendiert und 3 h gerührt. Dabei wurden pro Millimol Edukt 7 mL des Lösungsmittelgemischs verwendet. Anschließend wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Toluol/Aceton/Triethylamin 1:1:0.01 \rightarrow Toluol/Aceton/AcOH 1:1:0.01).

Automatisierte Festphasenpeptidsynthese und manuelle Dibenzofulvenbestimmung (AAV3): Die Synthese des Peptids erfolgte an der festen Phase automatisiert nach der Aktivestermethode unter Verwendung der Fmoc-Strategie an einem mikrowellenunterstützten Peptidsynthesizer. Bei dem verwendeten Harz handelte es sich um ein mit Glycin funktionalisiertes 2-Chlortritylharz. Dieses wurde vor Verwendung an dem Synthesizer 2-8 h quellen gelassen. Als Lösungsmittel diente DMF, Kupplungsschritte wurden zweifach durchgeführt. Typische Ansatzgrößen waren 100 μmol , 250 μmol und 500 μmol bezogen auf die reaktiven Stellen des Harzes. Zur Aktivierung der Säure dienten TBTU (0.5 M in DMF) und DIPEA (2.0 M in DMF). Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgte durch Piperidin in DMF (20% v/v) und *capping* Schritte wurden mittels Essigsäureanhydrid in DMF (10% v/v) durchgeführt. Für die einzelnen Kupplungsschritte wurden die in der Steuersoftware implementierten *default cycles* verwendet.

Nach erfolgter Synthese wurde die letzte Fmoc Schutzgruppe manuell abgespalten und der Dibenzofulvengehalt photometrisch bestimmt. Hierzu wurde das Harz in eine Glasfritte überführt, mit 2 mL Piperidin in DMF (20% v/v) 20 min bei Raumtemperatur geschwenkt, die Lösung in einem lichtgeschütztem Kolben gesammelt und das Harz mit insgesamt 8 mL DMF gespült. Dieser Vorgang wurde wiederholt und die erhaltenen Lösungen vor Vermessung am Photometer bei einer Wellenlänge von 301 nm so verdünnt, dass eine optische Dichte zwischen 0.3 und 0.8 erhalten wurden. Messungen bei verschiedenen Verdünnungen wurden durchgeführt, Mittelwerte gebildet und der Dibenzofulvengehalt über das Lambert-Beer'sche Gesetz (Gleichung 9) bestimmt:

$$n_{\text{Dibenzofulven}} = \frac{OD * V * F}{d * \epsilon}$$

Gleichung 9: Lambert-Beer'sches Gesetz, mit: V = Gesamtvolumen der vereinigten Abspalllösung, OD = gemessene optische Dichte, ϵ = molarer Extinktionskoeffizient (hier $7950 \frac{L}{\text{mol} \cdot \text{cm}}$), F = Verdünnungsfaktor, d = Schichtdicke Küvette

Die so ermittelten Werte dienten als Bezugsgröße für die folgende Synthese an der festen Phase, für die Einwaage der Edukte und für die Bestimmung der Ausbeute. Nach Bestimmung des Dibenzofulvengehalts wurde das Harz erst mit DMF, dann mit DCM gespült, im Luftstrom getrocknet und wenn nicht unmittelbar weiter umgesetzt bei -20 °C gelagert.

Manuelle Kupplung des Kohlenhydratbausteins an das Peptid (AAV4): Im Anschluss an AAV3 wurde das mit Peptid beladene Harz 2 h in DMF quellen gelassen. Es wurden 2.5 Äq des Neuraminsäurebausteins und 5 Äq TBTU bezogen auf die Dibenzofulvenbestimmung in einen Kolben gewogen und mehrere Stunden im Feinvakuum getrocknet. Unmittelbar vor Reaktionsstart wurde das überstehende DMF von dem Harz saugfiltriert, Neuraminsäurebaustein und TBTU in DMF gelöst, mit 6 Äq DIPEA versetzt und vollständig zu dem Harz gegeben. Dabei wurde die Gesamtmenge DMF zum vollständigen überführen so gewählt, dass der Neuraminsäurebaustein in einer Konzentration von 100 mM vorlag. Das Gemisch wurde vorsichtig unter N₂ gestellt, über Nacht bei Raumtemperatur geschwenkt, der Überstand abfiltriert und das Harz mit DMF und mit DCM trocken gespült.

Die Abspaltung erfolgte zweifach mit insgesamt 50 mL TFA/TIPS/H₂O 95:5:2 für jeweils 1-1.5 h bei Raumtemperatur, wobei das Filtrat aufgefangen wurde und das Harz ausgiebig mit Abspalllösung und DCM gespült wurde. Das Lösungsmittel wurde destillativ entfernt. Das Harz wurde nach Abspaltung 1 h in 20 mL H₂O geschwenkt, der Überstand zu dem Destillationsrückstand gegeben und die Suspension gefriergetrocknet.

Das erhaltene Rohprodukt wurde pro 30 mg in 900 μ L H₂O/MeCN 7:3 aufgenommen, sonifiziert und die Suspension zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet in H₂O/MeCN 70:30 resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die Überstände wurde vereinigt und gefriergetrocknet. Der erhaltene Feststoff wurde mittels RP-HPLC gereinigt.

Kupplung der Glykokonjugate an die core-Struktur (AAV5): In einen 10 mL Kolben wurden die geschützten core-Strukturen eingewogen und für 1.5 h in TFA/TIPS/H₂O 95:5:2 bei Raumtemperatur geschwenkt und das Lösungsmittel anschließend vollständig destillativ entfernt. Der Erfolg der Reaktion wurde massenspektrometrisch überprüft. Bei dem Produkt handelt es sich um einen glasartigen, hochviskosen farblosen Rückstand.

Parallel wurden 4.5 Äq des entsprechenden Glykokonjugats und 9 Äq HATU zusammen eingewogen und mehrere Stunden im Feinvakuum getrocknet. Diese wurden in wenig DMF gelöst, mit 10 Äq

DIPEA versetzt und zu dem entsprechenden geschützten Anker-molekül gegeben. Die Gesamtmenge DMF wurde dabei so gewählt, dass das Glycokonjugat in einer Konzentration von 6.6 mM vorlag. Die Reaktionslösung wurde während 16 h bei RT in einer N₂-Atmosphäre gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt, das erhaltene Rohprodukt in Wasser aufgenommen, gefriergetrocknet und mittels RP-HPLC gereinigt. Dazu wurde vor Auftragung der erhaltene, farblose Feststoff in Wasser/Acetonitril 7:3 aufgenommen und mittels Zentrifugenfilters von unlöslichen Bestandteilen befreit.

Entschützung der Liganden (AAV6): Die Entschützung der Liganden erfolgte in zwei Schritten ohne weitere Aufarbeitung. Zunächst wurden die Acetylgruppen nach Zemplén verseift^[139]. Dafür wurde unter Schlenk Bedingungen eine methanolische NaOMe-Lösung frisch angesetzt und auf pH 9-9.5 (nasses pH Papier) gestellt. MeOH wurde unmittelbar vor Gebrauch getrocknet und der geschützte Ligand mehrere Stunden im Feinvakuum getrocknet. Pro Milligramm Edukt wurde 1 mL der eingestellten NaOMe-Lösung zu dem geschützten Liganden gegeben und 4 h bei Raumtemperatur gerührt, wobei der pH Wert während der Reaktion überprüft wurde. Anschließend wurde der Ansatz mit einer 1 M Essigsäure neutralisiert, mit Wasser verdünnt und gefriergetrocknet.

Für die Verseifung des Methyl-esters wurde eine aq. NaOH auf pH 10.5 (pH Elektrode) gestellt. Zu dem erhaltenen Feststoff aus der Deacetylierung nach Zemplén wurde so viel der aq. NaOH gegeben, dass NaOH in 10-30fachem Überschuss zu dem eingesetzten Edukt vorlag. Die Reaktion wurde 16-36 h bei Raumtemperatur gerührt, wobei auch hier der pH Wert kontrolliert wurde. Die Lösung wurde anschließend mit wenig Amberlite IR120 H⁺ neutralisiert und filtriert, wobei der Ionentauscher gut gespült und die Lösung gefriergetrocknet wurde. Die Reinigung des Produkts erfolgte zweifach mittels RP-HPLC.

6.5.1.1 Mikrowellenmethode

MW1:

Schritt	1	2	3
Leistung [W]	30	0	30
ramp time [sek]	180	0	180
hold time [sek]	240	300	240
Zieltemperatur [°C]	50	20	50

6.5.1.2 HPLC Laufmittel und verwendete Methoden

Die Reinigung der Produkte mittels *RP*-HPLC erfolgte an einer C₁₈ Säule der Firma Macherey&Nagel (Nucleodur Isis, 250x21 mm, 5 µm, 300 Å) bei einer Flussrate von 20 mL/min. Die Detektion erfolgte UV-spektroskopisch mittels DAD und massenspektrometrisch durch ein ESI *single-quad* Massenspektrometer im Positivmodus. Abweichungen hiervon sind im Einzelnen aufgeführt. Eluiert wurde durch Verwendung von Gradienten der Laufmittelgemische **A** (H₂O/MeCN/FA 95:5:0.1 v/v) und **B** (MeCN/H₂O/FA 95:5:0.1). Die Laufmittelgemische wurden vor Verwendung im Ultraschallbad entgast. Die verwendeten Gradienten sind im Folgenden einzeln aufgeführt.

Methode	Minute	Anteil B
LC1	0-20	0-50%
	20-25	50-100%
	25-27	100-100%
	27-35	100-0%

Methode	Minute	Anteil B
LC2	0-15	0-25%
	15-19	25-100%
	19-21	100-100%
	21-25	100-0%

Methode	Minute	Anteil B
LC3	0-30	0-50%
	30-33	50-100%
	33-35	100-100%
	35-40	100-0%

Methode	Minute	Anteil B
LC4	0-5	0%
	5-20	0-15%
	20-24	15-100%
	24-28	100-0%

Methode	Minute	Anteil B
LC5	0-21	0-35%
	21-25	35-100%
	25-27	100-100%
	27-31	100-0%

Methode	Minute	Anteil B
LC6	0-5	0-25%
	5-25	25-75%
	25-26	75-100%
	26-30	100-0%

Methode	Minute	Anteil B
LC7	0-5	0-50%
	5-9	50-100%
	9-13	100-0%

Methode	Minute	Anteil B
LC8	0-25	0-25%
	25-28	25-100%
	28-32	100-0%

Methode	Minute	Anteil B
LC9	0-5	0-20%
	5-15	20%
	15-30	20-30%
	30-34	30%
	34-37	30-40%
	37-40	40-0%

6.6 Durchgeführte Synthesen

6.6.1.1 Darstellung von 1

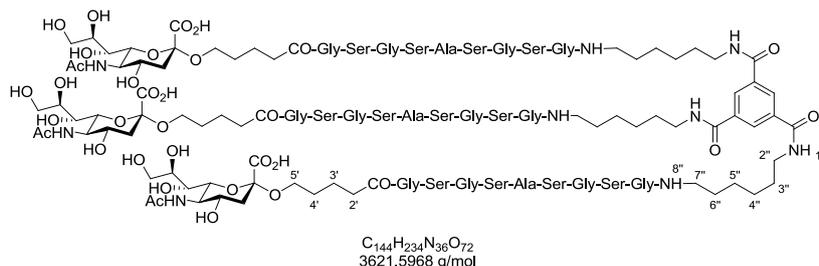
Nach **AAV6** wurden 14.5 mg (3.50 μmol) **29** zu 5.7 mg (1.6 μmol) **1** umgesetzt. Dies entspricht einer Ausbeute von 45% bezogen auf **29**.

Charakterisierung:

Farbloser Feststoff

R_f : 11.2 min (LC2)

Reinheit: 89% (254 nm)



HR-ESI-MS: m/z = ber.: 1810.7956 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, gef.: 1810.8134 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, pH 3):

System	δ NH [ppm]	δ H_α [ppm]	δ H_β [ppm]
Gly 1	8.299	3.928	
Ser 2	8.372	4.412	3.838
Gly 3	8.525	3.945	
Ser 4	8.178	4.392	3.808
Ala 5	8.409	4.324	1.357
Ser 6	8.237	4.363	3.818
Gly 7	8.347	3.954	
Ser 8	8.261	4.353	3.828
Gly 9	8.446	3.828	
Neu5Ac-Alkyl	3.687 (H-5'a); 3.398 (H-5'b); 2.279 (H-2'); 1.575 (H-3'); 1.517 (H-4')		
Neuraminsäure	8.048 (NHAc); 3.804 (H-9a); 3.796 (H-8); 3.762 (H-5); 3.658 (H-6); 3.630 (H-4); 3.576 (H-9b); 3.524 (H-7); 2.666 (H-3eq); 1.971 (NHAc); 1.612 (H-3ax)		
Anker	8.568 (NH-1''); 8.186 (H-arom); 7.683 (NH-8''); 3.350 (H-2''); 3.140 (H-7''); 1.570 (H-3''); 1.437 (H-6''); 1.319 (H-4''); 1.283 (H-5'')		

$^2J_{\text{H-3ax}, \text{H-3eq}} = 13.0$ Hz, $^3J_{\text{H-3eq}, \text{H-4}} = 4.9$ Hz, $^3J_{\text{H-4}', \text{H-5'a}} = 6.6$ Hz, $^3J_{\text{H-4}, \text{H-5'b}} = 6.8$ Hz, $^2J_{\text{H-5'a}, \text{H-5'b}} = 9.9$ Hz,

$^3J_{\text{NH-1''}, \text{H-2''}} = 6.0$ Hz, $^3J_{\text{H-7''}, \text{NH-8''}} = 6.0$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, pH 3): δ [ppm] = 128.7 (C-H-arom); 72.6 (C-6); 71.7 (C-8); 68.5 (C-7); 68.1 (C-4); 63.9 (C-5'); 63.1 (C-9); 61.3 (β -Ser); 56.0, 55.7 (α -Ser); 52.1 (C-5); 50.0 (α -Ala); 42.8 (α -Gly's); 40.2 (C-2''); 40.1 (C-3); 39.1 (C-7''); 35.0 (C-2'); 28.4 (C-4'); 28.2 (C-3''); 28.2 (C-6''); 25.5 (C-4''); 25.2 (C-5''); 22.6 (NHCOCH_3); 21.6 (C-3'); 16.6(β -Ala).

6.6.1.2 Darstellung von N^1, N^3, N^5 -Tris(5-*tert*-butyloxycarbonylamino-pent-1-yl)-1,3,5-benzotri-carbonsäureamid (7)

Nach einer literaturbekannten Vorschrift^[89] wurden 914 mg (3.44 mmol, 1 Äq) Trimesoylchlorid mit 2.80 g (13.8 mmol, 4 Äq) **3** zu 1.88 g (2.47 mmol) **7** umgesetzt. Dies entspricht einer Ausbeute von 72% bezogen auf Trimesoylchlorid. Abweichend von der Vorschrift erfolgte die Synthese von **7** unter Schlenkbedingungen, wobei Pyridin als Base im Volumenverhältnis 1:1 zu DCM eingesetzt wurde. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}$ 29:1:0.5 \rightarrow 19:1:0.5) gereinigt.

Charakterisierung:

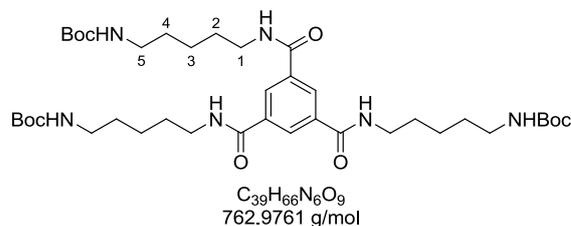
Farbloser Feststoff

R_f : 0.53 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}$ 19:1:0.5)

HR-ESI-MS: m/z = ber.: 763.4969 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gef.: 763.4980 $[\text{M}+\text{H}]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 8.39 (*s*, 3H, **H**-arom.), 4.64 (*s*, 3H, **NHBoc**); 3.55-3.39 (*m*, 6H, **H**-1); 3.15-3.05 (*m*, 6H, **H**-5); 1.73-1.59 (*m*, 6H, **H**-2); 1.58-1.48 (*m*, 6H, **H**-4); 1.46-1.33 (*m*, 6H, **H**-3); 1.42 (*s*, 27H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm] = 165.4 (NHCO); 155.5 (NHCOO); 135.1 (C_q -arom); 128.3 (C_H -arom.); 77.3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 40.0 (C-1); 39.6 (C-5); 29.2 (C-2); 28.7 (C-4); 28.6 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 23.7 (C-3).



6.6.1.3 Darstellung von N^1, N^3, N^5 -Tris(6-*tert*-butyloxycarbonylaminohex-1-yl)-1,3,5-benzotri-carbonsäureamid (**8**)

Nach einer literaturbekannten Vorschrift^[89] wurden 1.509 g (5.685 mmol, 1 Äq) Trimesoylchlorid mit 5.55 g (25.7 mmol, 4.5 Äq) **4** zu 3.707 g (4.605 mmol) **8** umgesetzt. Dies entspricht einer Ausbeute von 81% bezogen auf Trimesoylchlorid. Abweichend von der Vorschrift erfolgte die Synthese von **8** unter Schlenkbedingungen, wobei Pyridin als Base in neunfachem Überschuss eingesetzt wurden. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CHCl₃/MeOH/AcOH 29:1:0.5 → 19:1:0.5) gereinigt.

Charakterisierung:

Farbloser Feststoff

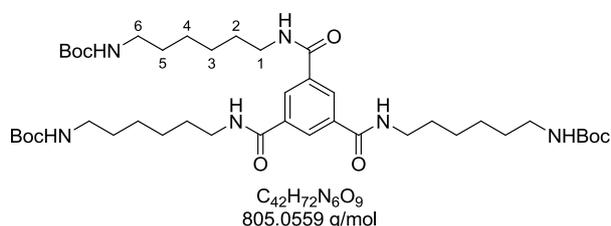
R_f: 0.41 (CHCl₃/MeOH/AcOH 19:1:0.5)

HR-ESI-MS: m/z = ber.: 805.5709 [M+H]⁺, gef.: 805.5437 [M+H]⁺

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8.42 (s, 3H, **H**-arom.), 4.71 (s, 3H, -NHBoc); 3.45-3.38 (m, 6H, **H**-1); 3.10 (t, 6H, **H**-6); 1.64-1.54 (m, 6H, **H**-2); 1.51-1.43 (m, 6H, **H**-5); 1.41-1.28 (m, 12H, **H**-3, **H**-4); 1.40 (s, 27H, C(CH₃)₃).

³J_{H-5,H-6} = 6.8 Hz.

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 166.2 (NHCO); 156.6 (NHCOO); 135.4 (C_q-arom.); 128.5 (C_H-arom.); 79.5 (C(CH₃)₃); 40.4 (C-6); 39.9 (C-1); 30.1 (C-5); 29.4 (C-2); 28.6 (C(CH₃)₃); 28.4 (C(CH₃)₃); 26.4, 26.3 (C-3, C-4).



6.6.1.4 Darstellung von N^1, N^3, N^5 -Tris(7-*tert*-butyloxycarbonylaminoheptyl)-1,3,5-benzotri-carbonsäureamid (**9**)

Nach einer literaturbekannten Vorschrift^[89] wurden 232 mg (0.874 mmol) Trimesoylchlorid mit 903 mg (3.92 mmol, 4.5 Äq) **5** zu 230 mg (0.271 mmol) **9** umgesetzt. Dies entspricht einer Ausbeute von 31% bezogen auf Trimesoylchlorid. Abweichend von der Vorschrift erfolgte die Synthese von **9** unter Schlenkbedingungen, wobei Pyridin als Base im Volumenverhältnis 1:1 zu DCM eingesetzt wurde. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CHCl₃/MeOH/AcOH 29:1:0.5 → 19:1:0.5) gereinigt.

