

Design, Synthese und Analyse von Inhibitoren des Hämaggglutinins der aviären Influenza H5N1

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der Naturwissenschaften
des Fachbereichs Chemie der Universität Hamburg

vorgelegt von

Karsten M. D. Winkel

aus Hamburg

Hamburg 2016

1. Gutachter: Prof. Dr. Bernd Meyer

2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. Wittko Francke

Tag der Disputation: 01.07.2016

Diese Arbeit wurde in dem Zeitraum von Oktober 2010 bis September 2015 am Institut für Organische Chemie im Fachbereich Chemie der Universität Hamburg, Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. Christian B. W. Stark, durchgeführt

Herrn Prof. Dr. Bernd Meyer möchte ich für die interessante Themenstellung, die Möglichkeit die Arbeiten frei gestalten zu können und die stets motivierende Unterstützung danken.

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

Für meine Eltern

Verzeichnisse

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	i
Abkürzungsverzeichnis	vi
1 Einleitung	1
1.1 Influenza	1
1.1.1 Klassifizierung, Aufbau und Replikationszyklus des Influenzavirus	2
1.1.2 Evolution der Influenza	5
1.1.3 Aviäre Influenza	6
1.2 Das Hämagglutinin H5 und sein Einfluss auf die Pathogenität.....	8
1.3 Therapeutische Möglichkeiten	9
1.4 Wirkstoffdesign	13
2 Aufgabenstellung	16
3 Ergebnisse und Diskussion.....	17
3.1 Struktur-basierter Entwurf eines vollständig artifiziellen Inhibitors	17
3.1.1 Virtuelles Fragmentscreening und Inhibitor-design	17
3.1.2 Synthese des vollständig artifiziellen Inhibitors	28
3.2 C-9 Aminokonjugate der <i>N</i> -Acetylneuraminsäure	30
3.2.1 Virtuelle Bindungsstudien mit C-9 Aminokonjugaten der <i>N</i> -Acetylneuraminsäure.....	31
3.2.2 Synthese der C-9 Aminokonjugate der <i>N</i> -Acetylneuraminsäure	35
3.2.3 Entwicklung der Methoden für die SPR-Messungen	40
3.2.4 SPR Bindungsstudien der C-9 Aminokonjugate der <i>N</i> -Acetylneuraminsäure...	42
3.3 Liganden mit funktionalisiertem Aglycon.....	47

Verzeichnisse

3.3.1	Synthese der Liganden mit funktionalisiertem Aglycon.....	48
3.3.2	SPR Bindungsstudien der Liganden mit funktionalisiertem Aglycon	66
3.3.3	STD-NMR Bindungsstudien der Liganden mit funktionalisiertem Aglycon	71
3.3.4	Moleküldynamiksimulationen der Liganden mit funktionalisiertem Aglycon....	79
4	Zusammenfassung.....	89
5	Summary	91
6	Experimenteller Teil.....	93
6.1	Geräte, Software, Chemikalien und Materialien	93
6.1.1	Verwendete Geräte	93
6.1.2	Verwendete Software	93
6.1.3	Verwendete Chemikalien und Materialien.....	93
6.2	Computergestützte Methoden.....	94
6.2.1	Vorbereitung der Kristallstruktur	94
6.2.2	Virtuelles screening von Liganddatenbanken	95
6.2.3	Design der Neuraminsäure-basierten Liganden	95
6.2.4	Durchführung von molecular dynamics Simulationen.....	95
6.3	SPR Bindungsstudien	96
6.3.1	Immobilisierung des Hämagglutinins H5	96
6.3.2	Durchführung der Messungen und Auswertung	96
6.4	STD-NMR Bindungsstudien	97
6.4.1	Vorbereitung der NMR-Proben.....	97
6.4.2	Aufnahme und Prozessierung der STD-NMR-Spektren.....	98
6.4.3	Auswertung der STD-NMR-Spektren.....	98

Verzeichnisse

6.5	Synthesen und Charakterisierungen	99
6.5.1	Darstellung von <i>N</i> -[4-(Cyclohexylmethoxy)-2-methyl-phenyl]-2- (3-hydroxy-propylamino)-acetamid 8	99
6.5.2	Darstellung von 4-(Cyclohexylmethoxy)-2-methyl-1-nitrobenzol 9	100
6.5.3	Darstellung von 4-(Cyclohexylmethoxy)-2-methylanilin 10	102
6.5.4	Darstellung von Methyl-5-acetamido-9-(ethyl-amino)-3,5,9-tridesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosidonsäure 15	103
6.5.5	Darstellung von Methyl-5-acetamido-9-(<i>n</i> -propyl-amino)-3,5,9-tridesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosidonsäure 16	105
6.5.6	Darstellung von Methyl-5-acetamido-9-(<i>iso</i> -propyl-amino)-3,5,9-tridesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosidonsäure 17	106
6.5.7	Darstellung von Methyl [methyl-5-acetamido-9-(<i>iso</i> -propyl-amino)-3,5,9-tridesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid]onat 25	107
6.5.8	Darstellung von Methyl [methyl-5-acetamido-9-(ethyl-amino)-3,5,9- tridesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid]onat 26	108
6.5.9	Darstellung von Methyl [methyl-5-acetamido-9-(<i>n</i> -propyl-amino)-3,5,9-tridesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid]onat 27	110
6.5.10	Versuch der Darstellung von Methyl [methyl-5-acetamido-9-(cyclopropyl-amino)-3,5,9-tridesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid]onat 28	111
6.5.11	Darstellung von Methyl {[3- <i>N</i> -(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-aminopropan-1-yl]-5-acetamido-4,7,8,9-tetra- <i>O</i> -acetyl-3,5-didesoxy-D-glycero- α -D-galacto-2-nonulopyranosid}-onat 29	112
6.5.12	Darstellung von 3-(1-Naphthyloxy)-propansäure 32	114
6.5.13	Darstellung von 3-(1-Naphthyloxy)-propannitril 33	115
6.5.14	Darstellung von (2 <i>S</i>)-4- <i>tert</i> -Butoxy-2-[3-(naphthyl-1-oxy)propanoylamino]-4-oxo-butansäure 35	117

Verzeichnisse

6.5.15	Darstellung von Methyl {2-[3-((2S)-4- <i>tert</i> -butoxy-2-[3-(naphthyl-1-oxy)-propanoylamino]-4-oxo-butanoyl}amino)propan-1-yl]-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-didesoxy-D- <i>glycero-α-D-galacto</i> -2-nonulopyranosid}-onat 38	118
6.5.16	Darstellung von Methyl {2-[3-((2S)-4- <i>tert</i> -butoxy-2-[3-(naphthyl-1-oxy)-propanoylamino]-4-oxo-butanoyl}amino)propan-1-yl]-5-acetamido-3,5-didesoxy-D- <i>glycero-α-D-galacto</i> -2-nonulopyranosid}-onat 39	120
6.5.17	Darstellung von Methyl {2-[3-((2S)-4-carboxy-2-[3-(naphthyl-1-oxy)-propanoylamino]-butanoyl}amino)propan-1-yl]-5-acetamido-3,5-didesoxy-D- <i>glycero-α-D-galacto</i> -2-nonulopyranosid}-onat 41	123
6.5.18	Darstellung von 2-[3-((2S)-4-carboxy-2-[3-(naphthyl-1-oxy)propanoylamino]-butanoyl}amino)propan-1-yl]-5-acetamido-3,5-didesoxy-D- <i>glycero-α-D-galacto</i> -2-nonulopyranosidonsäure 42	125
6.5.19	Darstellung von Methyl {5-acetamido-2-[3-((2S)-4- <i>tert</i> -butoxy-2-[3-(naphthyl-1-oxy)propanoylamino]-4-oxo-butanoyl}amino)propan-1-yl]-8-(cyclopropylmethyl-amino)-3,5,8-tridesoxy- <i>α-D-galacto</i> -2-octulopyranosid}-onat 44	127
6.5.20	Darstellung von Methyl {5-acetamido-2-[3-((2S)-4- <i>tert</i> -butoxy-2-[3-(naphthyl-1-oxy)propanoylamino]-4-oxo-butanoyl}amino)propan-1-yl]-8-(butansäure-4-yl-amino)-3,5,8-tridesoxy- <i>α-D-galacto</i> -2-octulopyranosid}-onat 45	129
6.5.21	Darstellung von Methyl {5-acetamido-2-[3-((2S)-4-carboxy-2-[3-(naphthyl-1-oxy)propanoylamino]butanoyl}amino)propan-1-yl]-8-(cyclopropylmethylamino)-3,5,8-tridesoxy- <i>α-D-galacto</i> -2-octulopyranosid}-onat 46	131
6.5.22	Darstellung von Methyl {5-acetamido-2-[3-((2S)-4-carboxy-2-[3-(naphthyl-1-oxy)propanoylamino]butanoyl}amino)propan-1-yl]-8-(butansäure-4-yl-amino)-3,5,8-tridesoxy- <i>α-D-galacto</i> -2-octulopyranosid}-onat 47	133
6.5.23	Darstellung von 5-Acetamido-2-[3-((2S)-4-carboxy-2-[3-(naphthyl-1-oxy)-propanoylamino]butanoyl}amino)propan-1-yl]-8-(cyclopropylmethylamino)-3,5,8-tridesoxy- <i>α-D-galacto</i> -2-nonulopyranosidonsäure 48	135

Verzeichnisse

6.5.24	Darstellung von 5-Acetamido-2-[3-({(2S)-4-carboxy-2-[3-(naphthyl-1-oxy)-propanoylamino]butanoyl}amino)propan-1-yl]-8-(butansäure-4-yl-amino)-3,5,8-tridesoxy- α -D- <i>galacto</i> -2-octulopyranosidonsäure 49	137
7	Toxikologische Daten	139
8	Literaturverzeichnis.....	145
9	Danksagung	154
10	Lebenslauf	156
11	Erklärungen	158
11.1	Eidesstattliche Versicherung.....	158
11.2	Erklärung über frühere Promotionsversuche	158

Verzeichnisse

Abkürzungsverzeichnis

Ac	Acetyl
AI	aviäre Influenza
Bu	Butyl
DCM	Dichlormethan
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
EE	Ethylacetat
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimidhydrochlorid
EIC	<i>extracted ion chromatogram</i>
ESI	Elektrospray-Ionisation
Et	Ethyl
HA	Hämagglutinin
HATU	[<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorophosphat]
HEF	Hämagglutinin-Esterase-Fusion-Protein
HPAI	<i>highly pathogenic avian influenza</i>
LPAI	<i>low pathogenic avian influenza</i>
min	Minuten
MS	Massenspektrometrie
MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
NA	Neuraminidase
Neu5Aca2Me	α -Methylglycosid der <i>N</i> -Acetylneuraminsäure
NOE	<i>nuclear Overhauser effect</i>
NP	Nucleoprotein
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
R _f	Retentionsfaktor
R _t	Retentionszeit
RMSF	<i>root-mean-square-fluctuation</i>
SAR	<i>structure affinity relationship</i>
SPR	<i>surface plasmon resonance</i>
STD	<i>saturation transfer difference</i>
TCM	Trichlormethan

Verzeichnisse

TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIC	<i>total ion current</i>
TIPS	Triisopropylsilan
vRNP	virales Ribonucleoprotein
WHO	World Health Organisation

1 Einleitung

1.1 Influenza

Die Influenza, welche allgemein als Grippe bezeichnet wird, ist eine durch Viren übertragene Erkrankung. Die Primärinfektion erfolgt bei Menschen hauptsächlich über die Epithelzellen des respiratorischen Trakts. Zu den häufigsten Symptomen gehören Kopf- und Gliederschmerzen, Schüttelfrost, hohes Fieber und allgemein ein ausgeprägtes Krankheitsgefühl. Die Inkubationszeit beträgt in der Regel ein bis drei Tage und die Krankheitsdauer ein bis zwei Wochen. In vereinzelten Fällen kann die Influenza selber durch das Auslösen einer viralen Pneumonie zum Tode führen. Deutlich häufiger sind jedoch bakterielle Sekundärinfektionen die Todesursache, da durch die Influenza der Körper und das Immunsystem entschieden geschwächt werden.¹ Aus diesem Grund ist die Krankheit bei sehr jungen oder alten und gesundheitlich geschwächten Menschen als besonders gefährlich anzusehen.

Sowohl die Infektiösität als auch die Letalität können zwischen den verschiedenen Virenstämmen sehr stark schwanken. Laut der *World Health Organisation* (WHO) erkranken an der saisonalen Grippe jährlich 3 - 5 Millionen Menschen weltweit, von denen 250 000 - 500 000 sterben.² Deutlich höhere Opferzahlen können bei großen pandemischen Ausbrüchen auftreten. So fielen der „Spanischen Grippe“ zwischen 1918 und 1920 weltweit 20 - 50 Millionen Menschen zum Opfer.³ Weitere große pandemische Ausbrüche, wie die „Asiatische Grippe“ (1957), die „Hongkong Grippe“ (1968) und die „Russische Grippe“ (1977) forderten wesentlich weniger Opfer als die „Spanische Grippe“, jedoch jeweils deutlich mehr als bei den normalen Ausbrüchen der saisonalen Grippe. Wie hochgradig ansteckend die Grippe sein kann, zeigte sich im Jahr 2009, als es zu einer globalen Grippepandemie, die als „Mexiko Grippe“ oder auch „Schweinegrippe“ bezeichnet wurde, kam. Obwohl der Erreger eine sehr hohe Infektionsrate besaß und sich innerhalb kürzester Zeit fast auf der ganzen Welt verbreitet hatte, kam es zu deutlich weniger Todesfällen als sonst bei epidemischen Ausbrüchen der saisonalen Influenza. Dies war dadurch begründet, dass die „Schweinegrippe“ in den meisten Bevölkerungsgruppen eine besonders geringe Mortalitätsrate aufwies. Die Grippewelle zeigte jedoch die alarmierende Tatsache, dass es trotz großer Bemühungen und der langen Kenntnis um die Risiken einer Influenzapandemie

1 Einleitung

kaum gelungen war die Ausbreitung des Virus zu verhindern oder zumindest wirksam einzudämmen.

1.1.1 Klassifizierung, Aufbau und Replikationszyklus des Influenzavirus

Die Influenzaviren sind der Familie der Orthomyxoviridae angehörig. Es sind RNA-Viren, die segmentierte einzelsträngige RNA negativer Polarität tragen. Sie werden in drei Gattungen eingeteilt: Influenza A, B und C. Unterschieden werden die Gattungen anhand des Nucleoproteins (NP) und des Matrixproteins M1.⁴ Die Wirte der Influenza A Viren sind hauptsächlich Vögel, Menschen und Schweine, aber auch andere Vertebraten. Infektionen durch Influenzaviren der Gattungen B und C treten fast nur bei Menschen, in seltenen Fällen aber auch bei Schweinen und Robben auf.⁵ Zur Benennung der unterschiedlichen Virenstämme hat sich das von der WHO vorgeschlagene Modell weitestgehend durchgesetzt.⁶ Diese Nomenklatur sieht einen Namen aus bis zu sechs Teilen vor. Der erste Teil ist die Gattung des Virus. Danach kann aufgeführt werden, aus welchem Organismus das Virus isoliert wurde. Die nächsten beiden Segmente geben den Ort an, an welchem das Virus gefunden wurde und eine für jeden Ort fortlaufende Nummer. Den fünften Teil bildet das Jahr, in dem das Virus entdeckt wurde. Als letztes Segment wird der Virus-Subtyp angegeben. Beispiel: A/duck/Singapore/3/97 (H5N1).

Influenzaviren der Gattungen A und B besitzen acht RNA-Segmente. Bis vor einigen Jahren ging man davon aus, dass diese RNA-Sequenzen zehn verschiedene Proteine codieren. In den vergangenen Jahren wurden jedoch immer wieder neue Varianten der bekannten Proteine entdeckt, welche durch alternative Leseraster zustande kommen und Einfluss auf die Pathogenität besitzen.⁷⁻¹¹ Die Hülle der Viren besteht aus zwei Schichten. Hierbei handelt es sich um das Matrixprotein M1, welches von einer Lipiddoppelschicht umgeben ist. Das Influenzavirus präsentiert drei Membranproteine auf seiner Oberfläche: Das Matrixprotein M2, welches als Ionenkanal dient und die beiden Hauptantigene des Virus, das Hämagglutinin (HA) und die Neuraminidase (NA) (Abbildung 1).^{12,13} Bisher sind 16 Typen des Hämagglutinins und neun Typen der Neuraminidase bekannt.¹⁴ Die individuelle Kombination der Typen des Hämagglutinins und der Neuraminidase eines Virus wird als Bezeichnung des Subtyps verwendet. Influenza C Viren tragen nur sieben RNA Segmente und codieren ein Protein weniger als Viren der anderen beiden Gattungen. Sie besitzen weder Hämagglutinin noch Neuraminidase, sondern präsentieren auf ihrer Oberfläche, zusätzlich zum Matrixprotein

1 Einleitung

M2, das Hämagglutinin-Esterase-Fusion-Protein (HEF), welches die Funktionen von Hämagglutinin und Neuraminidase in sich vereinigt.¹⁵

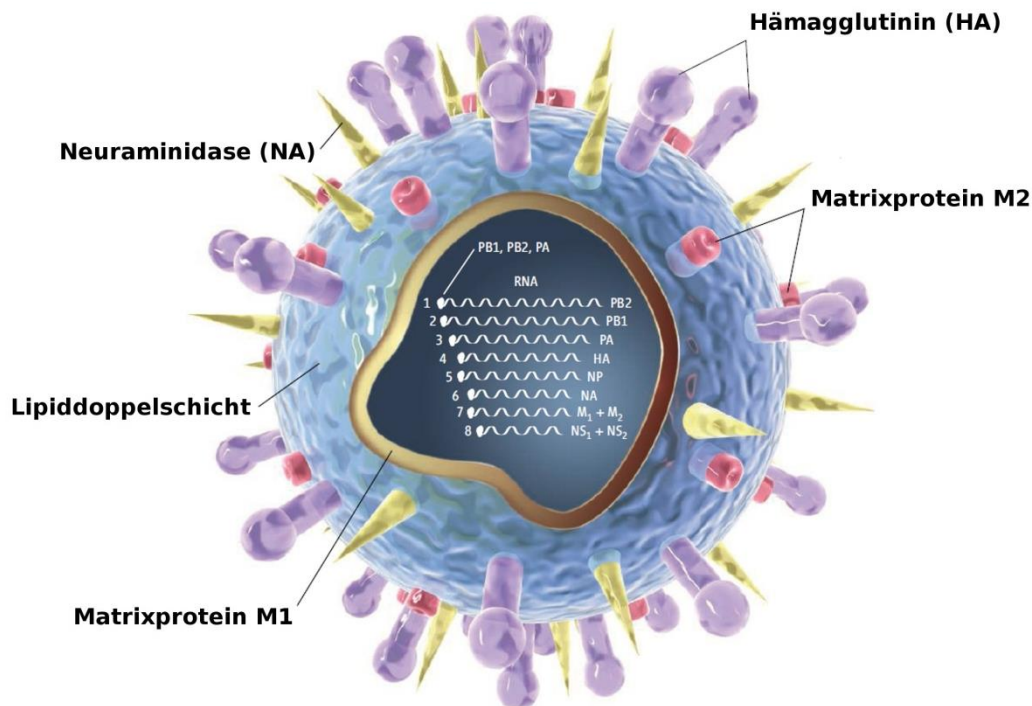


Abbildung 1: Darstellung eines Influenza A Virions. Im Inneren der zweischichtigen Hüllmembran befinden sich die acht RNA-Segmente und die viralen RNA-Polymerasen. Auf der Oberfläche sind die Membranproteine Hämagglutinin, Matrixprotein M2 und die Neuraminidase zu erkennen.¹⁶

Der Primärkontakt des Virus zu einer Zelle findet über Hämagglutinin statt, welches an Sialinsäurereste der Glycocalyx bindet. Diese Sialinsäurereste können α 2-3 oder α 2-6 mit der Galactose eines Lactosaminmotivs verknüpft sein. Jedes Hämagglutinin bindet spezifisch nur eine der beiden Varianten. Ausschlaggebend ist hierbei nicht die Verknüpfung selbst, sondern die daraus resultierende Topologie.¹⁷ Bei den menschlichen Epithelzellen des oberen respiratorischen Trakts sind diese Glycane α 2-6 sialyliert. Bei Vögeln ist die Verknüpfung hingegen α 2-3. Infektionen von Menschen durch Vogelgrippeviren treten aus diesem Grund in der Regel nur auf, wenn die Personen sehr stark mit dem Virus kontaminiert werden. Nach der Bindung des Virus auf der Zelloberfläche wird es durch Endocytose in die Zelle aufgenommen. Der niedrige pH-Wert im Endosomen aktiviert das Matrixprotein M2, welches dann Protonen in das Virusinnere durchlässt.^{13,18,19} Der sinkende pH-Wert führt zur Auflösung der Strukturen des Matrixproteins M1, an welchem die viralen Ribonucleoproteine (vRNP) immobilisiert sind.²⁰ Des Weiteren induziert der niedrige endosomale pH-Wert eine

1 Einleitung

Konformationsänderung des Hämagglutinins, wobei ein Fusionspeptid freigelegt wird (Abbildung 2).^{21,22} Dieses leitet dann die Fusion des Viruspartikels mit der Wirtszelle ein.

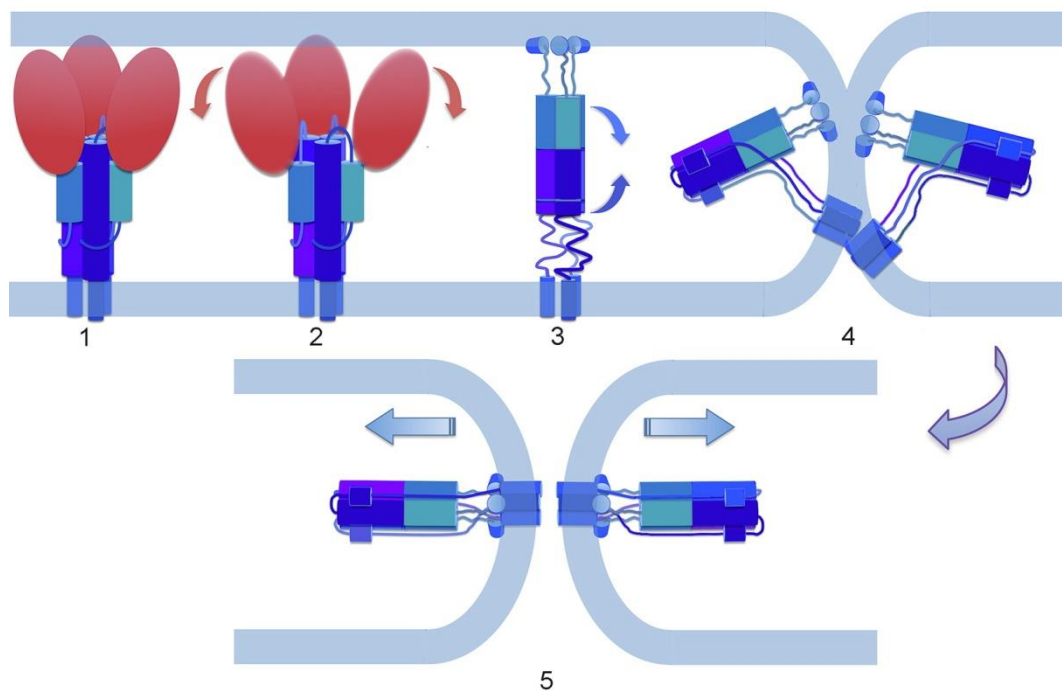


Abbildung 2: Schematische Darstellung der durch Hämagglutinin eingeleiteten Fusion. Die virale Membran ist jeweils unten dargestellt und die Wirtszellmembran oben. Die in rot abgebildete globuläre HA1-Kette bindet an die Zellmembran des Wirts (1). Wenn im Endosomen der pH-Wert sinkt, erfolgt eine Konformationsänderung, durch welche die HA1-Ketten nach außen dislozieren (2). Die HA1-Ketten bleiben mit den HA2-Ketten über Disulfidbrücken verbunden, werden aber in den folgenden Schritten nicht mehr abgebildet. Im Folgeschritt werden die Fusionspeptide aufgerichtet, welche dann direkt in der Zellmembran der Wirtszelle binden (3). Eine Änderung der Faltung der HA2-Ketten führt zunächst zur Verbindung von Zell- und Virusmembran (4) und anschließend zur Ausbildung einer Fusionspore (5).²³

Nach dem Transport der viralen RNA in den Nucleus der Wirtszelle beginnen die viralen Polymerasen PB1, PB2 und PA mit der Transkription und Replikation. Die Translation der viralen mRNA erfolgt dann wieder durch die Ribosomen der Wirtszelle. Nach posttranslationaler Modifikation der Proteine im Golgi-Apparat werden die viralen Membranproteine in die Zellmembran des Wirts eingebaut. Der letzte Schritt des Replikationszyklus ist das Ausknospen der neuen Virionen (Abbildung 3). Damit die Tochtervirionen sich von ihrer Wirtszelle ablösen können, wird die Neuraminidase aktiv und spaltet Sialinsäurereste der Glycocalyx ab.

1 Einleitung

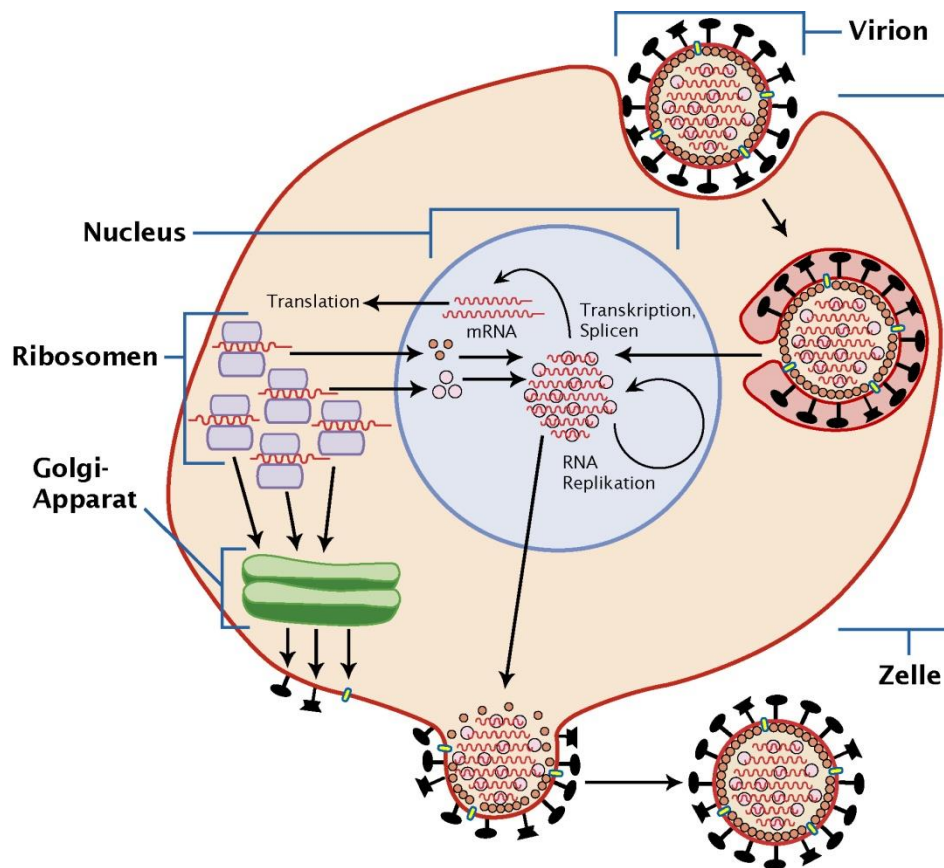


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Reproduktionszyklus von Influenzaviren. Nach dem Primärkontakt und der Endocytose wird die virale RNA durch virale Polymerasen repliziert und transkribiert. Die Translation erfolgt in den wirtseigenen Ribosomen. Virale Membranproteine werden nach posttranslationalen Modifikationen im Golgi-Apparat in die Zellmembran eingebaut. Anschließend können die Tochtervirionen ausknospen.²⁴

1.1.2 Evolution der Influenza

Das Genom des Influenzavirus besteht aus einzelsträngiger RNA negativer Polarität, welche innerhalb der Wirtszelle durch virale RNA-Polymerasen repliziert wird. Bei dieser Replikation kommt es zu etwa einer Fehlpaarung pro viralem Genom, welches knapp 14 000 Basenpaare groß ist.^{25,26} Derart häufige Mutationen ermöglichen den Viren, sich innerhalb kurzer Zeit äußeren Faktoren anzupassen. Dieser Mechanismus erklärt das schnelle Auftreten von Resistenzen gegen eingesetzte Medikamente.^{27,28} Die durch Punktmutationen schrittweise Variierung der Antigene des Virus wird *antigenic drift* genannt. Die fortwährende Veränderung verhindert eine langanhaltend wirkungsvolle Immunisierung des Wirts, da Antikörper sehr spezifisch ihr Substrat binden. Der *antigenic drift* ermöglicht auch einen Wechsel der Rezeptorspezifität. Der Austausch bereits einer Aminosäure kann dazu führen,

1 Einleitung

dass Hämagglutinin H5, welches in seiner nativen Form $\alpha 2$ -3 verknüpfte Sialinsäurereste bindet, eine deutlich gesteigerte Affinität für $\alpha 2$ -6 verknüpfte Reste erwirbt und somit potentiell infektiöser für Menschen sein kann.²⁹ Ein derartiger Wechsel der Wirtsspezifität kann auch durch einen anderen Mechanismus, den *antigenic shift*, auftreten. Dies ist eine Reassortierung genetischer Informationen zwischen Influenzaviren unterschiedlicher Stämme. Hierfür muss eine Zelle gleichzeitig von unterschiedlichen Grippeviren infiziert werden. Der *antigenic shift* kann nur bei Influenzaviren der Gattung A beobachtet werden.³⁰ Die Erreger der Grippepandemien von 1957 und 1968, sowie vermutlich auch die der „Spanischen Grippe“ von 1918, entstanden aus Vogelgrippeviren, welche sich dem Menschen als Wirt anpassten.³¹

1.1.3 Aviäre Influenza

In der Gruppe aviärer Influenza (AI) werden die Influenzaviren zusammengefasst, die hauptsächlich Vögel befallen. Innerhalb dieser Gruppe werden die Erreger entsprechend ihrer Pathogenität in *highly pathogenic avian influenza* (HPAI) - und *low pathogenic avian influenza* (LPAI) Viren unterteilt. Die hochpathogene Form wird häufig auch als Geflügelpest bezeichnet. Bei wildlebenden Vögeln sind Wasservögel besonders betroffen und an der Verbreitung des Erregers beteiligt. Das Virus kann im Verdauungstrakt der Tiere seine Infektiosität erhalten und sich auch vervielfältigen ohne zwangsläufig den ganzen Organismus seines Wirts zu befallen.³² Auch bei Nutztieren kommt es immer wieder zu Ausbrüchen mit teilweise rasanter Verbreitung des Virus. Als Gegenmaßnahme wird in der Regel der betroffene und gefährdete Tierbestand gekeult. Dies verursacht erhebliche wirtschaftliche Einbußen, unter anderem durch die Kosten für die durchgeführten Maßnahmen, den Verlust an Nutztieren und den Ausfall von Einnahmen. Die Höhe der Schäden einer Epidemie kann mehrere hundert Millionen Euro betragen.^{33,34} Besondere, weltweite Aufmerksamkeit erhielt die HPAI im Jahre 1997. Bei einem zunächst epidemischen Ausbruch des HPAI Subtyps H5N1 unter domestiziertem Geflügel wurden erstmals auch Menschen mit dem Virus infiziert. Von den nur 18 infizierten Menschen starben sechs.³⁵ Die weitere pandemische Ausbreitung wurde durch Massentötungen von Nutzvögeln erfolgreich eingedämmt. Ein Virus des gleichen Subtyps führte im Jahr 2003 zu einem erneuten Ausbruch der Vogelgrippe im südostasiatischen Raum. Ein Jahr später wurden, vor allem in Thailand und Vietnam, weitere pandemische Ausbrüche des Virus beobachtet. Zugvögel verbreiteten diese Pandemie bis nach Afrika und Europa. Seither konnte immer wieder beobachtet werden, dass Menschen,

1 Einleitung

die engen Kontakt zu infizierten Vögeln hatten, sich mit dem Virus ansteckten. Eine Übertragung von Mensch zu Mensch konnte jedoch bisher nicht registriert werden. Die WHO erfasste seit 2003 842 laborbestätigte Infektionen von Menschen durch H5N1. 447 dieser Erkrankten starben (Stand: 23.6.2015).³⁶ Die Mortalitätsrate von über 53 % des HPAI Virus ist auffällig hoch. Bisher wurde eine Vielzahl von Ursachen hierfür entdeckt, jedoch ist es bei weitem noch nicht in Gänze verstanden.³⁷ Ein bekannter Unterschied zwischen HPAI und LPAI ist eine Mutation im Nichtstrukturprotein NS1. Allgemein ist NS1 ein Interferonantagonist, der im Virion nicht vorkommt, aber in der infizierten Zelle exprimiert wird. Die Mutation im NS1 von HPAI führt dazu, dass es verglichen mit dem von LPAI zusätzlich an 30 PDZ-Domänen von 24 Proteinen in menschlichen Zellen binden kann. Die Folgen hiervon sind jedoch bislang unbekannt.³⁸ Weitaus besser verstanden ist hingegen der Einfluss von Variationen des Hämagglutinins H5 auf die Pathogenität.

1 Einleitung

1.2 Das Hämagglutinin H5 und sein Einfluss auf die Pathogenität

Hämagglutinin ist eines der Hauptantigene von Influenzaviren der Gattungen A und B. Das Virus präsentiert das homotrimere Lectin mit einer Häufigkeit von 2-4 Kopien pro 100 nm^2 auf seiner Oberfläche (Abbildung 4).³⁹

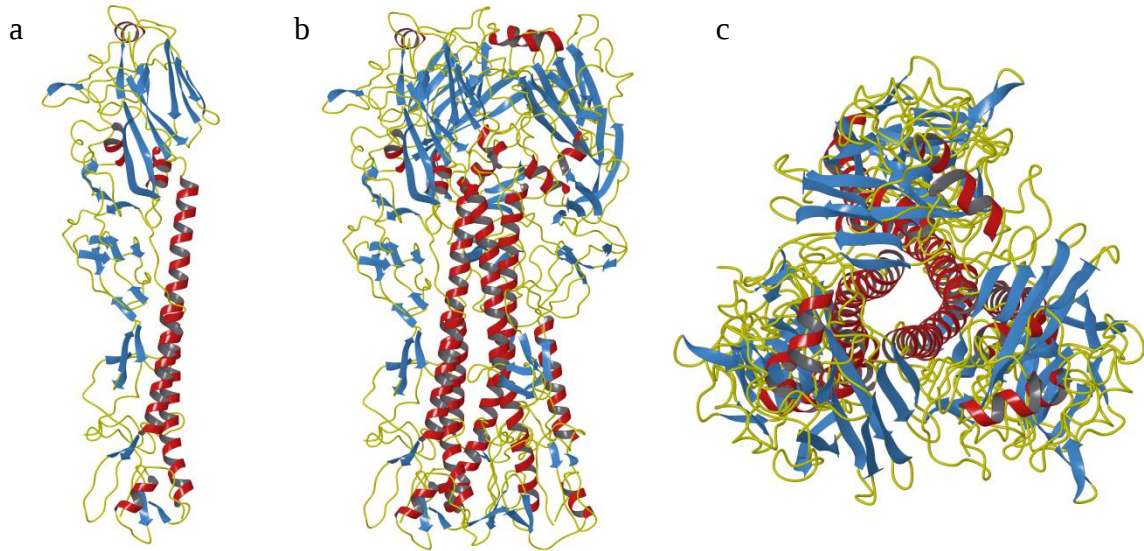


Abbildung 4: Darstellung der räumlichen Struktur des Hämagglutinins des Influenzavirus der Grippepandemie von 1918 als *ribbon-Model* (PDB: 1RUZ).⁴⁰ Die einzelnen Darstellungen zeigen das Monomer (a) und das Trimer (b) in der Seitenansicht und das Trimer in der Draufsicht (c). α -Helices sind in rot, β -Faltblätter in blau und *random coil* in gelb eingefärbt. Der obere, globuläre Teil beinhaltet die Bindungstasche für die Sialinsäurereste.