Charakterisierung:

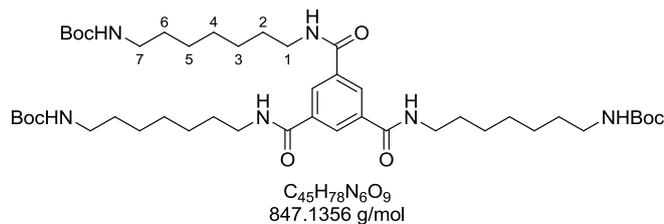
Farbloser Feststoff

R_f: 0.35 (CHCl₃/MeOH/AcoH 19:1:0.5)

HR-ESI-MS: *m/z* = ber.: 869.5728 [M+Na]⁺, gef.: 869.5734 [M+Na]⁺

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8.40 (*s*, 3H, **H**-arom.); 6.66 (*s*, 3H, **-NH**), 4.60 (*s*, 3H, **-NH**Boc); 3.53-3.43 (*m*, 6H, **H**-1); 3.15-3.04 (*m*, 6H, **H**-7); 1.70-1.55 (*m*, 6H, **H**-2); 1.51-1.40 (*m*, 6H, **H**-6); 1.43 (*s*, 27H, C(CH₃)₃); 1.40-1.24 (*m*, 18H, **H**-3, **H**-4, **H**-5).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 165.9 (NHCO); 128.2 (C_H-arom.); 40.7 (C-7); 40.4 (C-1); 29.9 (C-6); 29.5 (C-2); 28.6 (C(CH₃)₃); 28.6 (C-5); 26.3, 26.0 (C-3, C-4).



6.6.1.5 Darstellung von Methyl [*n*-hex-5-enyl (5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galacto-2-nonulopyranosid)]onat (17)

Nach AAV1 wurden 1.37 g (2.69 mmol) **16** in 18 mL 5-Hexen-1-ol zu 1.30 g (2.20 mmol) **17** umgesetzt. Dies entspricht einer Ausbeute von 82% bezogen auf **16**.

Charakterisierung:

Farbloser Schaum

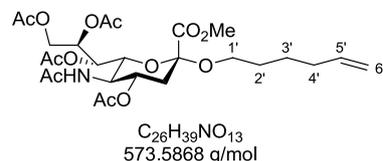
Drehwert: $[\alpha]_D^{25} = -10.0^\circ$ (c = 1, CHCl₃)

R_f: 0.13 (PE/EE 1:2)

HR-ESI-MS: *m/z* = ber.: 574.2499 [M+H]⁺, gef.: 574.2496 [M+H]⁺

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 5.80 (*ddt*, 1H, **H**-5[^]); 5.43-5.35 (*m*, 1H, **H**-8); 5.32 (*dd*, 1H, **H**-7); 5.13 (*d*, 1H, NHAc); 5.01 (*ddt*, 1H, **H**-6^{'E}); 4.94 (*ddt*, 1H, **H**-6^{'Z}); 4.84 (*ddt*, 1H, **H**-4); 4.31 (*dd*, 1H, **H**-9a); 4.13-4.04 (*m*, 3H, **H**-5, **H**-6, **H**-9b); 3.79 (*s*, 3H, COOCH₃); 3.76 (*dt*, 1H, **H**-1^{'a}); 3.23 (*dt*, 1H, **H**-1^{'b}); 2.56 (*dd*, 1H, **H**-3eq); 2.14, 2.13, 2.03, 2.02 (4x *s*; 4x 3H, 4x OAc); 2.09-2.03 (*m*, 2H, **H**-4[']); 1.94 (*dd*, 1H, **H**-3ax); 1.88 (*s*, 1H; NHAc); 1.61-1.51 (*m*, 2H, **H**-2[']); 1.48-1.39 (*m*, 2H, **H**-3[']).

²J_{H-3ax, H-3eq} = 12.9 Hz, ³J_{H-3ax, H-4} = 12.3 Hz, ³J_{H-3eq, H-4} = 4.6 Hz, ³J_{H-4, H-5} = 9.6 Hz, ³J_{H-6, H-7} = 1.7 Hz, ³J_{H-7, H-8} = 8.3 Hz, ³J_{H-8, H-9a} = 2.6 Hz, ³J_{H-8, H-9b} = 5.5 Hz, ²J_{H-9a, H-9b} = 12.4 Hz, ²J_{H-1^{'a}, H-1^{'b}} = 9.3 Hz, ³J_{H-1a['], H-2[']} = 6.3 Hz, ³J_{H-1^{'b}, H-2[']} = 6.3 Hz.



$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 171.2, 170.8, 170.3, 170.3, 170.1 (C=O); 168.7 (C-1); 138.9 (C-5'); 114.6 (C-6'); 98.9 (C-2); 72.4 (C-6); 69.3 (C-4); 68.8 (C-8); 67.6 (C-7); 65.0 (C-1'); 62.5 (C-9); 52.8 (CO_2CH_3); 49.7 (C-5); 38.3 (C-3); 33.4 (C-4'); 29.2 (C-2'); 25.3 (C-3'); 23.3 (NHCOCH_3); 21.2, 21.0, 21.0, 20.9 (OCOCH_3).

6.6.1.6 Darstellung von Methyl [*n*-undec-10-enyl (5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-di-desoxy-D-glycero- α -D-galacto-2-nonulopyranosid)]onat (**18**)

Nach **AAV1** wurden 3.10 g (6.10 mmol) **16** mit 10-Undecen-1-ol zu 1.97 g (2.20 mmol) **18** umgesetzt. Dies entspricht einer Ausbeute von 50% bezogen auf **16**.

Charakterisierung:

Farbloser Schaum

Drehwert: $[\alpha]_D^{25} = -10.5^\circ$ ($c = 1$, CHCl_3)

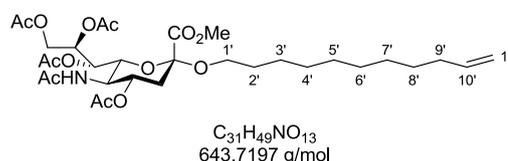
R_f : 0.14 (PE/EE 1:2)

HR-ESI-MS: $m/z = \text{ber.}: 644.3283$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, $\text{gef.}: 644.3277$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 5.77 (*ddt*, 1H, **H-10'**); 5.42 (*d*, 1H, **NHAc**); 5.37-5.33 (*m*, 1H, **H-8**); 5.30 (*dd*, 1H, **H-7**); 4.95 (*dd*, 1H, **H-11'E**); 4.88 (*dd*, 1H, **H-11'Z**); 4.80 (*ddd*, 1H, **H-4**); 4.30 (*dd*, 1H, **H-9a**); 4.10-4.03 (*m*, 3H, **H-5**, **H-6**, **H-9b**); 3.75 (*s*, 3H, COOCH_3); 3.71 (*dt*, 1H, **H-1'a**); 3.17 (*dt*, 1H, **H-1'b**); 2.54 (*dd*, 1H, **H-3eq**); 2.11, 2.10, 2.00, 1.99 (4x *s*; 4x 3H, 4x **OAc**); 2.04-1.99 (*m*, 3H, **H-3ax**, **H-9'**); 1.85 (*s*, 1H; **NHAc**); 1.51-1.46 (*m*, 2H, **H-2'**); 1.35-1.32 (*m*, 2H, **H-8'**); 1.28-1.20 (*m*, 10H, **H-3'**, **H-4'**, **H-5'**, **H-6'**, **H-7'**).

$^2J_{\text{H-3ax, H-3eq}} = 12.8$ Hz, $^3J_{\text{H-3ax, H-4}} = 11.1$ Hz, $^3J_{\text{H-3eq, H-4}} = 4.4$ Hz, $^3J_{\text{H-4, H-5}} = 10.6$ Hz, $^3J_{\text{H-5, H-NH}} = 9.6$ Hz, $^3J_{\text{H-6, H-7}} = 2.5$ Hz, $^3J_{\text{H-7, H-8}} = 8.0$ Hz, $^3J_{\text{H-8, H-9a}} = 1.6$ Hz, $^2J_{\text{H-9a, H-9b}} = 12.4$ Hz, $^2J_{\text{H-1'a, H-1'b}} = 9.6$ Hz, $^3J_{\text{H-1a', H-2'}}$ = 6.4 Hz, $^3J_{\text{H-1'b, H-2'}}$ = 6.4 Hz, $^3J_{\text{H-10', H-11'Z}} = 10.0$ Hz, $^3J_{\text{H-10', H-11'E}} = 15.2$ Hz, $^2J_{\text{H-11'Z, H-11'E}} = 2.0$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 171.1, 170.7, 170.4, 170.2, 170.2 (C=O); 168.7 (C-1); 139.3 (C-10'); 114.2 (C-11'); 98.9 (C-2); 72.6 (C-6); 69.4 (C-4); 69.1 (C-8); 67.6 (C-7); 65.2 (C-1'); 62.5 (C-9); 52.7 (CO_2CH_3); 49.5 (C-5); 38.2 (C-3); 33.9 (C-9'); 29.7 (C-2'); 29.6, 29.5, 29.4, 29.2 (C-3', C-4', C-6', C-7'); 23.2 (NHCOCH_3); 21.2, 20.9, 20.9, 20.8 (OCOCH_3).



6.6.1.7 Darstellung von Methyl [*n*-pent-5-ylsäure (5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-di-desoxy-D-glycero- α -D-galacto-2-nonulopyranosid)]onat (**19**)

Nach **AAV2** wurden 4.00 g (6.98 mmol) **17** mit 175 mg (~ 0.70 mmol) RuCl₃·xH₂O und 5.97 g (28.0 mmol) NaIO₄ zu 3.37 g (5.70 mmol) **19** umgesetzt. Dies entspricht einer Ausbeute von 82% bezogen auf **17**.

Charakterisierung:

Farbloser Schaum

Drehwert: $[\alpha]_D^{25} = -10.6^\circ$ (c = 1, CHCl₃)

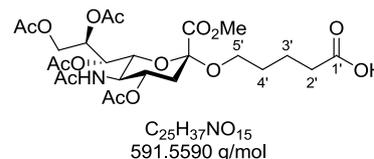
R_f: 0.48 (Toluol/Aceton/AcOH 1:1:0.01)

HR-ESI-MS: *m/z* = ber.: 592.2241 [M+H]⁺, gef.: 592.2242 [M+H]⁺

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 5.45-5.36 (*m*, 1H, **H-8**); 5.30 (*dd*, 1H, **H-7**); 5.14 (*d*, 1H NHAc); 4.85 (*ddd*, 1H, **H-4**); 4.32 (*dd*, 1H, **H-9a**); 4.14-4.01 (*m*, 3H, **H-5**, **H-6**, **H-9b**); 3.79 (*s*, 3H, COOCH₃); 3.78 (*dt*, 1H, **H-5'a**); 3.25 (*dt*, 1H, **H-5'b**); 2.57 (*dd*, 1H, **H-3eq**); 2.39 (*dt*, 2H, **H-2'**); 2.15, 2.14, 2.04, 2.02 (4x *s*, 4x 3H, 4x OAc); 1.95 (*dt*, 1H, **H-3ax**); 1.85 (*s*, 3H, NHAc); 1.79-1.66 (*m*, 2H, **H-3'**); 1.66-1.59 (*m*, 2H, **H-4'**).

²J_{H-3ax, H-3eq} = 12.5 Hz, ³J_{H-3ax, H-4} = 12.4 Hz, ³J_{H-3eq, H-4} = 4.6 Hz, ³J_{H-4, H-5} = 9.6 Hz, ³J_{H-6, H-7} = 1.7 Hz, ³J_{H-7, H-8} = 8.5 Hz, ³J_{H-8, H-9a} = 2.5 Hz, ²J_{H-9a, H-9b} = 12.4 Hz, ²J_{H-2', H-2'} = 1.6 Hz, ³J_{H-2', H-3'} = 7.6 Hz, ³J_{H-4', H-5'a} = 6.3 Hz, ³J_{H-4', H-5'b} = 6.3 Hz, ²J_{H-5'a, H-5'b} = 9.6 Hz.

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 171.2, 171.1, 170.4, 170.4, 170.3 (C=O); 168.6 (C-1); 98.7 (C-2); 72.4 (C-6); 69.1 (C-4); 68.5 (C-8); 67.4 (C-7); 64.2 (C-5'); 62.6 (C-9); 52.7 (CO₂CH₃); 49.5 (C-5); 38.0 (C-3); 33.2 (C-2'); 28.7 (C-4'); 23.4 (NHCOCH₃); 21.2 (C-3'); 21.1, 20.8, 20.8; 20.7 (OCOCH₃).



6.6.1.8 Darstellung von Methyl [*n*-dek-10-ylsäure (5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-di-desoxy-*D*-glycero- α -*D*-galacto-2-nonulopyranosid)]onat (**20**)

Nach **AAV2** wurden 1.97 g (3.06 mmol) **18** mit 67 mg (~ 0.30 mmol) RuCl₃·xH₂O und 2.62 g (12.3 mmol) NaIO₄ zu 1.06 g (1.60 mmol) **20** umgesetzt. Dies entspricht einer Ausbeute von 52% bezogen auf **18**.

Charakterisierung:

Farbloser Schaum

Drehwert: $[\alpha]_D^{25} = -13.9^\circ$ (c = 1, CHCl₃)

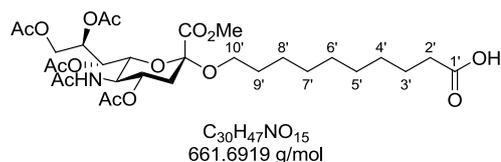
R_f: 0.25 (EE)

HR-ESI-MS: *m/z* = ber.: 662.3025 [M+H]⁺, gef.: 662.3030 [M+H]⁺

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 5.52 (*d*, 1H, NHAc); 5.37-5.34 (*m*, 1H, **H-8**); 5.30 (*dd*, 1H, **H-7**); 4.80 (*ddd*, 1H, **H-4**); 4.29 (*dd*, 1H, **H-9a**); 4.11-4.06 (*m*, 3H, **H-5**, **H-6**, **H-9b**); 3.75 (*s*, 3H, COOCH₃); 3.71 (*dt*, 1H, **H-10'a**); 3.17 (*dt*, 1H, **H-10'b**); 2.54 (*dd*, 1H, **H-3eq**); 2.30 (*t*, 2H, **H-2'**); 2.11, 2.10, 2.01, 2.00 (4x *s*, 4x 3H, 4x OAc); 1.91 (*dt*, 1H, **H-3ax**); 1.85 (*s*, 3H, NHAc); 1.59 (*m*, 2H, **H-9'**); 1.49 (*m*, 2H, **H-9'**); 1.32-1.21 (*m*, 10H, **H-4'**, **H-5'**, **H-6'**, **H-7'**, **H-8'**).

²J_{H-3ax, H-3eq} = 13.0 Hz, ³J_{H-3ax, H-4} = 11.0 Hz, ³J_{H-3eq, H-4} = 4.6 Hz, ³J_{H-4, H-5} = 10.5 Hz, ³J_{H-5, H-NH} = 9.5 Hz, ³J_{H-6, H-7} = 2.5 Hz, ³J_{H-7, H-8} = 7.8 Hz, ³J_{H-8, H-9a} = 2.6 Hz, ²J_{H-9a, H-9b} = 12.6 Hz, ²J_{H-2', H-3'} = 7.4 Hz, ³J_{H-9', H-10a'} = 6.4 Hz, ³J_{H-9', H-10'} = 6.3 Hz, ²J_{H-10'a, H-10'b} = 9.3 Hz.

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 178.5 (C-1'), 171.2, 170.8, 170.7, 170.3, 170.3 (C=O); 168.7 (C-1); 98.9 (C-2); 72.6 (C-6); 69.4 (C-4); 69.0 (C-8); 67.5 (C-7); 65.1 (C-10'); 62.5 (C-9); 52.7 (CO₂CH₃); 49.5 (C-5); 38.1 (C-3); 34.0 (C-2'); 29.6 (C-9'); 29.4, 29.2, 29.2, 29.1 (C-4', C-5', C-7', C-8'); 25.9 (C-6'); 24.7 (C-3'); 23.2 (NHCOCH₃); 21.2, 20.9, 20.9; 20.8 (OCOCH₃).



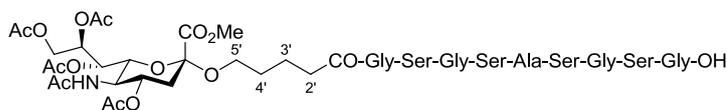
6.6.1.9 Darstellung von **21**

Die Synthese von **21** erfolgte nach **AAV 3** und **AAV4**. Die Darstellung des Peptids nach **AAV3** erfolgte in einer Ansatzgröße von 250 μ mol bezogen auf die Belegung des eingesetzten Harzes (0.37 mmol/g). Die Dibenzofulvenbestimmung ergab einen Wert von 146 μ mol. Für **AAV4** wurden hier 145 mg (245 μ mol, 1.6 \AA q) **19** zusammen mit 193 mg (600 μ mol, 4 \AA q) TBTU und 131 μ L (750 μ mol, 5 \AA q) DIPEA in 2.4 mL DMF gelöst und zu dem Harz gegeben. Es konnten 45 mg

(36 μmol) **21** erhalten werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 25% auf die Dibenzofulvenbestimmung, beziehungsweise von 15% auf die eingesetzte Harzmenge.

Charakterisierung:

Farbloser Feststoff

 R_f : 11.3 min (LC1)

 $\text{C}_{48}\text{H}_{74}\text{N}_{10}\text{O}_{28}$
 1239.1514 g/mol

 HR-ESI-MS: m/z = ber.: 1239.4752 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gef.: 1239.4747 $[\text{M}+\text{H}]^+$
 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, pH 3):

System	δ NH [ppm]	δ H_α [ppm]	δ H_β [ppm]
Gly 1	8.277	4.015	
Ser 2	8.396	4.507	3.910
Gly 3	8.567	4.029	
Ser 4	8.225	4.470	3.892
Ala 5	8.443	4.425	1.442
Ser 6	8.290	4.469	3.900
Gly 7	8.391	4.058	
Ser 8	8.254	4.532	3.909
Gly 9	8.372	4.016	
Neu5Ac-Alkyl	3.785 (H-5'a); 3.438 (H-5'b); 2.377 (H-2'); 1.677 (H-3'); 1.622 (H-4')		
Neuraminsäure	8.120 (NHAc); 5.412 (H-8); 5.382 (H-7); 4.914 (H-4); 4.363 (H-9a); 4.254 (H-6); 4.231 (H-9b); 3.923 (H-5); 3.880 (COOCH ₃); 2.733 (H-3eq); 1.960 (H-3ax)		
Acetylgruppen	2.220, 2.182, 2.104, 2.065 (4x OAc), 1.930 (NHAc)		

$^2J_{\text{H-3ax}, \text{H-3eq}} = 13.6$ Hz, $^3J_{\text{H-3ax}, \text{H-4}} = 12.2$ Hz, $^3J_{\text{H-3eq}, \text{H-4}} = 4.8$ Hz, $^3J_{\text{H-6}, \text{H-7}} = 1.7$ Hz, $^3J_{\text{H-7}, \text{H-8}} = 8.7$ Hz, $^3J_{\text{H-8}, \text{H-9a}} = 2.4$ Hz, $^2J_{\text{H-9a}, \text{H-9b}} = 12.7$ Hz, $^3J_{\text{H-2'}, \text{H-3'}}$ = 7.6 Hz, $^3J_{\text{H-4'}, \text{H-5'a}} = 6.7$ Hz, $^3J_{\text{H-4'}, \text{H-5'b}} = 6.6$ Hz, $^2J_{\text{H-5'a}, \text{H-5'b}} = 10.0$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, D_2O): δ [ppm] = 99.7 (C-2); 72.3 (C-6); 70.1 (C-4); 69.1 (C-8); 68.0 (C-7); 65.6 (C-5'), 63.0 (C-9); 61.9, 61.8, 61.7, 61.7 (β -Ser); 56.4, 56.3, 56.2, 56.1 (α -Ser); 54.1 (COOCH₃); 50.6 (α -Ala); 49.5 (C-5); 43.3, 43.2, 43.1 (α -Gly); 37.6 (C-3); 35.6 (C-2'); 29.0 (C-4'); 22.4 (NHCOCH₃); 22.3 (C-3'); 21.2, 20.9, 20.8 (OCOCH₃); 17.0 (β -Ala).

$^2J_{\text{H-3ax, H-3eq}} = 13.1 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-3ax, H-4}} = 13.0 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-3eq, H-4}} = 4.8 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-2', H-3'}}$ = 7.2 Hz, $^3J_{\text{H-4', H-5'a}} = 6.4 \text{ Hz}$,
 $^3J_{\text{H-4', H-5'b}} = 6.2 \text{ Hz}$, $^2J_{\text{H-5'a, H-5'b}} = 9.6 \text{ Hz}$.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, D_2O): δ [ppm] = 98.8 (C-2); 71.6 (C-6); 69.4 (C-4); 68.4 (C-8); 67.4 (C-7); 64.9 (C-5'); 62.6 (C-9); 61.1, 61.0, 61.0, 61.0 (β -Ser); 55.8, 55.7, 55.7, 55.5 (α -Ser); 53.5 (CO_2CH_3); 49.9 (α -Ala); 48.9 (C-5); 42.6, 42.5, 41.7 (α -Gly); 36.9 (C-3); 35.0 (C-2'); 28.3 (C-4'); 21.8 (NHCOCH_3); 21.7 (C-3'); 20.2, 20.1, 20.1 (OCOCH_3), 16.3 (β -Ala).

6.6.1.11 Darstellung von 23

Die Synthese von **23** erfolgte nach **AAV 3** und **AAV4**. Die Darstellung des Peptids nach **AAV3** erfolgte in einer Ansatzgröße von 250 μmol bezogen auf die Belegung des eingesetzten Harzes (0.37 mmol/g). Die Dibenzofulvenbestimmung ergab einen Wert von 85 μmol . Für **AAV4** wurden 148 mg (250 μmol , 2.5 Äq) **19** eingesetzt. Für **AAV4** wurden hier 190 mg (500 μmol , 5 Äq) HATU und 55 μL (500 μmol , 5 Äq) NMM in 1.5 mL NMP verwendet. Die Abspaltung vom Harz erfolgte mit TFA/DCM/TIPS/ H_2O 20:20:1:1. Es wurden 57 mg (42 μmol) **23** erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 49% auf die Dibenzofulvenbestimmung, beziehungsweise von 17% auf die eingesetzte Harzmenge.

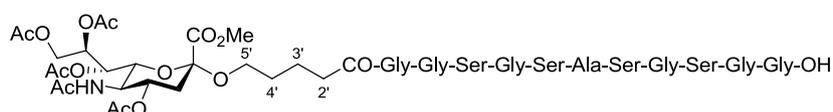
Charakterisierung:

Farbloser Feststoff

R_f : 15.5 min (LC5)

HR-ESI-MS: m/z = ber.: 1353.5181 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gef.: 1351.5159 $[\text{M}+\text{H}]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, pH 3):



$\text{C}_{52}\text{H}_{80}\text{N}_{12}\text{O}_{30}$
1353.2540 g/mol

System	$\delta \text{ NH}$ [ppm]	$\delta \text{ H}_\alpha$ [ppm]	$\delta \text{ H}_\beta$ [ppm]
Gly 1	8.351	4.020	
Gly 2	8.433	4.096	
Ser 3	8.445	4.512	3.971
Gly 4	8.562	4.073	
Ser 5	8.263	4.529	3.945
Ala 6	8.493	4.474	1.476
Ser 7	8.338	4.525	3.946

Gly 8	8.435	4.096	
Ser 9	8.353	4.556	3.988
Gly 10	8.595	4.071	
Gly 11	8.241	4.069	
Neu5Ac-Alkyl	3.821 (H-5'a); 3.463 (H-5'b); 2.416 (H-2'); 1.690 (H-3'); 1.651 (H-4')		
Neuraminsäure	8.165 (NHAc); 5.459 (H-8); 5.424 (H-7); 4.958 (H-4); 4.401 (H-9a); 4.301 (H-6); 4.266 (H-9b); 3.966 (H-5); 3.918 (COOCH ₃); 2.762 (H-3eq); 2.012 (H-3ax)		
Acetylgruppen	2.254, 2.212, 2.136, 2.092 (4x OAc); 1.969 (NHAc)		

$^2J_{\text{H-3ax, H-3eq}} = 13.6 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-3eq, H-4}} = 4.8 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-8, H-9a}} = 2.5 \text{ Hz}$, $^2J_{\text{H-9a, H-9b}} = 12.5 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-2', H-3'}} = 7.7 \text{ Hz}$,
 $^3J_{\text{H-4', H-5'a}} = 6.6 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-4', H-5'b}} = 6.5 \text{ Hz}$, $^2J_{\text{H-5'a, H-5'b}} = 10.1 \text{ Hz}$.

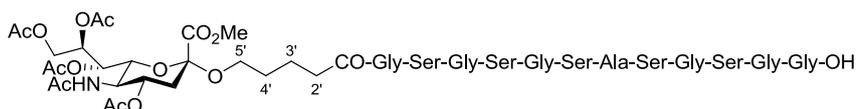
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, D₂O): δ [ppm] = 98.9 (**C-2**), 72.0 (**C-6**), 69.7 (**C-4**), 68.6 (**C-8**), 67.7 (**C-7**), 65.3 (**C-5'**), 62.5 (**C-9**), 61.5, 61.5, 61.4, 61.4 (β -Ser), 56.1, 56.1 56.0, 56.0 (α -Ser), 53.7 (CO₂CH₃), 50.3 (α -Ala), 49.3 (**C-5**), 42.8, 42.8, 42.8, 41.9 (α -Gly), 37.2 (**C-3**), 35.5 (**C-2'**), 28.7 (**C-4'**), 22.2 (NHCOCH₃), 22.0 (**C-3'**), 20.7, 20.6, 20.5, 20.4 (OCOCH₃), 16.6 (β -Ala).

6.6.1.12 Darstellung von 24

Die Synthese von **24** erfolgte nach **AAV 3** und **AAV4**. Die Darstellung des Peptids nach **AAV3** erfolgte in einer Ansatzgröße von 250 μmol bezogen auf die Belegung des eingesetzten Harzes (0.37 mmol/g). Die Dibenzofulvenbestimmung ergab einen Wert von 104 μmol . Für **AAV4** wurden 150 mg (253 μmol , 2.5 Äq) **19** eingesetzt. Für **AAV4** wurden hier 194 mg (511 μmol , 5 Äq) HATU als Aktivator und 55 μL (500 μmol , 5 Äq) NMM als Aktivator Base in 1.5 mL NMP verwendet. Die Abspaltung vom Harz erfolgte abweichend von **AAV4** mit TFA/DCM/TIPS/H₂O 20:20:1:1. Es konnten 30 mg (21 μmol) **24** erhalten werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 20% auf die Dibenzofulvenbestimmung, beziehungsweise von 8% auf die eingesetzte Harzmenge.

Charakterisierung:

Farbloser Feststoff



R_t: 15.3 min (LC5)

C₅₅H₈₅N₁₃O₃₂
1440.3313 g/mol

HR-ESI-MS: $m/z = \text{ber.}: 1440.5478 [\text{M}+\text{H}]^+$, $\text{gef.}: 1440.5497 [\text{M}+\text{H}]^+$

¹H-NMR (500 MHz, H₂O/D₂O 9:1, pH 3):

System	δ NH [ppm]	δ H _α [ppm]	δ H _β [ppm]
Gly 1	8.251	3.969	
Ser 2	8.274	4.443	3.860
Gly 3	8.499	3.969	
Ser 4	8.380	4.461	3.861
Gly 5	8.486	3.969	
Ser 6	8.191	4.441	3.839
Ala 7	8.422	4.356	1.390
Ser 8	8.263	4.419	3.841
Gly 9	8.360	4.011	
Ser 10	8.274	4.443	3.860
Gly 11	8.540	3.990	
Gly 12	8.161	3.967	
Neu5Ac-Alkyl	3.746 (H-5'a); 3.386 (H-5'b); 2.336 (H-2'); 1.650 (H-3'); 1.558 (H-4')		
Neuraminsäure	8.091 (NHAc); 5.383 (H-8); 5.346 (H-7); 4.872 (H-4); 4.324 (H-9a); 4.223 (H-6); 4.182 (H-9b); 3.882 (H-5); 3.840 (COOCH ₃); 2.686 (H-3eq); 1.925 (H-3ax)		
Acetylgruppen	2.172, 2.129, 2.056, 2.099(4x OAc); 1.888 (NHAc)		

²J_{H-3ax, H-3eq} = 13.6 Hz, ³J_{H-3eq, H-4} = 4.8 Hz, ²J_{H-9a, H-9b} = 12.5 Hz, ³J_{H-6, H-7} = 1.9 Hz, ³J_{H-7, H-8} = 8.8 Hz, ³J_{H-8, H-9a} = 2.6 Hz, ³J_{H-8, H-9b} = 4.5 Hz, ³J_{H-2', H-3'} = 7.7 Hz, ³J_{H-4', H-5'a} = 6.5 Hz, ³J_{H-4', H-5'b} = 6.5 Hz, ²J_{H-5'a, H-5'b} = 10.0 Hz.

¹³C-NMR (HSQC, 100 MHz, D₂O): δ [ppm] = 72.0 (C-6), 69.0 (C-4), 64.7 (C-5'), 62.5 (C-9), 61.2, 61.1, 61.1, 61.0, 61.0 (β-Ser), 55.8, 55.8, 55.7, 55.7 (α-Ser), 53.6 (CO₂CH₃), 50.0 (α-Ala), 49.4 (C-5), 42.6, 42.6, 42.6, 42.5, 42.4, 41.7 (α-Gly), 37.3 (C-3), 35.0 (C-2'), 28.4 (C-4'), 21.5 (NHCOCH₃), 22.0 (C-3'), 20.7, 20.2, 20.1, 20.1 (OCOCH₃), 16.6 (β-Ala).

6.6.1.13 Darstellung von 25

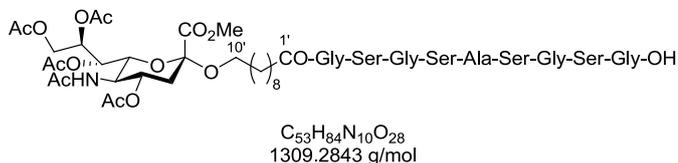
Die Synthese von **25** erfolgte nach **AAV 3** und **AAV4**. Die Darstellung des Peptids nach **AAV3** erfolgte in einer Ansatzgröße von 250 μmol bezogen auf die Belegung des eingesetzten Harzes (0.37 mmol/g). Die Dibenzofulvenbestimmung ergab einen Wert von 118 μmol. Für **AAV4** wurden hier 319 mg (472 μmol, 4 Äq, c = 200 mM) **20**, 190 mg (591 μmol, 5 Äq) TBTU und 96 μL (591 μmol, 5 Äq) DIPEA in 2.4 mL DMF eingesetzt. Es konnten 34.4 mg (26.3 μmol) **25** erhalten

werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 25% auf die Dibenzofulvenbestimmung, beziehungsweise von 11% auf die eingesetzte Harzmenge.

Charakterisierung:

Farbloser Feststoff

R_f: 21.6 min (LC5)



HR-ESI-MS: m/z = ber.: 1309.5536 [M+H]⁺, gef.: 1309.5492 [M+H]⁺

¹H-NMR (500 MHz, H₂O/D₂O 9:1, pH 3):

System	δ NH [ppm]	δ H _α [ppm]	δ H _β [ppm]
Gly 1	8.219	3.875	
Ser 2	8.311	4.932	3.910
Gly 3	8.489	3.902	
Ser 4	8.139	4.351	3.773
Ala 5	8.382	4.287	1.325
Ser 6	8.217	4.342	3.791
Gly 7	8.306	3.923	
Ser 8	8.172	4.415	3.792
Gly 9	8.204	3.760	
Neu5Ac-Alkyl	3.656 (H-10 ³ a); 3.302 (H-10 ⁴ b); 2.217 (H-2 ³); 1.490 (H-3 ³); 1.450 (H-9 ³); 1.229, 1.220-1.15 (H-4 ³ , H-5 ³ , H-6 ³ , H-7, H-8 ³)		
Neuraminsäure	8.050 (NHAc); 5.319 (H-8); 5.278 (H-7); 4.797 (H-4); 4.255 (H-9a); 4.154 (H-6); 4.116 (H-9b); 3.814 (H-5); 3.767 (COOCH ₃); 2.607 (H-3eq); 1.833 (H-3ax)		
Acetylgruppen	2.102, 2.063, 1.988, 1.940 (4x OAc), 1.833 (NHAc)		

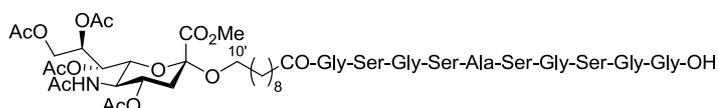
²J_{H-3ax, H-3eq} = 12.8 Hz, ³J_{H-3eq, H-4} = 4.6 Hz, ³J_{H-3ax, H-4} = 12.1 Hz, ³J_{H-4, H-5} = 10.0 Hz, ³J_{H-6, H-7} = 1.9 Hz, ³J_{H-6, H-7} = 10.8 Hz, ³J_{H-7, H-8} = 8.7 Hz, ³J_{H-8, H-9a} = 2.5 Hz, ³J_{H-8, H-9b} = 4.9 Hz, ²J_{H-9a, H-9b} = 12.7 Hz, ³J_{H-2³, H-3³} = 7.5 Hz, ³J_{H-9³, H-10³b} = 6.5 Hz, ²J_{H-10³a, H-10³b} = 9.6 Hz.

¹³C-NMR (150 MHz, D₂O): δ [ppm] = 98.8 (C-2); 71.5 (C-6); 69.4 (C-4); 68.1 (C-8); 67.5 (C-7); 65.4 (C-10⁴); 62.3 (C-9); 61.3, 61.1, 61.0 (β-Ser); 55.4, 55.4 (α-Ser); 53.4 (COOCH₃); 49.9 (α-Ala); 49.0 (C-5); 42.6, 41.0 (α-Gly); 36.9 (C-3); 35.5 (C-2³); 30.0 (C-9³); 28.6, 28.5, 28.4, 28.2, 28.0 (C-4³-C-8³); 25.2 (C-3³); 21.8 (NHCOCH₃); 21.8, 20.5, 20.2, 20.1 (OCOCH₃); 16.3 (β-Ala).

6.6.1.14 Darstellung von 26

Die Synthese von **26** erfolgte nach **AAV 3** und **AAV4**. Die Darstellung des Peptids nach **AAV3** erfolgte in einer Ansatzgröße von 250 μmol bezogen auf die Belegung des eingesetzten Harzes (0.37 mmol/g). Die Dibenzofulvenbestimmung ergab einen Wert von 135 μmol . Für **AAV4** wurden hier 179 mg (287 μmol , 2 Äq, $c = 150 \text{ mM}$) **20**, 217 mg (675 μmol , 5 Äq) TBTU und 110 μL (675 μmol , 5 Äq) DIPEA in 2.7 mL DMF verwendet. Es konnten 34.4 mg (26.3 μmol) **26** erhalten werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 22% auf die Dibenzofulvenbestimmung, beziehungsweise von 13% auf die eingesetzte Harzmenge.

Charakterisierung:



Farbloser Feststoff

$\text{C}_{55}\text{H}_{87}\text{N}_{11}\text{O}_{29}$
1366.3356 g/mol

R_f : 21.5 min (**LC5**)

HR-ESI-MS: $m/z = \text{ber.}: 1366.5749 [\text{M}+\text{H}]^+$, $\text{gef.}: 1366.5912 [\text{M}+\text{H}]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, pH 3):

System	$\delta \text{ NH}$ [ppm]	$\delta \text{ H}_\alpha$ [ppm]	$\delta \text{ H}_\beta$ [ppm]
Gly 1	8.217	3.876	
Ser 2	8.311	4.370	3.792
Gly 3	8.489	3.899	
Ser 4	8.138	4.350	3.766
Ala 5	8.377	4.286	1.324
Ser 6	8.217	4.327	3.770
Gly 7	8.310	3.927	
Ser 8	8.225	4.390	3.788
Gly 9	8.439	3.898	
Gly 10	8.049	3.825	
Neu5Ac-Alkyl	3.658 (H-10³a); 3.316 (H-10³b); 2.215 (H-2³); 1.497 (H-3³); 1.458 (H-9³); 1.233 (H-6³); 1.204 (H-4³ , H-5³ , H-7³ , H-8³)		
Neuraminsäure	8.050 (NHAc); 5.311 (H-8); 5.277 (H-7); 4.795 (H-4); 4.253 (H-9a); 4.154 (H-6); 4.111 (H-9b); 3.818 (H-5); 3.764 (COOCH_3); 2.604 (H-3eq); 1.834 (H-3ax)		
Acetylgruppen	2.099, 2.060, 1.984, 1.936 (4x OAc), 1.813 (NHAc)		

$^2J_{\text{H-3ax, H-3eq}} = 13.2 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-3eq, H-4}} = 4.6 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-2}', \text{H-3}'}$ = 8.0 Hz, $^3J_{\text{H-9}', \text{H-10}'a} = 7.5 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-9}', \text{H-10}'b} = 6.9 \text{ Hz}$,
 $^2J_{\text{H-10}'a, \text{H-10}'b} = 9.7 \text{ Hz}$.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, D_2O): δ [ppm] = 71.5 (C-6); 69.4 (C-4); 68.5 (C-8); 67.4 (C-7); 65.4 (C-10'); 62.3 (C-9); 61.1, 61.0 (β -Ser); 55.8, 55.7 (α -Ser); 53.4 (CO_2CH_3); 49.9 (α -Ala); 48.9 (C-5); 42.6, 42.5, 42.4 (α -Gly); 36.9 (C-3); 35.4 (C-2'); 28.6 (C-9'); 28.5, 28.3 (C-4', C-5', C-7', C-8'); 25.2 (C-3'); 25.1 (C-6'); 21.7 (NHCOCH_3); 20.7, 20.2, 20.1, 20.0 (OCOCH_3), 16.2 (β -Ala).

6.6.1.15 Darstellung von 27

Nach AAV5 wurden 1.81 mg (2.51 μmol , 1 \AA q) **6** mit 14.0 mg (11.3 μmol , 4.5 \AA q, $c = 6.6 \text{ mM}$) **21**, 8.6 mg (22 μmol , 9 \AA q) HATU und 4.4 μL (25 μmol , 10 \AA q) DIPEA in 1.7 mL DMF zu 7.5 mg (1.8 μmol) **27** umgesetzt. Dies entspricht einer Ausbeute von 73% bezogen auf **6**.

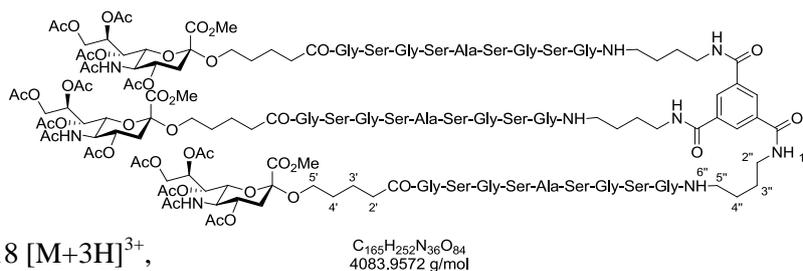
Charakterisierung:

Farblosler Feststoff

R_f : 19.6 min (LC1)

HR-ESI-MS: $m/z = \text{ber.}: 1361.5518 [\text{M}+3\text{H}]^{3+}$,

gef.: 1361.5537 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, pH 3):

System	$\delta \text{ NH}$ [ppm]	$\delta \text{ H}_\alpha$ [ppm]	$\delta \text{ H}_\beta$ [ppm]
Gly 1	8.195	3.881	
Ser 2	8.329	4.368	3.794
Gly 3	8.492	3.793	
Ser 4	8.137	4.341	3.752
Ala 5	8.356	4.270	1.308
Ser 6	8.177	4.305	3.757
Gly 7	8.290	3.890	
Ser 8	8.211	4.303	3.770
Gly 9	8.410	3.793	
Neu5Ac-Alkyl	3.659 (H-5'a); 3.375 (H-5'b); 2.250 (H-2'); 1.514 (H-3'); 1.497 (H-4')		
Neuraminsäure	8.046 (NHAc); 5.295 (H-8); 5.270 (H-7); 4.775 (H-4); 4.235 (H-9a); 4.142		

	(H-6); 4.103 (H-9b); 3.792 (H-5); 3.757 (COOCH ₃); 2.608 (H-3eq); 1.818 (H-3ax)
Acetylgruppen	2.099, 2.055, 1.981, 1.937 (4x OAc), 1.817 (NHAc)
Anker	8.547 (NH-1''); 8.180 (H-arom); 7.702 (NH-6''); 3.334 (H-2''); 3.157 (H-5''); 1.506 (H-3'' , H-4'')

$^2J_{\text{H-3ax, H-3eq}} = 13.4 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-3eq, H-4}} = 4.6 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-2'}, \text{H-3'}} = 7.6 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-4'}, \text{H-5'a}} = 6.8 \text{ Hz}$, $^2J_{\text{H-5'a, H-5'b}} = 10.5 \text{ Hz}$,
 $^3J_{\text{NH-1'', H-2''}} = 6.1 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-5'', NH-6''}} = 6.2 \text{ Hz}$.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, D₂O): δ [ppm] = 128.2 (C-H-arom); 71.6 (C-6); 69.4 (C-4); 68.1 (C-8); 67.3 (C-7); 65.1 (C-5'); 62.1 (C-9); 61.3 (β -Ser); 56.1 (α -Ser); 53.5 (COOCH₃); 50.5 (α -Ala); 49.2 (C-5); 43.1, 43.0 (α -Gly); 40.0 (C-2''); 39.7 (C-5''); 38.4 (C-3); 35.8 (C-2'); 28.9, 26.1, 22.3 (C-3', C-2'', C-3'', C-4''); 22.2 (NHCOCH₃); 4x 20.8 (4x OCOCH₃); 16.4 (β -Ala).