Die Bindung des Substrats Sialinsäure ist mit einer Dissoziationskonstante K_D von ungefähr 10^{-3} M relativ schwach.⁴¹ Die notwendige sehr starke Bindung der Influenzaviren an eine Zelle lässt sich nur durch polyvalente Bindungsereignisse erklären. Durch diese sind Affinitätssteigerungen um einen Faktor von bis zu 10^{10} möglich.³⁹

Die Expression des Hämagglutinins erfolgt als Vorläuferprotein HA0, welches die beiden Untereinheiten HA1, HA2 und ein Verbindungspeptid enthält, das bei der Reifung des Proteins entfernt wird.⁴²⁻⁴⁵ Die Untereinheiten sind über eine Disulfidbrücke kovalent miteinander verbunden. Die Reifung des Hämagglutinins ist ein Prozess mit entscheidender Bedeutung für die Pathogenität des Virus.⁴⁶⁻⁴⁸ Bei LPAI Viren geschieht die Reifung in der

1 Einleitung

Regel außerhalb der Wirtszelle.^{42,49,50} Die Entfernung des Verbindungspeptids des HA0 dieser Viren wird nur von einigen wirtseigenen Proteasen durchgeführt, welche bei Säugetieren nur im Lungengewebe vorkommen. Bei HPAI Viren kann diese Reifung auch durch andere Proteasen erfolgen, was diese Viren befähigt sich in einer Vielzahl von Gewebearten zu vervielfältigen.⁵¹ Die Reifung des HPAI Hämagglutinins erfolgt meist bereits vor dem Ausknospen aus der Wirtszelle.⁵² Variationen dieser Art sind bisher nur bei H5 und H7 bekannt und somit auf Vogelgrippeviren beschränkt. Da jedoch die Adaption auf den Menschen möglich ist, besteht die unmittelbare Notwendigkeit für wirksame Arzneistoffe.

1.3 Therapeutische Möglichkeiten

Bisher gibt es nur sehr eingeschränkte Möglichkeiten einer Influenzaepidemie vorzubeugen bzw. eine akute Erkrankung zu behandeln. Von einer prophylaktischen Verabreichung von Influenzamedikamenten wird in der Regel abgesehen. Als einzige vorbeugende Maßnahme, besonders für größere Gruppen von Individuen, ist die Impfung anzusehen. Diese hat allerdings zum Nachteil, dass Impfstoffe meist sehr spezifisch für einen Virus sind. Demnach kann mit der Herstellung des Impfstoffs erst begonnen werden, wenn der Erreger bekannt ist. Bis zur Einsatzbereitschaft des Impfstoffs vergehen dann ca. acht Monate.⁵³ Bei akuten Erkrankungen stehen derzeit Medikamente aus zwei verschiedenen Wirkstoffklassen zur Verfügung: M2-Membranprotein-Hemmer und Neuraminidase-Hemmer. Die Hemmung der M2-Aktivität beeinträchtigt die Reproduktionsfähigkeit der Influenzaviren zu zwei Zeitpunkten ihres Lebenszyklus. Die Inhibition des M2-Membranproteins verhindert zum einen, dass vor dem *uncoating* von Influenza A Viren in der Wirtszelle die viralen Ribonucleoproteine (vRNP) und das Matrixprotein M1 dissoziieren.^{12,54} Der Komplex aus beiden ist nicht in der Lage den Zellnucleus zu penetrieren. Zum anderen kann der inhibierte Ionenkanal M2 nicht mehr den pH-Wert im *trans*-Golgi-Netzwerk erhöhen. Dies ist jedoch essentiell für erfolgreiche Reifung des säurelabilen Hämagglutinins.⁵⁵ Beispiele für Wirkstoffe dieser Klasse sind Amantadin und Rimantadin (Abbildung 5).⁵⁶ Vor allem wegen des häufigen Auftretens von Resistenzen, aber auch wegen des Spektrums an Nebenwirkungen, werden diese Mittel nur selten eingesetzt.

Aus der Gruppe der Neuraminidase-Hemmer war Zanamivir der erste auf den Markt eingeführte Wirkstoff. Durch das Inhibieren der Neuraminidase wird das *budding*, also das Ausknospen aus der Wirtszelle gestört, da sich die Virionen nicht mehr von der

1 Einleitung

Zelloberfläche lösen können. Nachteilig bei Zanamivir ist die schlechte Bioverfügbarkeit bei oraler Gabe. Beim Passieren des Magen-Darm-Trakts werden nur ca. 2 % des Wirkstoffs aufgenommen.⁵⁷ Er wird deshalb seit 1999 unter dem Namen Relenza® als Pulver zur Inhalation von GlaxoSmithKline vertrieben. Mit dem Ziel diesen Nachteil zu überwinden, wurde ein weiterer Wirkstoff aus der Gruppe der Neuraminidase-Hemmer von Gilead Sciences und F. Hoffmann-La Roche entwickelt, Oseltamivir. Die sehr viel höhere Bioverfügbarkeit bei oraler Verabreichung ermöglicht eine Distribution in Tablettenform.⁵⁸ Seit der Erteilung der Arzneimittelzulassung in der Europäischen Union im Jahre 2002 wird der Wirkstoff unter dem Handelsnamen Tamiflu® durch F. Hoffmann-La Roche vertrieben.

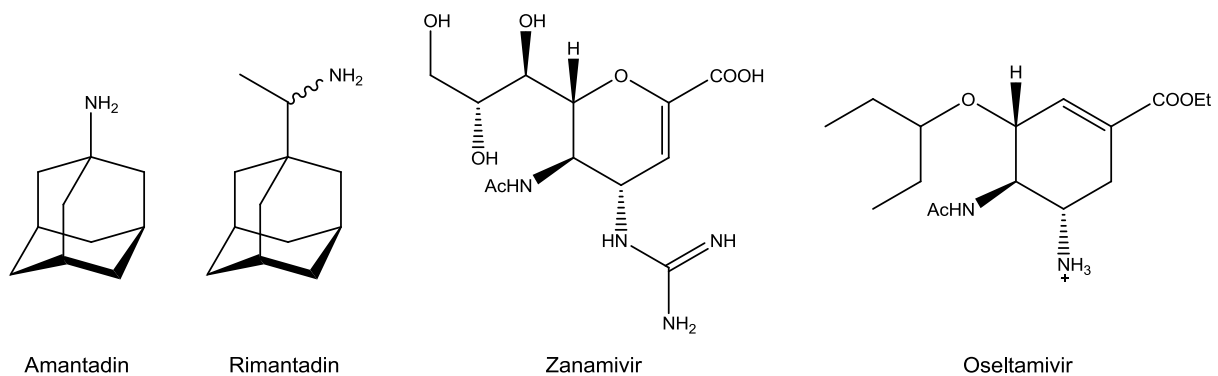


Abbildung 5: Strukturformeln der M2-Membranprotein-Hemmer Amantadin und Rimantadin und der Neuraminidase-Hemmer Zanamivir und Oseltamivir.

Bei klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass sich durch Oseltamivir eine Verkürzung der Krankheitsdauer um ca. 20 % erreichen lässt.⁵⁹ Hierbei ist es von entscheidender Bedeutung, dass mit der Einnahme frühzeitig begonnen wird.⁶⁰ Oseltamivir ist nicht nur in der Lage die Krankheitsdauer zu reduzieren, sondern es führt zusätzlich zu einer Abschwächung der Symptome. Dieser Effekt ist besonders für alte und geschwächte Menschen von entscheidender Bedeutung. In Studien konnte weiterhin gezeigt werden, dass eine prophylaktische Einnahme teilweise zu einem starken Rückgang der Neuinfektionen führte.⁶¹ Um pandemische Ausbrüche einzudämmen, ist eine Impfung dennoch praktikabler. Bei Neuraminidase-Hemmern konnten anfangs, im Gegensatz zu den M2-Membranprotein-Hemmern, nur vereinzelte Fälle von Resistenzen beobachtet werden.^{62,63} Seit 2007 wurde jedoch ein Anstieg der Anzahl an Oseltamivir-resistenten Virenstämmen verzeichnet. In den

1 Einleitung

USA wurden während der Grippesaison 2008/2009 264 der 268 untersuchten Virenstämme von Influenza A (H1N1) positiv auf Oseltamivirresistenz getestet.⁶⁴ Dies zeigt, dass fortwährend ein Bedarf an neuartigen und effektiven Arzneistoffen besteht.

2002 hat die japanische Firma Toyama Chemical Co. Ltd. erste Studien zur Wirksamkeit eines Pyrazinamids gegen Influenzaviren veröffentlicht.⁶⁵ Die Substanz T-705 und einige weitere ähnliche Verbindungen zeigten bei weiteren Untersuchungen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Aktivität gegen verschiedene RNA-Viren, unter anderem auch Ebola.^{66,67} Dieses brachte der Substanz eine für einen noch in klinischen Studien befindlichen Wirkstoff ungewöhnliche mediale Aufmerksamkeit. Bei der Ebolaepidemie 2014 in Westafrika wurde T-705 eingesetzt, um eine französische Krankenschwester, welche sich bei einem humanitären Einsatz angesteckt hatte, zu behandeln. Zu diesem Zeitpunkt hatte T-705 weltweit keine Arzneimittelzulassung. Zur Eignung als Influenzamedikament wurden bereits klinische Phase III Studien in Japan und den USA durchgeführt.⁶⁸ Die Pyrazinamide sind Prodrugs. Im Körper werden die Purinanaloga zum entsprechenden Ribofuranosyltriphosphat umgesetzt. Diese wiederum inhibieren die virale RNA-Polymerase und führen beim Einbau in virale RNA zum Kettenabbruch.^{69,70} Hierbei scheinen die Substanzen hochspezifisch zu sein, da die RNA-Synthese der Wirtszelle nicht gestört wird.

Ein weiterer Therapieansatz ist die Inhibition des Hämagglutinins. Bislang gibt es noch keinen Wirkstoff in der Klasse der Hämagglutinininhibitoren, der Marktreife erlangt hat. Es gibt jedoch eine Vielzahl von Studien mit Inhibitor unterschiedlichster Substanzklassen. Unter anderem gibt es Untersuchungen zu peptidischen Inhibitoren, RNA-Aptamere, Antikörper und Derivate der Sialinsäuren, bei welchen es Studien zu mono- und polyvalenten Ansätzen gibt.⁷¹⁻⁷⁵ Bei *in vitro* Untersuchungen konnten mit polyvalenten Liganden vielversprechende Affinitäten zu Hämagglutininen erzielt werden.⁷⁶⁻⁷⁸ Als tatsächliche Medikamente eignen sich derartige Makromoleküle in der Regel nicht, da sie tendenziell unvorteilhafte pharmakokinetische Eigenschaften besitzen.³⁹ Bei Designversuchen für monovalente Inhibitoren wurden bereits viele Studien mit Derivaten der Neuraminsäure durchgeführt. Die meisten Modifikationen und Substitutionen am Grundgerüst der Neuraminsäure ergaben keine stark bindenden Liganden des Hämagglutinins.^{41,79,80} Beispielsweise die Einführung einer Naphtylgruppe an einem *spacer*, der glycosidisch an die Sialinsäure gebunden ist, zeigte eine verglichen mit dem Methylglycosid der *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac α 2Me) um den Faktor 64 gesteigerte Affinität zu Hämglutinin H3. Eine zusätzliche 4-O-Dansylglycyl-

1 Einleitung

Substitution an der Sialinsäure erhöhte die Affinität um einen Faktor von ca. 1000 gegenüber Neu5Ac α 2Me.⁸¹

Im Rahmen der Doktorarbeit von M. Hollinger wurden Derivate der Neuraminsäure durch strukturbasiertes Wirkstoffdesign entwickelt, synthetisiert und auf ihre Bindungsaffinität zu Hämagglutinin H5 untersucht.⁸² Die Liganden lassen sich in zwei verschiedene Kategorien einsortieren. Bei einer hiervon wurden Variationen von Aglyconen entworfen und getestet. Dieser Ansatz basierte auf einem von Toogood et al. publiziertem Sialinsäureglycosid, welches für Hämagglutinin H3 entworfen wurde.⁸³ Dieser Ansatz führte über mehrere Designschritte, bei denen unter anderen die Länge des Aglycons und die endständige aromatische Gruppe variiert wurden, zu dem optimierten Liganden 1, der bei STD-NMR-Messungen einen um den Faktor 16 besseren K_D -Wert als Neu5Ac α 2Me aufwies (Verbindung 1, Abbildung 6).

Beim zweiten Ansatz zur Entwicklung neuer Liganden für H5 wurden Modifikation am Grundgerüst der Neuraminsäure selber durchgeführt. Durch oxidative Spaltung der Glycerolseitenkette und anschließender reduktiver Aminierung wurden Aminokonjugate von trunkierten Sialinsäuren dargestellt. Die oxidative Spaltung lässt sich an zwei verschiedenen Stellen durchführen: Zwischen C7 und C8 bzw. zwischen C8 und C9. Die Aminokonjugate der bis zum C7 verkürzten Sialinsäuren zeigten nur schwach verbesserte Bindungseigenschaften. Die C8-Aminokonjugate hingegen erreichten teilweise deutlich erhöhte Affinitäten zu H5. Für zwei Liganden konnten durch SPR-Messungen K_D -Werte bestimmt werden, die um den Faktor 21 bzw. 24 besser waren als der von Neu5Ac α 2Me (Verbindungen 2 und 3, Abbildung 6).

1 Einleitung

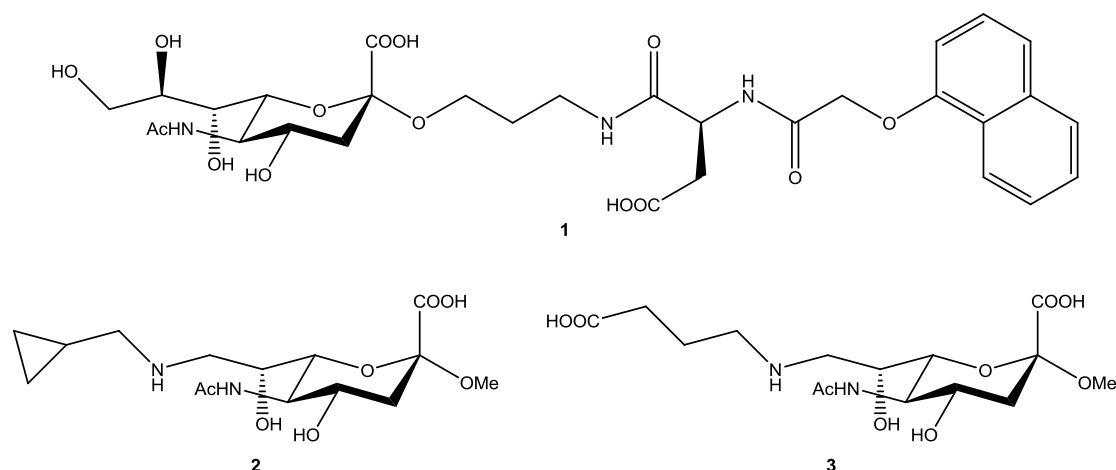


Abbildung 6: Strukturen der von M. Hollinger entworfenen und synthetisierten Liganden des Hämagglutinins H5.⁸² Für den Liganden 1 konnte per STD-NMR ein K_D -Wert von 171 μM bestimmt werden. Für den Liganden 2 wurde ein K_D -Wert von 68.0 μM und für den Liganden 3 ein K_D -Wert von 58.9 μM durch SPR-Messungen bestimmt.

Die Arbeiten von M. Hollinger zeigten, dass die Bindungsstärke von Sialinsäuren durch spezielle Aglycone oder eine Modifikation des Grundgerüsts deutlich gesteigert werden kann.⁸² Da sich diese beiden Strategien nicht gegenseitig ausschließen, ist eine Kombination dieser ein höchstinteressanter Ansatz. Ein derartiger Ligand kann in der Theorie eine Bindungsstärke erreichen, welche deutlich höher liegt als die der Liganden, von denen er abgeleitet wurde.

Die Modifizierung der Neuraminsäure ist, wie diese Arbeiten zeigen, durchaus eine vielversprechende Strategie, um im Rahmen des rationellen Wirkstoffdesigns verbesserte Leitstrukturen zu erzeugen.

1.4 Wirkstoffdesign

Das Bewusstsein, wie Krankheiten entstehen bzw. was sie verursacht, ist ein recht modernes. Als der römische Gelehrte Marcus Terentius Varro (* 116 v. Chr.; † 27 v. Chr.) mutmaßte, dass Krankheiten durch Tiere verursacht würden, die so klein seien, dass sie mit dem Auge nicht zu erkennen sind, war er seiner Zeit sehr weit voraus. Der Begriff Influenza (italienisch für Einfluss) hat seinen Ursprung aus dem bis ins Mittelalter gültigen Glauben, dass Krankheiten durch den Einfluss von Planetenkonstellationen entstünden. Die Erkenntnis, dass

1 Einleitung

es Stoffe gibt, welche Krankheiten heilen oder zumindest Symptome lindern können, ist jedoch ebenfalls bedeutend älter als die moderne Pathogenese. Bei altertümlichen Arzneien handelte es sich meist um Naturstoffe oder deren Zubereitungen. Von diesen waren nicht wenige wirkungslos und etliche sogar schädlich. Ihre Entdeckung beruhte meist auf dem Zufall. Anfang des 19. Jahrhunderts wurden erste gezielte Untersuchungen zu den Naturstoffzubereitungen durchgeführt. Immer häufiger zeigte sich hierbei, dass die Wirkung der Zubereitung meist auf nur einzelne Inhaltsstoffe zurückzuführen ist. Mit fortschreitender Etablierung der organischen Chemie wurden diese Stoffe zunehmend derivatisiert, um ihre Wirksamkeit und Verträglichkeit zu verbessern. Das mangelnde Wissen über die Wirkmechanismen verhinderte jedoch zielgerichtete Derivatisierungen. Mit dem Zusammenkommen neuer Technologien und Erkenntnisse im 20. Jahrhundert änderte sich dies erheblich. An Krankheiten beteiligte Enzyme konnten identifiziert und isoliert werden. Röntgenkristallographie und andere Strukturaufklärungsverfahren erlaubten die Erzeugung ausreichend genauer Strukturmodelle. Immer leistungsfähigere Computer ermöglichten stetig komplexere Simulationen, Berechnungen und auch Visualisierungen. Das somit enorm gesteigerte Verständnis für die Wirkweise eines Arzneistoffs und die Entstehung einer Krankheit ermöglichen die Optimierung eines Wirkstoffs auf ein bekanntes *target*, noch bevor eine Synthese durchgeführt werden muss.

Um einen neuen Wirkstoff zu kreieren, muss zunächst ein *target* identifiziert werden. Dies ist im Regelfall ein Enzym, welches zentral bei der Entstehung einer Krankheit oder am Fortbestehen eines Erregers beteiligt ist. Im nächsten Schritt wird anhand des *targets* eine Leitstruktur für den Wirkstoff entwickelt. Hierfür wird teilweise das natürliche Substrat des Rezeptors verwendet. Alternativ können *screenings* von großen Substanzbibliotheken, entweder real oder *in silico*, sowie computergestütztes *de novo*-Design angewendet werden. Die anschließende Optimierung der Leitstruktur erfolgt als iterativer Prozess. Den Beginn eines Designzyklus bildet in der Regel eine *in silico* Optimierungen der Leitstruktur. Nach erfolgreicher Synthese des Moleküls wird *in vitro* die Affinität zum *target* bestimmt. Diese Daten werden anschließend genutzt, um eine Struktur-Wirkungsbeziehungen (*structure activity relationship*, SAR) herzustellen, welche beim folgenden Designzyklus in die weitere Optimierung der Struktur einfließt. Im Allgemeinen bedarf es einer Vielzahl solcher Designzyklen, bevor aus einer anfänglichen Leitstruktur ein vielversprechender Wirkstoffkandidat wird, welcher dann in die weitere Entwicklung geht. Die weitere Evaluation der potentiellen Wirkstoffe bezüglich ihrer toxikologischen und

1 Einleitung

pharmakologischen Eigenschaften erfolgt am Tiermodell und teilweise zusätzlich an einfacheren Organismen. Erst anschließend können klinische Studien an Menschen absolviert werden. Diese werden in fünf aufeinander folgende Phasen eingeteilt. In der ersten Phase (bezeichnet als Phase 0) werden die pharmakodynamischen und -kinetischen Daten ermittelt. Die Probandengruppe umfasst dabei nur wenige (10-15) Personen. In Phase 1 werden an Gruppen von ca. 20-80 Personen sicherheitsbezogene Daten gesammelt. Der Nachweis der Wirksamkeit im Vergleich mit einem Placebo erfolgt in Phase 2 mit ca. 100-300 Probanden. In der letzten klinischen Phase (Phase 3) werden nochmals abschließend Sicherheit und Wirksamkeit des Wirkstoffes bestätigt. Diese Studie wird mit ca. 1000-3000 Probanden durchgeführt. Die Quote der Wirkstoffkandidaten, die diese Studien erfolgreich durchlaufen liegt bei ca. 4-7 %.⁸⁴ Die häufigsten Gründe für ein Scheitern sind schlechte pharmakokinetische Eigenschaften und fehlende Wirkung.⁸⁵ Wesentlich seltener sind es nicht absehbare Nebenwirkungen, da die präklinischen Untersuchungen am Tiermodell, trotz eingeschränkter Übertragbarkeit auf den Menschen, gute Ergebnisse liefern.⁸⁶ Als Phase 4 wird die fortwährende Beobachtung des Medikaments nach seiner Markteinführung bezeichnet. Diese Phase dient vor allem der Erkennung von seltenen Nebenwirkungen und Langzeitfolgen. Für den gesamten Prozess der Entwicklung bis zur Marktreife und offiziellen Zulassung werden im Regelfall 12-24 Jahren benötigt und schätzungsweise Kosten im Bereich von 500 Mio. bis 1.4 Mrd. US\$ verursacht.^{84,87,88}

2 Aufgabenstellung

Die Erreger der aviären Influenza des Subtyps A/(H5N1) führen seit langem zu pandemischen Ausbrüchen unter Wild- und Nutzvögeln. Dies allein verursacht gewaltige wirtschaftliche Schäden.^{33,34} Seit 1997 werden jedoch zusätzlich immer wieder Fälle beobachtet, bei denen auch Menschen durch die hochpathogene Form dieser Erreger infiziert werden. Die Sterberate ist mit über 50 % außergewöhnlich hoch.³⁶ Epidemien unter Menschen sind bisher ausgeblieben, da das Virus nicht zu einer Mensch-zu-Mensch-Übertragung befähigt ist. Eine Adaption an den Menschen als Wirt wäre indes bereits durch geringfügige Mutationen möglich.^{29,89,90} Die bisherigen Therapiemöglichkeiten sind für den Fall einer Pandemie eines hochpathogenen Influenzaerregers nicht ausreichend, da bisher zugelassenen Wirkstoffe nur eine geringe Wirksamkeit besitzen und bereits nach kürzester Zeit Resistenzen auftreten.^{59,60,64} Ein zuverlässiger Impfstoff kann erst entwickelt werden, wenn der Erreger bekannt ist und benötigt dann zu viel Zeit für Entwicklung und Produktion.⁵³

Ziel dieser Arbeit war es zur Weiterentwicklung des *entry*-Inhibitorkonzepts neue Liganden des Hämagglutinin H5 zu erzeugen. Hierbei sollten *in silico* basierte Verfahren sowohl zum *de novo* Design als auch zur optimierenden Modifikation des natürlichen Liganden angewendet werden. Das Konzept der Neuraminsäure-basierten Liganden sollte auf den Ergebnissen zweier vorangegangener Arbeiten beruhen.^{82,91} Für die kreierte Strukturen sollten Synthesestrategien entwickelt, durchgeführt und optimiert werden. Die isolierten und charakterisierten Liganden sollten dann bezüglich ihrer Affinität zu ihrem *target* untersucht werden. Zur Quantifizierung der Bindungsstärke sollten SPR-Spektroskopie und STD-NMR-Spektroskopie als Verfahren angewendet werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

Bei der Entwicklung neuer Liganden des Hämagglutinin H5 wurden verschiedene Aspekte beleuchtet. Als erstes wurde ein vollständig artifizieller Ligand *de novo* mit Hilfe virtueller Methoden entworfen und anschließend synthetisiert (Abschnitt 3.1). Sowohl das *in silico* durchgeführte *screening* durch *docking* von Strukturen aus Substanzdatenbanken als auch das Fragment-basierte Design neuartiger Leitstrukturen lieferte einen aussichtsreichen Kandidaten als Ergebnis. Der synthetische Zugang zu diesem konnte erfolgreich etabliert werden. Der zweite Aspekt in Abschnitt 3.2 war die Ausarbeitung einer Modifikation des Neuraminsäuregrundgerüsts. Die Alternativen wurden Bindungsstudien *in silico* unterzogen und darauf folgend bezüglich ihrer Synthetisierbarkeit und experimentell bestimmten Affinität zum *target* bewertet. Abschließend wurde dann in Abschnitt 3.3 zunächst eine Synthesestrategie für die in einer vorangegangenen Arbeit entwickelten Neuraminsäure-basierten Liganden etabliert.⁹¹ Bei *in vitro* Bindungsstudien konnte gezeigt werden, dass diese Liganden sehr gute Affinitäten zu Hämagglutinin H5 aufwiesen.

3.1 Struktur-basierter Entwurf eines vollständig artifiziellen Inhibitors

Im Rahmen eines virtuellen *screenings* wurden ca. 1500 Strukturen für ein *ligand docking* eingesetzt. Anhand des *docking scores* wurden dann die Ergebnisse evaluiert und *hits* bzw. Leitstrukturen identifiziert. Durch Modifikation einer vielversprechenden Leitstruktur wurde dann ein neuartiger Wirkstoffkandidat kreiert. Hierbei wurden stets Affinität und Synthetisierbarkeit als wichtigste Kriterien berücksichtigt. Die erhaltene Struktur wurde einer retrosynthetischen Analyse unterzogen und im Folgenden erfolgreich dargestellt. Von Bindungsstudien musste aufgrund zu geringer Löslichkeit in wässrigen Lösungen abgesehen werden. Infolge der Ermangelung der experimentellen Quantifizierbarkeit der Bindungsstärke erschien eine weitere Verfolgung dieses Ligandenkonzepts als impraktikabel.

3.1.1 Virtuelles Fragmentscreening und Inhibitor-design

Es wurden drei von Schrödinger LLC bereitgestellte Strukturbibliotheken jeweils einzeln beim Glide *docking* eingesetzt. Von jedem Ergebnissatz wurden die nach *docking score* besten 20 % der generierten *poses* genauer betrachtet. Dabei wurde primär auf wiederkehrende Strukturelemente in gleichen Regionen geachtet. Die meisten der wiederholt

3 Ergebnisse und Diskussion

auftauchenden polaren Wechselwirkungen waren analog zu denen des natürlichen Liganden. Dieser steht durch ein vielfältiges Netzwerk an H-Brückenbindungen mit dem Protein in Wechselwirkung (Abbildung 7).

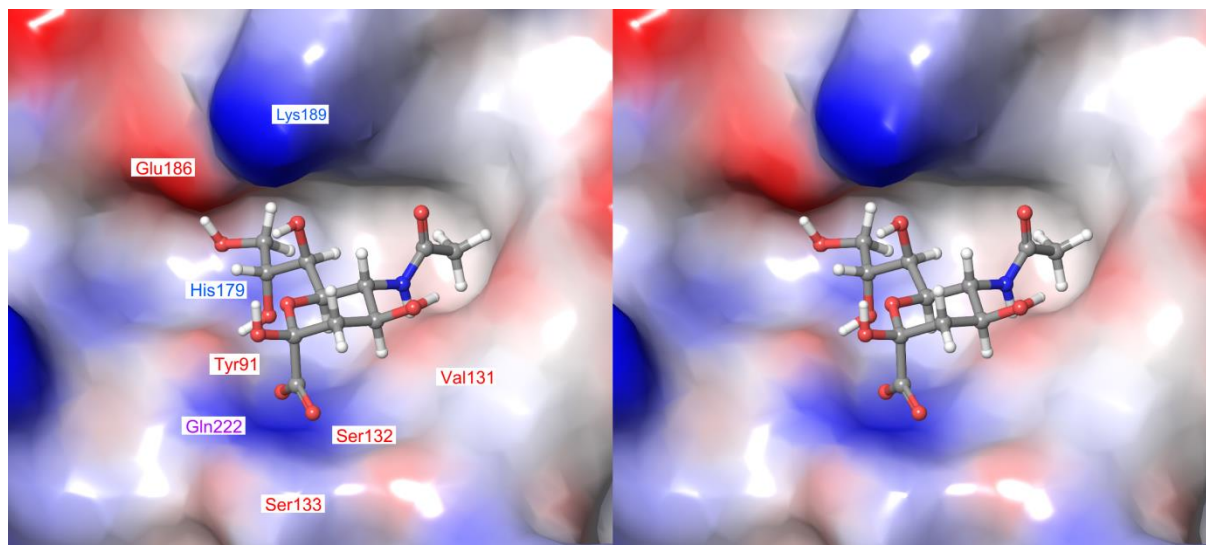


Abbildung 7: *Crossed-eye* Darstellung der *N*-Acetylneuraminsäure in der Bindungstasche des Hämagglutinins H5. Die Aminosäuren, zu welchen die wichtigsten polaren Wechselwirkungen eingegangen werden sind beschriftet. Das C-1 Carboxylat akzeptiert H-Brücken von Ser132, Ser133 und Gln222. Das C-5 amidische NH baut eine H-Brücke zum Rückgrat von Val131 auf. An der Glycerolseitenkette bilden sich H-Brücken zwischen C-7 OH und Lys189, zwei von C-8 OH zu Tyr91/Gln222 und zwei weitere zwischen His179/Glu186 aus. Die Proteinoberfläche ist entsprechend des elektrostatischen Potentials eingefärbt. Blau entspricht einem positiven, rot einem negativen und grau einem neutralen Potential.

Die Wasserstoffbrücken zu Ser132, Ser133, Glu186 und Lys189, von denen die ersten beiden im natürlichen System durch die Carboxylatfunktion und die beiden letzteren durch die Hydroxylgruppen an C-7 und C-9 der Neuraminsäure aufgebaut werden, wurden durch die gedockten Moleküle besonders häufig nachempfunden. In Abbildung 8 ist dies exemplarisch für das Fragment **287** (Abbildung 9) aus der „Schrödinger Fragment Library“ dargestellt.

3 Ergebnisse und Diskussion

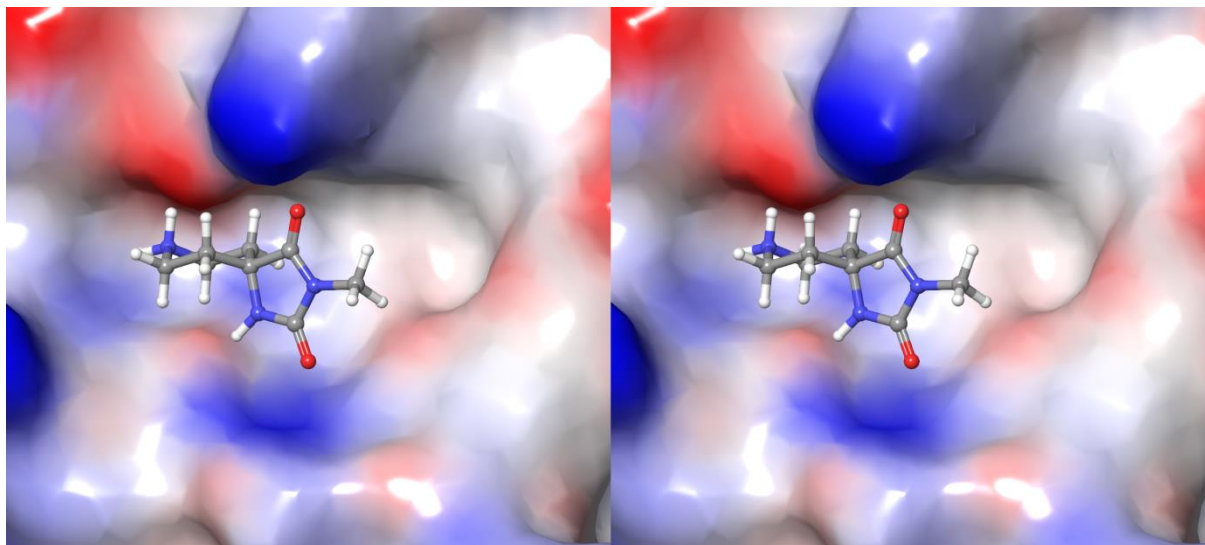


Abbildung 8: *Crossed-eye* Darstellung einer beispielhaften Struktur (Fragment 287) aus der „Schrödinger Fragment Library“ in der Bindungstasche des Hämagglutinins H5. Der untere Carbonylsauerstoff akzeptiert eine H-Brücke von Ser132. Der obere eine von Lys189. Die Ammoniumgruppe des Piperidinsystems baute eine H-Brücke zu Glu186 auf. Vergleichbare Wechselwirkungen wurden bei einer Vielzahl der Strukturen gefunden. Die Proteinoberfläche ist entsprechend des elektrostatischen Potentials eingefärbt. Blau entspricht einem positiven, rot einem negativen und grau einem neutralen Potential.

Weiterhin zeigte sich bei einer Vielzahl von Strukturen, dass die Kavität, in welche sich die Acetylgruppe der *N*-Acetylneuraminsäure einpasst, vielfach durch unpolare Reste belegt wurde. Bei Liganden, die über längere unpolare Reste verfügten, war wiederholt zu beobachten, dass sich diese in eine Furche des Proteins legten, welche sich von der Bindungstasche weiter in Richtung der Kopfgruppe des Proteins erstreckte.

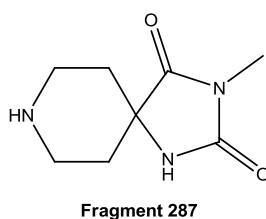


Abbildung 9: Struktur des Fragments 287 aus der „Schrödinger Fragment Library“. Dieser exemplarisch gewählte Ligand empfand gleich mehrere essentielle Wechselwirkungen des natürlichen Protein-Ligand-Systems nach.

3 Ergebnisse und Diskussion

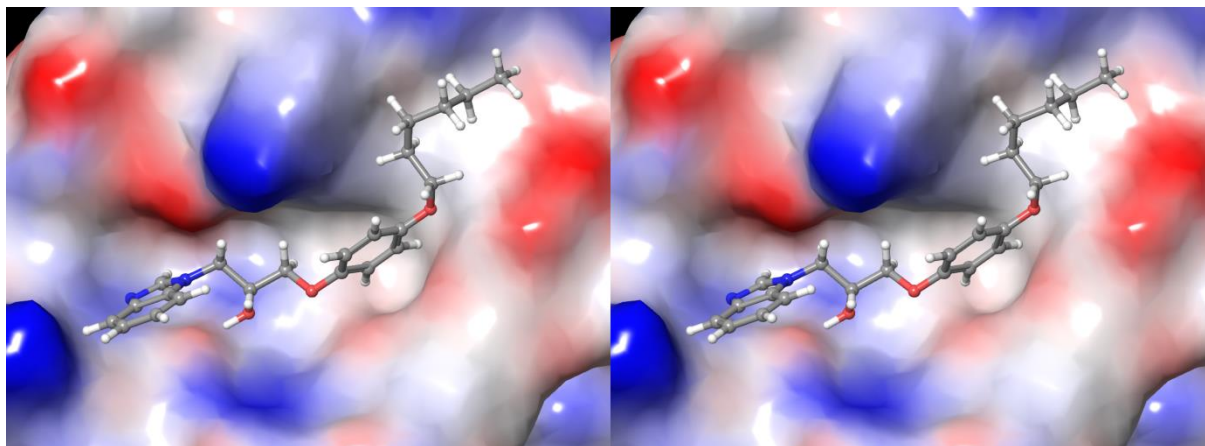


Abbildung 10: *Crossed-eye* Darstellung der exemplarisch gewählten Struktur 708245 aus dem „Glide Drug-Like Ligand Decoys Set“ in der Bindungstasche des Hämagglutinins H5. Zu erkennen ist, dass das Hydrochinolat den gleichen Raum einnimmt, wie zuvor die *N*-Acetylgruppe des natürlichen Liganden. Die Hexylkette legte sich in Richtung der Kopfgruppe des Proteins in eine Furche. Eine analoge Orientierung flexibler, unpolarer Reste wurde bei einer Vielzahl von Strukturen beobachtet. Die Proteinoberfläche ist entsprechend des elektrostatischen Potentials eingefärbt. Blau entspricht einem positiven, rot einem negativen und grau einem neutralen Potential.

Diese Orientierung eines unpolaren Rests ist in Abbildung 10 beispielhaft anhand der Struktur 708245 (Abbildung 11) dargestellt.

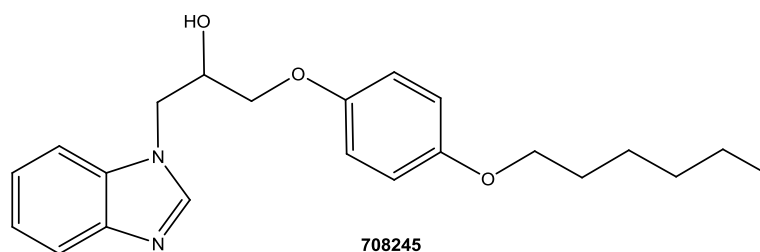


Abbildung 11: Struktur der exemplarisch gewählten Verbindung 708245 aus dem „Glide Drug-Like Ligand Decoys Set“. Die Hexylseitenkette des Liganden nahm eine für viele unpolare Reste anderer Liganden beispielhafte Orientierung ein.