6.6.1.16 Darstellung von 28

Nach **AAV5** wurden 1.90 mg (2.70 μmol , 1 \AA q) **6** mit 15.7 mg (12.1 μmol , 4.5 \AA q, $c = 4 \text{ mM}$) **22**, 9.4 mg (25 μmol , 9 \AA q) HATU und 4.8 μL (27 μmol , 10 \AA q) DIPEA in 3 mL DMF zu 5.0 mg (1.2 μmol) **28** umgesetzt. Dies entspricht einer Ausbeute von 45% bezogen auf **6**.

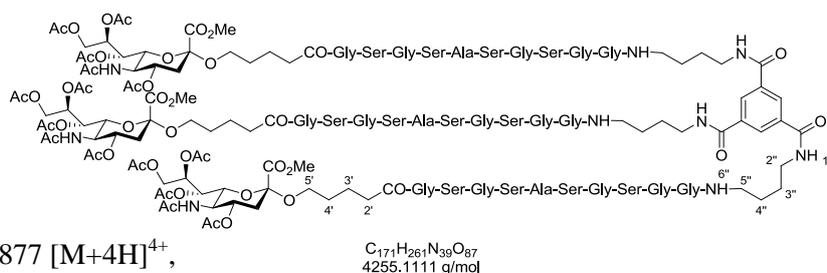
Charakterisierung:

Farbloser Feststoff

R_f : 19.3 min (LC3)

HR-ESI-MS: $m/z = \text{ber.}: 1064.1877 [\text{M}+4\text{H}]^{4+}$,

gef.: 1064.1861 $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$



6.6.1.17 Darstellung von 29

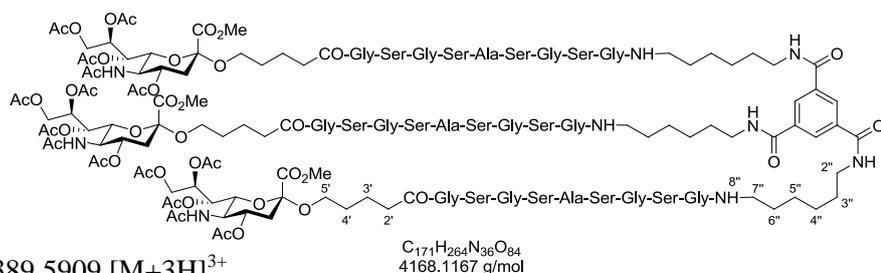
Nach **AAV5** wurden 1.53 mg (1.90 μmol , 1 $\text{\AA}q$) **8** mit 10.6 mg (8.55 μmol , 4.5 $\text{\AA}q$, $c = 5 \text{ mM}$) **21**, 5.4 mg (17 μmol , 9 $\text{\AA}q$) TBTU und 2.8 μL (17 μmol , 9 $\text{\AA}q$) DIPEA in 1.7 mL DMF zu 7.7 mg (1.8 μmol) **29** umgesetzt. Dies entspricht einer Ausbeute von 97% bezogen auf **8**.

Charakterisierung:

Farbloser Feststoff

 R_f : 20.2 min (LC3)

 HR-ESI-MS: $m/z = \text{ber.}: 1389.5909 [M+3H]^{3+}$,

 gef.: 1389.5870 $[M+3H]^{3+}$

 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, pH 3):

System	$\delta \text{ NH}$ [ppm]	$\delta \text{ H}_\alpha$ [ppm]	$\delta \text{ H}_\beta$ [ppm]
Gly 1	8.260	4.011	
Ser 2	8.389	4.497	3.910
Gly 3	8.565	4.028	
Ser 4	8.212	4.470	3.888
Ala 5	8.424	4.403	1.428
Ser 6	8.248	4.444	3.889
Gly 7	8.373	4.035	
Ser 8	8.283	4.440	3.905
Gly 9	8.465	3.908	
Neu5Ac-Alkyl	3.766 (H-5'a); 3.407 (H-5'b); 2.358 (H-2'); 1.655 (H-3'); 1.613 (H-4')		
Neuraminsäure	8.104 (NHAc); 5.413 (H-8); 5.374 (H-7); 4.904 (H-4); 4.351 (H-9a); 4.222 (H-6); 4.201 (H-9b); 3.927 (H-5); 3.867 (COOCH₃); 2.703 (H-3eq); 1.941 (H-3ax)		
Acetylgruppen	2.205, 2.168, 2.092, 2.050 (4x OAc), 1.929 (NHAc)		
Anker	8.581 (NH-1''); 8.281 (H-arom); 7.719 (NH-8''); 3.429 (H-2''); 3.214 (H-7''); 1.645 (H-3''); 1.519 (H-6''); 1.385 (H-4''); 1.365 (H-5'')		

$^2J_{\text{H-3ax, H-3eq}} = 13.6 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-3eq, H-4}} = 4.7 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-6, H-7}} = 1.6 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-7, H-8}} = 8.7 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-2'', H-3''}} = 7.9 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-4'', H-5''a}} = 6.5 \text{ Hz}$, $^2J_{\text{H-5''a, H-5''b}} = 9.9 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{NH-1'', H-2''}} = 6.4 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-7'', NH-8''}} = 6.1 \text{ Hz}$.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, pH 3): δ [ppm] = 128.9 (C-H-arom); 71.9 (C-6); 68.6 (C-8); 67.5 (C-7); 65.2 (C-5'); 62.5 (C-9); 61.5 (β -Ser); 56.2 (α -Ser); 53.6 (COOCH_3); 50.4 (α -Ala); 49.1 (C-5); 43.1 (α -Gly); 40.5 (C-2''); 39.5 (C-7''); 37.1 (C-3); 35.2 (C-2'); 28.6, 26.0, 22.0 (C-2', C-3', C-2'', C-3'', C-4'', C-5''); 22.0 (NHCOCH_3); 20.8, 20.8, 20.7, 20.3 (4x OCOCH_3); 16.8 (β -Ala).

6.6.1.18 Darstellung von 30

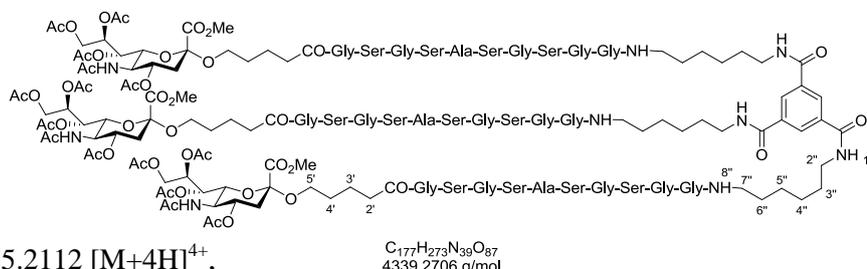
Nach **AAV5** wurden 2.34 mg (2.91 μmol) **8** mit 17.0 mg (13.1 μmol , 4.5 Äq, $c = 5 \text{ mM}$) **22**, 17 mg (52 μmol , 18 Äq) TBTU und 10.2 μL (58.2 μmol , 20 Äq) DIPEA in 2.6 mL DMF zu 7.0 mg (1.6 μmol) **30** umgesetzt. Dies entspricht einer Ausbeute von 55% bezogen auf **8**.

Charakterisierung:

Farbloser Feststoff

R_f : 19.9 min (LC3)

HR-ESI-MS: $m/z = \text{ber.}: 1085.2112 [\text{M}+4\text{H}]^{4+}$,
 gef.: 1085.2082 $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$



$\text{C}_{177}\text{H}_{273}\text{N}_{39}\text{O}_{87}$
 4339.2706 g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, pH 3):

System	δ NH [ppm]	δ H $_{\alpha}$ [ppm]	δ H $_{\beta}$ [ppm]
Gly 1	8.195	3.891	
Ser 2	8.328	4.371	3.737
Gly 3	8.494	3.904	
Ser 4	8.138	4.348	3.768
Ala 5	8.362	4.283	1.315
Ser 6	8.187	4.327	3.770
Gly 7	8.294	3.920	
Ser 8	8.214	4.362	3.788
Gly 9	8.463	3.875	
Gly 10	8.169	3.771	
Neu5Ac-Alkyl	3.656 (H-5'a); 3.279 (H-5'b); 2.246 (H-2'); 1.537 (H-3'); 1.523 (H-4')		
Neuraminsäure	8.045 (NHAc); 5.302 (H-8); 5.269 (H-7); 4.782 (H-4); 4.229 (H-9a); 4.132 (H-6); 4.096 (H-9b); 3.789 (H-5); 3.754 (COOCH_3); 2.595 (H-3eq); 1.819 (H-3ax)		

Acetylgruppen	2.097, 2.055, 1.980, 1.936 (4x OAc), 1.816 (NHAc)
Anker	8.514 (NH-1''); 8.166 (H-arom); 7.716 (NH-8''); 3.312 (H-2''); 3.109 (H-7''); 1.531 (H-3''); 1.408 (H-6''); 1.270 (H-4''); 1.255 (H-5'')

$^2J_{\text{H-3ax}, \text{H-3eq}} = 13.5 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-3eq}, \text{H-4}} = 4.7 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-6}, \text{H-7}} = 1.3 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-7}, \text{H-8}} = 8.8 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-8}, \text{H-9a}} = 2.2 \text{ Hz}$,
 $^3J_{\text{H-9b}, \text{H-9a}} = 12.5 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-2}', \text{H-3}'} = 7.7 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-4}', \text{H-5}'a} = 6.4 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-5}'a, \text{H-5}'b} = 10.0 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{NH-1}'', \text{H-2}''} = 6.1 \text{ Hz}$,
 $^3J_{\text{H-7}'', \text{NH-8}''} = 6.2 \text{ Hz}$.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, pH 3): δ [ppm] = 128.8 (C-H-arom); 68.5 (C-8); 67.4 (C-7); 65.0 (C-5'); 61.4 (β -Ser); 55.9 (α -Ser); 53.8 (COOCH_3); 42.9 (α -Gly); 40.4 (C-2''); 39.3 (C-7''); 36.8 (C-3); 35.1 (C-2'); 28.4 (C-2', C-3', C-2'', C-3'', C-6''); 25.7 (C-4'', C-5''); 22.1 (NHCOCH_3); 20.8, 20.4 (OCOCH_3); 16.7 (β -Ala).

6.6.1.19 Darstellung von 31

Es wurden 31.3 mg (23.1 μmol , 4.5 Äq) **23** zusammen mit 17.7 mg (46.6 μmol , 9 Äq) HATU in 11.5 mL DMF gelöst, mit 9.0 μl (51 μmol , 10 Äq) DIPEA versetzt und zu 2.6 mg (5.1 μmol , 1 Äq) **12** gegeben. Die Reaktionsmischung wurde zweimal Mikrowellenmethode **MW1** unterworfen. Anschließend wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt, der Rückstand in Wasser aufgenommen, gefriergetrocknet und mittels *RP*-HPLC gereinigt. Es konnten 8.8 mg (2.0 μmol) des Produkts erhalten werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 37% bezogen auf **12**.

Charakterisierung:

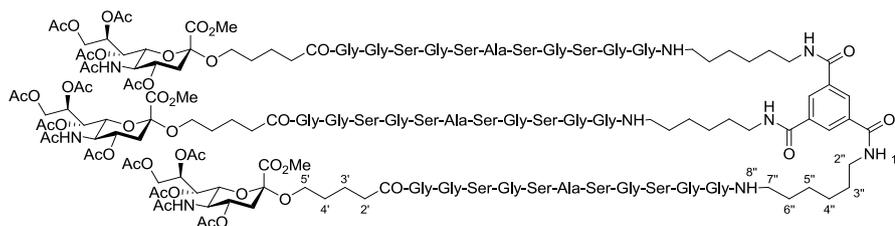
Farbloser Feststoff

R_f : 21.2 min (**LC3**)

HR-ESI-MS: $m/z = \text{ber.}: 1503.6338 [\text{M}+3\text{H}]^{3+}$,

$\text{C}_{183}\text{H}_{282}\text{N}_{42}\text{O}_{90}$
4510.4246 g/mol

gef.: 1503.6435 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz; DMSO- d_6): δ [ppm] =

Peptid	8.246 (Gly ; α : 3.736); 8.211 (Gly ; α : 3.749); 8.186 (Ser ; α : 4.321; β : 3.557); 8.081 (Gly ; α : 3.705); 8.075 (Gly ; α : 3.788); 8.066-8.008 (3x Ser ; α : 4.304- 4.232; β : 3.644-3.541); 8.019 (Gly ; α : 3.661); 8.058 (Gly ; α : 3.791); 7.935 (Ala ; α : 4.320; β : 1.251)
Neu5Ac-Alkyl	3.636 (H-5' a); 3.168 (H-5' b); 2.134 (H-2'); 1.480 (H-3'); 1.412 (H-4')
Neuraminsäure	7.924 (NHAc); 5.252 (H-8); 5.159 (H-7); 4.667 (H-4); 4.201 (H-9a); 4.029 (H-6); 3.993 (H-9b); 3.846 (H-5); 3.766 (COOCH₃); 2.527 (H-3eq); 1.702 (H-3ax)
Acetylgruppen	2.072, 2.011, 1.969, 1.916 (4x OAc); 1.666 (NHAc)
Anker	8.661 (NH-1''); 8.345 (H-Ar); 7.711 (NH-8''); 3.270 (H-2''); 3.051 (H-7''); 1.520 (H-3''); 1.398 (H-6''); 1.298 (H-4''); 1.298 (H-5'')

$^2J_{\text{H-3ax, H-3eq}} = 12.5$ Hz; $^3J_{\text{H-3eq, H-4}} = 4.5$ Hz; $^3J_{\text{H-6, H-7}} = 2.3$ Hz; $^3J_{\text{H-7, H-8}} = 8.7$ Hz; $^3J_{\text{H-8, H-9a}} = 5.9$ Hz;
 $^3J_{\text{H-8, H-9b}} = 3.0$ Hz; $^2J_{\text{H-9a, H-9b}} = 12.3$ Hz; $^3J_{\text{H-2', H-3'}}$ = 7.0 Hz, $^3J_{\text{NH-1'', H-2''}}$ = 5.2 Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 127.7 (**C-Ar**); 71.3 (**C-6**); 68.7 (**C-4**); 67.6 (**C-8**); 66.8
 (**C-7**); 63.4 (**C-5'**); 61.9 (**C-9**); 61.4 (β -**Ser**); 55.1(α -**Ser**); 52.5 (**COOCH₃**); 48.2 (α -**Ala**); 47.7 (**C-5**);
 41.9 (α -**Gly**); 39.0 (**C-2''**); 38.2 (**C-7''**); 37.4 (**C-3**); 34.4 (**C-2'**); 28.7 (**C-6''**); 28.5 (**C-3''**); 28.4 (**C-4'**);
 25.9 (**C-4''**); 25.9 (**C-5''**); 22.3 (**NHCOCH₃**); 21.5 (**C-3'**); 20.6, 20.5, 20.3, 20.3 (4 x **OCOCH₃**); 17.5
 (β -**Ala**).

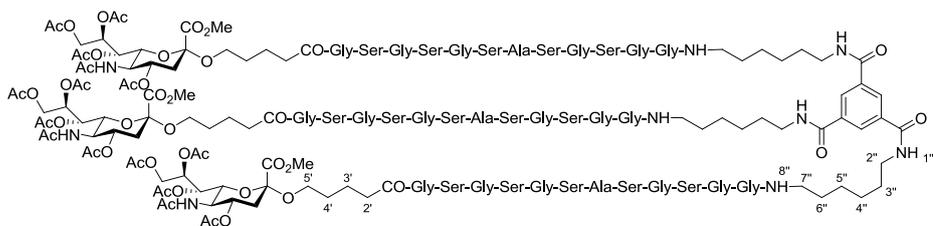
6.6.1.20 Darstellung von 32

Es wurden 21.4 mg (14.8 μmol , 4.5 \AA q) **24** zusammen mit 11.3 mg (29.7 μmol , 9 \AA q) HATU in
 7.5 mL DMF gelöst, mit 5.8 μl (33 μmol , 10 \AA q) DIPEA versetzt und zu 1.6 mg (3.3 μmol , 1 \AA q) **12**
 gegeben. Die Reaktionsmischung wurde zweimal Mikrowellenmethode **MW1** unterworfen.
 Anschließend wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt, der Rückstand in Wasser aufgenommen,
 gefriergetrocknet und mittels *RP*-HPLC gereinigt. Es konnten 4.5 mg (0.94 μmol) des Produkts
 erhalten werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 28% bezogen auf **12**.

Charakterisierung:

Farbloser Feststoff

R_f: 20.7 min (LC3)



HR-ESI-MS: m/z = ber.: 1590.6659 [M+3H]³⁺,

C₁₉₂H₂₉₇N₄₅O₉₆
4771.6565 g/mol

gef.: 1590.6751 [M+3H]³⁺

¹H-NMR (500 MHz, H₂O/D₂O 9:1, pH 3): δ [ppm] =

Peptid	8.519 (Gly ; α: 3.992); 8.489 (Gly ; α: 3.968); 8.478 (Gly ; α: 3.973); 8.394 (Ala ; α: 4.355; β: 1.379); 8.355 (Ser ; α: 4.453; β: 3.865); 8.330 (Gly ; α: 3.994); 8.249 (Ser ; α: 4.380; β: 3.860); 8.247 (Ser ; α: 4.436; β: 3.859); 8.225 (Ser ; α: 4.397; β: 3.843); 8.220 (Gly ; α: 3.966); 8.191 (Gly ; α: 3.842); 8.166 (Ser ; α: 4.424; β: 3.835)
Neu5Ac-Alkyl	3.721 (H-5'a); 3.369 (H-5'b); 2.319 (H-2'); 1.603 (H-3'); 1.566 (H-4')
Neuraminsäure	8.064 (NHAc); 5.364 (H-8); 5.336 (H-7); 4.833 (H-4); 4.297 (H-9a); 4.197 (H-6); 4.182 (H-9b); 3.880 (H-5); 3.825 (COOCH₃); 2.667 (H-3eq); 1.898 (H-3ax)
Acetylgruppen	2.163, 2.125 2.049, 2.007 (4x OAc); 1.886 (NHAc)
Anker	8.541 (NH-1''), 8.232 (3H, H-Ar), 7.748 (NH-8''), 3.380 (H-2''), 3.173 (H-7''), 1.597 (H-3''), 1.474 (H-6''); 1.322 (H-4''); 1.322 (H-5'')

²J_{H-3ax, H-3eq} = 13.8 Hz; ³J_{H-3eq, H-4} = 4.7 Hz; ³J_{H-8, H-9a} = 2.9 Hz; ²J_{H-9a, H-9b} = 12.5 Hz; ³J_{H-2'', H-3''} = 7.5 Hz; ³J_{H-4'', H-5a''} = 7.0 Hz; ²J_{H-5a'', H-5b''} = 9.8 Hz; ³J_{NH-1'', H-2''} = 6.9 Hz; ³J_{H-2'', H3''} = 6.8 Hz; ³J_{NH-8'', H-7''} = 7.4 Hz.

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 128.8 (**C-Ar**); 72.2 (**C-6**); 69.4 (**C-4**); 68.3 (**C-8**); 67.5 (**C-7**); 64.2 (**C-5'**); 62.4 (**C-9**); 62.1 (β-Ser); 55.7 (α-Ser); 53.2 (**COOCH₃**); 48.9 (α-Ala); 48.2 (**C-5**); 42.6 (α-Gly); 39.8 (**C-2''**); 38.9 (**C-7''**); 38.3 (**C-3**); 35.2 (**C-2'**); 29.8 (**C-3''**); 29.6 (**C-6''**); 29.3 (**C-4'**); 23.2 (**NHCOCH₃**); 21.4, 21.2, 21.1, 21.1 (4 x **OCOCH₃**); 26.6 (**C-4''**); 26.6 (**C-5''**); 22.4 (**C-3'**); 18.4 (β-Ala).

6.6.1.21 Darstellung von 33

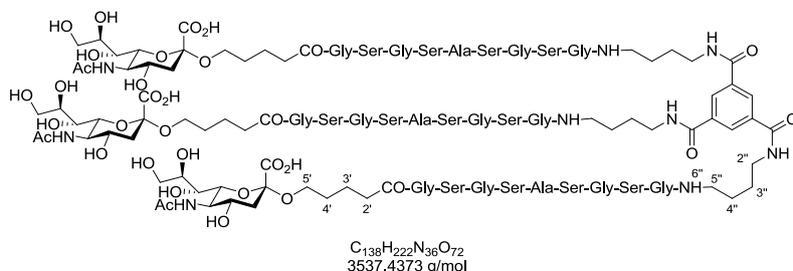
Nach **AAV6** wurden 19 mg (4.7 μmol) **27** zu 5.5 mg (1.5 μmol) **33** umgesetzt. Dies entspricht einer Ausbeute von 33% bezogen auf **27**.

Charakterisierung:

Farbloser Feststoff

R_f : 7.7 min (LC2)

Reinheit: 60% (254 nm)



HR-ESI-MS: m/z = ber.: 1768.7486 [M+2H]²⁺, gef.: 1768.7456 [M+2H]²⁺

¹H-NMR (500 MHz, H₂O/D₂O 9:1, pH 3):

System	δ NH [ppm]	δ H _{α} [ppm]	δ H _{β} [ppm]
Gly 1	8.289	3.954	
Ser 2	8.369	4.447	3.866
Gly 3	8.527	3.976	
Ser 4	8.185	4.418	3.832
Ala 5	8.404	4.350	1.380
Ser 6	8.232	4.386	3.838
Gly 7	8.342	3.966	
Ser 8	8.262	4.379	3.844
Gly 9	8.458	3.871	
Neu5Ac-Alkyl	3.667 (H-5'a); 3.373 (H-5'b); 2.268 (H-2'); 1.567 (H-3'); 1.498 (H-4')		
Neuraminsäure	8.037 (NHAc); 3.784 (H-9a); 3.774 (H-8); 3.734 (H-5); 3.614 (H-6); 3.590 (H-4); 3.555 (H-9b); 3.502 (H-7); 2.691 (H-3eq); 1.952 (NHAc); 1.572 (H-3ax)		
Anker	8.594 (NH-1''); 8.238 (H-arom); 7.758 (NH-6''); 3.355 (H-2''); 3.180 (H-5''); 1.537 (H-4''); 1.529 (H-3'')		

²J_{H-3ax, H-3eq} = 13.4 Hz, ³J_{H-3eq, H-4} = 5.0 Hz, ³J_{H-2', H-3'} = 8.0 Hz, ³J_{NH-1'', H-2''} = 5.9 Hz, ³J_{H-5'', NH-6''} = 5.8 Hz.

¹³C-NMR (125 MHz, H₂O/D₂O 9:1, pH 3): δ [ppm] = 128.9 (C-H-arom); 72.8 (C-6); 72.0 (C-8); 68.5 (C-4); 68.4 (C-7); 64.2 (C-5'); 63.0 (C-9); 61.3 (β -Ser); 56.1 (α -Ser); 56.0 (α -Ser 6); 52.2 (C-5); 50.2 (α -Ala); 43.0 (α -Gly 9); 42.9, 41.2 (α -Gly); 40.5 (C-3); 40.1 (C-2''); 39.3 (C-5''); 35.2 (C-2'); 28.6 (C-4'); 26.1 (C-3''); 25.9 (C-4''); 22.5 (NHCOCH₃); 22.2 (C-3'); 16.7(β -Ala).

6.6.1.22 Darstellung von 34

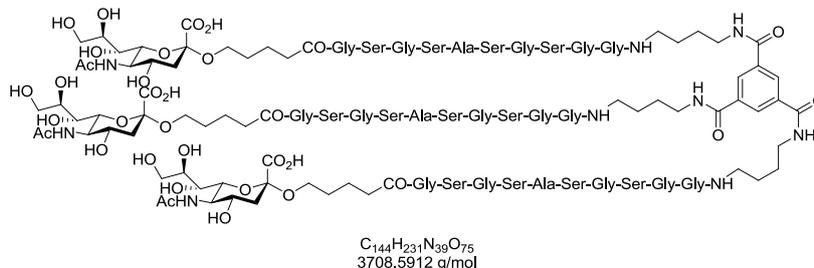
Nach **AAV6** wurden 4.9 mg (1.2 μmol) **28** zu 1.5 mg (0.40 μmol) **34** umgesetzt. Dies entspricht einer Ausbeute von 35% bezogen auf **28**.

Charakterisierung:

Farbloser Feststoff

R_f : 7.5 min (**LC2**)

Reinheit: 94% (254 nm)



HR-ESI-MS: m/z = ber.: 1854.2808 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, gef.: 1854.2986 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, pH 3):

System	δ NH [ppm]	δ H $_{\alpha}$ [ppm]	δ H $_{\beta}$ [ppm]
Gly 1	8.279	3.911	
Ser 2	8.357	4.398	3.818
Gly 3	8.507	3.926	
Ser 4	8.164	4.371	3.784
Ala 5	8.394	4.306	1.336
Ser 6	8.226	4.349	3.806
Gly 7	8.322	3.935	
Ser 8	8.240	4.360	3.796
Gly 9	8.493	3.899	
Gly 10	8.200	3.814	
Neu5Ac-Alkyl	3.675 (H-5'a); 3.394 (H-5'b); 2.264 (H-2'); 1.573 (H-3'); 1.504 (H-4')		
Neuraminsäure	8.022 (NHAc); 3.793 (H-9a); 3.789 (H-8); 3.737 (H-5); 3.628 (H-6); 3.616 (H-4); 3.562 (H-9b); 3.507 (H-7); 2.640 (H-3eq); 1.955 (NHAc); 1.580 (H-3ax)		
Anker	8.579 (NH-1''); 8.188 (H-arom); 7.816 (NH-8''); 3.358 (H-2''); 3.188 (H-5''); 1.548 (H-4''); 1.538 (H-3'')		

$^3J_{\text{H-3ax, H-3eq}} = 13.4$ Hz, $^3J_{\text{H-3eq, H-4}} = 4.8$ Hz, $^3J_{\text{H-2'}, \text{H-3'}} = 8.0$ Hz, $^3J_{\text{NH-1''}, \text{H-2''}} = 5.8$ Hz, $^3J_{\text{H-5''}, \text{NH-6''}} = 6.1$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, pH 3): δ [ppm] = 128.9 (C-H-arom); 72.8 (C-6); 71.8 (C-8); 68.6 (C-4); 68.5 (C-7); 64.4 (C-5'); 62.9 (C-9); 61.3 (β -Ser); 56.0 (α -Ser); 52.1 (C-5); 50.2 (α -Ala); 42.9 (α -Gly); 40.8 (C-3); 40.1 (C-2''); 39.3 (C-5''); 35.2 (C-2'); 28.5 (C-4'); 26.1 (C-3''); 25.9 (C-4''); 22.5 (NHCOCH_3); 22.0 (C-3'); 16.7(β -Ala).

6.6.1.23 Darstellung von 35

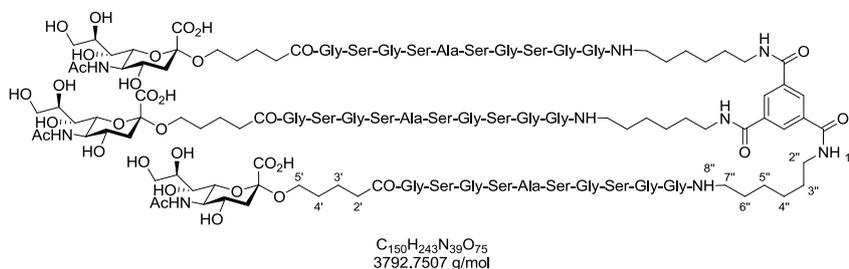
Nach **AAV6** wurden 10 mg (2.3 μmol) **30** zu 3.7 mg (1.0 μmol) **35** umgesetzt. Dies entspricht einer Ausbeute von 42% bezogen auf **30**.

Charakterisierung:

Farbloser Feststoff

R_f : 11.2 min (LC2)

Reinheit: 82% (254 nm)



HR-ESI-MS: m/z = ber.: 1896.3278 [$\text{M}+2\text{H}$] $^{2+}$, gef.: 1896.3421 [$\text{M}+2\text{H}$] $^{2+}$

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, pH 3):

System	δ NH [ppm]	δ H $_{\alpha}$ [ppm]	δ H $_{\beta}$ [ppm]
Gly 1	8.290	3.951	
Ser 2	8.366	4.440	3.862
Gly 3	8.525	3.970	
Ser 4	8.185	4.417	3.832
Ala 5	8.408	4.352	1.384
Ser 6	8.244	4.393	3.842
Gly 7	8.347	3.989	
Ser 8	8.263	4.428	3.846
Gly 9	8.508	3.942	
Gly 10	8.223	3.842	
Neu5Ac-Alkyl	3.722 (H-5'a); 3.442 (H-5'b); 2.310 (H-2'); 1.623 (H-3'); 1.569 (H-4')		
Neuraminsäure	8.036 (NHAc); 3.842 (H-9a); 3.830 (H-8); 3.783 (H-5); 3.695 (H-6); 3.657 (H-4); 3.612 (H-9b); 3.552 (H-7); 2.690 (H-3eq); 2.003 (NHAc); 1.632 (H-3ax)		
Anker	8.570 (NH-1''); 8.217 (H-arom); 7.766 (NH-8''); 3.389 (H-2''); 3.182 (H-7'');		

1.595 (**H-3''**); 1.478 (**H-6''**); 1.335 (**H-4''**); 1.320 (**H-5''**)

$^3J_{\text{H-3ax, H-3eq}} = 13.2 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-3eq, H-4}} = 4.7 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-2', H-3'}} = 8.2 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-4', H-5'a}} = 6.7 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-4, H-5'b}} = 7.0 \text{ Hz}$,
 $^3J_{\text{H-5'a, H-5'b}} = 10.0 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{NH-1'', H-2''}} = 6.0 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-7'', NH-8''}} = 5.8 \text{ Hz}$.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, pH 3): δ [ppm] = 128.7 (**C-H-arom**); 72.9 (**C-6**); 71.0 (**C-8**); 68.7 (**C-4**); 68.1 (**C-7**); 64.0 (**C-5'**); 62.9 (**C-9**); 61.2 (β -Ser); 55.6 (α -Ser); 52.3 (**C-5**); 49.8 (α -Ala); 42.8 (α -Gly); 42.4 (α -Gly 10); 40.1 (**C-3**); 40.0 (**C-2''**); 38.7 (**C-7''**); 35.0 (**C-2'**); 32.3 (**C-4'**); 28.1 (**C-6''**); 27.9 (**C-3''**); 25.6 (**C-5''**); 25.5 (**C-4''**); 22.3 (NHCOCH_3); 21.5 (**C-3'**); 16.5 (β -Ala).

6.6.1.24 Darstellung von 36

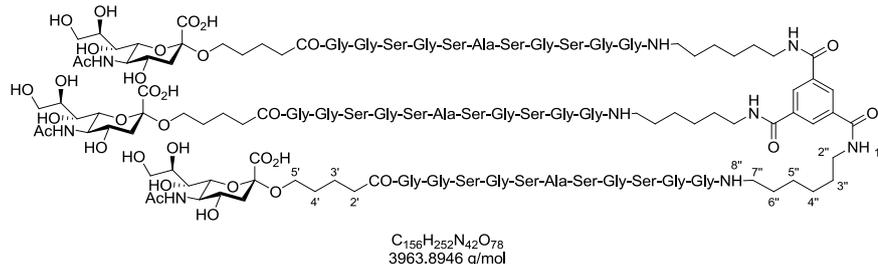
Nach **AAV6** wurden 16 mg (3.5 μmol) **31** zu 3.8 mg (0.96 μmol) **36** umgesetzt. Dies entspricht einer Ausbeute von 27% über zwei Stufen bezogen auf **31**.

Charakterisierung:

Farbloser Feststoff

R_f : 15.7 min (**LC8**)

Reinheit: 93% (254 nm)



HR-ESI-MS: $m/z = \text{ber.}: 1981.8572 [\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, gef.: 1981.8570 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, pH 3): δ [ppm] =

Peptid	8.508 (Gly ; α : 3.946); 8.508 (Gly ; α : 3.946); 8.407 (Ala ; α : 4.354; β : 1.384); 8.356 (Ser ; α : 3.989; β : 3.860); 8.347 (Gly ; α : 3.989); 8.312 (Gly ; α : 3.917); 8.263 (Ser ; α : 4.421; β : 3.816); 8.244 (Ser ; α : 4.397; β : 3.839); 8.221 (Gly ; α : 3.837); 8.209 (Gly ; α : 3.841); 8.179 (Ser ; α : 4.415; β : 3.813)
Neu5Ac-Alkyl	3.733 (H-5'a); 3.446 (H-5'b); 2.314 (H-2'); 1.603 (H-3'); 1.552 (H-4')
Neuraminsäure	8.032 (NHAc); 3.836 (H-9a); 3.832 (H-8); 3.792 (H-5); 3.701 (H-6); 3.666 (H-7); 3.617 (H-9b); 3.551 (H-4); 2.687 (H-3eq); 2.005 (NHCOCH_3); 1.650 (H-3ax)
Anker	8.566 (NH-1''); 8.217 (3H, H-Ar); 7.764 (NH-8''); 3.383 (H-2''); 3.178 (H-7''); 1.583 (H-3''); 1.476 (H-6''); 1.335 (H-4''); 1.319 (H-5'')

$^2J_{\text{H-3ax, H-3eq}} = 12.3 \text{ Hz}$; $^3J_{\text{H-3eq, H-4}} = 4.7 \text{ Hz}$; $^3J_{\text{H-2}', \text{H-3}' } = 7.7 \text{ Hz}$; $^3J_{\text{NH-1}'', \text{H-2}''} = 6.9 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-2}'', \text{H3}''} = 6.9 \text{ Hz}$;
 $^3J_{\text{NH-8}'', \text{H-7}''} = 7.4 \text{ Hz}$.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1 pH 3): δ [ppm] = 128.7 (C-Ar); 72.8 (C-6); 71.8 (C-8); 68.5 (C-4); 68.3 (C-7); 64.4 (C-5'); 63.1 (C-9); 61.2 (β -Ser); 55.9 (α -Ser); 52.0 (C-5); 50.1 (α -Ala); 42.8 (α -Gly); 40.2 (C-3); 40.2 (C-2''); 39.3 (C-7''); 35.1 (C-2'); 28.3 (C-4'); 28.3 (C-3''); 28.2 (C-6''); 25.8 (C-4''); 25.8 (C-5''); 22.3 (NHCOCH₃); 21.9 (C-3'); 16.5 (β -Ala).

6.6.1.25 Darstellung von 37

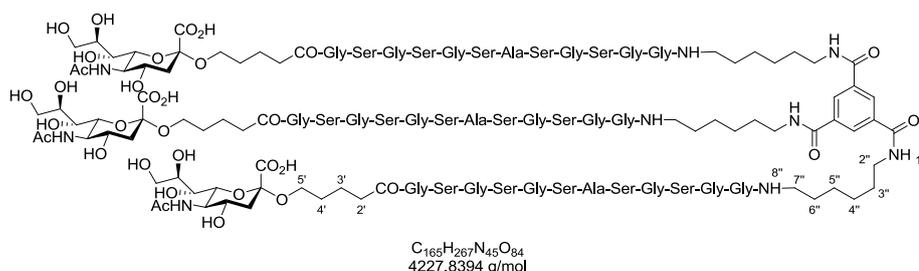
Nach **AAV6** wurden 12.4 mg (2.59 μmol) **32** zu 4.6 mg (1.1 μmol) **37** umgesetzt. Dies entspricht einer Ausbeute von 42% über zwei Stufen bezogen auf **32**.

Charakterisierung:

Farbloser Feststoff

R_f : 15.3 min (LC8)

Reinheit: 96% (254 nm)



HR-ESI-MS: $m/z = \text{ber.}: 2112.4080 [\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, gef.: 2112.4097 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1 pH 3): δ [ppm] =

Peptid	8.508 (Gly; α : 3.946); 8.508 (Gly; α : 3.946); 8.407 (Ala; α : 4.354; β : 1.384); 8.356 (Ser; α : 3.989; β : 3.860); 8.347 (Gly; α : 3.989); 8.312 (Gly; α : 3.917); 8.263 (Ser; α : 4.421; β : 3.816); 8.244 (Ser; α : 4.397; β : 3.839); 8.221 (Gly; α : 3.837); 8.209 (Gly; α : 3.841); 8.179 (Ser; α : 4.415; β : 3.813)
Neu5Ac-Alkyl	3.733 (H-5'a); 3.446 (H-5'b); 2.314 (H-2'); 1.603 (H-3'); 1.552 (H-4')
Neuraminsäure	8.032 (NHAc); 3.836 (H-9a); 3.832 (H-8); 3.792 (H-5); 3.701 (H-6); 3.666 (H-7); 3.617 (H-9b); 3.551 (H-4); 2.687 (H-3eq); 2.005 (NHCOCH ₃); 1.650 (H-3ax)
Anker	8.566 (NH-1''); 8.217 (3H, H-Ar); 7.764 (NH-8''); 3.383 (H-2''); 3.178 (H-7''); 1.583 (H-3''); 1.476 (H-6''); 1.335 (H-4''); 1.319 (H-5'')

$^2J_{\text{H-3ax, H-3eq}} = 12.3 \text{ Hz}$; $^3J_{\text{H-3eq, H-4}} = 4.7 \text{ Hz}$; $^3J_{\text{H-2}', \text{H-3}' } = 7.7 \text{ Hz}$; $^3J_{\text{NH-1}'', \text{H-2}''} = 6.9 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-2}'', \text{H3}''} = 6.9 \text{ Hz}$;
 $^3J_{\text{NH-8}'', \text{H-7}''} = 7.4 \text{ Hz}$.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1 pH 3): δ [ppm] = 128.7 (C-Ar); 72.8 (C-6); 71.8 (C-8); 68.5 (C-4); 68.3 (C-7); 64.4 (C-5'); 63.1 (C-9); 61.2 (β -Ser); 55.9 (α -Ser); 52.0 (C-5); 50.1 (α -Ala); 42.8 (α -Gly); 40.2 (C-3); 40.2 (C-2''); 39.3 (C-7''); 35.1 (C-2'); 28.3 (C-4'); 28.3 (C-3''); 28.2 (C-6''); 25.8 (C-4''); 25.8 (C-5''); 22.3 (NHCOCH_3); 21.9 (C-3'); 16.5 (β -Ala).

6.6.1.26 Darstellung von 38

Nach **AAV6** wurden 13.0 mg (10.5 μmol) **29** zu 6.5 mg (6.1 μmol) **38** umgesetzt. Dies entspricht einer Ausbeute von 59% über zwei Stufen bezogen auf **29**.

Charakterisierung:

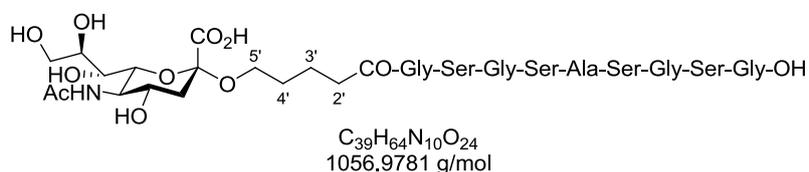
Farbloser Feststoff

R_f : 3.8 min (LC2)

Reinheit: 98% (HPLC, 215 nm)

HR-ESI-MS: m/z = ber.: 1055.4017 [M-H] $^-$, gef.: 1055.4021 [M-H] $^-$

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1 pH 3):



System	δ NH [ppm]	δ H_α [ppm]	δ H_β [ppm]
Gly 1	8.277	3.937	
Ser 2	8.355	4.431	3.904
Gly 3	8.517	3.974	
Ser 4	8.178	4.425	3.827
Ala 5	8.400	4.362	1.395
Ser 6	8.209	4.473	3.843
Gly 7	8.348	3.977	
Ser 8	8.249	4.411	3.841
Gly 9	8.348	3.967	
Neu5Ac-Alkyl	3.730 (H-5'a); 3.460 (H-5'b); 2.317 (H-2'); 1.621 (H-3'); 1.563 (H-4')		
Neuraminsäure	8.014 (NHAc); 3.831 (H-8); 3.833 (H-9a); 3.782 (H-5); 3.695 (H-6); 3.664 (H-4); 3.608 (H-9b); 3.547 (H-7); 2.694 (H-3eq); 1.658 (H-3ax)		

$^2J_{\text{H-3ax}, \text{H-3eq}} = 12.6$ Hz, $^3J_{\text{H-3ax}, \text{H-4}} = 12.4$ Hz, $^3J_{\text{H-3eq}, \text{H-4}} = 4.4$ Hz, $^3J_{\text{H-2'}, \text{H-3'}} = 6.8$ Hz, $^3J_{\text{H-4'}, \text{H-5'b}} = 6.4$ Hz, $^2J_{\text{H-5'a}, \text{H-5'b}} = 9.3$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, D_2O): δ [ppm] = 100.2 (C-2); 72.3 (C-6); 71.6 (C-8); 68.2 (C-7); 68.0 (C-4); 64.2 (C-5'); 62.7 (C-9); 61.2, 61.1, 61.0 (β -Ser's); 55.8, 55.7, 55.6 (α -Ser's); 55.4 (α -Ser 6); 52.0 (C-5); 50.0 (α -Ala); 42.6, 42.5, 41.3 (α -Gly's); 40.1 (C-3); 35.0 (C-2'); 28.3 (C-4'); 22.0 (NHCOCH_3); 21.7 (C-3'); 16.3 (β -Ala).