Aus dem „Glide Drug-Like Ligand Decoys Set“ stammte die Struktur **145502**, welche gleich aus mehreren Aspekten von besonderem Interesse war (Abbildung 12). Vorteilhaft für eine nachfolgende Synthese war das Fehlen chiraler Zentren. Die Funktionalitäten des Moleküls boten einen sehr günstigen Ausgangspunkt für die weiteren Modifikationen, da viele kleine Bereiche des Moleküls modular ausgetauscht werden konnten, ohne dass dies einen grundlegenden Einbruch der Synthetisierbarkeit mit sich gebracht hätte.

3 Ergebnisse und Diskussion

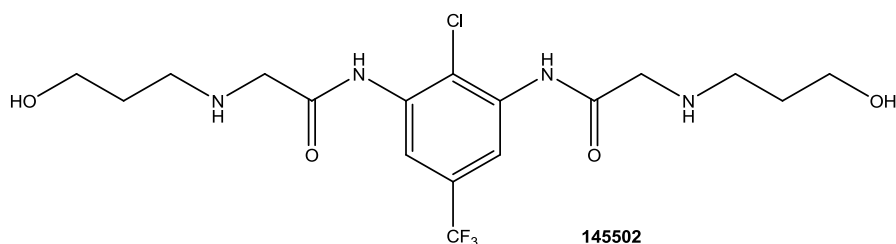


Abbildung 12: Struktur der Verbindung 145502 aus dem „Glide Drug-Like Ligand Decoys Set“. Die Verbindung wurde als Ausgangspunkt für weitere Modifikationen gewählt, da sie bereits vielversprechende Wechselwirkungen mit dem Protein einging und viele kleine Bereiche des Moleküls modular ausgetauscht werden konnten.

Die Lage der Verbindung **145502** in der Bindungstasche wies Analogien zu derjenigen der *N*-Acetylneuraminsäure auf. Beim *docking* wurden zwei verschiedene Konformationen des Moleküls in die Bindungstasche eingepasst. Beide hatten gemeinsam, dass einer der Seitenarme stets die Glycerolseitenkette der Neuraminsäure annähernd nachempfand. Die Orientierung des zentralen Arylbausteins war nur bei einer Positionierung so, dass die Trifluormethylgruppe die Bindungsstelle der *N*-Acetylgruppe okkupierte. Die unterschiedlichen Positionierungen der zweiten Seitenkette wiesen keinerlei Ähnlichkeiten auf (Abbildung 13). Diese Unterschiede äußerten sich in erheblich abweichenden Bindungsenergien von -48.7 kcal/mol und -40.2 kcal/mol.

3 Ergebnisse und Diskussion

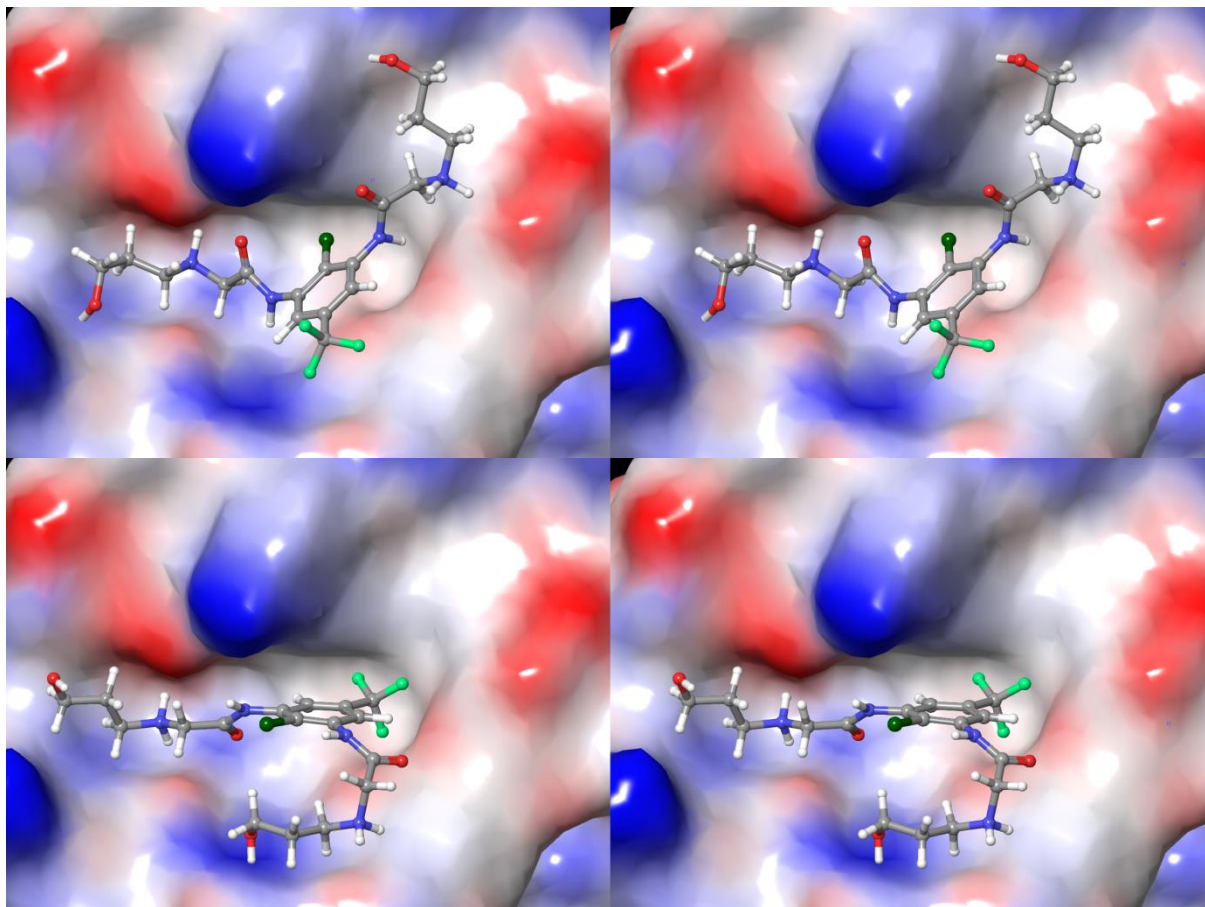


Abbildung 13: *Crossed-eye* Darstellungen zweier verschiedener *poses* der Verbindung mit der ID 145502 aus dem „Glide Drug-Like Ligand Decoys Set“ in der Bindungstasche des Hämagglutinins H5. Die oben dargestellte Positionierung ergab eine Bindungsenergie von -48.7 kcal/mol. Für die untere waren es nur -40.2 kcal/mol.

Zur Optimierung der Synthetisierbarkeit des Moleküls wurden im nächsten Schritt die Halogene durch Wasserstoffe substituiert (Abbildung 14). Der resultierende Ligand **4** wurde erneut durch *docking* in der Bindungstasche positioniert.

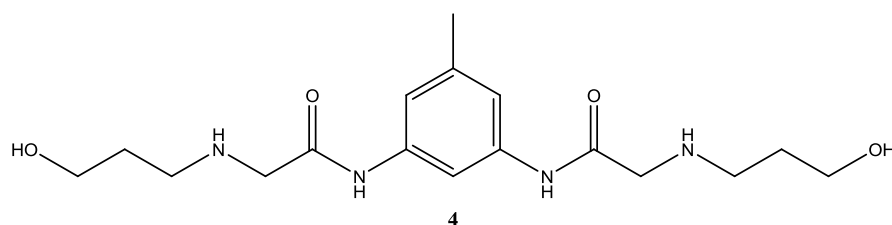


Abbildung 14: Struktur der Verbindung **4**. Diese wurde von der Verbindung mit der ID 145502 aus dem „Glide Drug-Like Ligand Decoys Set“ abgeleitet. Es wurden sämtliche Halogene durch Wasserstoffe substituiert, um eine spätere Synthese zu erleichtern.

3 Ergebnisse und Diskussion

Wie erwartet zeigte sich auch für den Liganden **4**, dass eine der Seitenketten den Bereich ausfüllte, der beim natürlichen Liganden von dessen Glycerolseitenkette belegt wird. Die Methylgruppe des zentralen aromatischen Bausteins nahm erneut den Raum der *N*-Acetylgruppe ein. Die zweite Seitenkette des Liganden **4** wurde so positioniert, dass nur geringfügige Ähnlichkeiten zu einem der vorher erhaltenen *poses* der Verbindung **145502** bestanden. Für **4** wurde eine Bindungsenergie von -56.5 kcal/mol berechnet.

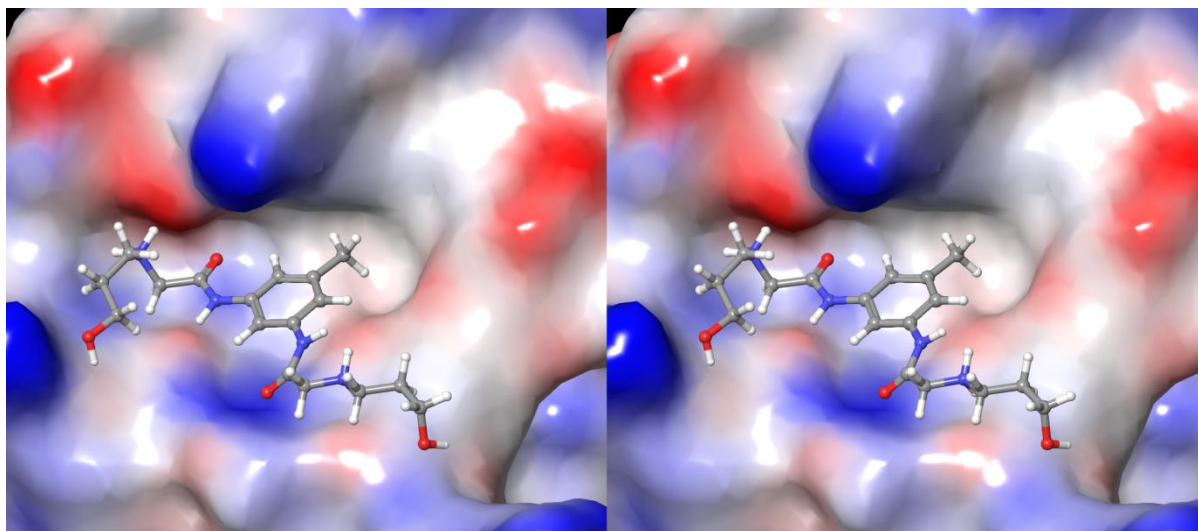


Abbildung 15: *Crossed-eye* Darstellung des Liganden **4** in der Bindungstasche des Hämagglutinins H5. Die Struktur des Liganden wurde durch Substitution aller Halogene der Verbindung **145502** durch Wasserstoffe erhalten. Die Methylgruppe des zentralen aromatischen Bausteins lag im gleichen Bereich der Bindungstasche wie die *N*-Acetylgruppe des natürlichen Liganden. Die Bindungsstellen der Seitenkette der Sialinsäure wurden durch eine der Seitenketten des Liganden belegt. Als Bindungsenergie wurde -56.5 kcal/mol berechnet.

Zunächst ließ sich feststellen, dass der Wegfall der Halogene eine deutliche Verbesserung der Affinität mit sich brachte. Da sich aber auch die Positionierungen der meisten Gruppen verschoben oder gänzlich geändert hatten, war ein Rückschluss auf einzelne Wechselwirkungen nicht möglich. Nach den bisher durchgeführten *dockings* fiel jedoch auf, dass nur eine der beiden Seitenketten eine recht definierte Funktion übernahm. Die andere wechselwirkte zwar auch stets mit dem Protein, aber augenscheinlich unspezifischer. Die Struktur von **5** ergab sich deshalb durch Weglassen der zweiten Seitenkette (Abbildung 16).

3 Ergebnisse und Diskussion

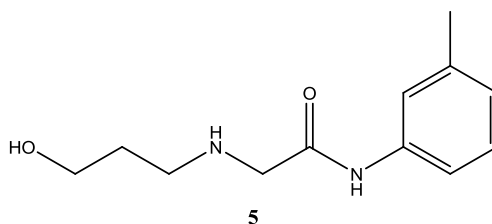


Abbildung 16: Struktur der Verbindung 5. Da bei *docking* Studien mit den Vorgängermolekülen eine Seitenkette stets eine ähnliche Position einnahm und die andere unspezifischer mit dem Protein wechselwirkte, wurde eine der Seitenketten entfernt.

Das *docking* sollte primär zeigen, wie sich Seitenkette und aromatischer Baustein ohne den variablen Einfluss der zweiten Seitenkette in der Bindungstasche positionierten. Das Glycinelement der Seitenkette lag ideal, um mit Lys189 und Glu186 wechselzuwirken (Abbildung 17). Die terminale Hydroxygruppe befand sich am äußersten Teil der Bindungstasche, wo sie über Wasserstoffbrückenbindungen zu Gln222, Ser223 und Gly224 fest eingebunden war. Die Methylgruppe des aromatischen Bausteins saß exakt an der Stelle der Methylgruppe der *N*-Acetylgruppe des natürlichen Liganden. Die berechnete Bindungsenergie betrug -53.3 kcal/mol.

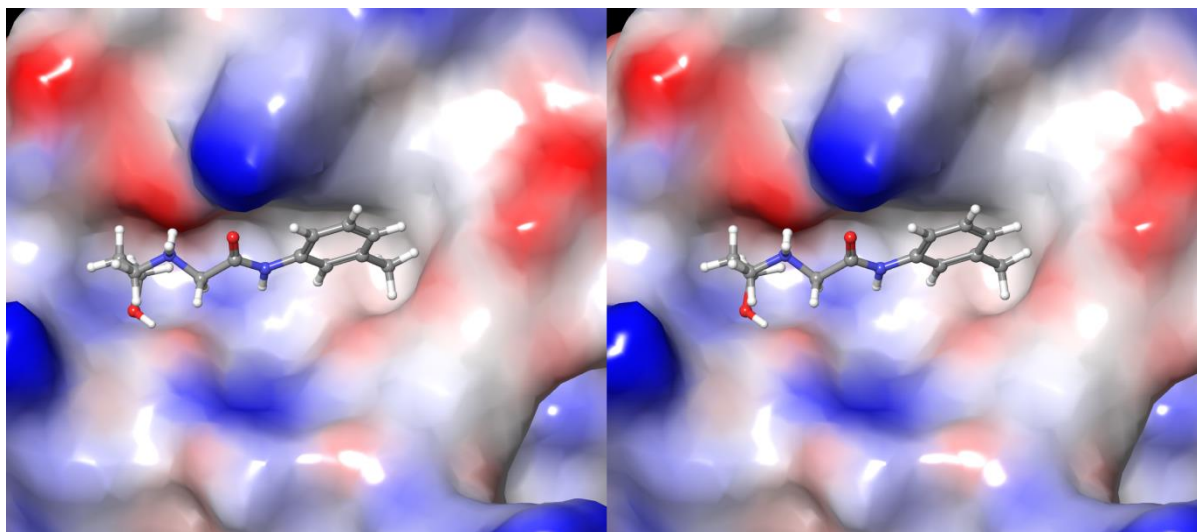


Abbildung 17: *Crossed-eye* Darstellung des Liganden 5 in der Bindungstasche des Hämagglutinins H5. Nach Entfernung der zweiten Seitenkette fügte sich der Ligand ideal in die Bindungstasche ein. Es wurde eine Bindungsenergie von -53.3 kcal/mol berechnet. Obwohl die molare Masse nur 63 % der von 4 beträgt, besitzt 5 bereits 94 % der Bindungsenergie.

Die Verbindung 5 besitzt demnach 94 % der Bindungsenergie von 4, hat aber nur 63 % der molaren Masse, das entspricht einer 50 %igen Steigerung der Bindungsenergie bezogen auf

3 Ergebnisse und Diskussion

das Molgewicht. Aufgrund des geringen Beitrags der zweiten Seitenkette, sollte diese komplett ersetzt werden. Da die ursprüngliche Substitutionsstelle in Richtung der Kanalartigen Vertiefung zeigte und zuvor bereits festgestellt werden konnte, dass bei den *screenings* eher unpolare Fragmente in diesem Bereich gebunden haben, wurde als nächster Schritt ein unverzweigter Alkylrest in Länge der ursprünglichen Seitenkette angefügt. Im Hinblick auf die Synthetisierbarkeit wurde beim Entwurf der Struktur **6** als verbrückendes Heteroatom nicht erneut Stickstoff sondern Sauerstoff gewählt (Abbildung 18). Dies sollte eine Differenzierbarkeit der beiden Positionen gewährleisten.

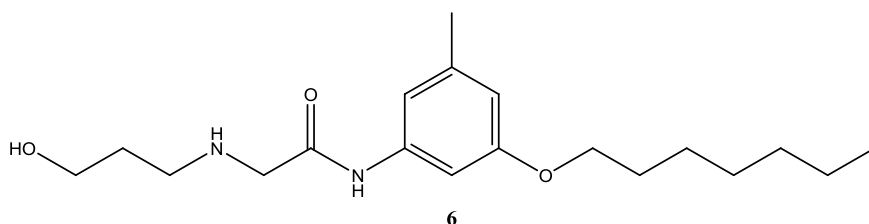


Abbildung 18: Struktur der Verbindung 6. Da eine polare zweite Seitenkette unspezifisch wechselwirkte, wurde eine unpolare Gruppe in gleicher Länge angefügt.

Entgegen den Erwartungen zeigte sich beim *docking*, dass der aromatische Baustein sich so positionierte, dass die Methylgruppe aus der Bindungstasche heraus zeigte (Abbildung 19). Die berechnete Bindungsenergie betrug nur -49.9 kcal/mol. Der Heptylsubstituent hat dementsprechend zu einem Verlust absoluter Bindungsenergie geführt.

3 Ergebnisse und Diskussion

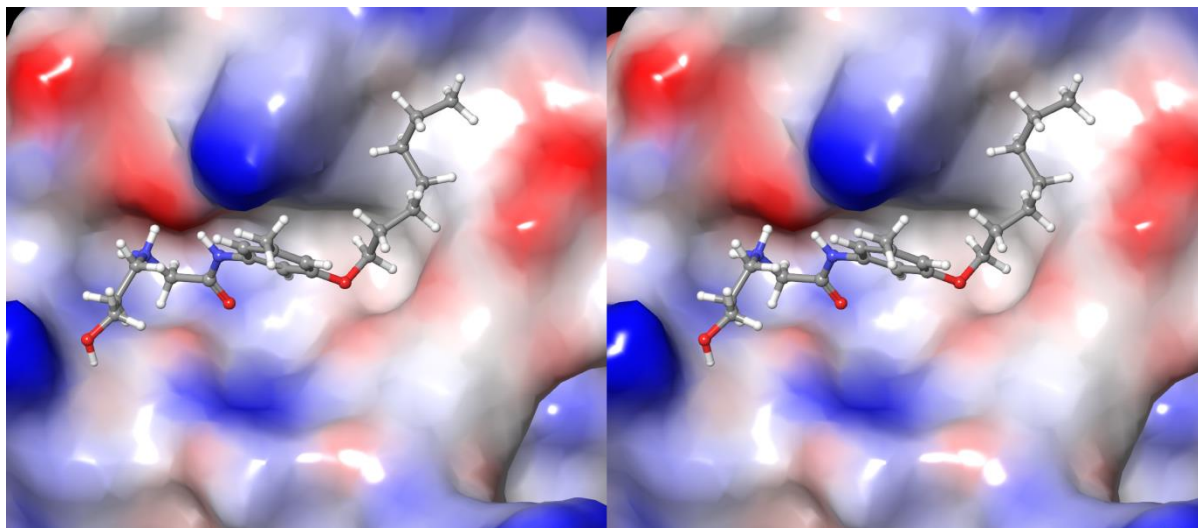


Abbildung 19: *Crossed-eye* Darstellung des Liganden 6 in der Bindungstasche des Hämagglutinins H5. Der Heptylsubstituent legte sich zwar erwartungsgemäß in die Kanal-artige Vertiefung, jedoch war die Positionierung so ungünstig, dass der aromatische Baustein aus seiner optimalen Position verdrängt wurde. Somit führte das Hinzufügen des Substituenten defakto zu einem Verlust an Bindungsenergie. Die berechnete Bindungsenergie betrug -49.9 kcal/mol.

Da sich die Heptylkette wie erwartet auf dem Protein positioniert hatte, wurde als nächstes versucht durch Änderung des Substitutionsmusters am Aromaten eine bessere Platzierung zu erreichen. Dafür wurde die Verbindung 7 (Abbildung 20) gedockt.

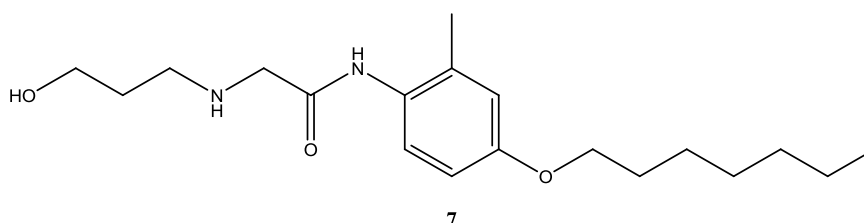


Abbildung 20: Struktur der Verbindung 7. Die Änderung des Substitutionsmusters sollte zeigen, ob sich eine bessere Positionierung des Aromaten erreichen ließ.

Durch Verschiebung der polareren Seitenkette in *para*-Stellung des *O*-Heptylsubstituenten wurde der aromatische Baustein wieder so in der Bindungstasche platziert, dass die Methylgruppe in die Bindungstasche zeigte (Abbildung 21). Die berechnete Bindungsenergie betrug -67.7 kcal/mol.

3 Ergebnisse und Diskussion

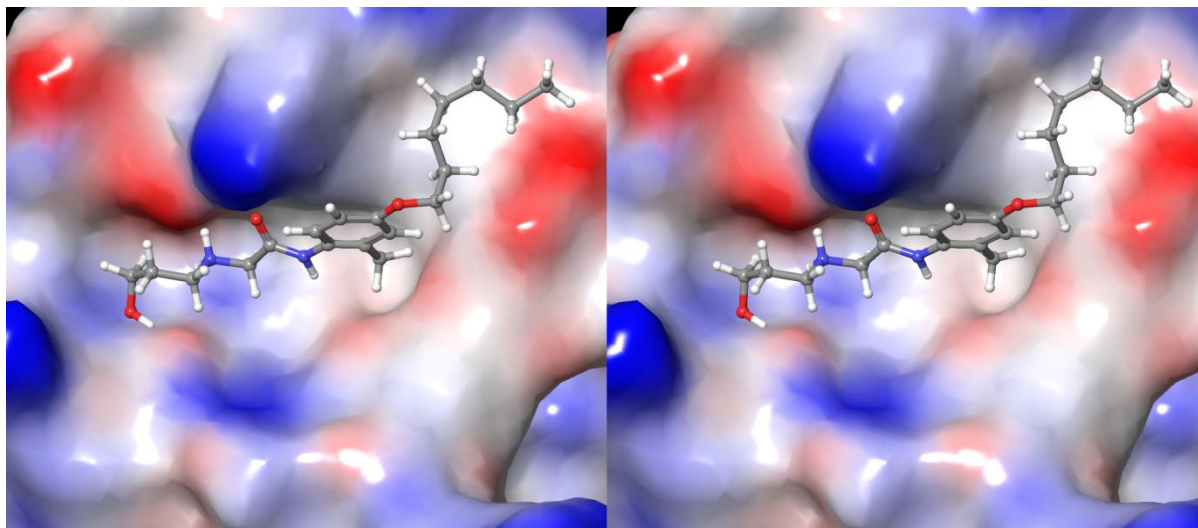


Abbildung 21: *Crossed-eye* Darstellung des Liganden **7** in der Bindungstasche des Hämagglutinins H5. Durch Verschiebung der polaren Seitenkette in *para*-Stellung des O-Heptylsubstituenten, wurde eine erneute gute Platzierung des aromatischen Bausteins erreicht. Die berechnete Bindungsenergie betrug -67.7 kcal/mol.

Die Einführung der *n*-Heptylkette in Verbindung mit der Anpassung des Substitutionmusters ergab eine substantielle Verbesserung der Affinität. Als nächstes wurde die Alkylkette durch ein rigideres System ersetzt, da ein starrer Ligand einem flexiblen gegenüber in der Regel einen entropischen Vorteil besitzt. Folglich wurde der Ligand **8** untersucht, bei welchem die Heptylkette durch ein Cyclohexylmethylysystem substituiert wurde (Abbildung 22).

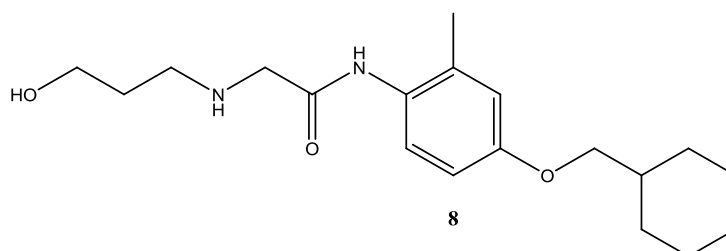


Abbildung 22: Struktur der Verbindung **8**. Die Substitution der Heptylkette durch ein Cyclohexylmethylysystem wurde zur Verringerung der Flexibilität des Liganden durchgeführt, da rigidere Liganden beim Bindungsereignis weniger Entropieverlust erfahren.

Die Positionierung der polareren Seitenkette und des aromatischen Bausteins war gegenüber **7** quasi identisch und der Cyclohexylrest fügte sich sehr gut in die zuvor durch die Heptylkette belegte Position ein (Abbildung 23). Die Modifikation führte zu einem leichten Verlust an Bindungsenergie. Für **8** wurde eine Bindungsenergie von -65.4 kcal/mol berechnet.

3 Ergebnisse und Diskussion

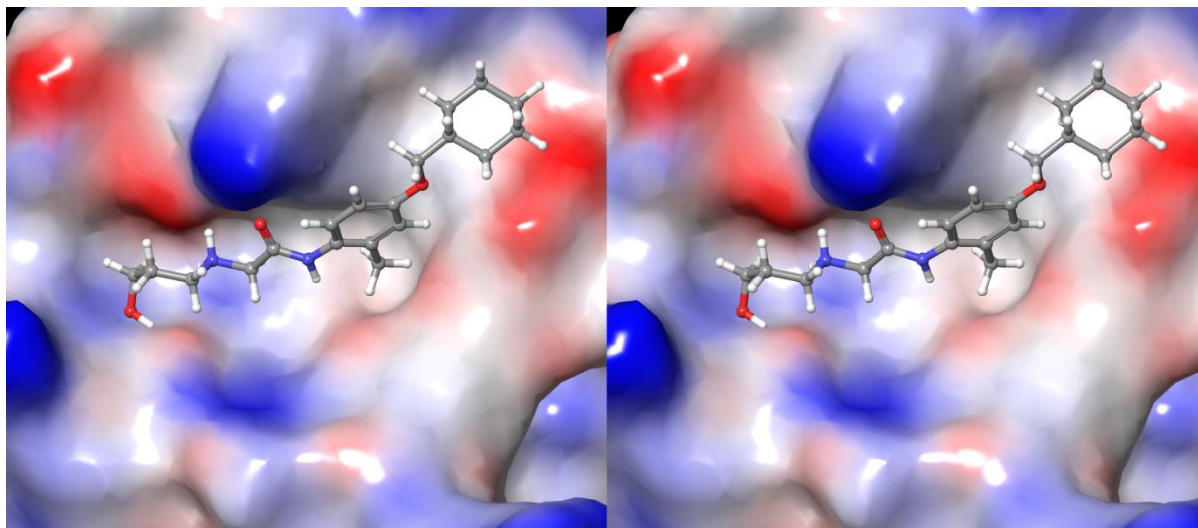


Abbildung 23: *Crossed-eye* Darstellung des Liganden **8** in der Bindungstasche des Hämagglutinins H5. Durch Substitution der *n*-Heptylseitenkette mit Cyclohexylmethyl wurde die Flexibilität des Liganden signifikant herabgesetzt. Dies sollte einen entropischen Vorteil beim Bindungsereignis bringen. Die berechnete Bindungsenergie betrug -65.4 kcal/mol.

Der Verlust von 2.3 kcal/mol ist bei den Dimensionen der durch MM-GBSA berechneten Energien und vor allem bei der Genauigkeit derartiger Rechnungen vernachlässigbar. Der erwartete Vorteil des starrereren Cyclohexylmethylrests gegenüber der *n*-Heptylkette sollte im entropischen Anteil der freien Bindungsenergie liegen. Die den Energieberechnungen zugrunde liegenden Modelle sind besonders für den entropischen Term stark vereinfacht und dementsprechend besonders fehlerbehaftet.⁹² Aus diesen Gründen wurde die Struktur **8** trotz der etwas geringeren Bindungsenergie als Ergebnis der Designstudie gewählt und für die anschließende Synthese als Zielstruktur definiert.

3.1.2 Synthese des vollständig artifiziellen Inhibitors

Die Synthese des Liganden **8** erfolgte ausgehend von 3-Methyl-4-nitrophenol. Im ersten Schritt wurde ein Ether in einer Williamson-Synthese hergestellt. Hierzu wurde in Anlehnung an eine literaturbekannte Vorschrift das Phenol mit Cyclohexylmethylbromid umgesetzt (Abbildung 24). Unter Verwendung von Kaliumcarbonat als Base und Zugabe katalytischer Mengen Natriumiodid zur Ermöglichung einer *in situ* Finkelstein-Reaktion konnte die Verbindung **9** mit einer Ausbeute von 86 % dargestellt werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

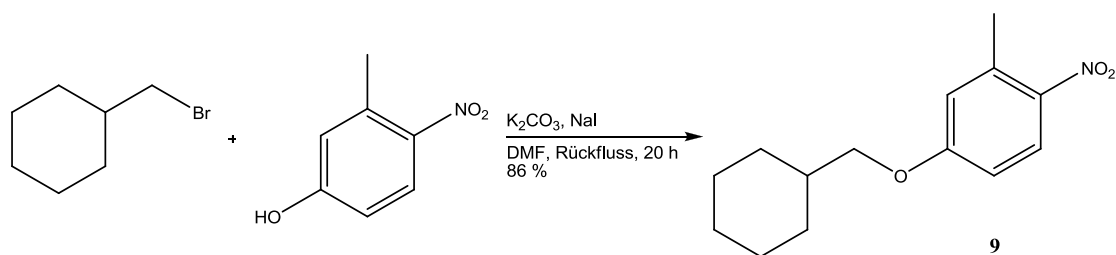


Abbildung 24: Williamson-Ethersynthese mit 3-Methyl-4-nitrophenol zur Darstellung der Verbindung **9**.

Anschließend wurde die Nitrogruppe zum entsprechenden Amin **10** reduziert (Abbildung 25). Zunächst wurde analog zu einer literaturbekannten, heterogen katalysierten Reduktion mit Wasserstoff an Palladium hydriert.⁹³ Dies erzielte jedoch eine Ausbeute von nur 30 %. Obwohl es literaturbekannt ist, dass die Reduktion aromatischer Nitroverbindungen mit Lithiumaluminiumhydrid zur Dimerisierung durch Bildung von Azoverbindungen führen kann, wurde diese Variante getestet.⁹⁴ Die Reduktion verlief erfolgreich mit einer Ausbeute von 61 %.

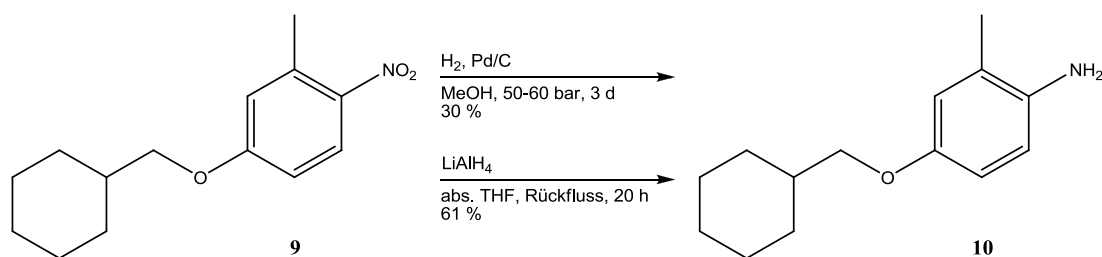


Abbildung 25: Reduktion der Nitrogruppe von **9** zum entsprechenden Amin **10**. Als Reduktionsmittel wurden Wasserstoff und Lithiumaluminiumhydrid miteinander verglichen. Die Reduktion mittels Lithiumaluminiumhydrid lieferte mit 61 % die doppelte Ausbeute gegenüber der Verwendung von Wasserstoff am Palladiumkatalysator.

Die letzten beiden Reaktionsschritte zur Darstellung des vollständigen Liganden **8** erfolgten analog zu einer literaturbekannten Synthese ohne Isolation des Zwischenprodukts **11** (Abbildung 26). Im ersten Reaktionsschritt wurde **10** mit Chloracetylchlorid umgesetzt. Anschließend wurde das α -Chlorid mit 3-Aminopropan-1-ol substituiert. Die Reaktionsausbeute über beide Schritte lag bei nur 10 %. Eine Ursache hierfür konnte nicht festgestellt werden, da bei der angewendeten Aufarbeitung weder Nebenprodukte noch unumgesetzte Edukte isoliert wurden.

3 Ergebnisse und Diskussion

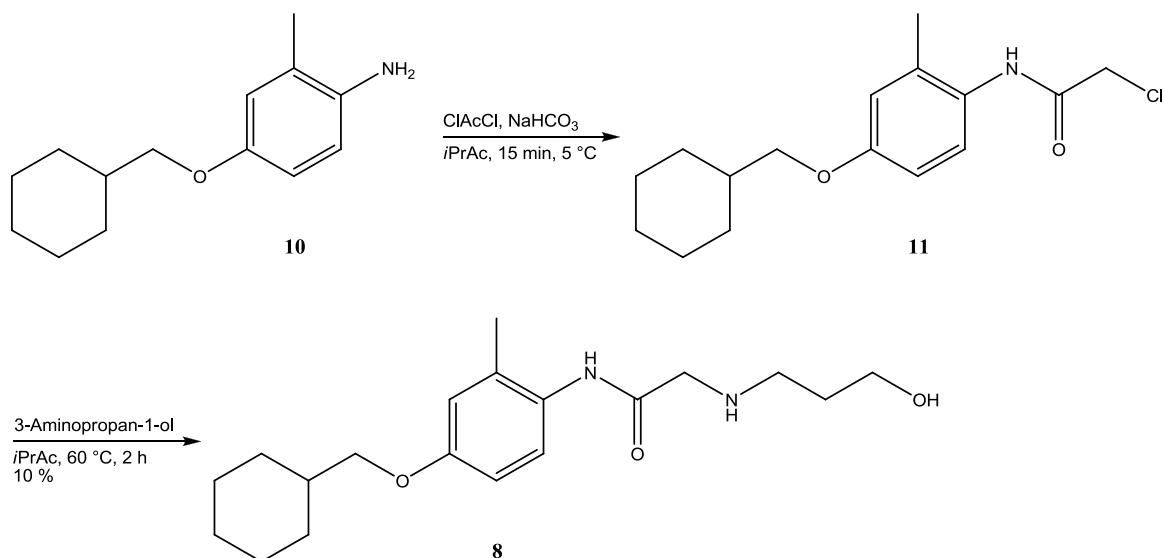


Abbildung 26: Darstellung des Liganden 8. Nach Einführung der α -Chloracetylgruppe wurde das Halogenid mit 3-Aminopropan-1-ol nucleophil substituiert.

Es wurde erfolgreich eine Syntheseroute für den Ligand 8 etabliert. Da die Verbindung in wässrigen Medien äußerst schwer löslich war, wurde von der Durchführung von Bindungsstudien abgesehen und das Konzept derartiger Liganden nicht weiter verfolgt.

3.2 C-9 Aminokonjugate der N-Acetylneuraminsäure

Die Eignung von C-9 Aminokonjugaten der N-Acetylneuraminsäure als Liganden des Hämagglutinins H5 wurde evaluiert. Hierbei lag der Fokus auf der Synthetisierbarkeit und der Affinität zu H5.