6.6.1.27 Darstellung von Methyl [*n*-pent-5-ylsäureamid (5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galacto-2-nonulopyranosid)]onat (**40a**)

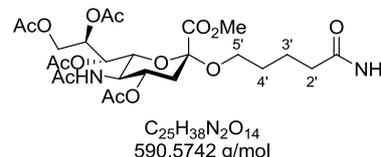
110 mg (100 μmol) eines Fmoc-Rink-Amid-AM-Polystyren Harzes wurden zweimal mit Pip/DMF 20% *v/v* für je 30 min entschützt. Anschließend wurde das Harz mit DMF gespült, bevor eine Lösung aus 59.1 mg (0.100 mmol, 1 Äq, $c = 50 \text{ mM}$) **19**, 152 mg (400 μmol , 4 Äq) HATU und 87 μL (64 mg, 0.50 mmol, 5 Äq) DIPEA in 2 mL DMF hinzugegeben wurde. Der Ansatz wurde 14 h bei Raumtemperatur geschwenkt, der Überstand saugfiltriert und das Harz mit DMF und DCM gespült. Die Abspaltung vom Harz erfolgte zweifach mit einer Lösung von TFA/TIPS/ H_2O 95:5:2 für je eine Stunde. Die Reinigung erfolgte an Kieselgel mit Aceton/Toluol 2:1 als Lösungsmittel. Es konnten 17 mg (29 μmol) des Produkts erhalten werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 29% bezogen auf die eingesetzte Menge Harz.

Charakterisierung:

Farbloser Schaum

R_f : 0.15 (Aceton/Toluol 2:1)

HR-ESI-MS: $m/z = \text{ber.}: 613.2221 [\text{M}+\text{Na}]^+$, gef.: 613.2222 $[\text{M}+\text{Na}]^+$



6.6.1.28 Darstellung von *n*-Pent-5-ylsäureamid (5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galacto-2-nonulopyranosid)onat (**40**)

Die Darstellung von **40** erfolgte nach **AAV6**. Davon abweichend wurde der Methylester unter Verwendung einer 0.01 M wässrigen NaOH während 90 min hydrolysiert und mit einer 0.1 M HCl neutralisiert. Eingesetzt wurden 17 mg (29 μmol) **40a**. Die Reinigung erfolgte durch Größenausschlusschromatographie an Biogel P2. Es konnten 3.2 mg (7.8 μmol) des Produkts erhalten werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 27% bezogen auf **40a**.

Charakterisierung:

Farbloser Feststoff

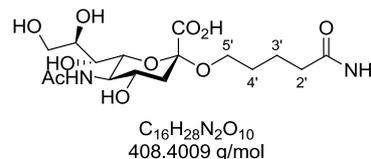
Reinheit: 98% (HPLC, 215 nm)

HR-ESI-MS: m/z = ber.: 407.1666 [M-H]⁻, gef.: 407.1658 [M-H]⁻

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ [ppm] = 3.86-3.78 (m, 2H, **H-8**, **H-9a**); 3.78-3.73 (m, 1H, **H-5**); 3.73-3.61 (m, 3H, **H-5'a**, **H-6**, **H-4**); 3.61-3.55 (m, 1H, **H-9b**); 3.55-3.49 (m, 1H, **H-7**); 3.43 (dt, 1H, **H-5'b**); 2.67 (dd, 1H, **H-3eq**); 2.23 (t, 2H, **H-2'**); 1.98 (s, 3H, NHAc); 1.63 (dd, 1H, **H-3ax**); 1.60-1.48 (m, 4H, **H-3'**, **H-4'**).

² $J_{\text{H-3ax, H-3eq}}$ = 12.5 Hz, ³ $J_{\text{H-3ax, H-4}}$ = 12.4 Hz, ³ $J_{\text{H-3eq, H-4}}$ = 4.5 Hz, ³ $J_{\text{H-2', H-3'}}$ = 7.3 Hz, ³ $J_{\text{H-4', H-5'b}}$ = 6.3 Hz, ² $J_{\text{H-5'a, H-5'b}}$ = 9.4 Hz.

¹³C-NMR (101 MHz, D₂O): δ [ppm] = 72.7 (**C-6**); 71.5 (**C-8**); 68.2 (**C-7**); 68.0 (**C-4**); 64.3 (**C-5'**); 62.7 (**C-9**); 51.9 (**C-5**); 40.1 (**C-3**); 34.6 (**C-2'**); 28.3 (**C-4'**); 22.0 (NHCOCH₃); 21.7 (**C-3'**).



6.6.1.29 Darstellung des Peptids H-G-S-G-S-A-S-G-S-G-NH₂ (41)

Die Darstellung von **41** erfolgte nach **AAV3** in einem 250 μ mol Ansatz. Abweichend von **AAV3** wurde ein Fmoc-Rink-Amid-AM-Polystyren-Harz verwendet, die Abspaltung der letzten Fmoc Schutzgruppe automatisiert durchgeführt und das Peptid mit TFA/TIPS/H₂O 95:5:2 vom Harz gespalten. Die Reinigung erfolgte mittels *RP*-HPLC an einer C₁₈ Säule von Macherey&Nagel (Nucleodur Pyramid, 250x21 mm, 5 μ m, 300 Å). Zur Elution dienten hier die Laufmittelgemische **A** (H₂O/FA 100:0.1) und **B** (MeCN/FA 100:0.1). Es konnten 36.4 mg (54.8 μ mol) des Produkts erhalten werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 22% bezogen auf die eingesetzte Menge Harz.

Charakterisierung:

Farbloser Feststoff

R_f: 2.9 min (**LC4**)

Reinheit: 98% (HPLC, 215 nm)

HR-ESI-MS: m/z = ber.: 665.2854 [M+H]⁺, gef.: 665.2855 [M+H]⁺

H-Gly-Ser-Gly-Ser-Ala-Ser-Gly-Ser-Gly-NH₂

C₂₃H₄₀N₁₀O₁₃
664.6229

¹H-NMR (500 MHz, H₂O/D₂O 9:1 pH 3):

System	δ NH [ppm]	δ H _α [ppm]	δ H _β [ppm]
Gly 1		3.882	
Ser 2	8.731	4.519	3.879
Gly 3	8.603	4.004	
Ser 4	8.255	4.448	3.854
Ala 5	8.466	4.379	1.403
Ser 6	8.288	4.428	3.868
Gly 7	8.391	4.012	
Ser 8	8.306	4.447	3.876
Gly 9	8.495	3.915	

6.6.1.30 Darstellung von *N*-α-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-*N*-ε-[methyl (5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-D-glycero-α-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat-*n*-5-oxy-pentanoyl]-L-lysin

150 mg (250 μmol, 1 Äq) **19** wurden zusammen mit 95.0 mg (250 μmol, 1 Äq) HATU und 180 μL (0.100 mmol, 4 Äq) DIPEA in 12 mL DMF gelöst und 1 min bei RT gerührt. Hier hinein wurden 172 mg (467 μmol, 1.8 Äq) **42** in 13 mL DMF gegeben und der Ansatz Mikrowellenprogramm **MW1** zweimal unterworfen. Das Lösungsmittel wurde im destillativ entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt. Anschließend wurde das vorgereinigte Produkt mittels *RP*-HPLC gereinigt. Es konnten 134 mg (142 μmol) des Produkts erhalten werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 57% bezogen auf **19**.

Charakterisierung:

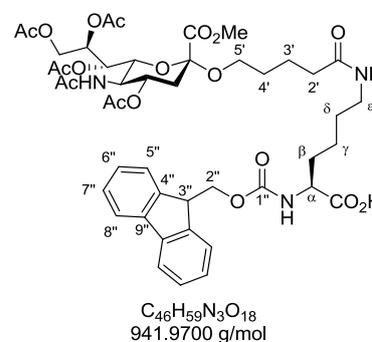
Farbloser Feststoff

R_f: 0.16 (DCM/MeOH/HOAc 4:1:0.005)

R_t: 9.0 min (**LC7**)

Drehwert: $[\alpha]_D^{27} = -6.20^\circ$ (c = 1, MeOH)

HR-ESI-MS: *m/z* = ber.: 942.3872 [M+H]⁺, gef.: 942.3863 [M+H]⁺



¹H-NMR (400 MHz, MeOH-*d*₄): δ [ppm] = 7.83-7.77 (m, 2H, **H-8'**); 7.72-7.65 (m, 2H, **H-5'**); 7.43-7.38 (m, 2H, **H-7'**); 7.35-7.28 (m, 2H, **H-6'**); 5.42-5.39 (m, 1H, **H-8**); 5.32 (dd, 1H, **H-7**); 4.78 (ddd, 1H, **H-4**); 4.38-4.33 (m, 2H, **H-2'**); 4.30 (dd, 1H, **H-9a**); 4.20 (t, 1H, **H-3'**); 4.18-4.11 (m, 2H, **H-α**, **H-6**); 4.05 (dd, 1H, **H-9b**); 3.95 (dd, 1H, **H-5**); 3.79 (s, 3H, -COOCH₃); 3.76 (dt, 1H, **H-5a'**); 3.25 (dt, 1H, **H-5b'**); 3.18 (t, 2H, **H-ε**); 2.61 (dd, 1H, **H-3eq**); 2.18 (t, 2H, **H-2'**); 2.13, 2.09, 1.99, 1.96 (4x s, 4x 3H, 4x OAc); 1.90-1.84 (m, 1H, **H-βa**); 1.83 (s, 3H, NHAc); 1.79 (dd, 1H, **H-3ax**); 1.73-1.59 (m, 3H, **H-βb**, **H-3'**); 1.58-1.48 (m, 4H, **H-δ**, **H-4'**); 1.48-1.39 (m, 2H, **H-γ**).

²J_{H-3ax, H-3eq} = 12.7 Hz, ³J_{H-3ax, H-4} = 12.5 Hz, ³J_{H-3eq, H-4} = 4.6 Hz, ³J_{H-4, H-5} = 10.3 Hz, ³J_{H-5, H-6} = 10.2 Hz, ³J_{H-6, H-7} = 2.2 Hz, ³J_{H-7, H-8} = 8.9 Hz, ³J_{H-8, H-9a} = 2.8 Hz, ³J_{H-8, H-9b} = 2.2 Hz, ²J_{H-9a, H-9b} = 12.4 Hz, ³J_{H-2', H-3'} = 7.4 Hz, ³J_{H-4', H-5'a} = 6.1 Hz, ³J_{H-4', H-5'b} = 6.0 Hz, ²J_{H-5'a, H-5'b} = 9.5 Hz, ³J_{H-δ, H-ε} = 7.6 Hz, ³J_{H-2'', H-3''} = 6.9 Hz.

¹³C-NMR (101 MHz, MeOH-*d*₄): δ [ppm] = 173.5, 172.5, 171.9, 171.8, 171.6 (C=O); 128.8 (C-7'), 128.2 (C-6'); 126.3 (C-5'); 121.0 (C-8'); 100.1 (C-2); 73.1 (C-6); 70.7 (C-4); 69.5 (C-8); 68.7 (C-7); 67.9 (C-2'); 65.5 (C-4'); 63.5 (C-9); 55.2 (C-α); 50.1 (C-5); 48.1 (C-3'); 40.1 (C-ε); 39.1 (C-3); 36.7 (C-2'); 32.4 (C-β); 30.1 (C-4'); 29.9 (C-δ); 24.4 (C-γ); 23.6 (C-3'); 22.7 (NHCOCH₃), 21.2, 20.9, 20.7, 20.7 (OCOCH₃).

6.6.1.31 Darstellung von 44

Die Synthese des Heptapeptids erfolgte nach **AAV3** in einem 250 μmol Ansatz. Die Dibenzofulvenbestimmung ergab eine Ausbeute von 51%. Anschließend wurden 198 mg (210 μmol, 1.5 Äq) **43**, 213 mg (560 μmol, 4 Äq.) HATU und 122 μL (700 μmol, 5 Äq) DIPEA gelöst in 2 mL DMF zu dem Harz gegeben und der Ansatz Mikrowellenstrahlung entsprechend **MW1** dreimal unterworfen. Der Überstand wurde entfernt, das Harz gut gespült und eine Dibenzofulvenbestimmung entsprechend **AAV3** durchgeführt. Diese ergab eine Ausbeute von 43%.

77.2 mg (260 μmol, 4 Äq) *N*-Fmoc-Gly-OH, 83.4 mg (260 μmol, 4 Äq) TBTU und 56.6 μL (325 μmol, 5 Äq) DIPEA wurden in 4 mL DMF gelöst und für 2 h zu dem Harz gegeben. Der Ansatz wurde für 16 h wiederholt und anschließend eine Dibenzofulvenbestimmung gemäß **AAV3** durchgeführt. Es konnte eine quantitative Ausbeute für diesen Schritt ermittelt werden.

77.0 mg (130 μmol, 2 Äq) **19**, 91.0 mg (260 μmol, 4 Äq) HATU und 57.0 μL (325 μmol, 5 Äq) DIPEA wurden in 4 mL DMF gelöst, zu dem Harz gegeben und Mikrowellenprogramm **MW1** dreimal unterworfen. Die Lösung wurde filtriert und das Harz gut gespült. Die Abspaltung vom Harz und die Reinigung erfolgten analog zu **AAV4**, wobei als Abspatlösung ein Gemisch von TFA/DCM/TIPS/H₂O 20:20:1:1 verwendet wurde. Das Produkt musste unter Verwendung verschiedener Gradienten zweimal mittels *RP*-HPLC gereinigt werden. Es konnten 5.0 mg (2.7 μmol)

des gereinigten Produkts erhalten werden. Die entspricht einer Ausbeute von 4% auf den letzten Schritt, beziehungsweise von 1% auf die eingesetzte Harzmenge.

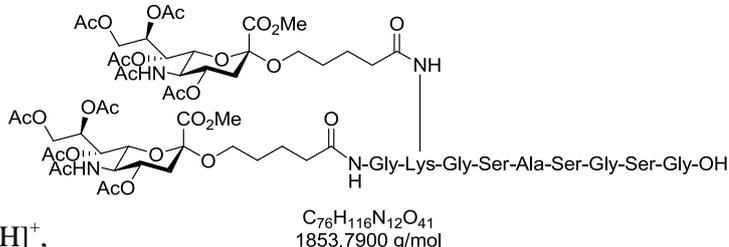
Charakterisierung:

Farbloser Feststoff

R_f: 10.1 min (LC6); 27.0 min (LC9)

HR-ESI-MS: m/z = ber.: 1853.7439 [M+H]⁺,

gef.: 1853.7495 [M+H]⁺



¹H-NMR (500 MHz, H₂O/D₂O 9:1 pH 3):

System	δ NH [ppm]	δ H _α [ppm]	δ H _β [ppm]	weitere
Gly 1	8.325	4.992		
Lys 2	8.277	4.288	1.801/1.700	γ: 1.477/1.350; δ: 1.755; ε: 3.143
Gly 3	8.517	3.947		
Ser 4	8.178	4.485	3.843	
Ala 5	8.415	3.992	1.403	
Ser 6	8.253	4.428	3.872	
Gly 7	8.359	3.928		
Ser 8	8.217	3.858	4.428	
Gly 9	8.325	3.992		
Neu5Ac-Alkyl	3.745 (H -5'a); 3.368 (H -5'b); 2.328/2.233 (Sia a/b H -2'); 1.586/1.563 (Sia a/b H -3'); 1.550 (H -4')			
Neuraminsäure	8.083 (NH Ac); 5.405 (H -8); 5.373 (H -7); 4.869 (H -4); 4.315 (H -9a); 4.206 (H -6); 4.177 (H -9b); 3.875 (H -5); 3.840 (COOCH ₃); 2.668 (H -3eq); 1.901 (H -3ax)			
Acetylgruppen	2.177, 2.134, 2.062, 2.016 (4x OAc), 1.891 (NHAc)			

7 Toxikologische Daten

Substanz	Piktogramm	H-Sätze	P-Sätze
1,4- <i>n</i> -Diaminobutan		302, 312, 314, 331	260, 264, 280, 301+330+331, 310
1,5- <i>n</i> -Diaminopentan		314	260, 264, 280, 301+330+331, 310
1,6- <i>n</i> -Diaminohexan		302, 312, 314, 335	260, 264, 280, 301+330+331, 310
1,7- <i>n</i> -Diaminoheptan		314	260, 264, 280, 301+330+331, 310
5-Hexen-1-ol		226	210, 233, 240, 241, 370+378
Aceton		225, 319, 336, EUH066	210, 233, 305+351+338
Acetonitril		225, 302+312+332, 319	210, 305+351+338, 403+235
Acetylchlorid		EUH014, 225, 314	210, 233, 240, 241, 264
Ameisensäure		226, 314	280, 305+351+338, 310
Boc ₂ O		315, 319, 330, 335	260, 264, 280, 284, 305+351+338
Chloroform, CDCl ₃		302, 315, 351, 373	281
DIC		315, 317, 318, 330, 335	260, 264, 280, 284, 310
Dichlormethan		351	281
1,4-Dioxan		EUH019, EUH066, 225, 319, 335, 351	201, 202, 210, 240, 264
DIPEA		225, 302, 314, 412	210, 233, 240, 241, 242
DMAP		301, 310, 315, 319, 335	261, 262, 264, 280, 304+340
DMF		226, 312, 319, 332, 360D	201, 280, 305+351+338, 310
EDC		315, 318, 335	261, 264, 280, 302+352, 310

Substanz	Piktogramm	H-Sätze	P-Sätze
Essigsäure	 	226, 314	280, 305+351+338, 310
Essigsäureanhydrid	  	226, 302, 314, 332	210, 233, 240, 241, 310
Ethylacetat	 	225, 319, 336	210, 261, 305+351+338
EtOH		225	210
HATU		315, 319, 335	261, 264, 280, 305+351+338, 321, 362
Kaliumcarbonat		302, 315, 319, 335	261, 264, 280, 321, 330
Methanol	  	225, 301, 311, 331, 370	210, 260, 280, 301+310, 311
NaIO ₄		302, 315, 319, 335	261, 264, 280, 305+351+338, 330
Natrium	 	260, 314	223, 231+232, 280, 305+351+338, 370+378
Natriumazid	 	EUH032, 300, 410	264, 273, 301+310, 321, 330
Natriumhydroxid		314	280, 305+351+338, 310
Natriummethanolat	 	EUH014, 251, 314	235+410, 260, 264, 280, 301+330+331
<i>n</i> -Tributylphosphin	  	250, 302, 312, 314	210, 222, 260, 264, 301+312
Piperidin	  	225, 311, 314, 331	210, 261, 280, 305+351+338, 310
Pyridin	 	225, 302, 312, 332	210, 280
RuCl ₃		314	260, 264, 280, 301+330+331, 310
Salzsäure 37%	 	314, 335	261, 280, 305+351+338, 310
Schwefelsäure		314	280, 305+351+338, 310
TBTU		315, 319, 335	261, 264, 280, 305+351+338, 405

Substanz	Piktogramm	H-Sätze	P-Sätze
Tetrachlorkohlenstoff	 	EUH059, 301, 311, 331, 372, 412	201, 202, 260, 264, 330
Toluol	  	225, 304, 315, 336, 361d-373	210, 261, 281, 301+310, 331
Trifluoressigsäure	 	314, 332, 412	273, 280, 305+351+338, 310
Triisopropylsilan	 	226, 315, 319, 335	260, 264, 280, 305+351+338, 310
Triphenylphosphin		302, 317	261, 264, 280, 301+312, 330
Wasserstoff	 	220	210