Bei den *in silico*-Studien zeigte sich, dass die C-9 Aminokonjugate vergleichbar starke Bindungen zu H5 eingingen, wie die von M. Hollinger dargestellten C-8 Aminokonjugate.⁸² Die Darstellung der C-9 Aminokonjugate ist allgemein durch die höhere Anzahl an Zwischenstufen etwas aufwendiger. Die Synthesen verliefen jedoch mit guten Ausbeuten und es konnte auf die Periodatspaltung, welche schwer abzutrennende Nebenprodukte hervorbrachte, verzichtet werden. Allerdings führte die Alkylierung des terminalen Amins je nach Reaktionstyp zu stark variierenden Ergebnissen. So gab es signifikante Probleme mit Nebenprodukten oder auch ein Ausbleiben der Produktbildung. Reduktive Aminierungen mit Ketonen lieferten jedoch gute Ausbeuten ohne problematische Nebenprodukte. Die per SPR gemessenen Affinitäten waren in der gleichen Größenordnung, wie die der C-8

3 Ergebnisse und Diskussion

Aminokonjugate und somit in sehr guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen des *molecular modeling*.

3.2.1 Virtuelle Bindungsstudien mit C-9 Aminokonjugaten der *N*-Acetylneuraminsäure

Die C-9 Aminokonjugate der *N*-Acetylneuraminsäure sollten sich strukturell möglichst stark an den von M. Hollinger entworfenen Strukturen orientieren, um eine bestmögliche Vergleichbarkeit der berechneten Bindungsenergien zu gewährleisten.⁸² Als Leitstrukturen wurden hierbei die Liganden 2 und 3 gewählt, da diese nicht nur *in silico*, sondern auch *in vitro* deutliches inhibitorisches Potential zeigten (Abbildung 27). Die mittels Prime MM-GBSA berechneten Bindungsenergien waren $\Delta G_2 = -54.9$ kcal/mol und $\Delta G_3 = -51.2$ kcal/mol. Die per SPR-Spektroskopie gemessenen Dissoziationskonstanten der beiden Liganden lagen im Bereich von 60 μ M.

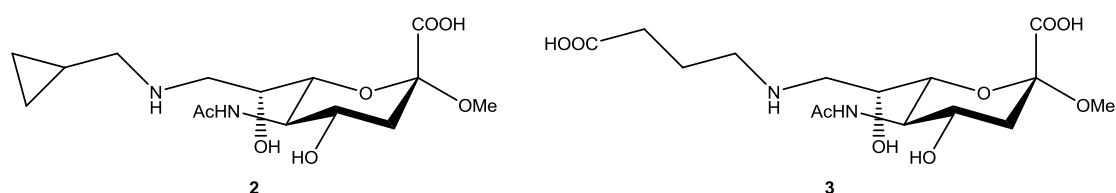


Abbildung 27: Strukturen der Liganden 2 und 3. Design, Synthese und SPR-Bindungsstudien wurden von M. Hollinger durchgeführt.⁸² Die berechneten Bindungsenergien waren $\Delta G_2 = -54.9$ kcal/mol und $\Delta G_3 = -51.2$ kcal/mol. Die Dissoziationskonstanten für diese Liganden lagen im Bereich von 60 μ M.

Die direkte Adaption der Seitenkettenmodifikationen von 2 und 3 an das Konzept der C-9 Aminokonjugate führte zu den Strukturen der Liganden 12 und 13 (Abbildung 28).

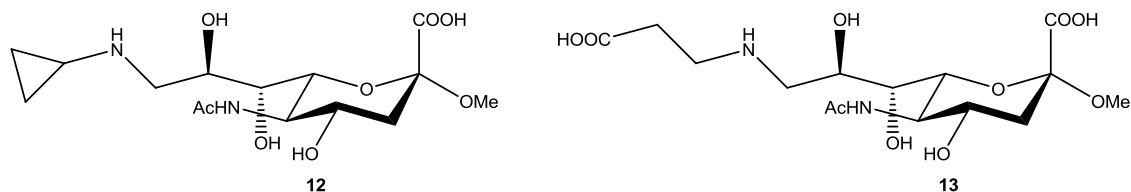


Abbildung 28: Strukturen der Liganden 12 und 13. Die berechneten Bindungsenergien waren $\Delta G_{12} = -54.1$ kcal/mol und $\Delta G_{13} = -48.5$ kcal/mol.

Die Cyclopropylgruppe des Liganden 12 füllte eine Kavität in der Bindungstasche des H5 aus, welche vom natürlichen Bindungspartner nicht genutzt wurde (Abbildung 29). Die

3 Ergebnisse und Diskussion

berechnete Bindungsenergie von -54.1 kcal/mol war quasi identisch mit der von 2. Da die Cyclopropylierung eines Amins potentiell synthetisch nur schwer zu erreichen ist, wurde im Folgenden nach strukturellen Alternativen gesucht.

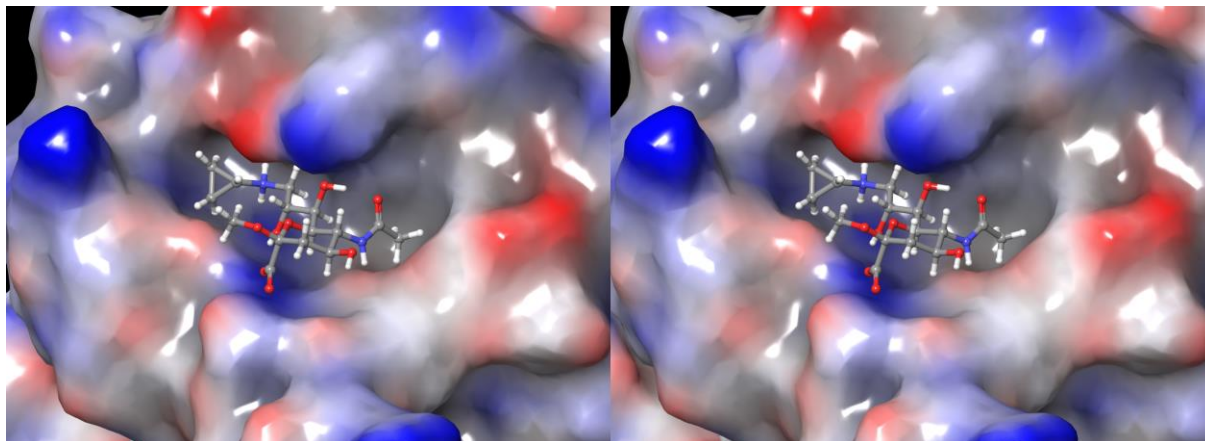


Abbildung 29: *Crossed-eye* Darstellung des Liganden 12 in der Bindungstasche des Hämaggglutinins H5. Die Cyclopropylgruppe füllte die sie umgebene Kavität ideal aus. Die berechnete Bindungsenergie betrug -54.1 kcal/mol.

Für den Liganden 13 wurde eine Bindungsenergie von -48.5 kcal/mol berechnet. Damit lag sie deutlich niedriger als die von 3. Diese Einbuße an Bindungsstärke ließ sich durch die Anordnung des Propionatsubstituenten erklären (Abbildung 30).

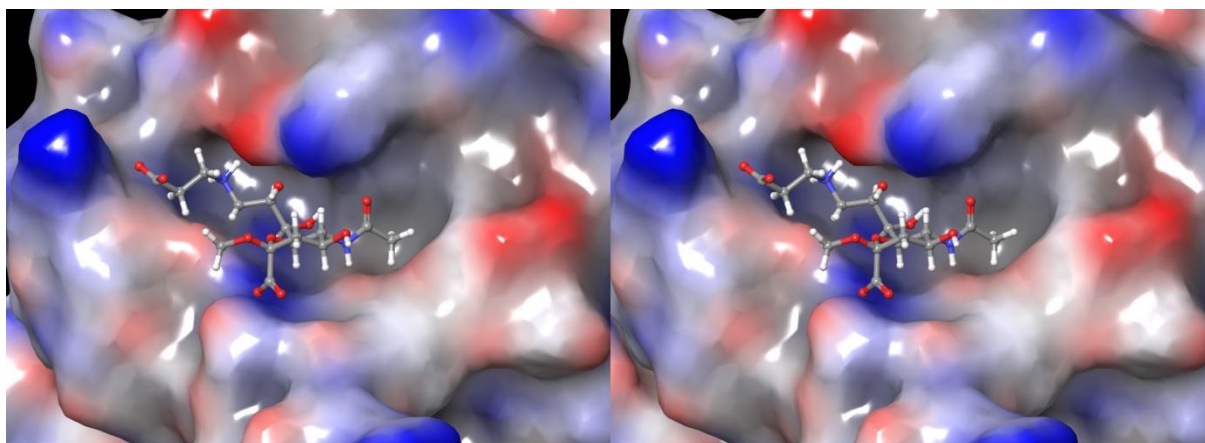


Abbildung 30: *Crossed-eye* Darstellung des Liganden 13 in der Bindungstasche des Hämaggglutinins H5. Die Lage der C-9 Ammoniumfunktion bedingte, dass die Propionatgruppe weder den Raum in der Bindungstasche optimal nutzen, noch einen geringen Abstand zur Ammoniumgruppe des Lys218 erreichen konnte. Dies führte zu einem deutlichen Verlust an Bindungsstärke gegenüber 3. Die berechnete Bindungsenergie betrug -48.5 kcal/mol.

3 Ergebnisse und Diskussion

Die Position der C-9 Ammoniumfunktion war als nur wenig variabel anzusehen, da sie eine essentielle Salzbrücke zu Glu186 aufbaute. Die Kürze der Propionatgruppe bedingte deshalb, dass der alkyliche Teil die Kavität nicht ausreichend füllen und gleichzeitig die Nähe zur Ammoniumgruppe des Lys218 aufbauen konnte. Der Abstand betrug 4.0 Å und war damit für die Ausbildung einer Salzbrücke zu groß. Es konnte jedoch davon ausgegangen werden, dass die Seitenkette des Lys218 eine ausreichende Flexibilität besaß, um diesen Abstand auf das optimale Maß von 2.7 - 3.0 Å zu reduzieren.⁹⁵ Um die Spannung zwischen den konkurrierenden Zentren zu reduzieren, wurde der Substituent um eine Methyleinheit verlängert. Für den so erhaltenen Ligand **14** wurde eine Bindungsenergie von -54.9 kcal/mol berechnet, welche damit besser war als die des Liganden **3**. Der Abstand zu Lys218 lag abermals bei 4.1 Å. Auffällig war, dass der alkyliche Teil nicht direkt von der C-9 Ammoniumgruppe in Richtung des Lys218 verlief, sondern zunächst in Richtung der Kavität zeigte und diese auszufüllen vermochte (Abbildung 31).

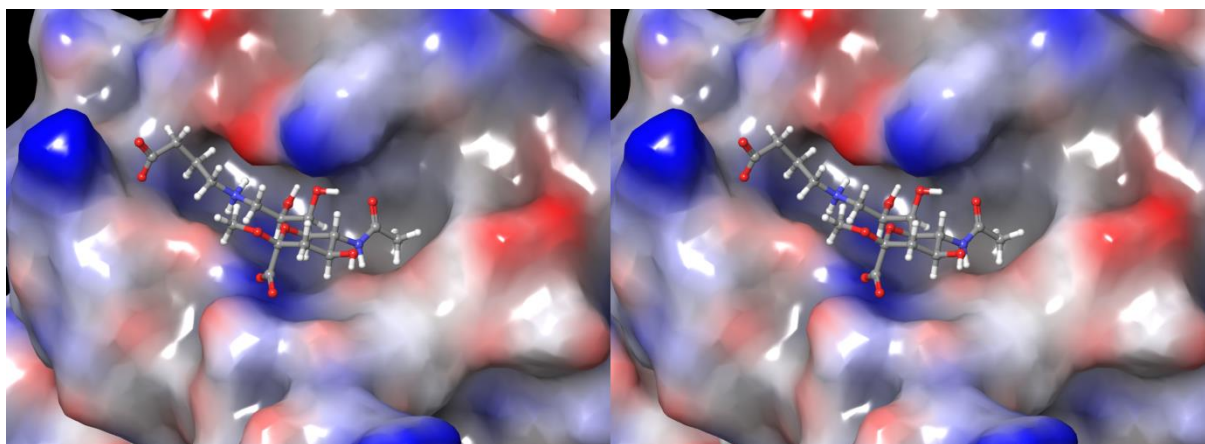


Abbildung 31. *Crossed-eye* Darstellung des Liganden **14** in der Bindungstasche des Hämaggglutinins H5. Der Butanoatsubstituent war im Gegensatz zur Propionatgruppe in der Lage die Kavität in der Bindungstasche auszufüllen und gleichzeitig eine ausreichende Nähe zur Ammoniumgruppe des Lys218 zu erreichen. Die berechnete Bindungsenergie betrug -54.9 kcal/mol.

Aufgrund der Annahme, dass der synthetische Zugang zu den bisher entworfenen Liganden **12** und **14** schwierig war, wurden weitere Strukturen entworfen. Hierbei handelte es sich um die Ethyl-, *n*-Propyl- und *iso*-Propyl-substituierten C-9 Amine (Abbildung 32). Für die drei Liganden wurden die Bindungsenergien $\Delta G_{15} = -53.1$ kcal/mol, $\Delta G_{16} = -57.2$ kcal/mol und $\Delta G_{17} = -56.6$ kcal/mol berechnet.

3 Ergebnisse und Diskussion

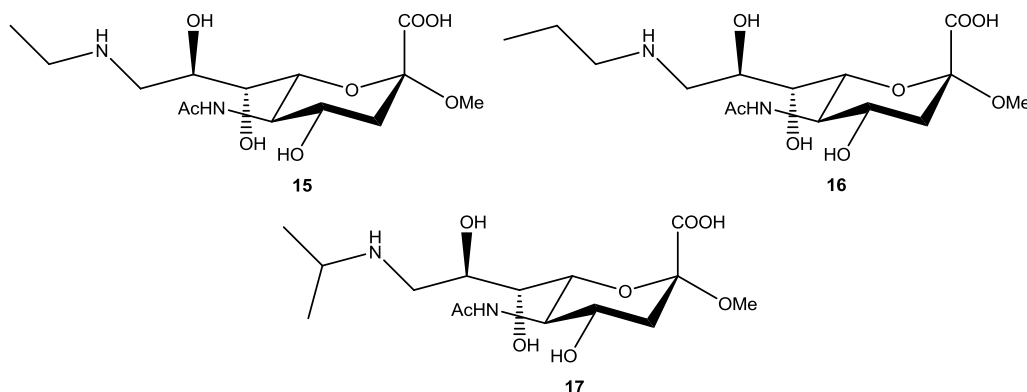


Abbildung 32: Strukturen der Liganden 15, 16 und 17. Die berechneten Bindungsenergien waren $\Delta G_{15} = -53.1$ kcal/mol, $\Delta G_{16} = -57.2$ kcal/mol und $\Delta G_{17} = -56.6$ kcal/mol.

Alle drei Liganden waren konzeptionell dem Liganden 12 nachempfunden und sollten dementsprechend die angestrebte affinitätssteigernde Wechselwirkung durch einen lipophilen Substituenten, welcher die Kavität der Bindungstasche vollständig füllen konnte, erreichen. Exemplarisch für die drei Varianten ist in Abbildung 33 der Ligand 17 in der Bindungstasche des Hämagglutinins dargestellt. Dieser besaß den sterisch anspruchsvollsten Substituenten und ließ sich dennoch sehr gut in den zur Verfügung stehenden Raum einpassen.

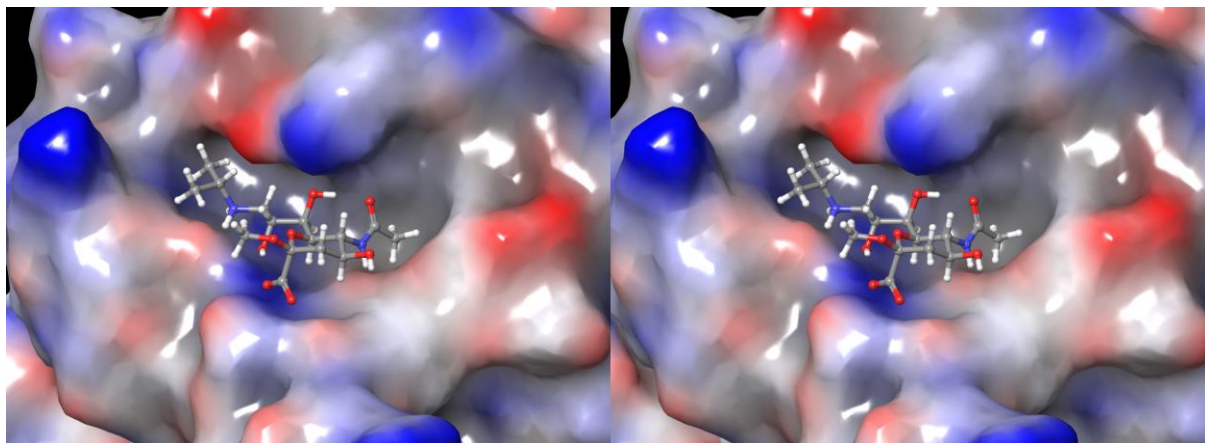


Abbildung 33: *Crossed-eye* Darstellung des Liganden 17 in der Bindungstasche des Hämagglutinins H5. Der *iso*-Propylsubstituent füllte analog zu der Cyclopropylgruppe des Liganden 12 die Kavität der Bindungstasche sehr gut aus. Die berechnete Bindungsenergie betrug -56.6 kcal/mol.

Die Konzepte der von M. Hollinger entwickelten Strukturen 2 und 3 konnten für die C-9 Aminoderivate der *N*-Acetylneuraminsäure adaptiert werden.⁸² Hiervon ausgehend wurden dann weitere ähnliche Strukturen entwickelt. Die in Tabelle 1 aufgeführten Bindungsenergien zeigen, dass es gelungen war, bei dieser Adaptierung und Diversifizierung die Affinitäten zu

3 Ergebnisse und Diskussion

erhalten oder sogar zu verbessern. Gerade die Vielzahl an unterschiedlichen Strukturen war für die Evaluation der Synthesemöglichkeiten besonders wertvoll.

Tabelle 1: Zusammenfassung der mittels Prime MM-GBSA berechneten Bindungsenergien der C-9 Aminoderivate der *N*-Acetylneuraminsäure und ihrer strukturellen Vorläufer.

Ligand	ΔG [kcal/mol]
2	-54.9
3	-51.2
12	-54.1
13	-48.5
14	-54.9
15	-53.1
16	-57.2
17	-56.6

3.2.2 Synthese der C-9 Aminokonjugate der *N*-Acetylneuraminsäure

Die Syntheseroute zur Darstellung der C-9 Aminokonjugate der *N*-Acetylneuraminsäure lässt sich in drei Etappen unterteilen. Zunächst erfolgte die Synthese des Methylesters des Methylglycosids der *N*-Acetylneuraminsäure. Dann wurde in einem mehrstufigen Prozess die C-9 OH-Gruppe durch eine NH₂-Gruppe substituiert. Abschließend wurde das primäre Amin einfach alkyliert und das Methylcarboxylat verseift.

Bei den ersten Schritten der Syntheseroute handelte es sich um literaturbekannte Darstellungen, die den Beschreibungen identisch oder mit geringfügigen Anpassungen durchgeführt wurden (Abbildung 34). Im ersten Syntheseschritt wurde die *N*-Acetylneuraminsäure nach de Smet *et al.* zum entsprechenden Methylester umgesetzt.⁹⁶ Hierbei wurde die vierfache der beschriebenen Menge an Lösungsmittel und stets frisch aktivierter Ionentauscher eingesetzt. Dies ermöglichte den direkten Erhalt eines reinen

3 Ergebnisse und Diskussion

Produkts, welches entgegen der Literatur nicht umkristallisiert werden musste und in Folge dessen mit bis zu quantitativen Ausbeuten erhalten werden konnte. Die anschließende Acetylierung wurde nach Marra *et al.* durchgeführt.⁹⁷ Auf eine Trennung der beiden Anomere wurde verzichtet, da die Konfiguration des anomeren Zentrums für die folgende Halogenierung unerheblich war. Die Darstellung des β -Chlorids **18** erfolgte nach der Methode von Roy *et al.* und lieferte ohne Aufarbeitung ein reines Produkt in sehr guten Ausbeuten.⁹⁸

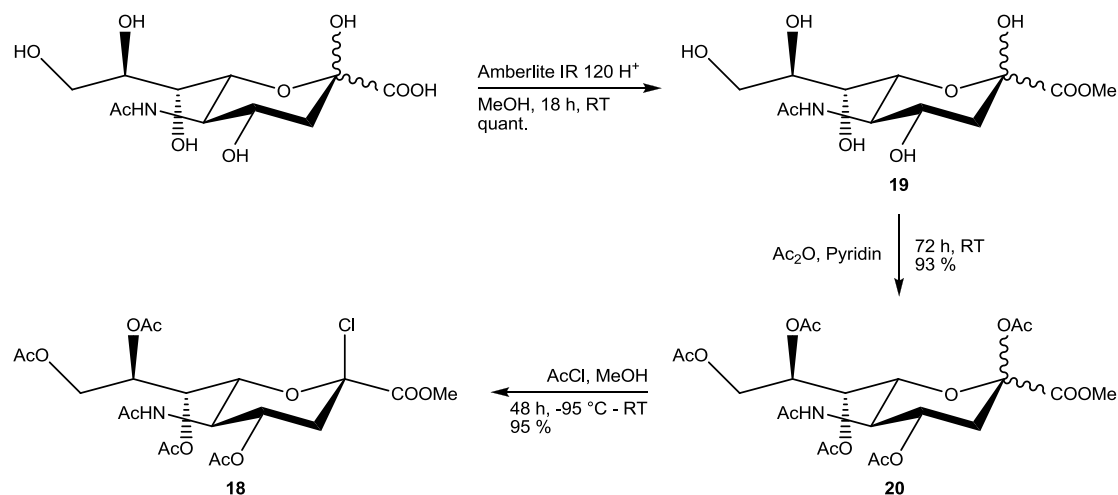


Abbildung 34: Darstellung des Glycosyldonors **18**. Die *N*-Acetylneuraminsäure wurde säurekatalysiert zum Methyl ester **19** verestert und anschließend mit Essigsäureanhydrid acetyliert.^{96,97} Der peracetylierte Methyl ester **20** wurde dann durch *in situ* dargestelltes HCl in das entsprechende β -Chlorid **18** überführt.⁹⁸

Das α -Methylglycosid **21** konnte nach einer von M. Hollinger entwickelten Methode direkt aus dem β -Chlorid **18** erhalten werden, indem es mit Natriummethanolat in Methanol behandelt wurde.⁸² Zur Einführung der Aminofunktion an C-9 wurde die von R. Brossmer *et al.* etablierte Syntheseroute verwendet (Abbildung 35).⁹⁹ Hierbei wurde im ersten Syntheseschritt die C-9 Hydroxygruppe tosyliert. Im Folgenden wurde dann die Tosylatgruppe der Verbindung **22** durch ein Azidion nucleophil substituiert. Die Azidgruppe ist eine bei vielen Reaktionsbedingungen stabile funktionelle Gruppe. Demnach wäre die Verbindung **23** bzw. deren Derivate eine interessante Stufe für die Inkorporierung dieser Synthesestrategie in andere Syntheserouten. Im Rahmen dieser Synthese wurde die Azidgruppe in einer heterogen katalysierten Hydrierung zum primären Amin **24** reduziert. Abweichend zu der von R. Brossmer *et al.* publizierten Methode wurde Palladium auf Aktivkohle und nicht Palladiumoxid verwendet. Sowohl bei der Reaktion als auch bei der Reinigung wurde stets mit Essigsäure angesäuert. Diese Maßnahme war essentiell, da

3 Ergebnisse und Diskussion

ansonsten das freie Amin den C-1 Methylester angriff und zur Bildung des entsprechenden Lactams führte.

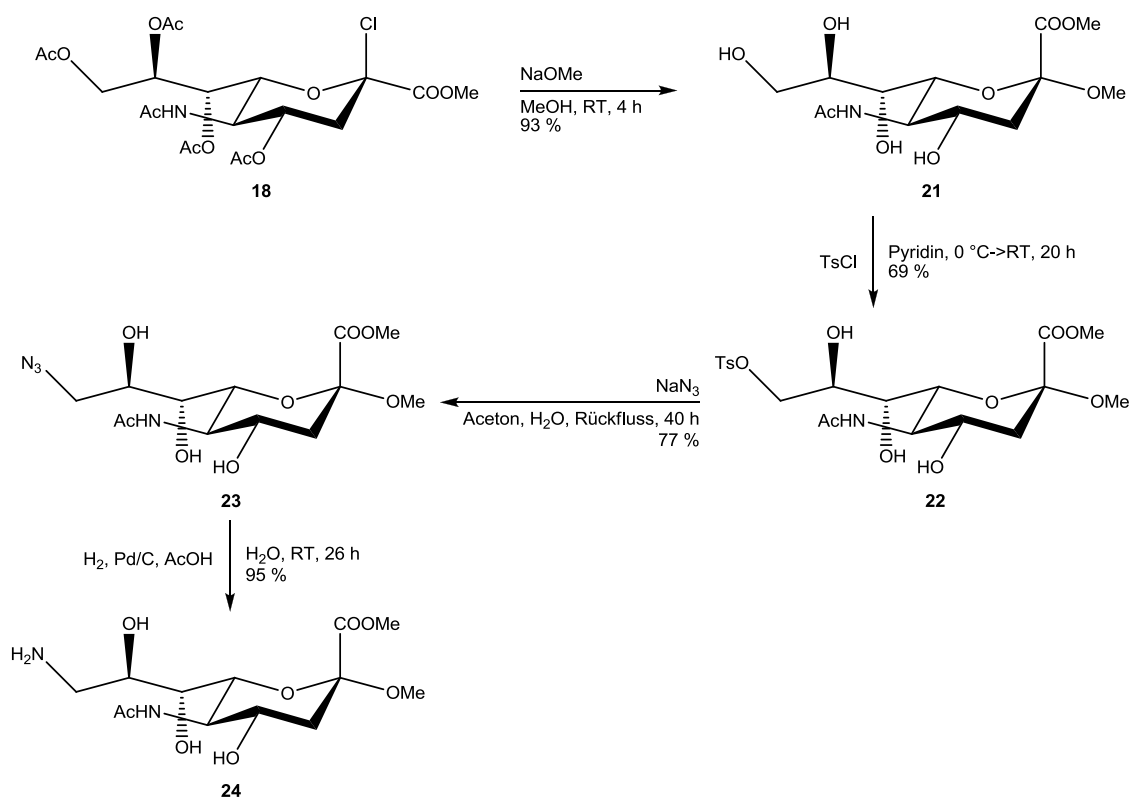


Abbildung 35: Darstellung des C-9 Amins der *N*-Acetylneuraminsäure **24**. Das Methylglycosid **21** wurde nach der von M. Hollinger etablierten Methode dargestellt.⁸² Die Einführung des Amins erfolgte nach einer von R. Brossmer *et al.* etablierten Route durch Tosylierung und anschließender Substitution der C-9 OH-Gruppe durch ein Azidion und abschließender Reduktion zum Amin.⁹⁹

Ausgehend von dem C-9 Amin-Derivat **24** wurden dann verschiedene Alkylierungen am Stickstoff durchgeführt. Die Einführung einer *iso*-Propylgruppe gelang durch reduktive Aminierung mit Aceton (Abbildung 36).

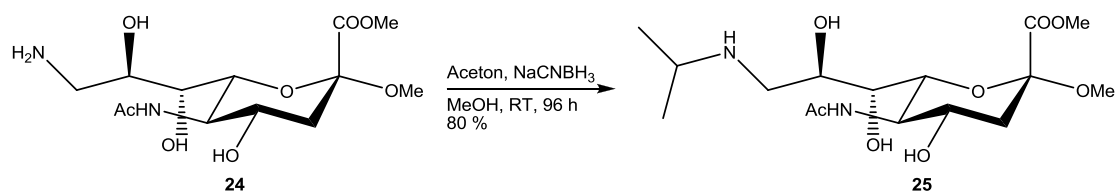


Abbildung 36: Reduktive Aminierung von Aceton mit dem C-9 Amin-Derivat **24** zur Darstellung des sekundären Amins **25**.

3 Ergebnisse und Diskussion

Die Alkylierung des Stickstoffs mit den Resten Ethyl und Propyl wurde durch reduktive Aminierung mit den entsprechenden Aldehyden erreicht (Abbildung 37). Bei beiden Synthesen konnte die Bildung der jeweils doppelt alkylierten Nebenprodukte beobachtet werden. Durch nacheinander durchgeführte normalphasige Säulenchromatographie und umgekehrt phasige HPLC ließ sich das Produkt isolieren, jedoch ließen sich keine guten Ausbeuten erreichen. Hierfür waren die Verluste durch die Bildung des Nebenprodukts und auch die Reinigungsverluste aufgrund nicht ausreichend guter Trennung zu substantiell.

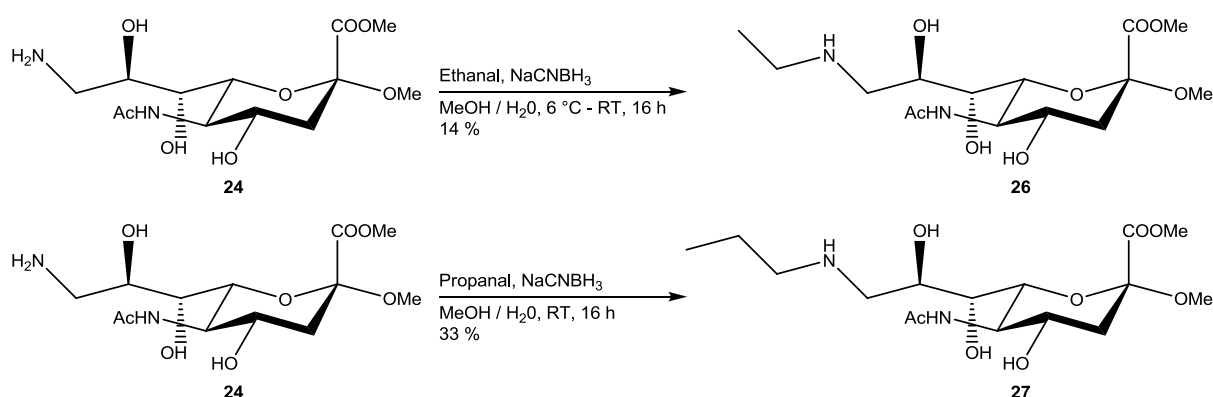


Abbildung 37: Reduktive Aminierung von Ethanal und Propanal mit dem C-9 Amin-Derivat 24. Bei der Darstellung der gewünschten sekundären Amine 26 und 27 ließ sich die Bildung der doppelt alkylierten tertiären Amine nicht verhindern. Dies hatte substantielle Ausbeuteverluste zur Folge.

Bei der reduktiven Aminierung mit Ethanal wurde untersucht, ob die Konzentration der Essigsäure einen Einfluss auf die Entstehung des Nebenprodukts hat. Dazu wurden drei Ansätze wie unter 6.5.8 beschrieben parallel durchgeführt und nur die Menge an zugegebener Essigsäure variiert (250 μ L, 500 μ L und 1000 μ L). Durch ESI-MS Messungen direkt aus den Reaktionslösungen wurde das Verhältnis von Haupt- zu Nebenprodukt verglichen. Hierbei konnten keine relevanten Unterschiede festgestellt werden. Auch die Verwendung einer Methanol/Wasser 1:1 Mischung als Lösungsmittel schien keinen Einfluss zu haben. Allgemein wird bei reduktiven Aminierungen ein großer Überschuss des Amins eingesetzt. Dies könnte auch bei dieser Reaktion der Bildung des Nebenprodukts entgegenwirken. Da jedoch die Eignung dieser Umsetzung zur Inkorporierung in andere Synthesestrategien, bei welchen der Neuraminsäurebaustein in der Regel nur in begrenztem Maße zur Verfügung steht, evaluiert werden sollte, wurde von dieser Möglichkeit abgesehen.

Der Cyclopropylsubstituent am Stickstoff wurde nicht durch eine reduktive Aminierung eingeführt, da das dafür benötigte Cyclopropanon äußerst instabil ist.¹⁰⁰ Alternativ wurde

3 Ergebnisse und Diskussion

versucht die Cyclopropylgruppe durch eine nucleophile Substitution zu integrieren. Da sp^2 -hybridisierte Kohlenstoffe in Cyclopropylsystemen allgemein instabil sind und sich somit nur schwer bilden, wurde als Reaktionsmechanismus eine S_N2 -Reaktion angestrebt und demnach *N,N*-Dimethylformamid (DMF) als Lösungsmittel gewählt. Bei dem Syntheserversuch unter basischen Bedingungen konnte keine Bildung des Produkts **28** beobachtet werden (Abbildung 38). Eine massenspektrometrische Untersuchung zeigte ein Nebenprodukt, dessen Masse dem *N*-formylierten Edukt entsprach. Die Formylierung durch DMF ist literaturbekannt.¹⁰¹

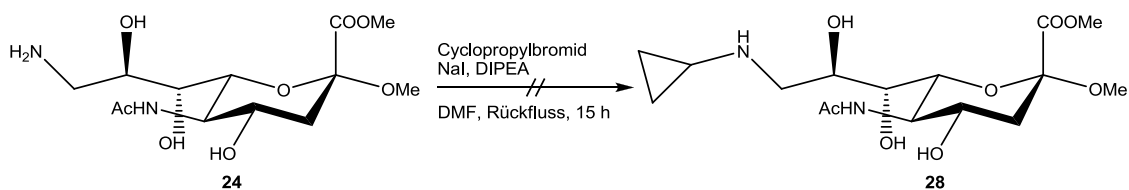


Abbildung 38: Versuch der nucleophilen Substitution des C-9 Amin-Derivats an Cyclopropylbromid. Eine Produktbildung blieb aus. Als einzige Umsetzung konnte die teilweise Formylierung des primären Amins durch DMF beobachtet werden.

Aufgrund der zu geringen Reaktivität des Cyclopropylbromids bei nucleophilen Substitutionsreaktionen wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

Die drei erfolgreich alkylierten C-9 Amin-Derivate wurden abschließend in Natronlauge verseift (Abbildung 39).

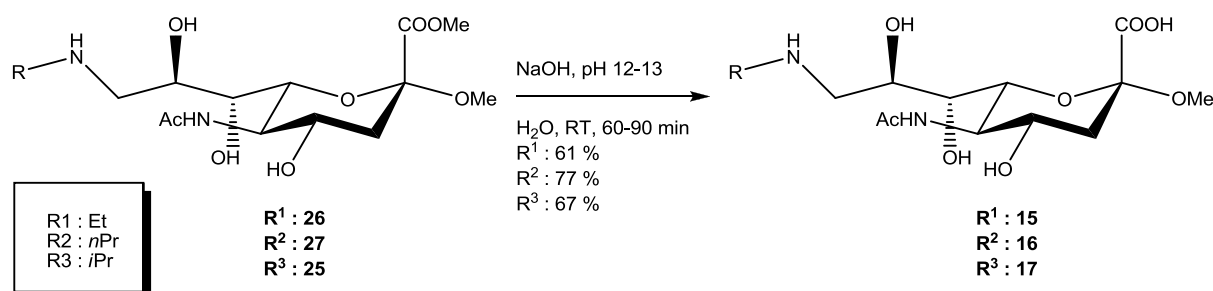


Abbildung 39: Alkalische Verseifung der Methylcarboxylate der Ligandvorstufen **26**, **27** und **25**.

Es konnte eine Synthesestrategie zur Darstellung von C-9 Amin-Derivaten der *N*-Acetylneuraminsäure etabliert werden. Die Alkylierung des primären Amins **24** ist allerdings nur in bestimmten Fällen eine aussichtsreiche Strategie. So ist die reduktive Aminierung von Ketonen mit guten Ausbeuten durchführbar. Bei Aldehyden kommt es

3 Ergebnisse und Diskussion

zumindest beim äquimolaren Einsatz der Reaktionspartner zur mehrfach Alkylierung. Obwohl die Alkylierung durch nucleophile Substitution bei der in dieser Arbeit versuchten Umsetzung nicht erfolgreich war, sollte sie in bestimmten Fällen möglich sein. Hierbei muss der elektrophile Reaktand reaktiv genug sein, ohne zur Mehrfachalkylierung zu neigen. Bei der vorgestellten Synthesestrategie handelt es sich zweifelsohne um eine sehr interessante, jedoch wurde aufgrund der aufgezeigten Einschränkungen von einer Inkorporierung in andere Syntheserouten abgesehen.

3.2.3 Entwicklung der Methoden für die SPR-Messungen

Die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (engl.: *surface plasmon resonance*, SPR) ist eine Methode zur Beobachtung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen. Hierbei wird einer der Bindungspartner auf einem Sensorchip immobilisiert und der andere in gelöster Form über diese Oberfläche geleitet. Es handelt sich demnach um ein Verfahren, bei welchem Bindungsereignisse im strömenden System beobachtet werden können.

Die Generierung des Messsignals beruht auf dem Effekt der Oberflächenplasmonenresonanz. Wird TM-polarisiertes Licht durch ein Prisma auf eine dünne metallische Schicht eingestrahlt und dort totalreflektiert, regt dies Oberflächenplasmonen an. Dies hat zur Folge, dass die freien Elektronen in der Metalloberfläche in Schwingung entlang der selbigen versetzt werden. Im Resonanzfall wird das einfallende Licht absorbiert. Die Resonanzbedingung ist abhängig vom Einstrahlwinkel. Von den schwingenden Ladungsträgern geht ein evaneszentes Feld senkrecht zur Oberfläche aus, welches empfindlich auf den Brechungsindex des von ihm durchdrungenen Mediums reagiert. Ändert sich der Brechungsindex innerhalb dieses Bereichs führt das zu einer Rückkopplung, welche den nötigen Winkel zur Erfüllung der Resonanzbedingung ändert. Apparativ wird die Intensität des totalreflektierten Lichts in Abhängigkeit des Einstrahlwinkels gemessen. Das Messsignal ist hierbei die Lage bzw. die Änderung der Lage des Intensitätsminimums. Auf der Optik-abgewandten Seite der Metalloberfläche wird einer der Bindungspartner immobilisiert und der andere in gelöster Form an ihm vorbeigeführt. Jegliche Form von Bindung führt dann zu einer Akkumulation des mobilen Bindungspartners, was wiederum eine Änderung des Brechungsindex zur Folge hat.

3 Ergebnisse und Diskussion

Die Immobilisierung des Hämagglutinins H5 erfolgte in Anlehnung an die von M. Hollinger etablierte Methode.⁸² Eine exakte Anwendung dieser Methode war nicht möglich, da das für diese Arbeit verwendete Protein in einem Tris-haltigen Puffer gelöst war und deshalb vorher dialysiert werden musste. Das von M. Hollinger verwendete Protein lag in einem Phosphatpuffer vor und konnte direkt im Immobilisierungspuffer aufgenommen werden.⁸² Das Protein war in dem Immobilisierungspuffer nicht lange stabil. Durch Zugabe von 20 mM *N*-Acetylneuraminsäuremethylglycosid konnte die Stabilität etwas verbessert werden. Dieser Zusatz verschlechterte jedoch die Affinität des Proteins zur Dextranmatrix des Sensorchips erheblich, so dass mit sehr langen Kontaktzeiten bei der Immobilisierung gearbeitet werden musste. Die Herstellung eines Sensorchips mit einer ausreichenden Belegung an aktivem Hämagglutinin H5 gestaltete sich durch diese Umstände als schwierig und offensichtlich sehr empfindlich gegenüber kleinsten Variationen in der Durchführung. Die sichere Reproduktion einer Immobilisierung war nicht möglich. Es gelang einmalig eine initiale Immobilisierung von ca. 7600 *response unit* (RU) zu erreichen. Der Wert fiel kontinuierlich ab, wodurch die Verwendbarkeitsdauer einer Messzelle stark begrenzt war. Da aus ersten Messungen abgeschätzt werden konnte, dass sowohl die Assoziation als auch die Dissoziation langsam ablaufen, mussten lange Intervalle für diese Prozesse gewählt werden. Eine Verkürzung der Dissoziationszeit durch Implementierung einer Regenerationsphase war nicht möglich, da die getesteten Regenerationslösungen entweder keinen Effekt hatten oder die Messzelle unbrauchbar machten. Getestet wurden 50 mM HBS-Puffer, 1 M NaCl-Lösung, 10 mM Glycin pH 3, 10 mM Glycin pH 9.5 eine Lösung aus jeweils 50 mM Oxalsäure, Phosphorsäure, Ameisensäure und Oxalsäure, eine Lösung aus jeweils 67 mM Ethanolamin, Natriumphosphat, Piperazin und Glycin und eine Lösung mit 150 mM Kaliumthiocyanat, 600 mM Magnesiumchlorid, 30 mM Harnstoff und 600 mM Glycinhydrochlorid. Von diesen Lösungen hatten die pH-neutralen Lösungen nur geringe oder gar keine Effekte. Die basischen und vor allem die sauren Lösungen schienen das Protein irreversibel zu denaturieren. Die Kombination dieser Gegebenheiten erlaubte nur eine geringe Anzahl an Messzyklen mit einer erfolgreich hergestellten Messzelle. Um möglichst viele Liganden mit einer Messzelle vermessen zu können, wurde auf wiederholte Messungen eines Vergleichsliganden verzichtet.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.2.4 SPR Bindungsstudien der C-9 Aminokonjugate der N-Acetylneuraminsäure

Die SPR-Bindungsstudien des Ethylamino-Liganden **15** wurden in einem Konzentrationsbereich von 25 - 400 μM durchgeführt. Der theoretisch berechnete RU_{max} lag bei 41 RU. Dieser Wert wurde zumindest bei einer Messung überschritten. Alle Assoziationskurven zeigten eine Überlagerung durch unspezifische Wechselwirkungen. Die thermodynamische Analyse ergab einen Wert für K_D von 86.4 μM . Der Datenpunkt einer Messung der geringsten Konzentration wurde bei der Auswertung ignoriert (Abbildung 40).

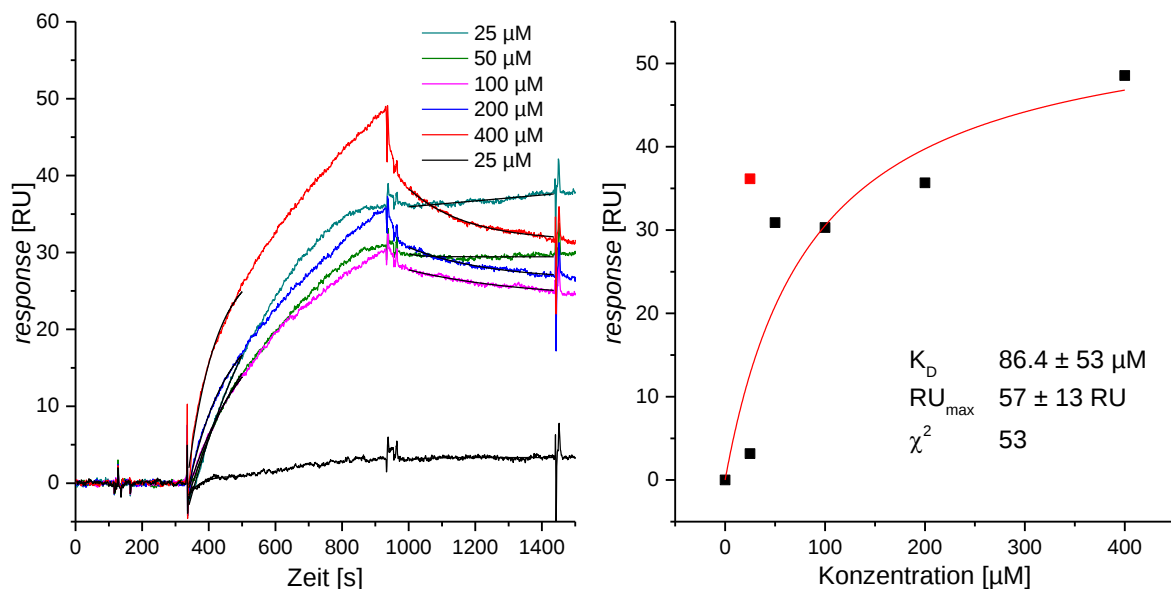


Abbildung 40: SPR-Bindungsstudie des Liganden **15**. Der theoretisch berechnete RU_{max} lag bei 41 RU. Auf der linken Seite sind die normierten und Basislinien-korrigierten Sensorgramme abgebildet. Die angepassten Funktionen zur Bestimmung von k_{on} und k_{off} sind den Sensorgrammen überlagert. Auf der rechten Seite ist die Anpassung an das *one site binding* Modell dargestellt. Der in rot dargestellte Messpunkt wurde bei der Kurvenanpassung nicht berücksichtigt.

Der nach dem *one site binding* Modell erhaltene Wert für K_D von 86.4 μM liegt in einer realistisch erscheinenden Größenordnung. Der sehr hohe χ^2 Wert zeigt jedoch eine geringe Korrelation der Anpassungsfunktion mit den Messdaten. Die weitere Analyse der Daten erfolgte kinetisch (Tabelle 2). Die Anpassung der Assoziationskurve erfolgte für die Messwerte der ersten 160 s ab Ligandinjektion, da im weiteren Kurvenverlauf der Einfluss unspezifischer Wechselwirkungen die Anpassbarkeit verschlechterte. Generell war es nur möglich die Sensorgramme der Proben mit den drei höchsten Konzentrationen einer

3 Ergebnisse und Diskussion

kinetischen Analyse zu unterziehen. Die Dissoziationskurven der restlichen Sensorgramme wiesen einen Anstieg des Signals auf, weshalb kein realistischer Wert für k_{off} erhalten werden konnte.

Tabelle 2: Kinetische Auswertung der SPR-Sensorgramme von 15. Die Werte für k_{off} und k_{on} wurden durch Kurvenanpassung in Origin 9.1 erhalten. Von der Assoziationskurve wurden aufgrund unspezifischer Wechselwirkungen nur die ersten 160 s ab Ligandinjektion berücksichtigt. Der Wert für K_D wurde durch Division von k_{off} durch k_{on} erhalten. Werte in Klammern wurden als nicht real betrachtet und sind nur der Vollständigkeit halber aufgeführt.

Konzentration [μM]	k_{off} [1/s]	k_{on} [1/Ms]	K_D [M]
25	$(-4.62 \cdot 10^{-3} \pm 3.9 \cdot 10^{-4})$	$(184 \pm 1.7 \cdot 10^{-3})$	n.a.
50	$2.96 \cdot 10^{-2} \pm 1.0 \cdot 10^{-2}$	(-489 ± 3.1)	n.a.
100	$2.86 \cdot 10^{-3} \pm 2.3 \cdot 10^{-4}$	28.2 ± 1.7	$1.01 \cdot 10^{-4}$
200	$4.11 \cdot 10^{-3} \pm 1.8 \cdot 10^{-4}$	22.6 ± 1.2	$1.82 \cdot 10^{-4}$
400	$5.74 \cdot 10^{-3} \pm 1.2 \cdot 10^{-4}$	14.7 ± 0.89	$3.91 \cdot 10^{-4}$
25	$2.03 \cdot 10^{-2} \pm 6.0 \cdot 10^{-2}$	(280 ± 71)	n.a.

Die kinetische Analyse der drei auswertbaren Sensorgramme ergaben sowohl für k_{off} als auch für k_{on} ähnliche Werte. Da bei der Probe mit der geringsten Konzentration auch die geringsten unspezifischen Wechselwirkungen zu erwarten waren, wurde deren Wert für K_D von 101 μM als Messergebnis gewertet. Damit waren die Werte der thermodynamischen und der kinetischen Auswertung sehr ähnlich.

Der *n*-Propylamino-Ligand **16** wurde ebenfalls in einem Konzentrationsbereich von 25 - 400 μM vermessen. Der theoretische berechnete RU_{max} lag bei 42 RU und wurde erneut im Sensorgramm der höchstkonzentrierten Probe überschritten (Abbildung 41). Die thermodynamische Analyse durch Anpassung an das *one site binding* Modell ergab einen K_D -Wert von 195 μM . Hierbei wurde ein Messwert der niedrigstkonzentrierten Probe vernachlässigt, da er negativ war und die Anpassbarkeit der Datenpunkte erheblich verschlechterte.

3 Ergebnisse und Diskussion

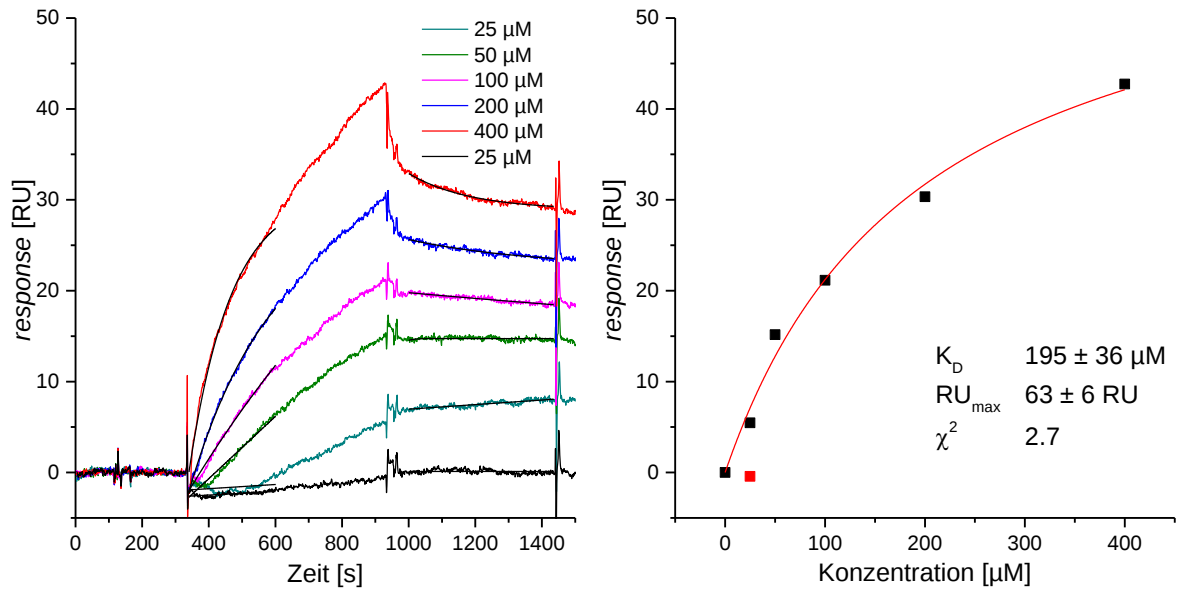


Abbildung 41: SPR-Bindungsstudie des Liganden 16. Der theoretisch berechnete RU_{max} lag bei 42 RU. Auf der linken Seite sind die normierten und Basislinien-korrigierten Sensorgramme abgebildet. Die angepassten Funktionen zur Bestimmung von k_{on} und k_{off} sind den Sensorgrammen überlagert. Auf der rechten Seite ist die Anpassung an das *one site binding* Modell dargestellt. Der in rot dargestellte Messpunkt wurde bei der Kurvenanpassung nicht berücksichtigt.

Die Anpassung der Assoziations- und Dissoziationskurven war nur für einen Teil der Daten möglich. Die Dissoziationskurven der drei Messungen der beiden am niedrigsten konzentrierten Proben zeigten kein Absinken oder sogar einen Anstieg der Kurve und waren somit nicht auswertbar. Bei den Assoziationskurven der vier Sensorgramme der am niedrigsten konzentrierten Proben trat anfänglich und unterschiedlich stark ausgeprägt ein irregulärer Verlauf der Kurven auf. Für die Auswertung wurden die Daten der ersten 260 s ab Ligandinjektion verwendet. Da bei drei der vier betroffenen Assoziationskurven der irreguläre Verlauf einen zu großen Anteil an diesem Bereich aufwies, konnten sie nicht sinnvoll ausgewertet werden. Für die Vierte musste zumindest von einer eingeschränkten Belastbarkeit des Ergebnisses ausgegangen werden, was sich auch in einem, den anderen Bestimmungen gegenüber, deutlichen erhöhten Fehler widerspiegelte.

3 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 3: Kinetische Auswertung der SPR-Sensorgramme von **16**. Die Werte für k_{off} und k_{on} wurden durch Kurvenanpassung in Origin 9.1 erhalten. Von der Assoziationskurve wurden aufgrund unspezifischer Wechselwirkungen nur die ersten 260 s ab Ligandinjektion berücksichtigt. Der Wert für K_D wurde durch Division von k_{off} durch k_{on} erhalten. Werte in Klammern wurden als nicht real betrachtet und sind nur der Vollständigkeit halber aufgeführt.

Konzentration [μM]	k_{off} [1/s]	k_{on} [1/Ms]	K_D [M]
25	$(1.68 \cdot 10^{-6} \pm 1.3 \cdot 10^{-4})$	$(-6.70 \cdot 10^{-2} \pm 85)$	n.a.
50	$(5.75 \cdot 10^{-2} \pm 4.0 \cdot 10^{-2})$	$(-1.15 \cdot 10^3 \pm 1.6 \cdot 10^{-2})$	n.a.
100	$2.99 \cdot 10^{-4} \pm 3.9 \cdot 10^{-4}$	7.32 ± 1.5	$(4.09 \cdot 10^{-5})$
200	$2.67 \cdot 10^{-3} \pm 2.9 \cdot 10^{-4}$	6.60 ± 0.37	$4.04 \cdot 10^{-4}$
400	$5.41 \cdot 10^{-3} \pm 2.1 \cdot 10^{-4}$	6.32 ± 0.42	$8.55 \cdot 10^{-4}$
25	$(6.21 \cdot 10^{-2} \pm 5.9 \cdot 10^{-2})$	$(-2.48 \cdot 10^3 \pm 3.9)$	n.a.

Die kinetische Analyse der drei auswertbaren Sensorgramme ergab drei unterschiedliche Werte für K_D (Tabelle 5). Die Werte für k_{on} waren weitestgehend identisch. Die Auswertung des Sensorgramms der 100 μM Probe ergab besonders stark fehlerbehaftete Ergebnisse. Der Fehler der Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation k_{off} überstieg 100 %. Deshalb wurde das Ergebnis dieser Probe als nicht belastbar eingestuft und verworfen. Von den verbleibenden beiden Messreihen konnte keine eindeutig disqualifiziert werden. Generell erschien die Messung der 200 μM als verlässlicher, da bei der geringer konzentrierten Probe die Effekte unspezifischer Wechselwirkungen weniger ausgeprägt sein sollten. Zusätzlich entsprach der erhaltene Wert für K_D eher dem der thermodynamischen Analyse. Es ließ sich demnach kein eindeutiges Ergebnis bestimmen. Aus den zuvor genannten Gründen wurde der Wert von 404 μM für **16** als ungefähre Dissoziationskonstante angenommen.

Für die SPR-Bindungsstudien des *iso*-Propyl-Liganden **17** wurde erneut ein Konzentrationsbereich von 25 - 400 μM gewählt. Der theoretische berechnete RU_{max} lag bei 42 RU. Obwohl das Sensorgramm der höchstkonzentrierten Probe deutliche Anzeichen unspezifischer Wechselwirkungen aufwies, wurde eine maximale Resonanzantwort von ca. einem Drittel RU_{max} erhalten (Abbildung 42). Dies konnte ein Hinweis auf eine

3 Ergebnisse und Diskussion

vorangeschrittene Degradation des Proteins auf der Chipoberfläche sein. Nach Anpassung an das *one site binding* Modell wurde ein K_D -Wert von 221 μM erhalten. Allerdings ist dieser Wert mit einem Fehler von 100 % berechnet worden. Die Werte der beiden Messreihen der niedrigstkonzentrierten Probe waren negativ und mussten zur Erreichung einer akzeptablen Anpassbarkeit vernachlässigt werden. Der Messwert der 400 μM Probe wurde aufgrund der starken Beeinflussung durch unspezifische Wechselwirkungen nicht berücksichtigt.

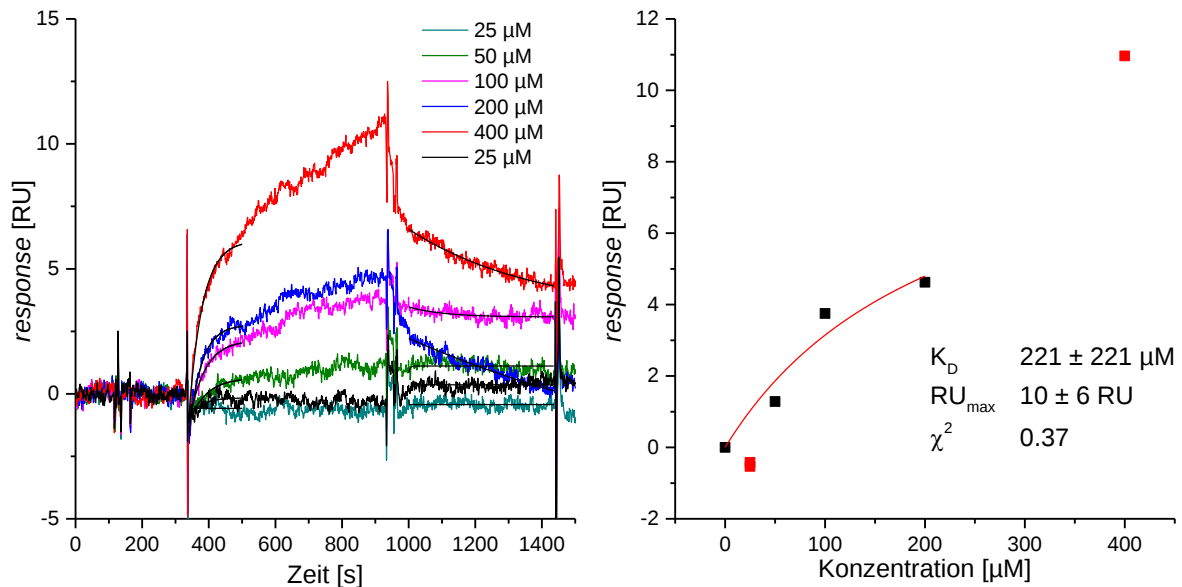


Abbildung 42: SPR-Bindungsstudie des Liganden 17. Der theoretisch berechnete $RU_{\max}$ lag bei 42 RU. Auf der linken Seite sind die normierten und Basislinien-korrigierten Sensorgramme abgebildet. Die angepassten Funktionen zur Bestimmung von k_{on} und k_{off} sind den Sensorgrammen überlagert. Auf der rechten Seite ist die Anpassung an das *one site binding* Modell dargestellt. Die in rot dargestellten Messpunkte wurden bei der Kurvenanpassung nicht berücksichtigt.

Für die kinetische Analyse konnten wieder nur wenige der Sensorgramme verwendet werden. Von den Assoziationskurven wurden nur die Daten der ersten 160 s ab Ligandinjektion ausgewertet. Hierbei waren die Signale der beiden Messungen der 25 μM Probe kaum vom Rauschen zu differenzieren. Die Dissoziationskurven der 25 μM und 50 μM Proben zeigten keinen abfallenden Verlauf. Die Dissoziationskurve der 200 μM Probe hingegen zeigte einen unrealistisch stark erscheinenden Abfall des Resonanzsignals. Die beiden verbliebenen Sensorgramme ergaben ähnliche Werte für K_D (Tabelle 4). Es wurde erneut das Ergebnis der geringer konzentrierten Probe als Ergebnis gewertet, da ein geringerer Einfluss unspezifischer Wechselwirkungen zu erwarten war. Der Wert für K_D ergab sich damit zu 80.6 μM .

3 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 4: Kinetische Auswertung der SPR-Sensorgramme von 17. Die Werte für k_{off} und k_{on} wurden durch Kurvenanpassung in Origin 9.1 erhalten. Von der Assoziationskurve wurden aufgrund unspezifischer Wechselwirkungen nur die ersten 160 s ab Ligandinjektion berücksichtigt. Der Wert für K_D wurde durch Division von k_{off} durch k_{on} erhalten. Werte in Klammern wurden als nicht real betrachtet und sind nur der Vollständigkeit halber aufgeführt.

Konzentration [μM]	k_{off} [1/s]	k_{on} [1/Ms]	K_D [M]
25	(1.92 ± 6.4)	$(-6.59 \cdot 10^5 \pm 85)$	n.a.
50	(0.276 ± 0.33)	$(-1.14 \cdot 10^3 \pm 33)$	n.a.
100	$9.53 \cdot 10^{-3} \pm 2.2 \cdot 10^{-3}$	118 ± 8.6	$8.06 \cdot 10^{-5}$
200	$9.96 \cdot 10^{-4} \pm 2.6 \cdot 10^{-4}$	129 ± 4.8	$(7.74 \cdot 10^{-6})$
400	$2.60 \cdot 10^{-3} \pm 2.1 \cdot 10^{-4}$	54.3 ± 1.8	$4.78 \cdot 10^{-5}$
25	$(0.134 \pm 9.2 \cdot 10^{-2})$	$(-4.22 \cdot 10^3 \pm 2.4 \cdot 10^2)$	n.a.

Die SPR-spektroskopischen Bindungsstudien der C-9 Aminokonjugate der *N*-Acetylneuraminsäure erwiesen sich als schwierig. Die Assoziationskurven schienen stets durch unspezifische Wechselwirkungen beeinflusst worden zu sein. Des Weiteren ließ die Qualität des Sensorchips fortwährend durch die stetige Degradation des immobilisierten Proteins nach. Trotz dieser Problematiken und der Tatsache, dass von jeder Messreihe nur ein Teil der Messzyklen ausgewertet werden konnte, war es möglich, die Dissoziationskonstanten der Liganden bestimmen zu können. Die Dissoziationskonstanten K_D lagen hierbei ungefähr in dem Bereich von 40 μM bis 220 μM . Damit sind diese Liganden denen von M. Hollinger zwar ähnlich, aber tendenziell eher geringer affin zum Hämagglutinin H5.⁸² Zusammen mit den Erkenntnissen zur Synthetisierbarkeit dieser Liganden bestärken diese Ergebnisse das Urteil, dass eine Inkorporierung dieser Modifikationen in die Liganden mit funktionalisiertem Aglycon nicht von Vorteil ist.

3.3 Liganden mit funktionalisiertem Aglycon

Aufbauend auf den Ergebnissen aus der Diplomarbeit wurde die Synthese der ursprünglichen Zielstruktur optimiert und erfolgreich etabliert.⁹¹ Hierbei führten weniger ausbleibende

3 Ergebnisse und Diskussion

Reaktionen als vielmehr auftretende Nebenreaktionen und damit verbundene Probleme bei der Isolierung zu Schwierigkeiten in der Darstellung der angestrebten Liganden. Nach erfolgreicher Synthese wurden erste Bindungsstudien mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie und STD-NMR-Spektroskopie durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine deutliche Steigerung der Affinität dieser Liganden gegenüber ihren Vorläuferstrukturen. Die SPR-spektroskopischen Bindungsstudien zeigten zunächst nur eine leichte Steigerung der Bindungsstärke. Aufgrund offensichtlicher zusätzlicher unspezifischer Wechselwirkungen wurden die Bindungen mittels kompetitiver STD-NMR-Titration als weiteres Verfahren charakterisiert. Hierbei zeigten die Inhibitionskonstanten K_I zweier Liganden, dass eine deutlich stärkere Bindung möglich ist. Die Bindungsstudien beschrieben die mitunter stärksten Wechselwirkungen zwischen Hämagglutinin H5 und monovalenten Liganden. Bei *in silico* durchgeführten *molecular dynamics* Simulationen zeigte sich, dass alternative Bindungsmodi existieren können, welche ebenfalls einen Beitrag zu der hohen Affinität leisten.

3.3.1 Synthese der Liganden mit funktionalisiertem Aglycon

Ausgehend vom β -Chlorid **18** wurde bei der nachfolgenden Glycosidsynthese zunächst Silbersalicylat als Promotor verwendet (siehe 6.5.11, Durchführung 1). Das Silbersalicylat und der Glycosylakzeptor *N*-Fmoc-3-Aminopropan-1-ol wurden zuvor nach literaturbekannten Synthesevorschriften dargestellt.^{102,103} Bei der Glycosylierung ließ sich kein reines Produkt **29** isolieren (Abbildung 43).

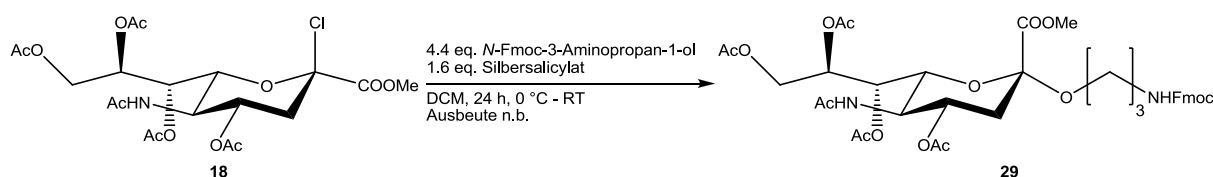


Abbildung 43: Glycosylierung von *N*-Fmoc-geschütztem 3-Aminopropan-1-ol mit dem Donator **18** unter Verwendung des Promotors Silbersalicylat. Die Entstehung des Produktes konnte nachgewiesen werden, jedoch war eine Reinigung nicht möglich.

Zunächst führten die hohen eingesetzten Mengen des Glycosylakzeptors zu Problemen bei der Reinigung. Da der Akzeptor im Gegensatz zum Produkt mit einem 1:1 Gemisch aus Petrolether und Ethylacetat eluiert werden konnte, ließ er sich durch eine Säulenfiltration komplett entfernen. Die weitere Reinigung des Produktes erwies sich jedoch nach wie vor als

3 Ergebnisse und Diskussion

problematisch. Unter den gewählten Reaktionsbedingungen entstanden stets beide Anomere des Glycosids. Diese ließen sich säulenchromatographisch zumindest teilweise trennen. Dennoch zeigte sich NMR-spektroskopisch stets, dass auch bei dünnsschichtchromatographisch rein erscheinenden Proben mehrere Derivate der Neuraminsäure enthalten waren. Aus dem NMR-Spektrum ließ sich allerdings nur auf die Anwesenheit des entsprechenden Glycals der peracetylierten Neuraminsäure schließen, da dieses ein charakteristisches Dublett bei 6.02 ppm besitzt. Das Vorhandensein zusätzlicher Dubletts vom Dublett im Bereich des Signals der equatorialen H-3 Protonen von Sialinsäuren ließ auf Verunreinigungen durch zusätzliche Nebenprodukte schließen. Um die Zusammensetzung genauer zu analysieren, wurde eine Probe nach der Abtrennung des Glycosylakzeptors per HPLC-ESI-MS untersucht (Abbildung 44).

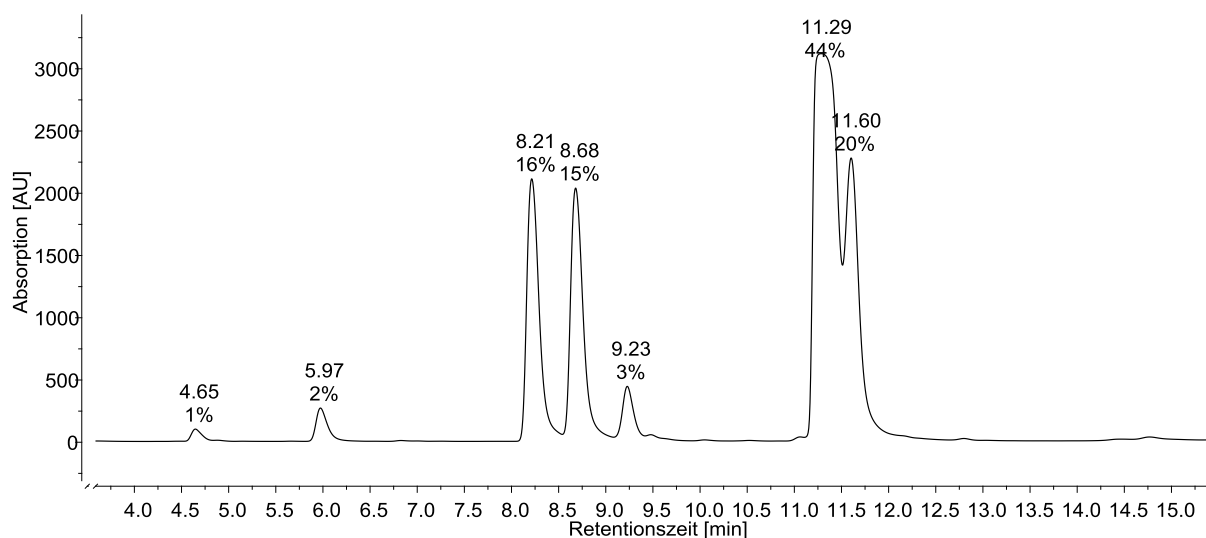


Abbildung 44: Chromatogramm von **29** nach 7.5.14 Durchführung 1. Dargestellt ist der Absorptionsverlauf bei $\lambda = 215$ nm von 3.5 bis 15.5 min. Die Peaks sind mit der Retentionszeit und dem prozentualen Flächenanteil an der Gesamtfläche beschriftet. Als Laufmittel A wurde reinst Wasser/Acetonitril 95:5 und als Laufmittel B Acetonitril/reinst Wasser 95:5 verwendet. Gradient: 0 min, 20 % B; 2 min, 40 % B; 15 min, 100 % B; 16 min, 100 % B; 21 min, 20 % B.

Das Chromatogramm zeigte, dass das Rohprodukt aus mindestens sieben verschiedenen Stoffen bestand. Das eigentlich gewünschte Produkt besaß am Gesamtintegral nur einen Anteil von 44 %. Anhand der Massenspektren zu den einzelnen Peaks konnte abgeschätzt werden, um welche Strukturen es sich wahrscheinlich handelte. Die unter den zwei ersten Peaks detektierten Masse zu Ladungsverhältnisse entsprachen denen des von **20** abgeleiteten Glycals bei $R_t = 5.97$ min und einem solchen Glycal ohne eine der Acetylschutzgruppen bei

3 Ergebnisse und Diskussion

$R_t = 4.65$ min. Das Glycal konnte nach Isolation auch NMR-Spektroskopisch nachgewiesen werden. Die Peaks bei 8.21 min, 8.68 min und 9.23 min konnten massenspektrometrisch Glycosiden der Salicylsäure (Abbildung 45, Verbindungen **30** und **31**) zugeordnet werden. Die beiden Glycoside, die zwischen Minute 8 und 9 eluierten konnten zusätzlich auch noch NMR-spektroskopisch charakterisiert werden. Die Spektren bestätigten die Auswertung der massenspektrometrischen Daten. In beiden Spektren zeigte sich ein Singulett mit einem Integral von jeweils eins bei einer Verschiebung von ca. 10.1 ppm. Diese Signale stammen von dem phenolischen Proton der Salicylsäure. Demnach ist die glycosidische Bindung über die Carboxylfunktion der Salicylsäure entstanden. Das Auftreten mehrerer isobarer Strukturen ist vermutlich zum einen durch das Entstehen der beiden Anomere des beschriebenen Glycosids zu erklären. Zum anderen ist es auch denkbar, dass das Salicylsäureglycosid mit der glycosidischen Bindung über den phenolischen Sauerstoff entstanden ist. Eine praktikable, eindeutige Bestimmung der Konfiguration des anomeren Zentrums per NMR wäre erst nach Entfernung der *O*-Acetylschutzgruppen möglich. Allerdings wurde davon ausgegangen, dass die Glycoside bei den hierfür benötigten Reaktionsbedingungen nicht stabil wären.

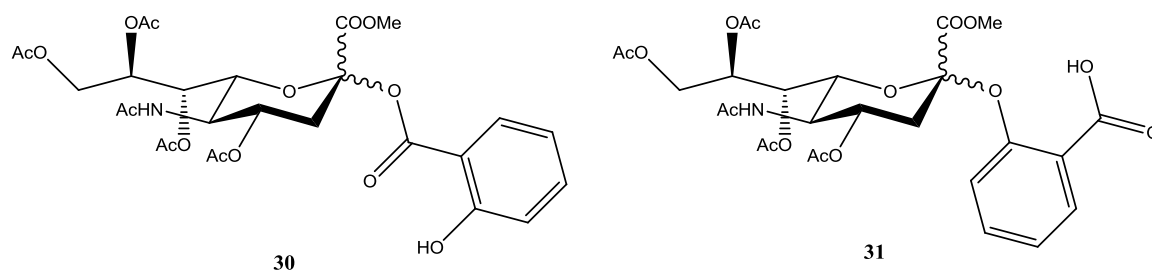


Abbildung 45: Strukturen der Salicylsäureglycoside der peracetylierten *N*-Acetylneuraminsäure, welche als Nebenprodukte bei der Glycosylierung mit Silbersalicylat als Promotor entstanden sind.

Bei den beiden Stoffen, die bei $R_t = 11.29$ min und $R_t = 11.60$ min eluierten, handelte es sich um das angestrebte Produkt und sein anomeres Epimer. Nach Isolation und Entfernung der *O*-Acetylschutzgruppen konnte für den zuerst eluierenden Stoff bestimmt werden, dass es sich um das α -Anomer handelte. Somit konnte gezeigt werden, dass bei den gewählten Reaktionsbedingungen das gewünschte Produkt erfolgreich dargestellt werden konnte, jedoch verhinderte die Vielzahl an Nebenprodukten eine erfolgreiche Reinigung. Um das Auftreten der Nebenprodukte zu verhindern, musste zunächst ein anderer Promotor gewählt werden. Der Glycosylakzeptor verfügt offensichtlich über eine zu geringe Nucleophilie, um entweder

3 Ergebnisse und Diskussion

schneller mit dem Donor zu reagieren als das Salicylat oder das Salicylsäureglycosid zu substituieren. Als Alternative wurde dann Silbercarbonat verwendet. In einem ersten Versuch zeigte sich hierbei, dass bei Temperaturen von $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ die Reaktion nur sehr langsam voranschritt und nach 48 Stunden Reaktionszeit das Edukt zu großen Teilen isoliert werden konnte. Dies zeigte erneut die geringe Reaktivität des eingesetzten Glycosylakzeptors. Bei Raumtemperatur und ansonsten identischer Reaktionsführung (siehe 6.5.11, Durchführung 2, Seite 112) konnte das gewünschte Produkt in 72 %iger Ausbeute erhalten werden (Abbildung 46).