8 Literaturverzeichnis

1. P. Gagneux, A. Varki, Evolutionary considerations in relating oligosaccharide diversity to biological function, *Glycobiology*, **1999**, 9(8); 747-55.
2. M. Nieuwdorp, M.C. Meuwese, H. Vink, J.B. Hoekstra, J.J. Kastelein, E.S. Stroes, The endothelial glycocalyx: a potential barrier between health and vascular disease, *Curr Opin Lipid*, **2005**, 16(5); 507-11.
3. R.T.A. Megens, S. Reitsma, P.H.M. Schiffers, R.H.P. Hilgers, J.G.R. De Mey, D.W. Slaaf, M.G.A. Egbrink, M.A.M.J. van Zandvoort, Two-Photon Microscopy of Vital Murine Elastic and Muscular Arteries, *J Vasc Res*, **2007**, 44(2); 87-98.
4. E.E. Eboong, F.P. Macaluso, D.C. Spray, J.M. Tarbell, Imaging the Endothelial Glycocalyx In Vitro by Rapid Freezing/Freeze Substitution Transmission Electron Microscopy, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **2011**, 31(8); 1908-15.
5. J.C. Dyason, M. von Itzstein, Chapter 15 - Viral surface glycoproteins in carbohydrate recognition: Structure and modelling, in *Microbial Glycobiology*, **2010**, Academic Press, 269-83.
6. S.B. Sieczkarski, G.R. Whittaker, Viral Entry in *Membrane Trafficking in Viral Replication*, **2005**, Springer, 1-23.
7. A.W. Hampson, J.S. Mackenzie, The influenza viruses, *Med J Aust*, **2006**, 185; 39-43.
8. N.P. Johnson, J. Mueller, Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 "Spanish" influenza pandemic, *Bull Hist Med*, **2002**, 76(1); 105-15.
9. J.S. Oxford, R. Lambkin, A. Elliot, R. Daniels, A. Sefton, D. Gill, Scientific lessons from the first influenza pandemic of the 20th century, *Vaccine*, **2006**, 24(44-46); 6742-46.
10. D.R. Perez, E.M. Sorrell, R.O. Donis, Avian influenza: an omnipresent pandemic threat, *Pediatr Infect Dis J*, **2005**, 24; 208-16.
11. Y. Ha, D.J. Stevens, J.J. Skehel, D.C. Wiley, X-ray structures of H5 avian and H9 swine influenza virus hemagglutinins bound to avian and human receptor analogs, *Proc Natl Acad Sci USA*, **2001**, 98(20); 11181-6.
12. S. Yamada, Y. Suzuki, T. Suzuki, M.Q. Le, C.A. Nidom, Y. Sakai-Tagawa, Y. Muramoto, M. Ito, M. Kiso, T. Horimoto, K. Shinya, T. Sawada, T. Usui, T. Murata, Y. Lin, A. Hay, L.F. Haire, D.J. Stevens, R.J. Russell, S.J. Gamblin, J.J. Skehel, Y. Kawaoaka, Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors, *Nature*, **2006**, 444(7117); 378-82.
13. Y. Ha, D.J. Stevens, J.J. Skehel, D.C. Wiley, H5 avian and H9 swine influenza virus haemagglutinin structures: possible origin of influenza subtypes, *Embo J*, **2002**, 21(5); 865-75.
14. J. Stevens, O. Blixt, T.M. Tumpey, J.K. Taubenberger, J.C. Paulson, I.A. Wilson, Structure and Receptor Specificity of the Hemagglutinin from an H5N1 Influenza Virus, *Science*, **2006**, 312(5772); 404-10.
15. I.A. Wilson, J.J. Skehel, D.C. Wiley, Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution, *Nature*, **1981**, 289(5796); 366-73.
16. M. Ogata, T. Murata, K. Murakami, T. Suzuki, K.I.P.J. Hidari, Y. Suzuki, T. Usui, Chemoenzymatic synthesis of artificial glycopolypeptides containing multivalent sialyloligosaccharides with a γ -polyglutamic acid backbone and their effect on inhibition of infection by influenza viruses, *Bioorg & Med Chem*, **2007**, 15(3); 1383-93.
17. A. Marra, L. Moni, D. Pazzi, A. Corallini, D. Bridi, A. Dondoni, Synthesis of sialoclusters appended to calix[4]arene platforms via multiple azide-alkyne cycloaddition. New inhibitors of hemagglutination and cytopathic effect mediated by BK and influenza A viruses, *Org & Biomol Chem*, **2008**, 6(8); 1396-409.
18. W.I. Weis, Cell-surface carbohydrate recognition by animal and viral lectins, *Curr Opin Struc Biol*, **1997**, 7(5); 624-30.
19. M. Mammen, S.-K. Choi, G.M. Whitesides, Polyvalent Interactions in Biological Systems: Implications for Design and Use of Multivalent Ligands and Inhibitors, *Angew Chem Int Ed*, **1998**, 37(20); 2754-94.
20. P.I. Kitov, D.R. Bundle, On the Nature of the Multivalency Effect: A Thermodynamic Model, *J Am Chem Soc*, **2003**, 125(52); 16271-84.
21. W.P. Jencks, On the attribution and additivity of binding energies, *Proc Natl Acad Sci of USA*, **1981**, 78(7); 4046-50.
22. R.J. Pieters, Maximising multivalency effects in protein-carbohydrate interactions, *Org Biomol Chem*, **2009**, 7(10); 2013-25.
23. Y.C. Lee, R.T. Lee, Carbohydrate-Protein Interactions: Basis of Glycobiology, *Acc Chem Res*, **1995**, 28(8); 321-27.

24. C. Fasting, C.A. Schalley, M. Weber, O. Seitz, S. Hecht, B. Koksche, J. Dervedde, C. Graf, E.-W. Knapp, R. Haag, Multivalency as a Chemical Organization and Action Principle, *Angew Chem Int Ed*, **2012**, 51(42); 10472-98.
25. C. Fasting, C.A. Schalley, M. Weber, O. Seitz, S. Hecht, B. Koksche, J. Dervedde, C. Graf, E.-W. Knapp, R. Haag, Multivalenz als chemisches Organisations- und Wirkprinzip, *Angew Chem*, **2012**, 124(42); 10622-50.
26. J. Dervedde, A. Rausch, M. Weinhardt, S. Enders, R. Tauber, K. Licha, M. Schirner, U. Zügel, A. von Bonin, R. Haag, Dendritic polyglycerol sulfates as multivalent inhibitors of inflammation, *Proc Natl Acad Sci of USA*, **2010**, 107(46); 19679-84.
27. T.D. McCarthy, P. Karellas, S.A. Henderson, M. Giannis, D.F. O'Keefe, G. Heery, J.R.A. Paull, B.R. Matthews, G. Holan, Dendrimers as Drugs: Discovery and Preclinical and Clinical Development of Dendrimer-Based Microbicides for HIV and STI Prevention, *Mol Pharm*, **2005**, 2(4); 312-18.
28. http://www.starpharma.com/vivagel/vivagel_availability; letzter Zugriff: **2013**.
29. G.B. Sigal, M. Mammen, G. Dahmann, G.M. Whitesides, Polyacrylamides Bearing Pendant α -Sialoside Groups Strongly Inhibit Agglutination of Erythrocytes by Influenza Virus: The Strong Inhibition Reflects Enhanced Binding through Cooperative Polyvalent Interactions, *J Am Chem Soc*, **1996**, 118(16); 3789-800.
30. H. Kamitakahara, T. Suzuki, N. Nishigori, Y. Suzuki, O. Kanie, C.-H. Wong, Ein Lysogangliosid/Poly-L-glutaminsäure- Konjugat als picomolarer Inhibitor von Influenza-Hämagglutinin, *Angew Chem*, **1998**, 110(11); 1607-11.
31. L. Röglin, E.H.M. Lempens, E.W. Meijer, Ein Meisterstück in der Synthese: wohldefinierte, multivalente und multimodale dendritische Architekturen für biomedizinische Anwendungen, *Angew Chem*, **2011**, 123(1); 106-17.
32. J.J. Landers, Z. Cao, I. Lee, L.T. Piehler, P.P. Myc, A. Myc, T. Hamouda, A.T. Galecki, J.R. Baker, Prevention of Influenza Pneumonitis by Sialic Acid – Conjugated Dendritic Polymers, *J Inf Dis*, **2002**, 186(9); 1222-30.
33. A. Joshi, S. Kate, V. Poon, D. Mondal, M.B. Boggara, A. Saraph, J.T. Martin, R. McAlpine, R. Day, A.E. Garcia, J. Mogridge, R.S. Kane, Structure-Based Design of a Heptavalent Anthrax Toxin Inhibitor, *Biomacromol*, **2011**, 12(3); 791-96.
34. P.I. Kitov, J.M. Sadowska, G. Mulvey, G.D. Armstrong, H. Ling, N.S. Pannu, R.J. Read, D.R. Bundle, Shiga-like toxins are neutralized by tailored multivalent carbohydrate ligands, *Nature*, **2000**, 403(6770); 669-72.
35. G.L. Mulvey, P. Marcato, P.I. Kitov, J. Sadowska, D.R. Bundle, G.D. Armstrong, Assessment in Mice of the Therapeutic Potential of Tailored, Multivalent Shiga Toxin Carbohydrate Ligands, *J Inf Dis*, **2003**, 187(4); 640-49.
36. D. Specker, V. Wittmann, Synthesis and Application of Glycopeptide and Glycoprotein Mimetics, in *Glycopeptides and Glycoproteins*, **2007**, Springer, 65-107.
37. H.-J. Gabius, Animal Lectins, *Eur J Biochem*, **1997**, 243(3); 543-76.
38. A. Joshi, D. Vance, P. Rai, A. Thiyagarajan, R.S. Kane, The Design of Polyvalent Therapeutics, *Chem – A Eur J*, **2008**, 14(26); 7738-47.
39. R. Roy, C.A. Laferrière, A. Gamian, H.J. Jennings, N-Acetylneuraminic Acid: Neoglycoproteins and Pseudopolysaccharides, *J Carb Chem*, **1987**, 6(1); 161 - 65.
40. D. Solomon, P.I. Kitov, E. Paszkiewicz, G.A. Grant, J.M. Sadowska, D.R. Bundle, Heterobifunctional Multivalent Inhibitor-Adaptor Mediates Specific Aggregation between Shiga Toxin and a Pentraxin, *Org Lett*, **2005**, 7(20); 4369-72.
41. H.J. Allen, E.C. Kisailus, in *Glycoconjugates: Composition, Structure, and Function*, **1992**, Dekker.
42. J. Marin, A. Violette, J.-P. Briand, G. Guichard, Galactosylated 5-Hydroxylysine Mimetics for Glycopeptide Synthesis, *Eur J Org Chem*, **2004**, (14); 3027-39.
43. V. Wittmann, S. Seeberger, Combinatorial Solid-Phase Synthesis of Multivalent Cyclic Neoglycopeptides, *Angew Chem Int Ed*, **2000**, 39(23); 4348-52.
44. D.J. Lee, P.W.R. Harris, M.A. Brimble, Synthesis of MUC1 Neoglycopeptides using efficient microwave-enhanced chaotrope-assisted click chemistry, *Org Biomol Chem*, **2011**, 9(5); 1621-26.
45. H. Kunz, H. Waldmann, Aufbau disaccharidischer N-Glycopeptide - Synthese der Verknüpfungsregion der Transmembran-Neuraminidase eines Influenza-Virus, *Angew Chem*, **1985**, 97(10); 885-87.
46. C. Unverzagt, H. Kunz, Synthesis of glycopeptides and neoglycoproteins containing the fucosylated linkage region of N-glycoproteins, *Bioorg Med Chem*, **1994**, 2(11); 1189-201.
47. B. Liebe, H. Kunz, Solid-Phase Synthesis of a Tumor-Associated Sialyl-TN Antigen Glycopeptide with a Partial Sequence of the "Tandem Repeat" of the MUC-1 Mucin, *Angew Chem Int Ed*, **1997**, 36(6); 618-21.

48. K. Baumann, D. Kowalczyk, H. Kunz, Total Synthesis of the Glycopeptide Recognition Domain of the P-Selectin Glycoprotein Ligand 113, *Angew Chem Int Ed*, **2008**, 47(18); 3445-49.
49. M. Kiso, Y. Kaneda, R. Shimizu, A. Hasegawa, A general, convenient synthesis of the repeating, disaccharide dipeptide unit of the bacterial, cell-wall peptidoglycan by the oxazoline method, *Carb Res*, **1980**, 83(1); C8-C11.
50. A. Hasegawa, E. Tanahashi, M. Kiso, Synthesis of 2,6-di(acylamino)-2,6-dideoxy-3-O-(d-2-propanoyl-l-alanyl-d-isoglutamine)-d-glucopyranoses, *Carb Res*, **1982**, 103(2); 251-61.
51. A. Hasegawa, E. Tanakashi, Y. Goh, M. Kiso, Synthesis of some carbohydrate analogs of *N*-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-isoglutamine, *Carb Res*, **1982**, 103(2); 263-72.
52. A. Hasegawa, E. Tanahashi, Y. Goh, M. Kiso, Synthesis of 4-acetamido-*N*-acetyl-4-deoxy- and 4,6-di(acetamido)-*N*-acetyl-4,6-dideoxy-muramoyl-L-alanyl-D-isoglutamine derivatives, *Carb Res*, **1982**, 103(2); 273-80.
53. H. Paulsen, J.-P. Hölck, Bausteine von Oligosacchariden, XXXIX. Synthese der Glycopeptide β -D-Gal(1 \rightarrow 4)- α -D-GlcNAc(1 \rightarrow O)-D-Ser und β -D-Gal(1 \rightarrow 4)- α -D-GlcNAc(1 \rightarrow O)-L-Thr, *Liebigs Annalen der Chemie*, **1982**, 1982(6); 1121-31.
54. P. Hans, S. Michael, Bausteine von Oligosacchariden, LXXIII. Synthese der Tetrapeptidsequenz 12 bis 15 des Asialoglycophorin A mit vier Disaccharid-Seitenketten, *Lieb Ann Chem*, **1986**, 1986(8); 1435-47.
55. G.M.U.Weichert, H. Paulsen, Solid-Phase Synthesis of *O*-Glycopeptide Sequences, *Angew Chem Int Ed*, **1988**, 27(10); 1365-67.
56. P. Schultheiß-Reimann, H. Kunz, *O*-Glycopeptid-Synthese unter Verwendung von 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-(Fmoc-)geschützten Bausteinen, *Angew Chem*, **1983**, 95(1); 64-64.
57. H. Kunz, Synthese von Glycopeptiden, Partialstrukturen biologischer Erkennungskomponenten, *Angew Chem*, **1987**, 99(4); 297-311.
58. N. Röckendorf, T.K. Lindhorst, Glucuronic Acid Derivatives as Branching Units for the Synthesis of Glycopeptide Mimetics, *J Org Chem*, **2004**, 69(13); 4441-45.
59. A. Schierholt, H.A. Shaikh, J. Schmidt-Lassen, T.K. Lindhorst, Utilizing Staudinger Ligation for the Synthesis of Glycoamino Acid Building Blocks and Other Glycomimetics, *Eur J Org Chem*, **2009**, 2009(22); 3783-89.
60. T.J. Tolbert, C.-H. Wong, Intein-Mediated Synthesis of Proteins Containing Carbohydrates and Other Molecular Probes, *J Am Chem Soc*, **2000**, 122(23); 5421-28.
61. R. Huisgen, G. Szeimies, L. Möbius, 1,3-Dipolare Cycloadditionen, XXXII. Kinetik der Additionen organischer Azide an CC-Mehrfachbindungen, *Chemische Berichte*, **1967**, 100(8); 2494-507.
62. H.C. Kolb, M.G. Finn, K.B. Sharpless, Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions, *Angew Chem Int Ed*, **2001**, 40(11); 2004-21.
63. V.V. Rostovtsev, L.G. Green, V.V. Fokin, K.B. Sharpless, A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective "Ligation" of Azides and Terminal Alkynes, *Angew Chem Int Ed*, **2002**, 41(14); 2596-99.
64. E.G. Weinhold, J.R. Knowles, Design and evaluation of a tightly binding fluorescent ligand for influenza A hemagglutinin, *J Am Chem Soc*, **1992**, 114(24); 9270-75.
65. M. von Itzstein, W.-Y. Wu, G.B. Kok, M.S. Pegg, J.C. Dyason, B. Jin, T.V. Phan, M.L. Smythe, H.F. White, S.W. Oliver, P.M. Colman, J.N. Varghese, D.M. Ryan, J.M. Woods, R.C. Bethell, V.J. Hotham, J.M. Cameron, C.R. Penn, Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication, *Nature*, **1993**, 363(6428); 418-23.
66. E. van der Vries, F.F. Stelma, C.A.B. Boucher, Emergence of a Multidrug-Resistant Pandemic Influenza A (H1N1) Virus, *New Engl J Med*, **2010**, 363(14); 1381-82.
67. C. McCullough, M. Wang, L. Rong, M. Caffrey, Characterization of influenza hemagglutinin interactions with receptor by NMR, *PLoS One*, **2012**, 7(7); 33958.
68. M. Yamashita, T. Tomozawa, M. Kakuta, A. Tokumitsu, H. Nasu, S. Kubo, CS-8958, a Prodrug of the New Neuraminidase Inhibitor R-125489, Shows Long-Acting Anti-Influenza Virus Activity, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2009**, 53(1); 186-92.
69. E. Vanderlinden, F. Göktaş, Z. Cesur, M. Froeyen, M.L. Reed, C.J. Russell, N. Cesur, L. Naesens, Novel Inhibitors of Influenza Virus Fusion: Structure-Activity Relationship and Interaction with the Viral Hemagglutinin, *J Virol*, **2010**, 84(9); 4277-88.
70. J. Yoshimoto, M. Kakui, H. Iwasaki, T. Fujiwara, H. Sugimoto, N. Hattori, Identification of a novel HA conformational change inhibitor of human influenza virus, *Arch Virol*, **1999**, 144(5); 865-78.
71. J.C. Jones, E.A. Turpin, H. Bultmann, C.R. Brandt, S. Schultz-Cherry, Inhibition of Influenza Virus Infection by a Novel Antiviral Peptide That Targets Viral Attachment to Cells, *J Virol*, **2006**, 80(24); 11960-67.

72. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=influenza+hemagglutinin&Search=Search>, letzter Zugriff: **2013**.
73. Q.M. Le, M. Kiso, K. Someya, Y.T. Sakai, T.H. Nguyen, K.H. Nguyen, N.D. Pham, H.H. Ngyen, S. Yamada, Y. Muramoto, T. Horimoto, A. Takada, H. Goto, T. Suzuki, Y. Suzuki, Y. Kawaoka, Avian flu: isolation of drug-resistant H5N1 virus, *Nature*, **2005**, 437(7062); 1108.
74. A. Lackenby, C.I. Thompson, J. Democratis, The potential impact of neuraminidase inhibitor resistant influenza, *Curr Opin Infect Dis*, **2008**, 21(6); 626-38.
75. <http://www.pdb.org/pdb/results/results.do?grid=FD54A0&tabtoshow=Current>, letzter Zugriff: **2013**.
76. M. Waldmann, Strukturbasiertes Design, Synthese und Analyse polyvalenter Liganden zur Inhibierung des Hämagglutinin des Influenzavirus H5N1, *Diplomarbeit Universität Hamburg*, **2009**.
77. W.D. Curtis, J.F. Stoddart, G.H. Jones, 1,6,13,18,25,30-Hexaoxa[6.6.6](1,3,5)cyclophane. Attempted synthesis of a [4]cryptand, *J Chem Soc, Perkin Transactions 1*, **1977**, (7); 785-88.
78. J. Nithyanandhan, N. Jayaraman, Synthesis of Poly(alkyl aryl ether) Dendrimers, *J Org Chem*, **2002**, 67(17); 6282-85.
79. Y. Boland, P. Hertsens, J. Marchand-Brynaert, Y. Garcia, New Ditopic and Tripodal 1,2,4-Triazole- and Tetrazole-Based Ligands for Coordination Chemistry, *Synthesis*, **2006**, 1504-12.
80. J.M.J. Fréchet, K.E. Haque, Use of polymers as protecting groups in organic synthesis. II. Protection of primary alcohol functional groups, *Tetr Lett*, **1975**, 16(35); 3055-56.
81. I. Zenkevich, A. Eshchenko, S. Makarova, A. Vitenberg, Y. Dobryakov, V. Utsal, Identification of the Products of Oxidation of Quercetin by Air Oxygen at Ambient Temperature, *Molecules*, **2007**, 12(3); 654-72.
82. S. Ramaswamy, M. Malaiyandi, G.W. Buchanan, Phase-transfer-catalyzed methylation of hydroxyaromatic acids, hydroxyaromatic aldehydes, and aromatic polycarboxylic acids, *Environ Sci Tech*, **1985**, 19(6); 507-12.
83. E. Kiehlmann, R.W. Lauener, Bromophloroglucinols and their methyl ethers, *Can J Chem*, **1989**, 67(2); 335-44.
84. B.R. Brown, W.W. Elliott, D.L. Hammick, 318. The mechanism of decarboxylation. Part VI. Kinetics of the acid-catalysed decarboxylation of 2 : 4 : 6-trihydroxybenzoic acid, *J Chem Soc (Resumed)*, **1951**, (0); 1384-89.
85. M. Fölsing, *mündliche Mitteilung*, Hamburg **2013**.
86. L.A. Carpino, G.Y. Han, 9-Fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group, *J Org Chem*, **1972**, 37(22); 3404-09.
87. C. Sieben, C. Kappel, R. Zhu, A. Wozniak, C. Rankl, P. Hinterdorfer, H. Grubmüller, A. Herrmann, Influenza virus binds its host cell using multiple dynamic interactions, *Proc Natl Acad Sci*, **2012**, 109(34); 13626-31.
88. N. Trouche, S.b. Wieckowski, W. Sun, O. Chaloin, J. Hoebeke, S. Fournel, G. Guichard, Small Multivalent Architectures Mimicking Homotrimers of the TNF Superfamily Member CD40: Delineating the Relationship between Structure and Effector Function, *J Am Chem Soc*, **2007**, 129(44); 13480-92.
89. K. Matsuura, K. Murasato, N. Kimizuka, Artificial Peptide-Nanospheres Self-Assembled from Three-Way Junctions of β -Sheet-Forming Peptides, *J Am Chem Soc*, **2005**, 127(29); 10148-49.
90. C. Schotten, Ueber die Oxydation des Piperidins, *Ber deut chem Gesell*, **1884**, 17(2); 2544-47.
91. B. Liebe, H. Kunz, Solid-Phase Synthesis of a Sialyl-Tn-Glycoundecapeptide of the MUC1 Repeating Unit, *Hel Chim Acta*, **1997**, 80(5); 1473-82.
92. K. Baumann, D. Kowalczyk, T. Gutjahr, M. Pieczyk, C. Jones, M. Wild, D. Vestweber, H. Kunz, Sulfated and Non-Sulfated Glycopeptide Recognition Domains of P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 and their Binding to P- and E-Selectin, *Angew Chem Int Ed*, **2009**, 48(17); 3174-78.
93. M. Pudelko, J. Bull, H. Kunz, Chemical and Chemoenzymatic Synthesis of Glycopeptide Selectin Ligands Containing Sialyl Lewis X Structures, *Chem Bio Chem*, **2010**, 11(7); 904-30.
94. R. Roy, C.A. Laferrrière, Synthesis of protein conjugates and analogues of N-acetylneuraminic acid, *Can J Chem*, **1990**, 68(11); 2045-54.
95. J.C. McAuliffe, D. Rabuka, O. Hindsgaul, Synthesis of O-Glycolyl-Linked Neuraminic Acids through a Spirocyclic Intermediate, *Org Lett*, **2002**, 4(18); 3067-69.
96. K. Matsuoka, H. Kurosawa, Y. Esumi, D. Terunuma, H. Kuzuhara, Introduction of monosaccharides having functional groups onto a carbosilane dendrimer: A broadly applicable one-pot reaction in liquid ammonia involving Birch reduction and subsequent Sn2 reaction, *Carb Res*, **2000**, 329(4); 765-72.
97. V.R.N. Munasinghe, J.E.T. Corrie, G. Kelly, S.R. Martin, Fluorescent Ligands for the Hemagglutinin of Influenza A: Synthesis and Ligand Binding Assays, *Bioconj Chem*, **2006**, 18(1); 231-37.
98. P.L. Toogood, P.K. Galliker, G.D. Glick, J.R. Knowles, Monovalent sialosides that bind tightly to influenza A virus, *J Med Chem*, **1991**, 34(10); 3138-40.

99. R. Kuhn, P. Lutz, D.L. Macdonald, Synthese anomerer Sialinsäure-methylketoside, *Chem Ber*, **1966**, 99(2); 611-17.
100. A. Marra, P. Sinay, Acetylation of *N*-acetylneuraminic acid and its methyl ester, *Carb Res*, **1989**, 190(2); 317-22.
101. K. Furuhata, K. Anazawa, M. Itoh, Y. Shitori, H. Ogura, Studies on Sialic Acids. V. Synthesis of α - and β -D-Neu5Acp-(2 \rightarrow 6)-lactose, *Chem Pharm Bull*, **1986**, 34(7); 2725-31.
102. A.Y. Veinberg, G.I. Roslovitseva, G.I. Samokhvalov, Silver salt of salicylic acid as a catalyst in glycoside synthesis, *Russ J Gen Chem*, **1973**, 43(3); 688-89.
103. D.J.M. van der Vleugel, W.A.R. van Heeswijk, J.F.G. Vliegthart, A facile preparation of alkyl [α]-glycosides of the methyl ester of *N*-acetyl-neuraminic acid, *Carb Res*, **1982**, 102(1); 121-30.
104. D.G. Lee, M.v.d. Engh, The Oxidation of 2-Propanol by Ruthenium Tetroxide, *Can J Chem*, **1972**, 50(13); 2000-09.
105. P.H.J. Carlsen, T. Katsuki, V.S. Martin, K.B. Sharpless, A greatly improved procedure for ruthenium tetroxide catalyzed oxidations of organic compounds, *J Org Chem*, **1981**, 46(19); 3936-38.
106. Louis A. Carpino, Hideko Imazumi, Ayman El-Faham, Fernando J. Ferrer, Chongwu Zhang, Yunsub Lee, Bruce M. Foxman, Peter Henklein, Christiane Hanay, Clemens Mügge, Holger Wenschuh, Jana Klose, Michael Beyermann, M. Bienert, The Uronium/Guanidinium Peptide Coupling Reagents: Finally the True Uronium Salts, *Angew Chem Int Ed*, **2002**, 41(3); 441-45.
107. K. Barlos, D. Papaioannou, D. Theodoropoulos, Preparation and properties of *N*- α -trityl amino acid 1-hydroxybenzotriazole esters, *Int J Pept Prot Res*, **1984**, 23(3); 300-05.
108. C.O. Kappe, B. Pieber, D. Dallinger, Microwave Effects in Organic Synthesis: Myth or Reality?, *Angew Chem Int Ed*, **2013**, 52(4); 1088-94.
109. G. Zemplén, Abbau der reduzierenden Biosen, I.: Direkte Konstitutions-Ermittlung der Cellobiose, *Ber deut chem Gesell (A and B Series)*, **1926**, 59(6); 1254-66.
110. J.L. Bada, Kinetics of racemization of amino acids as a function of pH, *J Am Chem Soc*, **1972**, 94(4); 1371-73.
111. G. Riley, J.H. Turnbull, W. Wilson, Synthesis of some phosphorylated amino-hydroxy-acids and derived peptides related to the phosphoproteins, *J Chem Soc (Resumed)*, **1957**, 0(0); 1373-79.
112. R.P. Linstead, L.N. Owen, R.F. Webb, Elimination reactions of esters. Part I. The formation of α - and β -unsaturated acids from β -acyloxy-compounds, *J Chem Soc (Resumed)*, **1953**, 0(0); 1211-18.
113. P. Sjölin, M. Elofsson, J. Kihlberg, Removal of Acyl Protective Groups from Glycopeptides: Base Does Not Epimerize Peptide Stereocenters, and β -Elimination Is Slow, *J Org Chem*, **1996**, 61(2); 560-65.
114. J.L. Sonnenburg, H. van Halbeek, A. Varki, Characterization of the Acid Stability of Glycosidically Linked Neuraminic Acid: Use in detecting De-N-acetyl-gangliosides in Human Melanoma, *J Biol Chem*, **2002**, 277(20); 17502-10.
115. S.M. Kelly, T.J. Jess, N.C. Price, How to study proteins by circular dichroism, *Biochim Biophys Acta - Proteins and Proteomics*, **2005**, 1751(2); 119-39.
116. J.T. Pelton, L.R. McLean, Spectroscopic Methods for Analysis of Protein Secondary Structure, *Anal Biochem*, **2000**, 277(2); 167-76.
117. J.G. Lees, B.R. Smith, F. Wien, A.J. Miles, B.A. Wallace, CDtool - an integrated software package for circular dichroism spectroscopic data processing, analysis, and archiving, *Anal Biochem*, **2004**, 332(2); 285-89.
118. M.-J. Gething, K. McCammon, J. Sambrook, Expression of wild-type and mutant forms of influenza hemagglutinin: The role of folding in intracellular transport, *Cell*, **1986**, 46(6); 939-50.
119. A. Nestorowicz, G. Laver, D.C. Jackson, Antigenic Determinants of Influenza Virus Haemagglutinin. X. A Comparison of the Physical and Antigenic Properties of Monomeric and Trimeric Forms, *J Gen Vir*, **1985**, 66(8); 1687-95.
120. A.N. Nestorowicz, D.O. White, D.C. Jackson, Conformational changes in influenza virus haemagglutinin and its monomer detected by monoclonal antibodies, *Vaccine*, **1985**, 3(3); 175-81.
121. J.J. Skehel, M.D. Waterfield, J.W. McCauley, K. Elder, D.C. Wiley, Studies on the Structure of the Haemagglutinin, *Phil Trans Roy Soc London. Series B, Biol Sci*, **1980**, 288(1029); 335-39.
122. J. Michael Schurr, V. Bloomfield, Dynamic Light Scattering Of Biopolymers And Biocolloid, *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **1977**, 4(4); 371-431.
123. J. Crawford, B. Wilkinson, A. Vosnesensky, G. Smith, M. Garcia, H. Stone, M.L. Perdue, Baculovirus-derived hemagglutinin vaccines protect against lethal influenza infections by avian H5 and H7 subtypes, *Vaccine*, **1999**, 17(18); 2265-74.
124. A. Lubineau, J.L. Gallic, Stereoselective Syntheses of Alkyl- and Alkyl-2-thio- α -Sialosides, *J Carb Chem*, **1991**, 10(2); 263-68.

125. B. Meyer, T. Peters, NMR Spectroscopy Techniques for Screening and Identifying Ligand Binding to Protein Receptors, *Angew Chem Int Ed*, **2003**, 42(8); 864-90.
126. N.K. Sauter, M.D. Bednarski, B.A. Wurzburg, J.E. Hanson, G.M. Whitesides, J.J. Skehel, D.C. Wiley, Hemagglutinins from two influenza virus variants bind to sialic acid derivatives with millimolar dissociation constants: a 500-MHz proton nuclear magnetic resonance study, *Biochem*, **1989**, 28(21); 8388-96.
127. M. Hollinger, Design, Synthese und Analyse von Liganden als Inhibitoren des Hämagglutinins des aviären Influenza Virus H5N1, *Dissertation Universität Hamburg*, **2009**.
128. Y. Cheng, W.H. Prusoff, Relationship between the inhibition constant (K_I) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (IC_{50}) of an enzymatic reaction, *Biochem Pharmacol*, **1973**, 22(23); 3099-108.
129. isoelectric.ovh.org/files/calculate.php, letzter Zugriff: **Mai 2012**.
130. C.-F. Mandenius, R. Wang, A. Aldén, G. Bergström, S. Thébault, C. Lutsch, S. Ohlson, Monitoring of influenza virus hemagglutinin in process samples using weak affinity ligands and surface plasmon resonance, *Anal Chim Acta*, **2008**, 623(1); 66-75.
131. Y.-F. Chang, S.-F. Wang, J.C. Huang, L.-C. Su, L. Yao, Y.-C. Li, S.-C. Wu, Y.-M.A. Chen, J.-P. Hsieh, C. Chou, Detection of swine-origin influenza A (H1N1) viruses using a localized surface plasmon coupled fluorescence fiber-optic biosensor, *Biosens Bioelectr*, **2010**, 26(3); 1068-73.
132. E. Suenaga, H. Mizuno, K.K.R. Penmetcha, Monitoring influenza hemagglutinin and glycan interactions using surface plasmon resonance, *Biosens Bioelectr*, **2012**, 32(1); 195-201.
133. C. Estmer Nilsson, S. Abbas, M. Bennemo, A. Larsson, M.D. Hämäläinen, Å. Frostell-Karlsson, A novel assay for influenza virus quantification using surface plasmon resonance, *Vaccine*, **2010**, 28(3); 759-66.
134. J.J. Skehel, D.C. Wiley, Receptor Binding and Membrane Fusion in Virus Entry: The Influenza Hemagglutinin, *Ann Rev Biochem*, **2000**, 69(1); 531-69.
135. D. Wilhelm, Design, Synthese und Analyse CD4 bindender Peptide, Glycopeptide und deren Mimetika als HIV-Entry-Inhibitoren, *Dissertation Universität Hamburg*, **2009**.
136. W.-N. Liao, Synthese 9-substituierter Sialinsäureanaloga als Inhibitoren des Hämagglutinins des aviären Influenza Virus H5N1, *Diplomarbeit, Universität Hamburg*, **2011**.
137. www.basic.northwestern.edu/biotools/proteincalc.html, letzter Zugriff: **April 2012**.
138. G.R. Fulmer, A.J.M. Miller, N.H. Sherden, H.E. Gottlieb, A. Nudelman, B.M. Stoltz, J.E. Bercaw, K.I. Goldberg, NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Common Laboratory Solvents, Organics, and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist, *Organometallics*, 29(9); 2176-79.
139. G. Zemplén, A. Gerecs, I. Hadácsy, Über die Verseifung acetylierter Kohlenhydrate, *Ber deut chem Gesell (A and B Series)*, **1936**, 69(8); 1827-29.
140. S. Lee, H.-L. Yen, Targeting the host or the virus: Current and novel concepts for antiviral approaches against influenza virus infection, *Antivir Res*, **2012**, 96, 391-404.

9 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei den Leuten bedanken, die direkt oder indirekt zu dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich in den vielen Studienjahren stets unterstützt haben und durch ihr Vertrauen in mich in dem bekräftigten, was ich machen wollte.

Meiner Freundin Eileen, die häufig die Hauptleidtragende in stressigen Momenten war und mir dennoch immer Halt und Unterstützung gab. Ohne dich hätte ich es nicht gepackt.

Meinen Freunden, für die ich selten Zeit hatte (und wenn dann häufig nur nach meinen Konditionen) und die immer noch mit mir zu tun haben wollen.

Aktiven und ehemaligen Mitgliedern des AK Meyer:

- Anna, die mich mit ihrer liebenswürdigen Art und Weise sofort für den AK hat gewinnen können.
- Dennis, der mich zum Schwerpunkt aufgenommen hat, von dem ich viel lernen konnte und mit dem ich stets viel Spaß hatte.
- Der Dirk, der mir mit chemischen Problemen viel geholfen hat und mich immer wieder mit seiner Integrität und seiner Herangehensweise an Dinge beeindrucken konnte.
- Katrin, für die Synthesetips (ohne dich hätte es weder den magischen Heizpilz noch die dazugehörigen Brände gegeben) und dafür, dass du mich häufig wieder auf den rechten Weg bei meiner Diss gebracht hast.
- Katha, die sich so lange so hingebungsvoll für den AK aufgeopfert hat und für die vielen netten gemeinsamen Abende bei Bier und Wein.
- Thomas, der Holli, Robin, Flügge und Bea, die ich zum Teil kurz, zum Teil lang, noch ein Stück ihrer Diss begleiten durfte und mit denen es auch nie langweilig wurde.
- Karsten, mit cogenialer Kompagnion, für all die gemeinsamen Touren, sei es nun zu Globetrotter oder nach Neapel, und den Spaß, den wir hier gemeinsam hatten.
- Felix, der mich nicht nur fachlich immer wieder verblüfft hat, sondern auch mit seiner Rolle als Familienvater mut gemacht hat.
- Martin, für die vielen guten Gespräche fachlicher wie zwischenmenschlicher Natur, sowie unseren leider nicht so uneindeutigen Duellen auf dem court.
- Alex, dem super Admin, für die unzähligen humoristischen Einlagen und auch für seine Rolle als junger Familienvater.

- Ilona, für die herzliche Aufnahme in der 17a, Hilfe bei etlichen Synthesen und für die vielen Stullen, die mich über den Nachmittag gebracht haben.
- Patrizia für ihre herzliche und ehrliche Art.
- Kalthi für die vielen, vielen schönen Geschichten (dank damit auch an Karsti, der für die Geschichten letzten Endes sorgt).
- Miriam, für den fachlichen support am NMR und bei biochemischen Fragen
- Den übrigen AK Mitgliedern Melissa, Henning, Raffi, Nadja, Wei, Kerstin, Tim, Alena und Davina. Auch ihr habt dazu beigetragen, dass ich immer gern zur Uni gekommen bin, auch wenn es chemisch nicht immer rund lief!

Meinen Praktis Ken, Raffi, Roberto, Ina, Martin, Fabian, Abdullah, Malina, Galina, Patrick, Ken, Sebi und Sandra.

Thomas, Herrn Sinnwell und dem Team des NMR-Services, ohne euch steht die OC still!

Maria und ihrem MS-Team, die sich immer wieder Zeit für meine Probleme genommen haben.

Dem IT-Service, für die exzellente Versorgung mit Hardware und die stets freundliche, kompetente und verständnisvolle Hilfe, wenn das Problem mal wieder vor dem Rechner saß.

Den Mitarbeitern des Instituts, zu denen ich fast ausnahmslos ein sehr gutes Verhältnis hatte.

Und schlussendlich möchte ich mich nochmals bei Eileen, Der Dirk, Dennis, Felix, Martin und Frau Parsons bedanken, die diese Arbeit ganz oder in Teilen Korrektur gelesen haben.

10 Curriculum vitae

Name Moritz Waldmann
Geboren 21.5.1982 in Hildesheim

Ausbildung

04/2009 – 04/2013: Promotion in der Forschungsgruppe von Prof. Dr. Bernd Meyer, Department Chemie, Universität Hamburg

Titel: „*Design, Synthese und Analyse multivalenter Inhibitoren der Adhäsion des Hämagglutinin H5 des Vogelgrippe Virus*“

04/2008 – 01/2009: Diplomarbeit in der Forschungsgruppe von Prof. Dr. Bernd Meyer, Department Chemie, Universität Hamburg

Titel: „*Strukturbasiertes Design, Synthese und Analyse polyvalenter Liganden zur Inhibierung des Hämagglutinin des Influenzavirus H5N1*“ (Note: sehr gut)

02/2008 mündliche Diplomprüfung

04/2003 – 02/2008 Studium der Chemie an der Universität Hamburg

04/2002 – 04/2003 Studium der Physik an der Universität zu Köln

09/2001 – 05/2002 Grundwehrdienst am Standortsanitätszentrum Hildesheim

06/2001 Abitur am Gymnasium Andreanum in Hildesheim (Note: 2.1)

Akademische Berufserfahrung

04/2009 – 03/2012 wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität Hamburg

04/2009 – 03/2012 Assistent im organischen Grundpraktikum im Nebenfach

04/2009 – 11/2012 Assistent für Studierende des Hauptstudiums bzw. Masterstudiengangs im Forschungspraktikum für Organische Chemie an der Universität Hamburg

10/2009 – 09/2011 Assistent für Bachelor- und Masterstudenten der Strukturbiologie für NMR-Spektroskopie für Strukturbiologie

03/2010 – 03/2013 Assistent im kleinen chemischen Praktikum für Mediziner und Holzwirte

Posterpräsentation

Moritz Waldmann and Bernd Meyer

ICS, 25th International Carbohydrate Symposium, Tokyo, Japan 2010

„Structure Based Design, Synthesis and Analysis of Polyvalent Ligands for Influenza Hemagglutinin H5”

Vorträge

Moritz Waldmann

Eurocarb, 16th Eurocarb Carbohydrate Symposium, Sorrento, Italy 2011

„Multivalent Glycoderivatives as Potential Inhibitors for Influenza Lectin Hemagglutinin H5”

Eidesstattliche Erklärung

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

Hamburg, den 19.03.2013