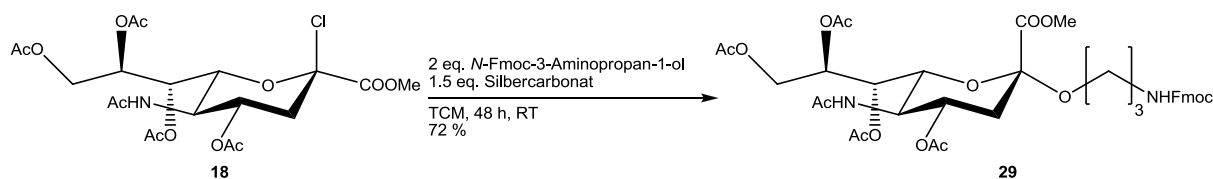


Abbildung 46: Glycosylierung von *N*-Fmoc-geschütztem 3-Aminopropan-1-ol mit dem Donor 18 unter Verwendung des Promotors Silbercarbonat. Die Verwendung von Silbercarbonat erlaubte die α -selektive Darstellung in guter Ausbeute.

Die Synthese des vollständigen Aglycons erfolgte nach einer konvergenten Strategie. Der endständige Baustein konnte bereits in einer vorangegangenen Arbeit erfolgreich synthetisiert werden. Der erste Syntheseschritt war die Darstellung der 3-(1-Naphthyloxy)-propansäure **32** entsprechend einer Williamson-Ethersynthese. Diese erfolgte analog zu einer literaturbekannten allgemeinen Arbeitsvorschrift zur Darstellung von (Aryloxy)-essigsäuren (Abbildung 47).¹⁰⁴ Hierbei lag die reproduzierbare Ausbeute jedoch nur bei 10 %.

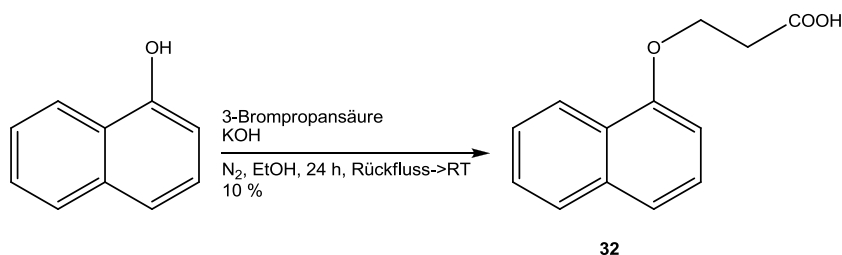


Abbildung 47: Darstellung von 3-(Naphthyloxy)-propansäure **32 in einer Williamson-Ethersynthese.**

Da niemals Nebenprodukte isoliert werden konnten, die einen eindeutigen Schluss auf die auftretende Nebenreaktion zuließen, wurde davon ausgegangen, dass eine Eliminierung des Bromides der 3-Brompropansäure die wahrscheinlichste Nebenreaktion wäre. Um dies zu umgehen, wurde versucht nach einer Vorschrift von Subramanian *et al.* die Verbindung **32** über das entsprechende Nitril **33** darzustellen (Abbildung 48).¹⁰⁵ Die Synthese des Nitrils

3 Ergebnisse und Diskussion

sollte theoretisch eine Ausbeute von 48 % liefern. Es konnte jedoch kein Produkt nachgewiesen werden.

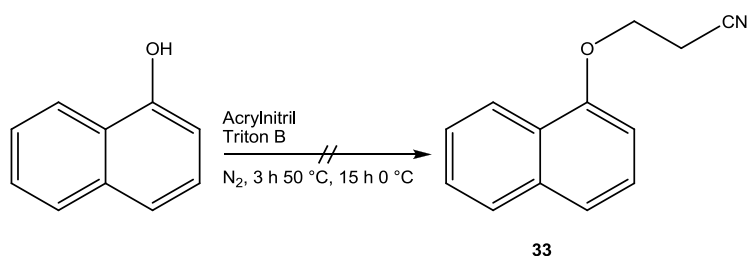


Abbildung 48: Versuch der Darstellung von 3-(Naphthyloxy)-propannitril **33 in einer Michael-Addition. Die Ergebnisse der literaturbekannten Synthese konnten nicht reproduziert werden.¹⁰⁵**

Daraufhin wurde eine ähnliche, alternative Synthesestrategie gewählt. Anstelle der Base Triton B wurde Diisopropylethylamin (DIPEA) verwendet und für eine längere Zeit stärker erwärmt. Auch die Gesamtreaktionsdauer wurde erhöht. Auf diese Weise ließ sich das Nitril **33** in einer Ausbeute von 66 % darstellen.

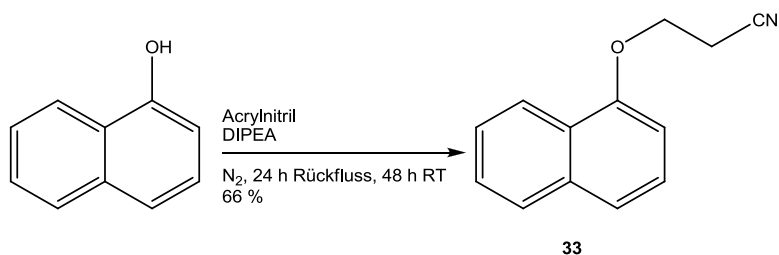


Abbildung 49: Darstellung von 3-(Naphthyloxy)-propannitril **33 in einer Michael-Addition. Durch Verwendung der Base DIPEA und Erhöhung der Reaktionsdauer und -temperatur konnte das Produkt erfolgreich synthetisiert werden.**

Um die ursprüngliche Zielverbindung **32** zu erhalten musste als nächstes das Nitril **33** verseift werden. Diese wurde erneut nach der Vorschrift von Subramanian *et al.* versucht (Abbildung 50).¹⁰⁵ Auch hierbei war die Synthese nicht erfolgreich. Eine Entstehung des Produktes konnte nicht nachgewiesen werden. Die einzige isolierbare Verbindung war 1-Naphthol, weshalb davon ausgegangen werden musste, dass ausschließlich die Spaltung des Ethers durch eine Eliminierung des Naphthols erfolgte.

3 Ergebnisse und Diskussion

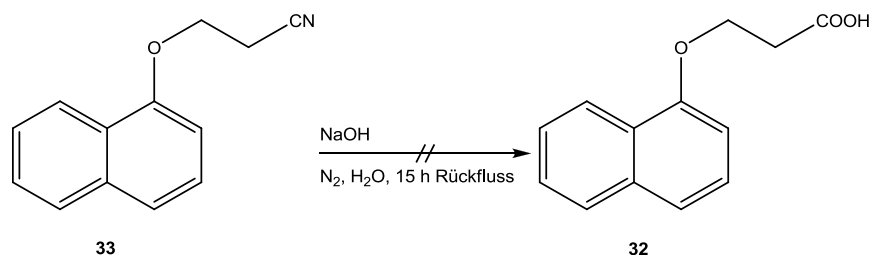


Abbildung 50: Versuch der Verseifung des Nitrils 33. Eine Entstehung des Produkts 32 konnte nicht beobachtet werden. Stattdessen konnte nur 1-Naphthol isoliert werden.

Die literaturbekannte Syntheseroute zur Darstellung der 3-(1-Naphthyloxy)-propansäure konnte somit nicht verifiziert werden.¹⁰⁵

Bei der Verseifung des Methylesters des endständigen Bausteins des Aglycons **34** wurde eine alternative Durchführung als in der vorangegangenen Arbeit etabliert (Abbildung 51).⁹¹ Der Grund lag darin, dass während der Verseifung immer wieder der pH-Wert kontrolliert und korrigiert werden musste. Hierbei war es sehr leicht möglich, dass zu stark alkalisiert und somit das Edukt bis zur weiteren Korrektur einem zu hohen pH-Wert ausgesetzt wurde. Dies hätte zu einer Racemisierung des Aspartats oder bei starker Überschreitung des Sollwertes zu einer Eliminierung an der Propionatgruppe führen können. Um dies zu verhindern, wurde die Verseifung in einem Hydrogencarbonat/Carbonat-Puffer bei pH 10 durchgeführt. Bei dieser Durchführung musste die Reaktionszeit deutlich gesteigert werden. Dies wies darauf hin, dass bei der Verseifung ohne Puffer zeitweise deutliche Überschreitungen des Soll-pH-Wertes aufgetreten sind. Die Spaltung des Methylesters im Puffer lieferte sehr gute Ausbeuten.

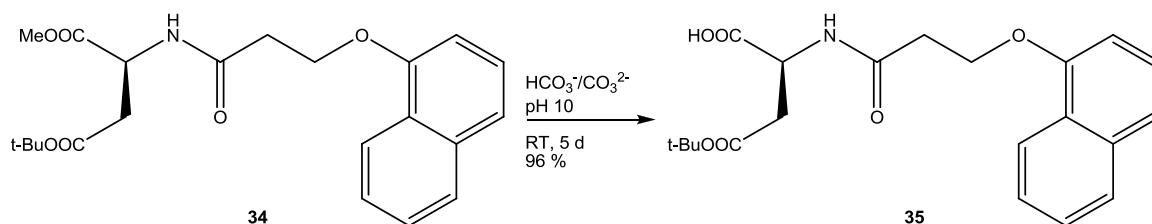


Abbildung 51: Verseifung des Methylester des endständigen Bausteins des Aglycons 34. Durch die Verwendung eines Puffers konnten Nebenreaktionen vermieden und der Baustein 35 in sehr guten Ausbeuten dargestellt werden.

Im nächsten Schritt wurde die Kupplung zum vollständigen Aglycon vollzogen. Erste Erkenntnisse zu dieser Synthese konnten bereits in der vorangegangenen Arbeit erlangt werden.⁹¹ So zeigte sich beispielsweise, dass nach Entschützung des terminalen Amins am

3 Ergebnisse und Diskussion

Aglycon der Verbindung **29** ein intramolekularer Angriff des freien Amins auf die Methylcarboxylatgruppe stattfand (Abbildung 52).

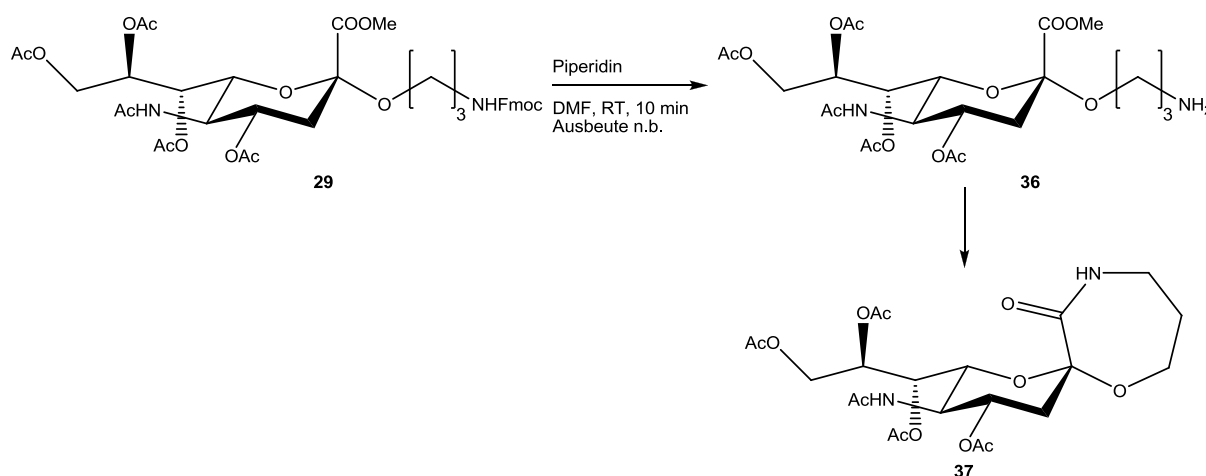


Abbildung 52: Entschützung des terminalen Amins des Glycosids **29**. Nach der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe griff das terminale Amin das C-1 Methylcarboxalat intramolekular an und führte zur Bildung des Lactams **37**. Das Produkt **36** war demnach instabil und eine Aufarbeitung nicht möglich.

Die Bildung des Lactams **37** war jedoch langsam genug, als dass eine sofortige Umsetzung mit dem Baustein **35** dieser Nebenreaktion zuvorkommen konnte.

Das Kupplungsreagenz TBTU ist nicht in der Lage die Amidbildung zu vermitteln. Erst durch Verwendung von HATU war dies möglich (Abbildung 53). Da bei den ersten Syntheseversuchen kein anomerenreines Glycosid **29** zur Verfügung stand, konnte auch kein reines Produkt erhalten werden.⁹¹ Im Rahmen dieser Arbeit gelang es allerdings das Glycosid **29** anomerenrein darzustellen. Des Weiteren konnte auch die säulenchromatographische Reinigung verbessert werden. Auf diesem Wege gelang es, das Glycosid mit dem vollständigen Aglycon **38** in guten Ausbeuten darzustellen.

3 Ergebnisse und Diskussion

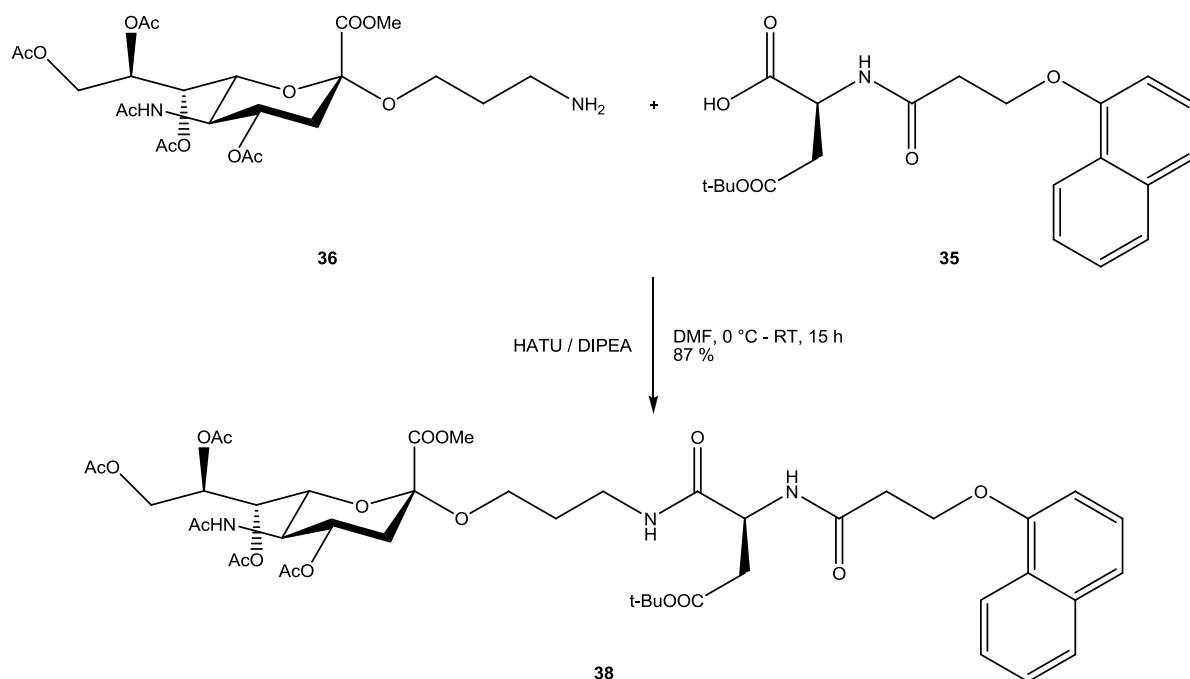


Abbildung 53: Amidkupplung zur Vervollständigung des Aglycons von Verbindung 38.

Im nächsten Schritt wurden alle *O*-Acetylschutzgruppen entfernt. Dies gelang mit der Methode nach Zemplén (Abbildung 54).^{106,107} Hierbei wurde darauf geachtet, dass der pH-Wert 10 nicht überschritt und die Reaktion absolut wasserfrei verlief. Eine leichte Kontamination mit Wasser zeigte sich durch einen ungewöhnlich langsamen Reaktionsverlauf. Eine Überschreitung des pH-Wertes hätte erneut zu einer Racemisierung des Aspartats oder einer Eliminierung an der Propionatgruppe führen können. Bei starker Überschreitung wäre auch eine Abspaltung der *N*-Acetylschutzgruppe möglich gewesen.

3 Ergebnisse und Diskussion

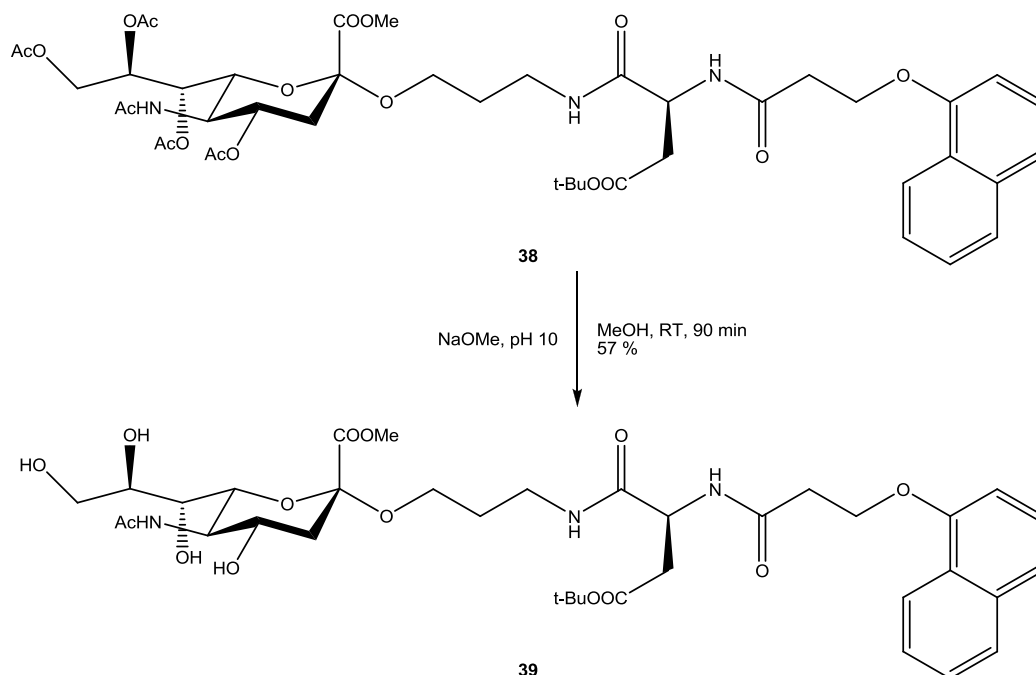


Abbildung 54: Deacetylierung nach Zemplén. Die Reaktion wurde bei pH 10 durchgeführt, um Nebenreaktionen wie der Racemisierung des Aspartats, der Eliminierung an der Propionatgruppe und der Abspaltung der *N*-Acetylschutzgruppe vorzubeugen.

Bei der Isolation des Produkts **39** mittels HPLC konnte bei allen Ansätzen festgestellt werden, dass zu einem Teil die *tert*-Butanolatgruppe durch eine Methanolatgruppe substituiert wurde (Abbildung 55). Es gelang dieses Nebenprodukt **40** in Ausbeuten von bis zu 13 % zu isolieren.

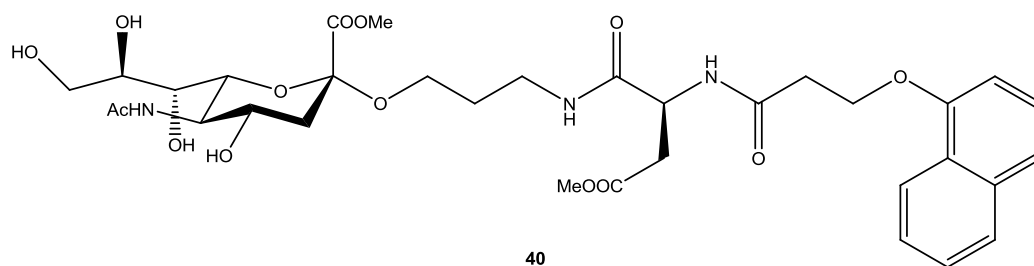


Abbildung 55: Struktur des bei der Deacetylierung der Verbindung 38 nach Zemplén entstandenen Nebenprodukts 40.

Die Verbindung **39** ist der letzte Baustein in der Synthesestrategie für die Darstellung der Liganden mit funktionalisiertem Aglycon, den alle Zielverbindungen gemeinsam haben. Für den ersten angestrebten Liganden mussten der Methyl- und der *tert*-Butylester hydrolysiert werden. Zuerst wurde der *tert*-Butylester mit Trifluoressigsäure (TFA) und Triisopropylsilan

3 Ergebnisse und Diskussion

(TIPS) gespalten (Abbildung 56). Bei dieser Reaktion sollte in der Theorie eine quantitative Umsetzung erreichbar sein. Die tatsächlich erreichte Ausbeute von 40 % war dementsprechend ungewöhnlich gering. Es ist davon auszugehen, dass neben den Verlusten bei der Reinigung auch eine Zersetzung des Produkts aufgetreten war. Bei der Reinigung mittels HPLC zeigten sich nur wenig intensive und nicht zuordenbare Fremdpeaks, so dass nicht eindeutig bestimmt werden konnte, welche Nebenreaktionen aufgetreten waren.

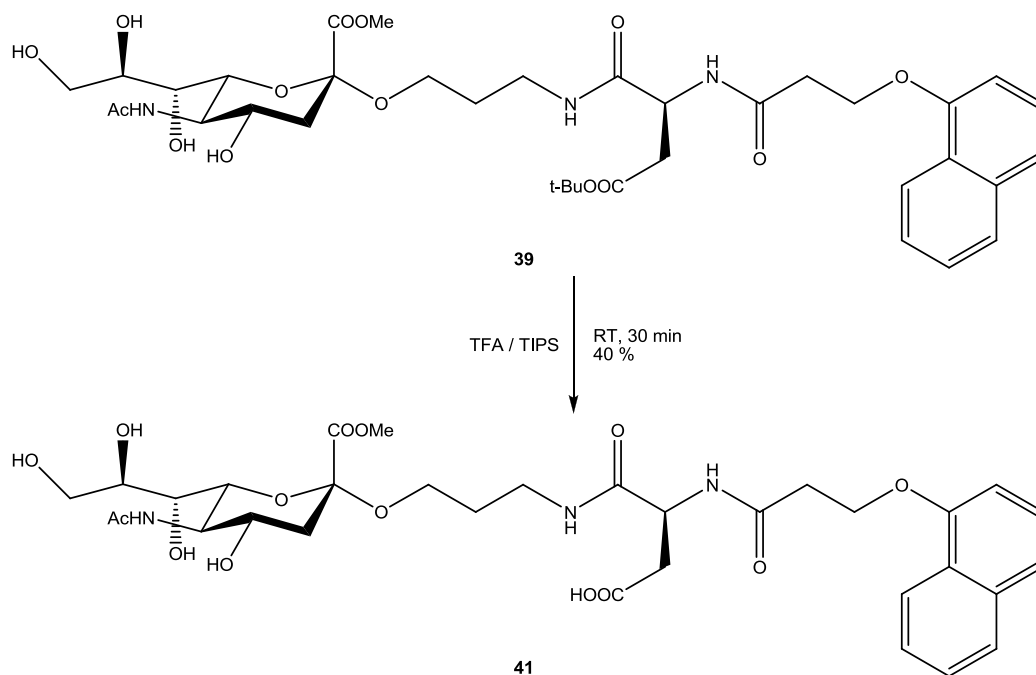


Abbildung 56: Spaltung des *tert*-Butylesters der Verbindung 39 mit TFA/TIPS.

Die anschließende Verseifung des Methylesters der Verbindung **41** wurde in einem Hydrogencarbonat/Carbonat-Puffer bei pH 10 durchgeführt (Abbildung 57). Dies erlaubte das Arbeiten bei niedrigem basischen pH-Wert in kleineren Volumina als beispielsweise die Verwendung von Natronlauge, ohne häufig den pH-Wert korrigieren zu müssen. Die Ausbeute von 67 % an freier Säure **42** lag hierbei wieder unter den theoretischen Erwartungen bei der basischen Verseifung eines Methylester.

3 Ergebnisse und Diskussion

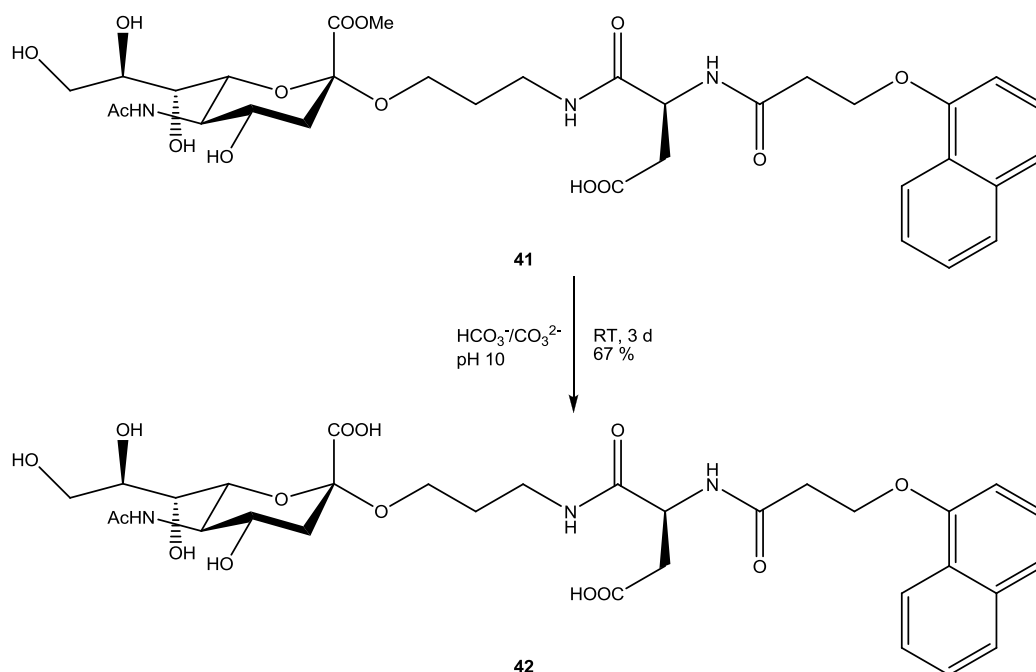


Abbildung 57: Verseifung des Methylester 41 in einem Hydrogencarbonat/Carbonat-Puffer bei pH 10.

Bei der Reinigung mittels HPLC konnten zwei Gründe für die geringe Ausbeute gefunden werden. Zum einen war trotz massenspektrometrischer Reaktionsverfolgung noch nicht umgesetztes Edukt enthalten und zum anderen schien es in geringem Maße zu einer Abspaltung des Aglycons gekommen zu sein. Das nicht umgesetzte Edukt **41** wäre chromatographisch isolierbar gewesen und hätte somit weiter verseift werden können.

Die weiteren Liganden mit funktionalisiertem Aglycon wurden ausgehend von der gemeinsamen Vorstufe **39** synthetisiert. Der nächste, noch für beide Zielverbindungen identische Schritt, war die Periodatspaltung an der Glycerolseitenkette (Abbildung 58). Bei ersten Versuchen wurde zur Aufarbeitung der Reaktion der Ionentauscher Amberlite MB-3 verwendet, welcher zu sehr geringen Ausbeuten des Aldehyds **43** führte. Ähnliches konnte auch bei der Neutralisation der Deacetylierung nach Zemplén der Verbindung **38** festgestellt werden. Ein möglicher Grund wäre die Anheftung der Substanzen über ihre Naphthylgruppe an das Polystyrolharz dieser Ionentauscher. Deshalb wurde bei allen Verbindungen mit dem vollständigen Aglycon auf die Verwendung von Ionentauschern verzichtet, wodurch die Ausbeuten signifikant gesteigert werden konnten.

3 Ergebnisse und Diskussion

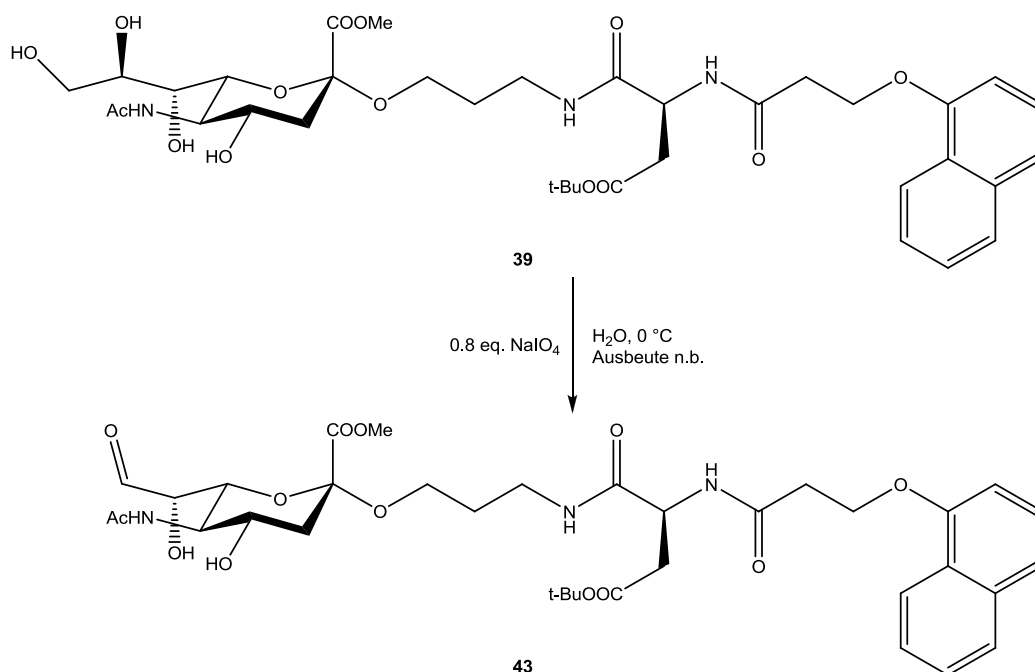


Abbildung 58: Periodatspaltung and der Glycerolseitenkette der Verbindung 39.

Aufgrund der *trans*-Anordnung der beiden OH-Gruppen an C-7 und C-8 und der geringeren sterischen Hinderung bei den OH-Gruppen an C-8 und C-9 würde zunächst eine eindeutige Selektivität für die Spaltung der C-8-C-9-Bindung erwartet werden. Da allerdings der C-8 Aldehyd in wässriger Lösung auch als Hydrat vorliegt, war von diesem ausgehend auch die weitere Spaltung zum C-7 Aldehyd erklärbar (Abbildung 59). Dieses Nebenprodukt war besonders problematisch, da es bei den weiteren Reaktionen analog zum Hauptprodukt reagierte.

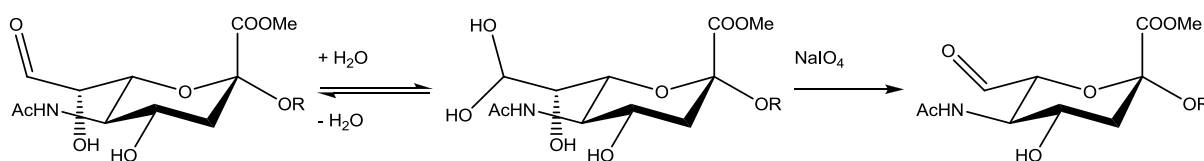


Abbildung 59: Mögliche Reaktionssequenz zur Entstehung des C-7 Aldehyds. Nach der ersten Periodatspaltung des endständigen vicinalen Diols lag der Aldehyd in wässriger Lösung teilweise als Hydrat vor. Da dieses erneut ein vicinales Diol war, konnte es gespalten werden.

Erste Versuche die weiteren Derivate des Nebenprodukts in den nachfolgenden Synthesen abzutrennen, waren nicht erfolgreich. Auf diese Problematik wird im Folgenden bei den entsprechenden Synthesen eingegangen. Es zeigte sich, dass die Entfernung des C-7 derivatisierten Nebenprodukts nur direkt nach der Periodatspaltung mittels HPLC möglich

3 Ergebnisse und Diskussion

war (Abbildung 60). Eine vollständige Isolation des C-8 Aldehyds war jedoch mit akzeptablem Aufwand nicht zu realisieren, da die Trennung durch das Gleichgewicht zwischen Aldehyd und Hydrat erschwert wurde.

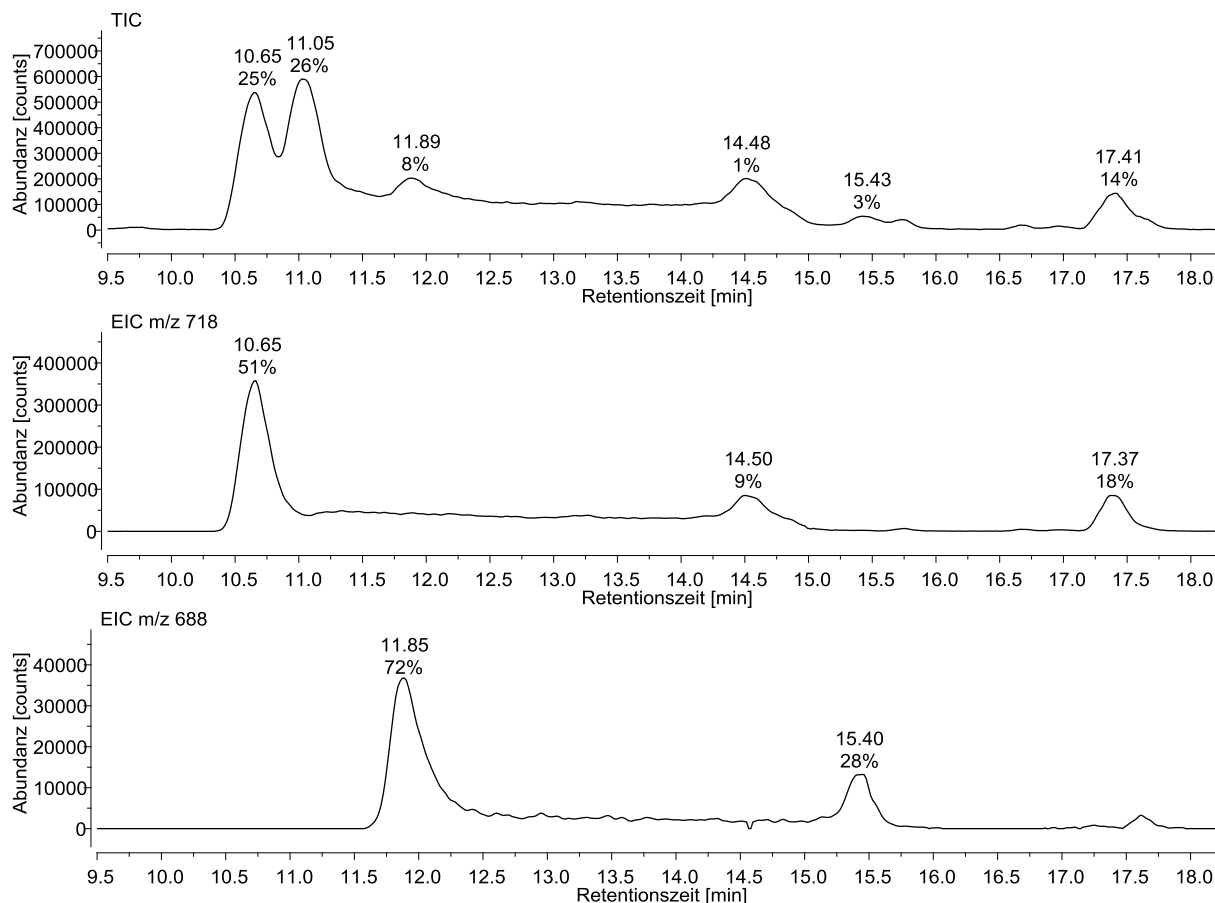


Abbildung 60: Chromatogramme eines HPLC-ESI-MS Trennlaufes von 43. Dargestellt sind die Daten des ESI-MS von 9.5 bis 18 min. Die Peaks sind mit der Retentionszeit und dem prozentualen Flächenanteil an der Gesamtfläche beschriftet. Als Laufmittel A wurde reinst Wasser/Acetonitril 95:5 und als Laufmittel B Acetonitril/reinst Wasser 95:5 verwendet. Gradient: 0 min, 20 % B; 5 min, 40 % B; 12.5 min, 45 % B; 16 min, 100 % B; 17 min, 100 % B; 19 min, 80 % B. Das oberste Chromatogramm zeigt den *total ion current* (TIC) für den m/z-Bereich von 400 bis 1000. Das zweite Chromatogramm zeigt ein *extracted ion chromatogram* (EIC) für m/z 718. Dies entspricht dem m/z für den $[M+H]^+$ -Peak des Produkts. Das dritte Chromatogramm zeigt ein EIC für m/z 688. Dies entspricht dem m/z für den $[M+H]^+$ -Peak des C-7 Nebenprodukts.

Die EICs der Massen des Haupt- und des Nebenprodukts wiesen je zwei Maxima mit einem dazwischen liegenden Plateau auf. Die beiden Maxima waren den Molekülen zuzuordnen, die während der gesamten Dauer des Trennlaufs entweder als Aldehyd oder dessen Hydrat vorlagen. Das Plateau entsprach den Molekülen, die während des Trennlaufes zwischen den

3 Ergebnisse und Diskussion

beiden Formen gewechselt haben. Dass es sich um zwei im Gleichgewicht stehende Substanzen handelte, konnte durch erneute Trennung der nach Minute 11.5 eluierenden Substanzen gezeigt werden, da die Form des EICs wieder die selbe war und sich demnach die Substanz mit $R_t = 10.65$ min nachgebildet haben musste. Eine massenspektrometrische Unterscheidung war nicht möglich, da das Aldehydhydrat unter den Ionisierungsbedingungen in der ESI-Ionenquelle nicht stabil war. Bei der Substanz mit $R_t = 11.05$ min handelte es sich um das Edukt **39**. Von dessen Abtrennung wurde zugunsten einer maximalen Ausbeute an Verbindung **43** abgesehen, zumal es in der Folgereaktion inert und anschließend signifikant besser zu trennen war. Dies war von besonderer Bedeutung, da nicht nur das Unvermögen das Produkt quantitativ chromatographisch zu trennen die zu erwartende Ausbeute schmälerte. Die Nebenreaktion wirkte sich in zweifacher Weise negativ aus, da zum einen das Hauptprodukt degradiert und das für die Reaktion benötigte Periodat verbraucht wurde.

Im nächsten Reaktionsschritt erfolgte die reduktive Aminierung des Aldehyds **43** (Abbildung 61). Als Amine wurden Cyclopropanmethylamin und 4-Aminobuttersäure eingesetzt. Die Ausbeuten für beide Stufen beziehen sich auf die eingesetzte Menge an Natriumperiodat bei der Spaltung der Verbindung **39**. Bei der Reinigung per HPLC-MS konnte nicht festgestellt werden, dass sich noch unumgesetztes Edukt **43** in dem Ansatz befand. Dies lässt den Schluss zu, dass die reduktive Aminierung annähernd quantitativ ablief. Die Ausbeuteeinbußen resultierten demnach primär aus der Periodatspaltung.

3 Ergebnisse und Diskussion

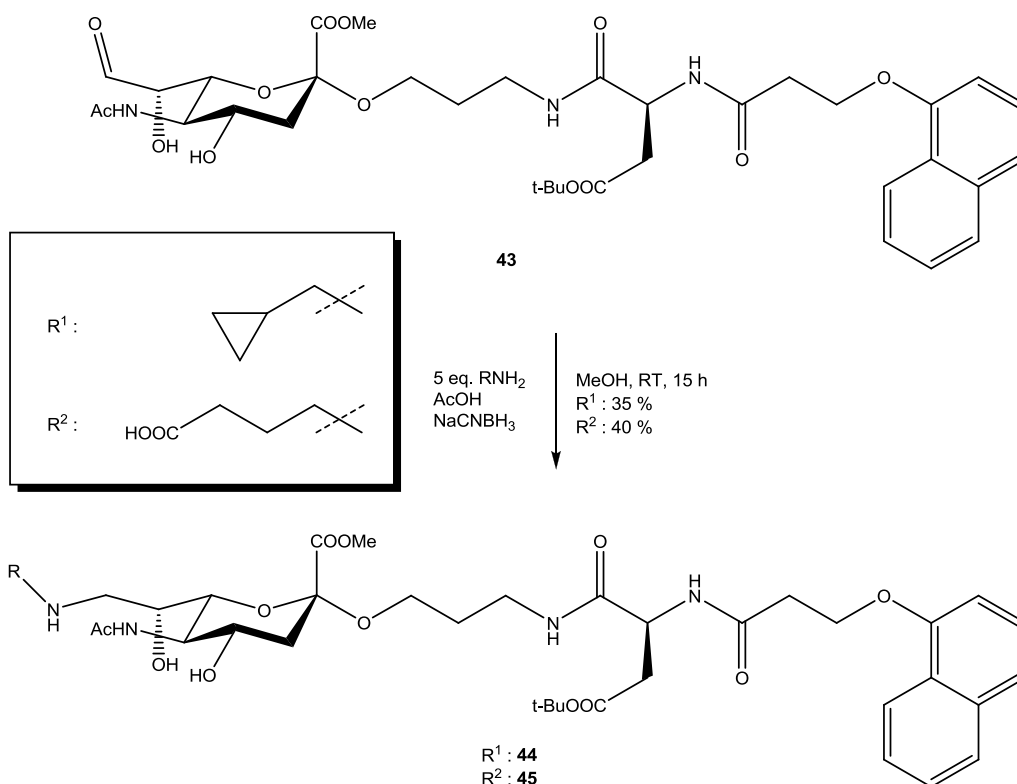


Abbildung 61: Reduktive Aminierung des Aldehyds 43 mit Cyclopropanmethylamin und 4-Aminobuttersäure. Da das Edukt 43 nur als Gemisch mit dessen Vorstufe 39 erhalten werden konnte, beziehen sich die Ausbeuten über zwei Stufen auf das für die Periodatspaltung im Unterschuss eingesetzte Natriumperiodat.

Die Produkte beider reduktiven Aminierungen (**44** und **45**) ließen sich per HPLC gut isolieren, solange nach der Periodatspaltung das Nebenprodukt abgetrennt wurde. In ersten Versuchen wurde dies nicht durchgeführt. Die anschließende Trennung erwies sich als sehr schwer, da der Unterschied in den Retentionszeiten, wie im exemplarischen Chromatogramm (Abbildung 62) zu erkennen, in der Regel marginal war. Auch die Verwendung verschiedener Säulenmaterialien und Gradienten konnte die Trennung nicht verbessern. Eine Beschleunigung des Gradienten verringerte den Unterschied in den Retentionszeiten und eine Verlangsamung führte zu sehr starkem *tailing* bis hin zu vollkommen unscharfen, über viele Minuten eluierende Substanzen. Zu den getesteten Säulen gehörten die Macherey-Nagel NUCLEODUR[®] C₁₈ Isis und Pyramid Säulen und die Phenomenex[®] Luna NH₂ Säule.

3 Ergebnisse und Diskussion

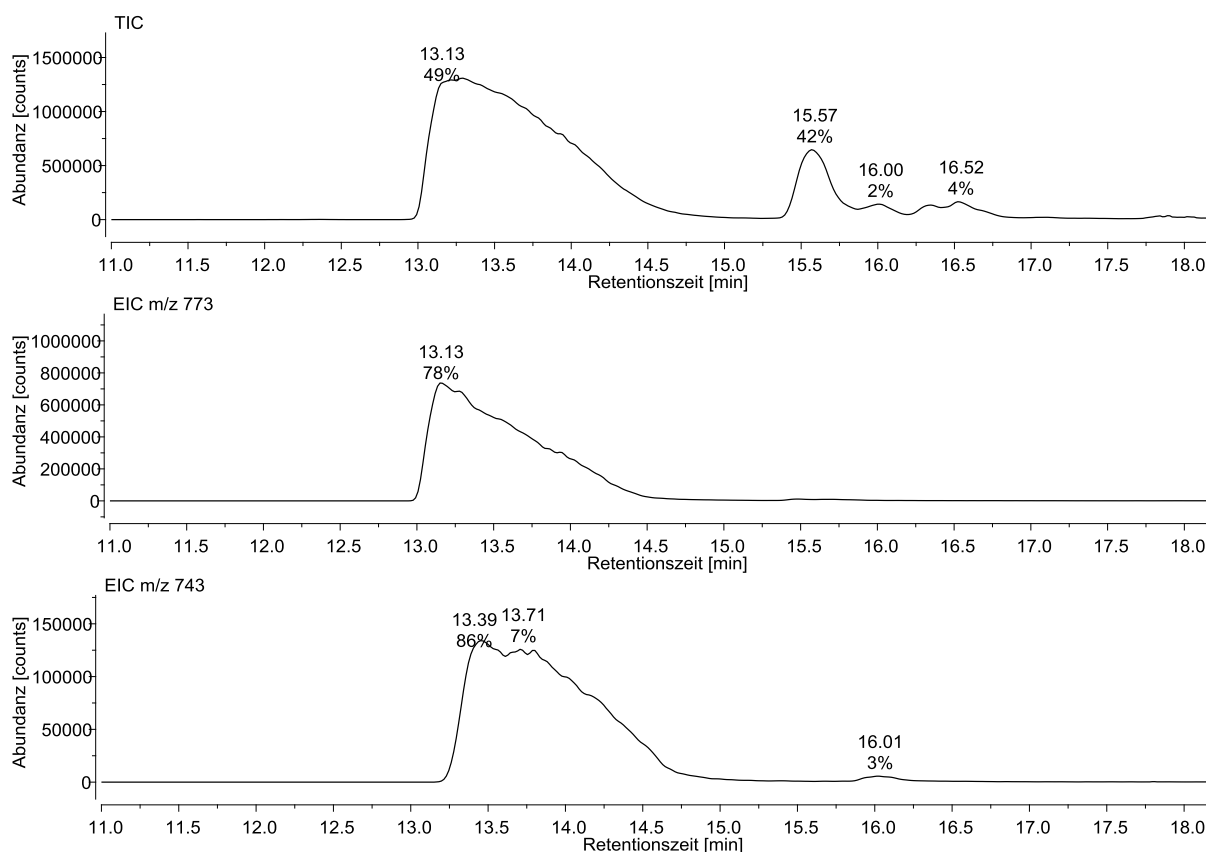


Abbildung 62: Chromatogramme eines HPLC-ESI-MS Trennlaufes von **44**. Dargestellt sind die Daten des ESI-MS von 11 bis 18 min. Die Peaks sind mit der Retentionszeit und dem prozentualen Flächenanteil an der Gesamtfläche beschriftet. Als Laufmittel A wurde reinst Wasser/Acetonitril 95:5 und als Laufmittel B Acetonitril/reinst Wasser 95:5 jeweils mit 0.1 % Ameisensäure verwendet. Gradient: 0 min, 20 % B; 19.5 min, 72 % B; 21 min, 100 % B; 23 min, 80 % B. Das oberste Chromatogramm zeigt den *total ion current* (TIC) für den m/z-Bereich von 720 bis 820. Das zweite Chromatogramm zeigt ein *extracted ion chromatogram* (EIC) für m/z 773. Dies entspricht dem m/z für den $[M+H]^+$ -Peak des Produkts. Das dritte Chromatogramm zeigt ein EIC für m/z 743. Dies entspricht dem m/z für den $[M+H]^+$ -Peak des C-7 Nebenprodukts.

Bei den letzten beiden Schritten bis zur Fertigstellung der angestrebten Liganden handelte es sich um die Verseifung der beiden geschützten Carboxylate. Es wurde zunächst versucht, beide Verseifungen ohne zwischenzeitliche Reinigung der Produkte durchzuführen. Die Reinheit des Liganden war entschieden höher, wenn nach jeder einzelnen Verseifung mittels HPLC gereinigt wurde. Als erstes wurden die *tert*-Butylester der Verbindungen **44** und **45** mit TFA/TIPS abgespalten (Abbildung 63). Bei der Reinigung der beiden Produkte zeigt sich, dass sich keine allgemeine Aufarbeitung etablieren ließ. Die Isolierung von **46** gelang am besten unter Verwendung der Phenomenex[®] Luna NH₂ Säule. Das Produkt **47** hingegen

3 Ergebnisse und Diskussion

eluierte bei Verwendung dieser Säule mit der Laufmittelfront. Für dieses Produkt ließ sich die beste Trennung unter Verwendung der Macherey-Nagel NUCLEODUR[®] C₁₈ Isis Säule erreichen.

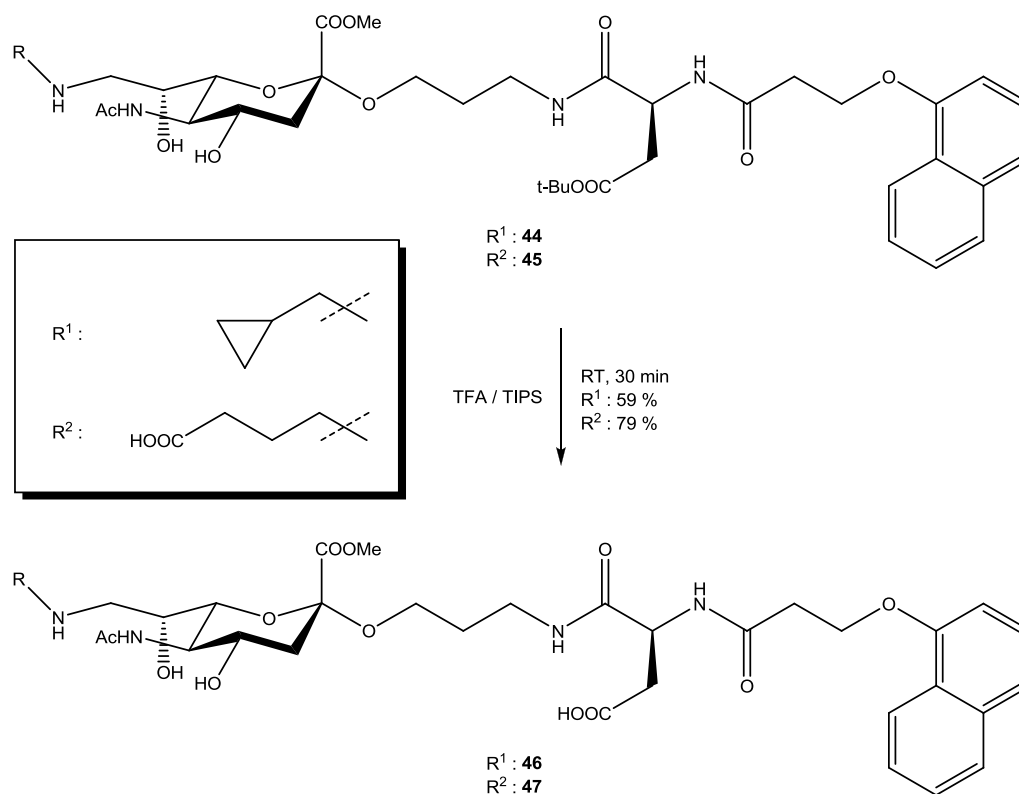


Abbildung 63: Verseifung der *tert*-Butylester der Verbindungen 44 und 45 mit TFA/TIPS.

Der finale Syntheseschritt zu den beiden Liganden **48** und **49** war die Verseifung des Methylesters (Abbildung 64). Es wurde erneut ein Hydrogencarbonat/Carbonat-Puffer bei pH 10 eingesetzt und die Aufarbeitung dieser Stufe erfolgte ebenfalls per HPLC. Beide Liganden ließen sich am besten unter Verwendung der Phenomenex[®] Luna NH₂ Säule trennen und zeigten hierbei ein ähnliches Elutionsverhalten. Die geringe Ausbeute bei der Darstellung des Liganden **49** war hauptsächlich auf eine unvollständige Umsetzung zurückzuführen. Da Produkt und Edukt ein deutlich unterschiedliches Elutionsverhalten aufwiesen, konnte das Edukt vollständig abgetrennt werden. Es bestände also die Möglichkeit, dieses zurückzugewinnen und erneut zu verseifen.

3 Ergebnisse und Diskussion

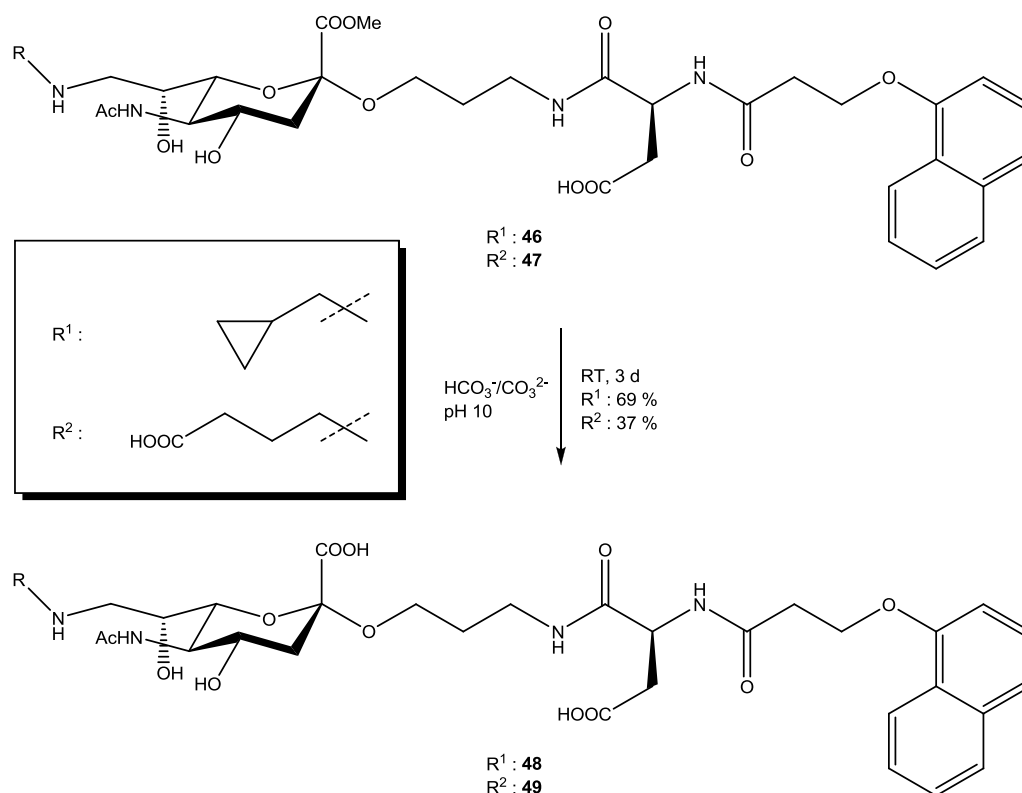


Abbildung 64: Verseifung der Methylester der Verbindungen 46 und 47 in einem Hydrogencarbonat/Carbonat-Puffer bei pH 10.

Die hier dargestellte Syntheseroute ermöglichte den Zugang zu drei sehr interessanten Liganden des Hämagglutinins H5: **42**, **48** und **49** (Abbildung 65). Des Weiteren sollte es auch möglich sein, diese Synthesestrategie auf weitere Variationen mit analogen Bausteinen zu übertragen und somit eine Vielzahl ähnlicher Liganden darzustellen und diese weiter zu optimieren.

3 Ergebnisse und Diskussion

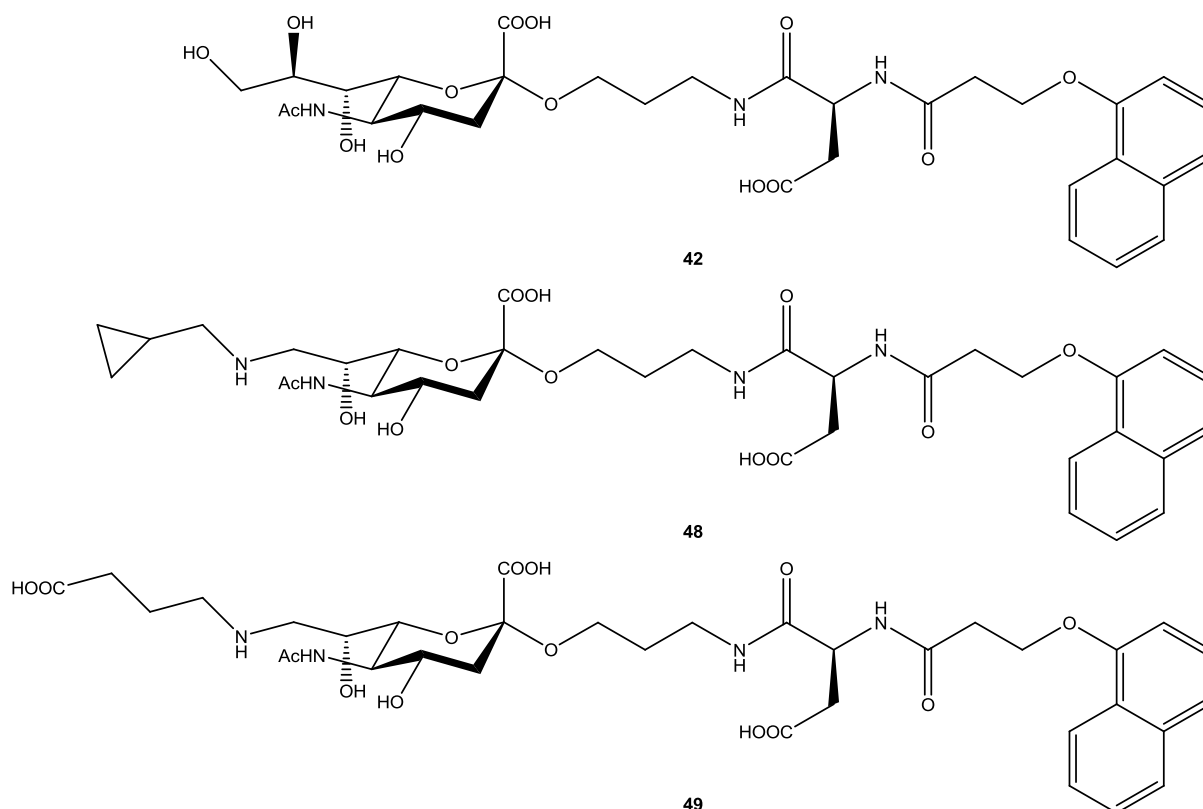


Abbildung 65: Strukturformeln der Liganden 42, 48 und 49. Alle drei Liganden konnten im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich synthetisiert werden.

3.3.2 SPR Bindungsstudien der Liganden mit funktionalisiertem Aglycon

Die SPR-Bindungsstudien des Liganden 42 wurden in einem Konzentrationsbereich von 62.5-1000 μM durchgeführt. Obwohl der theoretische berechnete RU_{max} von 79 RU nicht annähernd erreicht wurde, ließ der in den Sensorgrammen zu erkennende Kurvenverlauf auf unspezifische Wechselwirkungen schließen (Abbildung 66). Die thermodynamische Analyse bestätigte diesen Verdacht, da die erhaltenen Datenpunkte auf einer Geraden zu liegen schienen. Bei Anpassung an das *one site binding* Modell wurden Werte für K_D und RU_{max} erhalten, die deutlich über den erwarteten lagen und Fehler von annähernd 100 % aufwiesen.

3 Ergebnisse und Diskussion

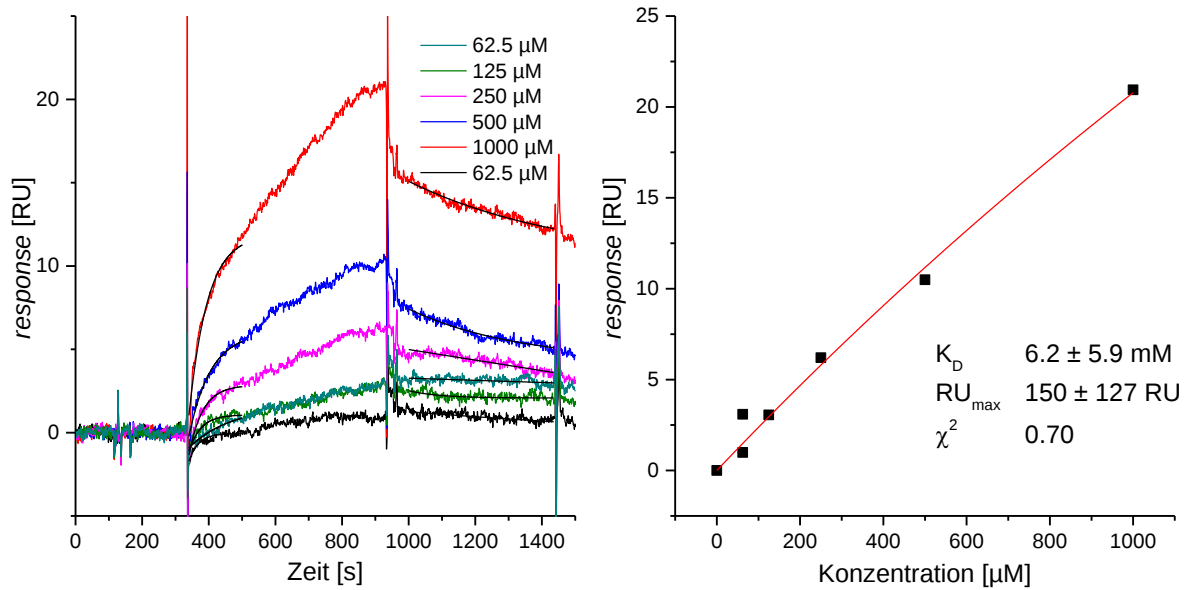


Abbildung 66: SPR-Bindungsstudie des Liganden 42. Der theoretisch berechnete RU_{max} lag bei 79 RU. Auf der linken Seite sind die normierten und Basislinien-korrigierten Sensorgramme abgebildet. Die angepassten Funktionen zur Bestimmung von k_{on} und k_{off} sind den Sensorgrammen überlagert. Auf der rechten Seite ist die Anpassung an das *one site binding* Modell dargestellt. Aufgrund unspezifischer Wechselwirkungen lieferte diese Bestimmung keine realistischen Werte.

Um trotzdem erste Erkenntnisse aus den gesammelten Daten erlangen zu können, wurde bei der kinetischen Analyse die Anpassung an die Funktion von k_{on} nur für die Messdaten der ersten 160 s ab Ligandinjektion durchgeführt. Die Dissoziationskonstante K_D wurde durch Division von k_{off} durch k_{on} erhalten (Tabelle 5).

3 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 5: Kinetische Auswertung der SPR-Sensorgramme von 42. Die Werte für k_{off} und k_{on} wurden durch Kurvenanpassung in Origin 9.1 erhalten. Von der Assoziationskurve wurde aufgrund unspezifischer Wechselwirkungen nur etwas mehr als das erste Viertel berücksichtigt. Der Wert für K_D wurde durch Division von k_{off} durch k_{on} erhalten.

Konzentration [μM]	k_{off} [1/s]	k_{on} [1/Ms]	K_D [M]
62.5	$2.77 \cdot 10^{-6} \pm 2.9 \cdot 10^{-3}$	126 ± 24	$2.20 \cdot 10^{-8}$
125	$1.08 \cdot 10^{-2} \pm 2.5 \cdot 10^{-3}$	139 ± 16	$7.75 \cdot 10^{-5}$
250	$1.37 \cdot 10^{-6} \pm 1.4 \cdot 10^{-4}$	96.2 ± 4.4	$1.42 \cdot 10^{-8}$
500	$3.01 \cdot 10^{-3} \pm 2.7 \cdot 10^{-4}$	24.7 ± 1.4	$1.22 \cdot 10^{-4}$
1000	$2.05 \cdot 10^{-3} \pm 2.2 \cdot 10^{-4}$	15.9 ± 0.64	$1.29 \cdot 10^{-4}$
62.5	$7.01 \cdot 10^{-4} \pm 9.2 \cdot 10^{-4}$	545 ± 45	$1.29 \cdot 10^{-6}$

Bei der kinetischen Analyse wurden teilweise sehr unterschiedliche Ergebnisse aus den einzelnen Sensorgrammen der Konzentrationsreihe erhalten. Die Daten der Messungen der 62.5 μM und der 125 μM Proben wurden als unzuverlässig betrachtet, da nur sehr geringe Änderungen der Signalantwort, besonders bei den Dissoziationskurven, beobachtet werden konnten. Bei der Auswertung der 250 μM Probe wurde ein Wert für k_{off} erhalten, dessen Fehler fast zwei Größenordnungen größer als der eigentliche Messwert war. Die Auswertung der Sensorgramme der 500 μM und der 1000 μM Proben ergab sowohl für k_{on} als auch k_{off} ähnliche Werte. Im Mittel ergaben diese beiden Messkurven eine Dissoziationskonstante K_D von 126 μM für den Liganden **42**. Dieser Wert schien, obwohl er unter den Erwartungen lag, zunächst realistisch zu sein, da er dem des Liganden **1** von M. Hollinger sehr ähnlich war.⁸² Der Ligand unterscheidet sich nur um eine Methyleneinheit im Aglycon von **42** und wies einen K_D -Wert von 171 μM auf. Wegen der starken Überlagerung der Messkurven durch unspezifische Assoziationen wurde die Bindung dieses Liganden zusätzlich mittels STD-NMR charakterisiert.

Die SPR-Bindungsstudien des Liganden **48** wurden in einem Konzentrationsbereich von 6.25-100 μM durchgeführt. Der theoretische berechnete RU_{max} lag bei 81 RU. Dieser Wert wurde erneut nicht erreicht. Die Sensorgramme wiesen ebenfalls einen Kurvenverlauf auf, der

3 Ergebnisse und Diskussion

auf unspezifische Wechselwirkungen schließen ließ (Abbildung 67). Dem entsprechend ergab die Anpassung an das *one site binding* Modell wieder keine realistischen Ergebnisse. Der Wert der 12.5 μM Probe wurde vernachlässigt, da es bei diesem Messzyklus, wie das Sensorgramm erkennen lässt, zu einem nicht nachvollziehbaren Messfehler kam. Die Werte der beiden 6.25 μM Proben waren negativ und mussten vernachlässigt werden, um überhaupt eine erfolgreiche Anpassung erreichen zu können.

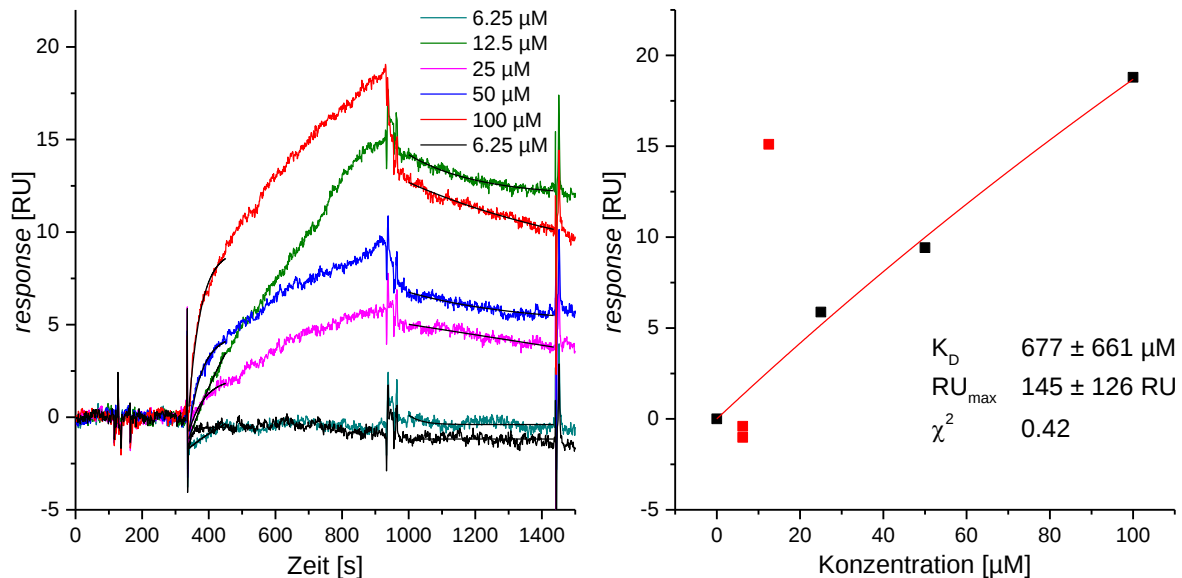


Abbildung 67: SPR-Bindungsstudie des Liganden 48. Der theoretisch berechnete $RU_{\max}$ lag bei 81 RU. Auf der linken Seite sind die normierten und Basislinien-korrigierten Sensorgramme abgebildet. Die angepassten Funktionen zur Bestimmung von k_{on} und k_{off} sind den Sensorgrammen überlagert. Auf der rechten Seite ist die Anpassung an das *one site binding* Modell dargestellt. Aufgrund unspezifischer Wechselwirkungen lieferte diese Bestimmung keine realistischen Werte. Die in rot dargestellten Messpunkte wurden bei der Kurvenanpassung nicht berücksichtigt.

Um bei der kinetischen Analyse den Einfluss der unspezifischen Wechselwirkungen möglichst gering halten zu können, erfolgte die Anpassung an die Funktion von k_{on} nur für die Messdaten der ersten 110 s ab Ligandinjektion.

3 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 6: Kinetische Auswertung der SPR-Sensorgramme von 48. Die Werte für k_{off} und k_{on} wurden durch Kurvenanpassung in Origin 9.1 erhalten. Von der Assoziationskurve wurden aufgrund unspezifischer Wechselwirkungen nur die ersten 110 s ab Ligandinjektion berücksichtigt. Der Wert für K_D wurde durch Division von k_{off} durch k_{on} erhalten. Werte in Klammern wurden, aufgrund des negativen Vorzeichens, als nicht real betrachtet und sind nur der Vollständigkeit halber aufgeführt.

Konzentration [μM]	k_{off} [1/s]	k_{on} [1/Ms]	K_D [M]
6.25	$2.59 \cdot 10^{-2} \pm 5.9 \cdot 10^{-3}$	$(-3.54 \cdot 10^3 \pm 4.0 \cdot 10^2)$	n. a.
12.5	$4.79 \cdot 10^{-3} \pm 2.9 \cdot 10^{-4}$	(-46.2 ± 60)	n. a.
25	$6.37 \cdot 10^{-4} \pm 1.7 \cdot 10^{-5}$	807 ± 80	$7.89 \cdot 10^{-7}$
50	$3.03 \cdot 10^{-3} \pm 4.8 \cdot 10^{-4}$	442 ± 28	$6.84 \cdot 10^{-6}$
100	$1.51 \cdot 10^{-3} \pm 2.2 \cdot 10^{-4}$	255 ± 10	$5.91 \cdot 10^{-6}$
6.25	$9.20 \cdot 10^{-9} \pm 1.3 \cdot 10^{-1}$	$5.56 \cdot 10^2 \pm 2.5 \cdot 10^3$	$1.65 \cdot 10^{-4}$

Das Sensorgramm der 12.5 μM Probe wurde als zu stark fehlerbehaftet angesehen, um verwendet zu werden. Die beiden Messungen der geringsten Konzentration wiesen zu geringe Signalantworten auf, um verwendet werden zu können. Die restlichen drei Sensorgramme zeigten bei der kinetischen Analyse ähnliche Ergebnisse. Die Sensorgramme der 50 μM und der 100 μM Probe ergaben beide einen Wert für K_D von ca. 6 μM . Die Auswertung der Daten der 25 μM Probe ergab einen Wert von knapp 1 μM für K_D . Im Rahmen der Genauigkeit des angewendeten Verfahrens war dieser Unterschied als nicht signifikant anzusehen. Da eine Auswertbarkeit der Dissoziationskurve nur gegeben war, wenn die Lage der Basislinie RU_{min} manuell auf 0 RU festgelegt wurde, konnte davon ausgegangen werden, dass die Belastbarkeit dieser Daten geringer als die der anderen beiden Proben wäre. Dem zu folge wurde der gemittelte K_D -Wert zu 6.38 μM bestimmt.

Der Ligand **49** wurde nicht per SPR vermessen, da die aufgetretenen Probleme bei den vorangegangenen Messungen zeigten, dass dieses Verfahren für diesen Typ von Liganden ungeeignet zu sein schien.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.3.3 STD-NMR Bindungsstudien der Liganden mit funktionalisiertem Aglycon

Die *saturation transfer difference* (STD) NMR-Spektroskopie ist ein Messverfahren, welches es erlaubt, Bindungsprozesse zwischen Proteinen und ihren Liganden zu charakterisieren.¹⁰⁸ Es können nicht nur Daten, wie die Dissoziationskonstante K_D , sondern unter anderem auch Bindungsepitope bestimmt werden. Das Verfahren macht sich gleich mehrere Effekte zu Nutze. Große Moleküle mit Massen von mehr als 10 kDa befinden sich im Spin-Diffusions-Limit. Dies hat zur Folge, dass eine selektive Sättigung in kürzester Zeit zu einer Verteilung der Magnetisierung über das gesamte Molekül führt. Durch den Kern-Overhauser-Effekt (engl. *nuclear Overhauser effect*, NOE) kann sich diese Magnetisierung auf andere Moleküle in direktem Kontakt, wie beispielsweise einen Liganden in einer Bindungstasche, übertragen. Dieser Übertragungsprozess benötigt bis zu 100 ms. Verlässt dieses Molekül den gebundenen Zustand, solange es noch eine Sättigung besitzt, so baut sich diese im freien Molekül verhältnismäßig langsam ab. Für kleine Moleküle liegt diese Relaxationszeit typischer Weise im Bereich von ca. einer Sekunde.¹⁰⁹ Wird während dieser Zeit ein weiteres NMR-Experiment durchgeführt, so erscheinen die vorgesättigten Signale mit verringerter Intensität. Durch Subtraktion eines Spektrums mit Vorsättigung von einem Spektrum ohne Vorsättigung wird ein Differenzspektrum erhalten, welches nur Signale der Molekülteile enthält, die eine Sättigung erfahren haben. Da die Intensität des NOE eine reziproke Abhängigkeit zur sechsten Potenz des Abstandes besitzt, erfolgt die Übertragung der Sättigung nur auf die Molekülteile in unmittelbarer Nähe und die Sensibilität bezüglich unterschiedlicher Abstände ist sehr hoch. Dies erlaubt die Bestimmung eines Bindungsepitops. Da nur Moleküle detektiert werden, die an das gesättigte Protein gebunden und es noch vor der vollständigen Relaxation wieder verlassen haben, können somit auch Liganden aus Stoffgemischen identifiziert werden. Des Weiteren erzeugen Bindungspartner mit einer hohen *off rate* sehr intensive Signale. Dadurch erreicht die STD-NMR-Spektroskopie gerade bei niedriger affinen Liganden gute Signalintensitäten. Zur Quantifizierung der Affinität eines Liganden muss eine Konzentrationsreihe des Liganden untersucht werden.

Für die STD-NMR Bindungsstudien der Liganden mit funktionalisiertem Aglycon wurden kompetitive STD-Titrationen durchgeführt. In ersten Vorversuchen konnte festgestellt werden, dass sich bei direkten STD-Messungen nur in geringem Maße Sättigung auf die Liganden übertragen ließ. Dies kann an der geringen *off rate* dieses Typs von Liganden liegen, welche sich bei den SPR-Messungen gezeigt hatte. Des Weiteren musste bei

3 Ergebnisse und Diskussion

Messungen mit der Verbindung **48** ein weiter im Hochfeld liegender Einstrahlpunkt gewählt werden, da die Cyclopropylgruppe im deuterierten Puffer ein Signal bei 0.17 ppm aufwies. Dies verringerte die Effizienz der Sättigung zusätzlich. Als Kompetitor wurde das α -Methylglycosid der *N*-Acetylneuraminsäure in einer Konzentration von 20 mM gewählt. Die Rezeptorbelegung RO des Hämagglutinins H5 wurde nach folgender Formel berechnet:¹⁰⁹

$$RO = \frac{[PL]}{[P]_0} \quad \text{mit} \quad (1)$$

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

Bei einer Proteinkonzentration von 1 μ M und einer Dissoziationskonstante von 2 mM ergab sich eine Rezeptorbelegung von 91 %.¹¹⁰ Die geringe Proteinkonzentration wurde gewählt, um einen genügend großen Überschuss der Liganden gewährleisten zu können. Die maximal eingestellte Ligandkonzentration lag bei 256 μ M. In Tabelle 7 sind die eingesetzten Protein- und Ligandkonzentrationen aufgeführt.

Tabelle 7: Auflistung der Ligand- und Kompetitorkonzentrationen, die bei den kompetitiven STD-NMR-Titrationen verwendet wurden. Die Rezeptorbelegung des Hämagglutinins H5 wurde für die stets verwendete Kompetitorkonzentration von 20 mM bei einem K_D von 2 mM berechnet.

Ligand	c(H5) [μ M]	RO	c(Ligand) [μ M]
42	1.6	91 %	4-256
48	1.0	91 %	0.5-32
49	1.3	91 %	1-64

Für die Auswertung der Spektren wurden drei Signale des Kompetitors beobachtet: H-3_{eq}, H-5 und das Signal der Methylgruppe der *N*-Acetylgruppe. Diese Signale wurden gewählt, da sie isoliert von anderen im Spektrum lagen. Die Werte der Nullprobe, welche nur den Kompetitor und keinen weiteren Liganden enthielt, wurden bei der Normierung berücksichtigt und haben stets den 100 STD% Wert dargestellt. Bei der Auftragung und

3 Ergebnisse und Diskussion

Kurvenanpassung wurden sie jedoch nicht berücksichtigt, da sie per Definition auf der oberen Asymptote der Funktion liegen sollten.

Die Lage der unteren Asymptote kann einen starken Einfluss auf die Bestimmung der Inhibitionskonstante K_I haben. Die Bestimmung ihrer Lage ist jedoch anhand der Messungen nicht eindeutig durchführbar, da sie abhängig von den Kinetiken beider Liganden ist und sich daraus folgend ein rekursives Gleichungssystem ergeben würde. Um trotzdem den Bereich, in welchem der K_I -Wert liegt, eingrenzen zu können, wurden die Messwerte zum einen unter der Annahme ausgewertet, dass sich der Kompetitor vollständig verdrängen lassen müsste, die untere Asymptote also bei 0 STD% läge. Dies wurde erreicht, indem ein virtueller Datenpunkt bei 0 STD% hinzugefügt wurde, dessen Verschiebung zu höheren Konzentrationen keinen signifikanten Einfluss auf den K_I hatte. Zum Anderen wurde alternativ eine Auswertung ohne virtuellen Nullpunkt durchgeführt. Die Lage der unteren Asymptote wurde dann durch den Anpassungsalgorithmus bestimmt.

Die Daten der Konzentrationsreihe des nicht Seitenketten-modifizierten Liganden **42** zeigten eine konzentrationsabhängige Abnahme des STD-Signals und somit einen eindeutigen inhibitorischen Effekt (Abbildung 68).

3 Ergebnisse und Diskussion

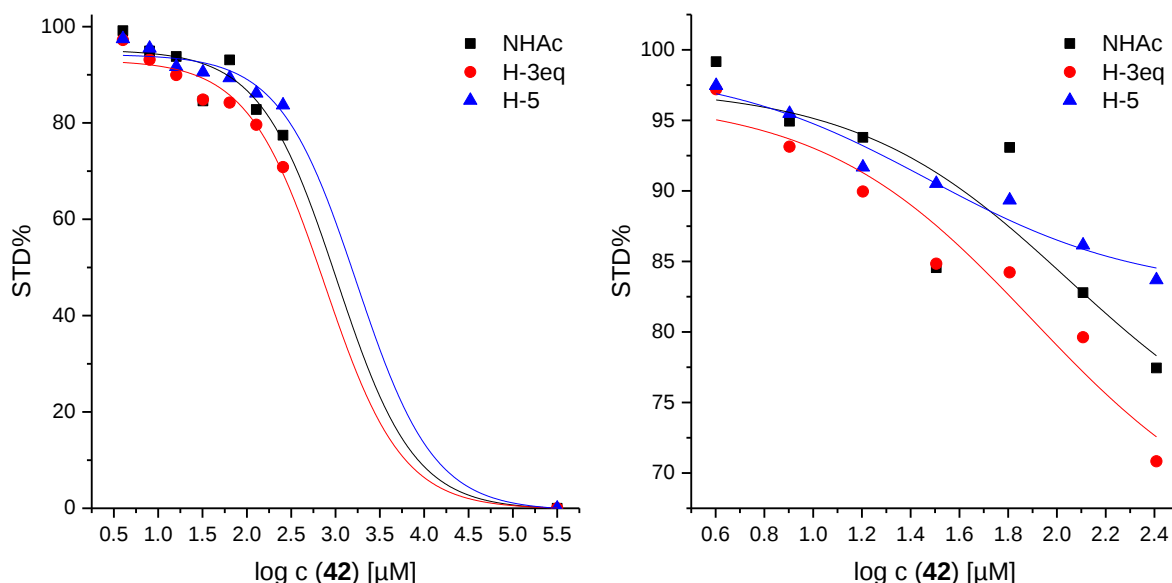


Abbildung 68: Auftragung der normierten STD% gegen den dekadischen Logarithmus der Konzentration des Liganden 42. Die links dargestellte Auswertung wurde unter Berücksichtigung eines virtuellen Nullpunkts bei $c(42) = 316 \text{ mM}$ durchgeführt. Bei der rechts dargestellten Auswertung wurden nur reale Messpunkte an das *one site competition* Modell angepasst. Die Trendlinien stellen den Verlauf der angepassten Funktionen dar.

Die Daten wurden erfolgreich an das *one site competition* Modell angepasst. Die Ergebnisse der Anpassung sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Ergebnisse der Kurvenanpassung der Messwerte der kompetitiven STD-NMR-Titration von Ligand 42. Die Werte für K_I wurden anhand der Cheng-Prusoff-Gleichung aus dem IC_{50} errechnet.

Signal	$IC_{50,0}$ [μM]	$K_{I,0}$ [μM]	χ^2_0	IC_{50} [μM]	K_I [μM]	χ^2	untere Asymptote [STD%]
NHAc	1032 ± 1.4	93.8 ± 0.13	19	112 ± 4.8	10.2 ± 0.43	22	70
H-3eq	755 ± 1.2	68.6 ± 0.11	9.6	80 ± 1.9	7.2 ± 0.17	6.5	65
H-5	1728 ± 1.3	157 ± 0.12	5.8	30 ± 1.6	2.7 ± 0.15	0.94	83

Die beiden unterschiedlichen Auswertungen der drei Datensätze ergaben jeweils ähnliche Werte für den IC_{50} und folglich auch den K_I . Die jeweiligen niedrigsten gemessenen Bindungskonstanten werden als repräsentativ für den gesamten Liganden gewertet, da der

3 Ergebnisse und Diskussion

berechnete K_I -Wert abhängig von der Distanz des beobachteten Protons zum Protein ist und sich mit steigendem Abstand erhöht. Dementsprechend ist auch der geringste bestimmte Wert tendenziell zu hoch. Unter Berücksichtigung eines virtuellen Nullpunkts bei $c(\mathbf{42}) = 316 \text{ mM}$ wurde ein $IC_{50, 0}$ von $755 \text{ }\mu\text{M}$ und ein $K_{I, 0}$ von $68.6 \text{ }\mu\text{M}$ erhalten. Ohne den virtuellen Nullpunkt wurde ein IC_{50} von $30 \text{ }\mu\text{M}$ und ein K_I von $2.7 \text{ }\mu\text{M}$ erhalten. Die Lage der unteren Asymptote beeinflusst das Ergebnis um einen Faktor von 25. Die beiden bestimmten K_I -Werte sind geringer als der per SPR-Spektroskopie bestimmte K_D von $126 \text{ }\mu\text{M}$. Aufgrund fundamentaler Unterschiede zwischen den beiden Messtechniken, wie beispielsweise, dass es sich bei der einen Technik um ein fließendes und bei der anderen um ein statisches System handelt, können auch größere Abweichungen der Ergebnisse auftreten, ohne dass es sich um Messfehler handeln muss. Sofern die Abweichungen nicht auf den methodischen Unterschieden beruhen, ist zu beachten, dass bei den SPR-Messungen starke unspezifische Wechselwirkungen auftraten, die ein fälschlicherweise zu hohes Ergebnis ergaben. Da der $K_{I, 0}$ nur wenig niedriger als der K_D war, konnte auch für diesen Wert angenommen werden, dass er tendenziell noch zu hoch ist.

Für den Cyclopropylmethylamino-Liganden **48** zeigte die Auftragung der Messwerte gleichermaßen einen inhibitorischen Effekt (Abbildung 69).

3 Ergebnisse und Diskussion

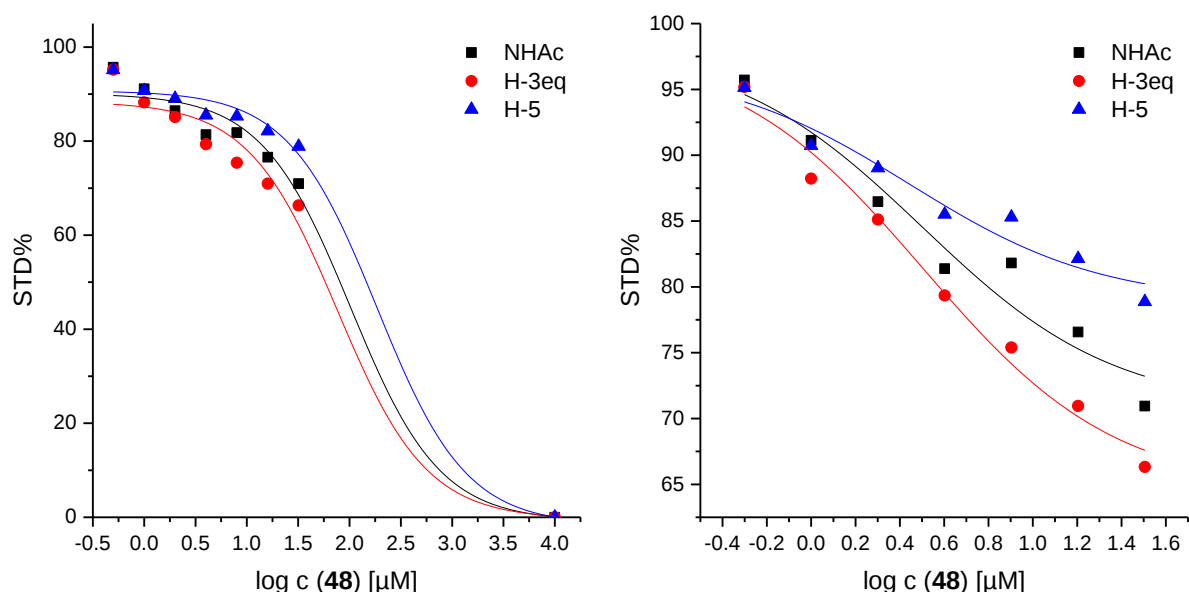


Abbildung 69: Auftragung der normierten STD% gegen den dekadischen Logarithmus der Konzentration des Liganden 48. Die links dargestellte Auswertung wurde unter Berücksichtigung eines virtuellen Nullpunkts bei $c(48) = 10 \text{ mM}$ durchgeführt. Bei der rechts dargestellten Auswertung wurden nur reale Messpunkte an das *one site competition* Modell angepasst. Die Trendlinien stellen den Verlauf der angepassten Funktionen dar.

Die erhaltenen Daten ließen sich sehr gut an das *one site competition* Modell anpassen und es wurden aus den drei Messreihen ähnliche Werte erhalten (Tabelle 9).

Tabelle 9: Ergebnisse der Kurvenanpassung der Messwerte der kompetitiven STD-NMR-Titration von Ligand 48. Die Werte für K_I wurden anhand der Cheng-Prusoff-Gleichung aus dem IC_{50} errechnet.

Signal	$IC_{50,0}$ [μM]	$K_{I,0}$ [μM]	χ^2_0	IC_{50} [μM]	K_I [μM]	χ^2	untere Asymptote [STD%]
NHAc	102 ± 1.3	9.3 ± 0.12	17	3.17 ± 1.8	0.288 ± 0.16	5.7	71
H-3eq	76.2 ± 1.3	6.9 ± 0.12	24	3.21 ± 1.4	0.292 ± 0.13	2.5	65
H-5	186 ± 1.3	17 ± 0.12	8.1	2.78 ± 1.8	0.253 ± 0.16	2.3	79

Die beiden unterschiedlichen Auswertungen ergaben erneut inhibitorische Konstanten, die sich um einen Faktor von ca. 25 unterschieden. Unter Berücksichtigung eines virtuellen Nullpunkts bei $c(48) = 10 \text{ mM}$ wurde ein $IC_{50,0}$ von $76 \mu\text{M}$ und ein $K_{I,0}$ von $6.9 \mu\text{M}$ erhalten.

3 Ergebnisse und Diskussion

Ohne den virtuellen Nullpunkt wurde ein IC_{50} von 2.78 μM und ein K_I von 253 nM erhalten. Damit sind der $K_{I,0}$ und der per SPR-Spektroskopie bestimmte K_D von 6.38 μM praktisch identisch. Aus den bereits für den Liganden **42** erwähnten Gründen kann auch hierbei davon ausgegangen werden, dass die SPR-Studie zu hohe Ergebnisse geliefert hatte. Unabhängig von der Methode der Auswertung sind die Daten der STD-Studie konsistenter und deshalb als belastbarer anzusehen.

Die Auftragung der Messwerte des 4-Aminobuttersäure-Liganden **49** zeigte ebenfalls einen eindeutigen inhibitorischen Effekt. Die Korrelation des Verlaufs der Datenreihen und den zugehörigen angepassten Kurven war ohne die Beeinflussung der unteren Asymptote durch einen virtuellen Nullpunkt höher, obgleich die Anpassung der Fitfunktion an die Daten des Signals der *N*-Acetylgruppe nur nach Festlegung der oberen Asymptote auf einen Wert von 100 möglich war. Die Messwerte des H-5-Signals schwankten in beiden Fällen stark um die angepasste Kurve (Abbildung 70).

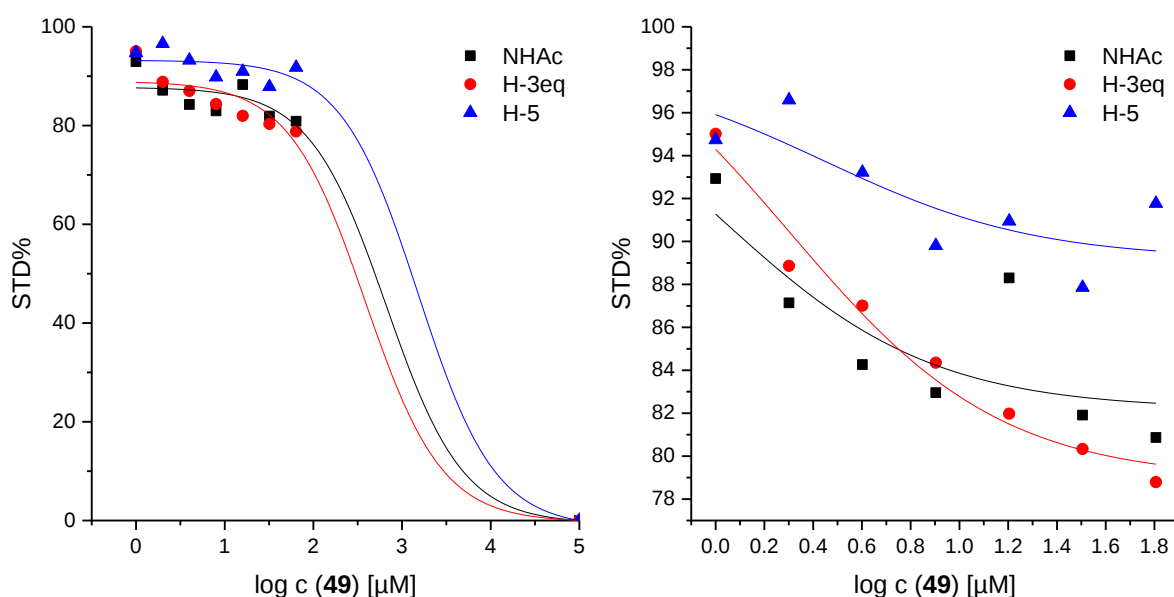


Abbildung 70: Auftragung der normierten STD% gegen den dekadischen Logarithmus der Konzentration des Liganden 49. Die links dargestellte Auswertung wurde unter Berücksichtigung eines virtuellen Nullpunkts bei $c(49) = 100$ mM durchgeführt. Bei der rechts dargestellten Auswertung wurden nur reale Messpunkte an das *one site competition* Modell angepasst. Die Trendlinien stellen den Verlauf der angepassten Funktionen dar.

Die Werte für IC_{50} und K_I , die aus der Anpassung an das *one site competition* Modell erhalten wurden sind in Tabelle 10 aufgeführt.

3 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 10: Ergebnisse der Kurvenanpassung der Messwerte der kompetitiven STD-NMR-Titration von Ligand 49. Die Werte für K_I wurden anhand der Cheng-Prusoff-Gleichung aus dem IC_{50} errechnet.

Signal	$IC_{50,0}$ [μ M]	$K_{I,0}$ [μ M]	χ^2_0	IC_{50} [μ M]	K_I [μ M]	χ^2	untere Asymptote [STD%]
NHAc	662 ± 1.7	60.2 ± 0.15	12	1.04 ± 1.7	0.0948 ± 0.15	7.4	82
H-3eq	386 ± 1.5	35.1 ± 0.14	14	2.01 ± 1.6	0.183 ± 0.15	1.2	79
H-5	1521 ± 2.5	138 ± 0.23	8.4	2.79 ± 7.1	0.253 ± 0.64	4.5	89

Die Abweichungen der Ergebnisse der unterschiedlichen Auswertung der Daten sind bei den Messreihen des Liganden **49** mit einem Faktor von fast 200 besonders hoch. Es wurde ein $IC_{50,0}$ von 386 μ M und ein $K_{I,0}$ von 35.1 μ M bei Berücksichtigung des virtuellen Nullpunkts erhalten. Ohne diesen ergab sich ein IC_{50} von 2.01 μ M und ein K_I von 183 nM. Die anhand der *N*-Acetylgruppe bestimmten Werte wurden aufgrund eines zu großen Fehlers nicht berücksichtigt. Die Validität der Auswertung mit virtuellem Nullpunkt wurde dadurch geschwächt, dass die angepasste Funktion die Lage der Datenpunkte kaum repräsentierte. Es war davon auszugehen, dass der $K_{I,0}$ von 35.1 μ M deutlich zu hoch war. In Analogie zu den Ergebnissen M. Hollingers war mit einer höheren Affinität des Liganden **49** verglichen mit **48** zu rechnen.⁸² Die relative Größe der K_I -Werte der Auswertung ohne virtuellen Nullpunkt entspricht den erwarteten Werten sehr gut. Dieser Umstand stärkt das Ergebnis dieser Auswertung trotz des teilweise großen Fehlers.

Die STD-Bindungsstudien zeigten, dass die Liganden hervorragende Affinitäten zum Hämagglutinin H5 aufwiesen. Die gemessenen K_I -Werte der Liganden **42** und **48** lagen deutlich unter den per SPR-Spektroskopie bestimmten K_D -Werten. Die $K_{I,0}$ -Werte waren den K_D -Werten sehr ähnlich. Wie bereits angeführt, waren alle SPR-spektroskopischen Messungen durch das Auftreten unspezifischer Wechselwirkungen verzerrt. Somit ist für die bestimmten K_D -Werte anzunehmen, dass sie zu hoch lagen. Die per STD-NMR-Spektroskopie gemessenen K_I -Werte beschreiben für die Liganden **48** und **49** die bisher mitunter stärksten Wechselwirkungen monovalenter Liganden dieses Rezeptors.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.3.4 Moleküldynamiksimulationen der Liganden mit funktionalisiertem Aglycon

Die ursprüngliche Entwicklung der Liganden **42**, **48** und **49** erfolgte mit dem Programm Sybyl 8.0 (Tripos International, 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144, USA).⁹¹ Der Entwicklungsprozess wurde ausschließlich iterativ über manuelle Manipulation der Strukturen und anschließenden Vergleich der berechneten Bindungsenergien vorangetrieben. Um weitere Erkenntnisse über die Validität des so postulierten Bindungsmodus zu erhalten, wurden mit den Protein-Ligand-Komplexen Moleküldynamiksimulationen durchgeführt. Es wurden die ursprünglich in Sybyl erzeugten Strukturen in Maestro 2014-4 (Maestro, version 10.0, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2014) importiert und verwendet.

Die Moleküldynamiksimulationen wurden für einen Zeitraum von 4.8 ns durchgeführt. Für die erwarteten Bindungskinetikwerte handelt es sich um einen verhältnismäßig kurzen Zeitraum. Die per SPR-Spektroskopie bestimmten Zerfallskonstanten des Protein-Ligand-Komplexes k_{off} lagen im Bereich von 10^{-3} s^{-1} . Die mittlere Lebensdauer des Komplexes sollte dementsprechend ca. 1000 s betragen. Ein durchgehender Verbleib des Liganden in der Bindungstasche wäre demnach zu erwarten gewesen. Bei dem Liganden **48** zeichnete sich nach kurzer Zeit ab, dass das Aglycon sich anders verhielt als es bei dem Entwurf beabsichtigt war. Die Carboxylatgruppe entfernte sich bereits nach ca. 180 ps weiter als 3 Å von der Ammoniumgruppe des Lys218 (Abbildung 71). Bei Überschreitung dieses Schwellwertes sind die attraktiven Wechselwirkungen einer Salzbrücke nicht mehr existent.

3 Ergebnisse und Diskussion

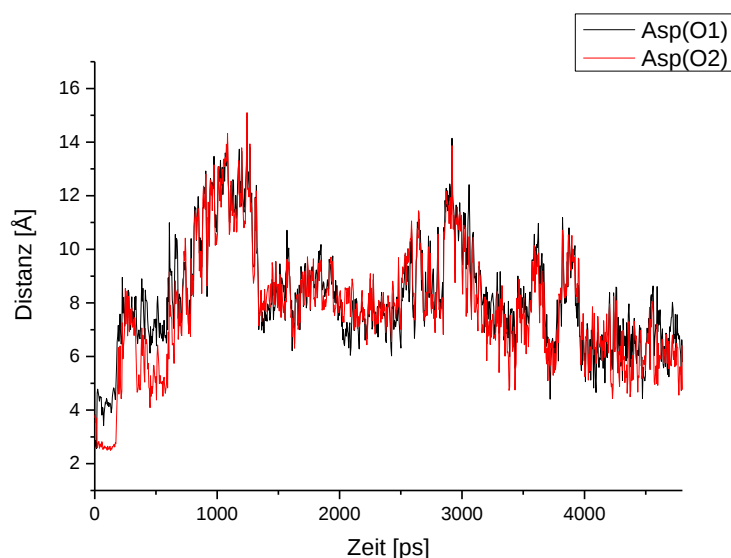


Abbildung 71: Auftragung der jeweiligen Distanzen der beiden Sauerstoffatome der Carboxylatgruppe des Aspartats des Aglycons von 48 und des Stickstoffs der Ammoniumgruppe des Lys218 im zeitlichen Verlauf der Moleküldynamiksimulation. Bei Distanzen über 3 Å sind die attraktiven Wechselwirkungen einer Salzbrücke nicht mehr existent. Dies ist hier nach ca. 180 ps der Fall.

Generell zeigte das Aglycon keine definierte Lage auf der Oberfläche des Proteins: Die quadratisch gemittelte Fluktuation (engl.: *root-mean-square fluctuation*, RMSF) aller Schweratome der Liganden über die gesamte Dauer der Moleküldynamiksimulation zeigte dieses eindeutig, da die Atome des Aglycons mit zunehmendem Abstand zur glycosidischen Bindung eine erhöhte Fluktuation aufwiesen (Abbildung 72). Die Atome der Seitenkette des Aspartats und die der Naphthylgruppe erwiesen sich hierbei als besonders mobil. Für die Seitenkette des Aspartats war dies, nach dem bereits zuvor beobachteten Verlust der Salzbrücke zu Lys218, zu erwarten. Da die in sich starre Naphthylgruppe nur als Ganzes bewegen konnte, war der Grund für die erhöhte Fluktuation einiger Atome dieser Gruppe in ihrer Distanz zu den beweglichen Zentren und nicht in zusätzlichen Freiheitsgraden zu finden und dementsprechend auch kein Charakteristikum geringerer Wechselwirkungen dieser Regionen des Liganden zum Protein. Allgemein ließ sich der Kontakt des Aglycons zum Protein als nicht definiert aber stetig beschreiben.

3 Ergebnisse und Diskussion

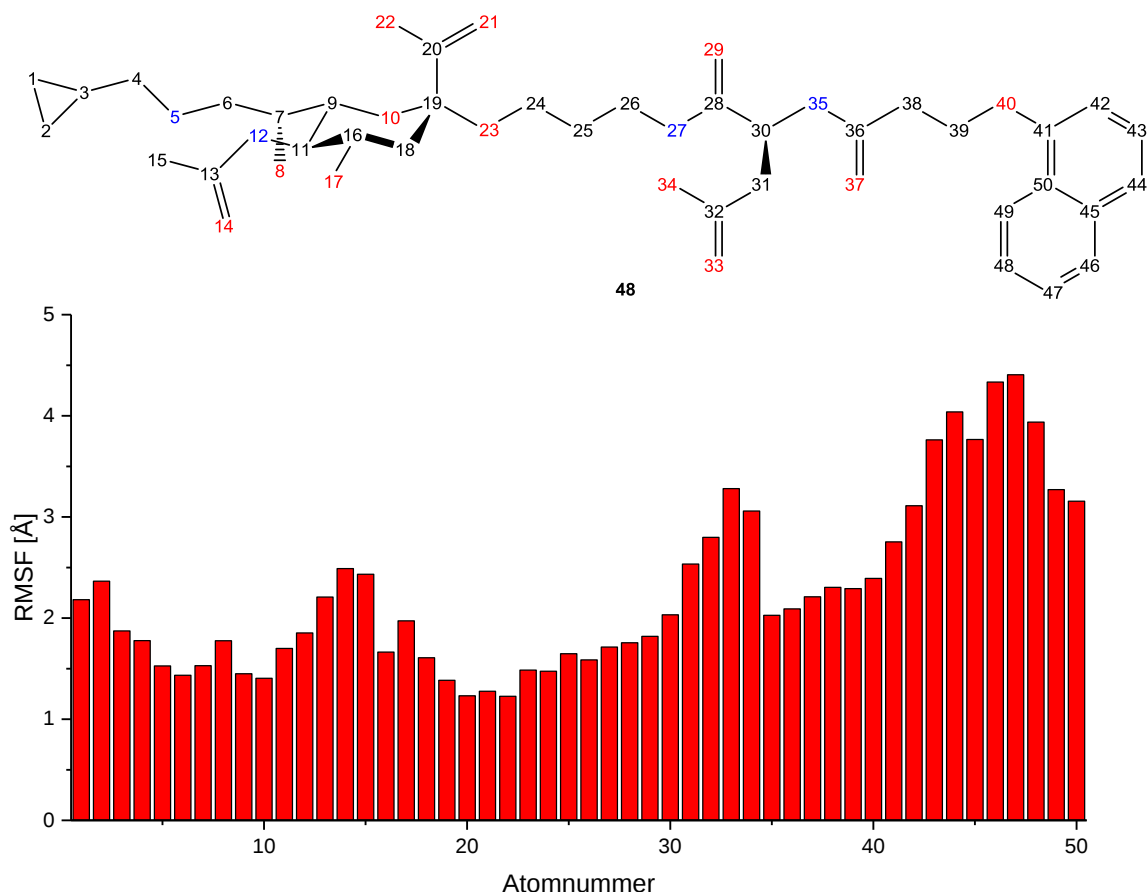


Abbildung 72: Auftragung der quadratisch gemittelten Fluktuation der Schweratome des Liganden 48 über den gesamten Zeitraum der Moleküldynamiksimulation. Die Atome der Naphthylgruppe und die der Seitenkette des Aspartats weisen eine besonders hohe Fluktuation auf.

Ebenfalls bei der Betrachtung der Anfangs- und Endlage des Liganden war sehr gut zu erkennen, dass das Aglycon, mit Ausnahme der Seitenkette des Aspartats, zwar fortwährend attraktive Wechselwirkung zum Protein aufzubauen schien, hierbei jedoch keine spezifischen Bindungspartner besaß (Abbildung 73). Des Weiteren ist zu erkennen, dass die Bindungstasche am Ende der Simulation stark deformiert war und die *N*-Acetyl-substituierte Seite des Zuckers nicht mehr in Richtung des Inneren des Proteins zeigte, sondern eher parallel zu dessen Oberfläche verlief. Aufgrund der Komplexität der Moleküldynamiken derartig großer Strukturen sind die Aussagen einer Simulation spekulativ und müssen bezüglich ihrer Relevanz bewertet werden. Da es sich bei der Neuraminsäurekernstruktur um den natürlichen Bindungspartner handelte, welcher der Kristallstruktur entsprechend in der Bindungstasche positioniert war, wurde eine derartig große Änderung als nicht repräsentativ eingeschätzt.

3 Ergebnisse und Diskussion

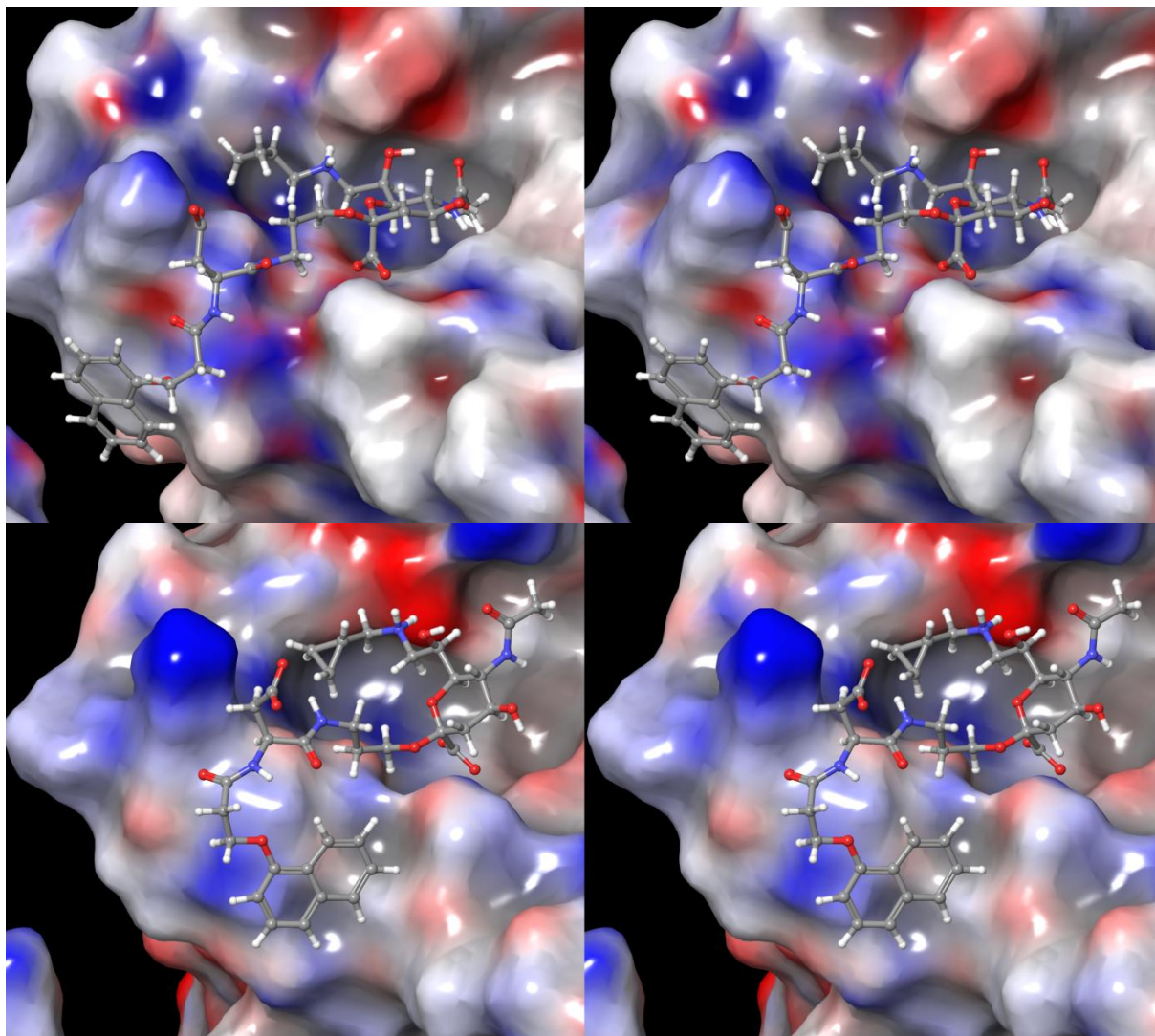


Abbildung 73: *Crossed-eye* Darstellung des Liganden 48 in der Bindungstasche des Hämagglutinins H5 zu Beginn (oben) und am Ende (unten) der Moleküldynamiksimulation nach 4.8 ns. Die Lage des Aglycons, besonders die der Naphthylgruppe, verschob sich ohne jedoch die Nähe des Proteins zu verlassen.

Auffällig ist, dass die Lage der modifizierten Seitenkette der Neuraminsäure trotz der starken Dislozierung des benachbarten Ligandsegments und der Deformation der Bindungstasche relativ zu den wechselwirkenden Gruppen stabil geblieben war. Im Ligand-Protein-Kontaktplot ist zu erkennen, dass die Ammoniumgruppe fast die gesamte Zeit der Simulation eine Salzbrücke zu Glu186 aufrecht erhielt (Abbildung 74). Dieser Umstand verdeutlicht, wie hoch die Affinität dieses Teil des Liganden war.

3 Ergebnisse und Diskussion

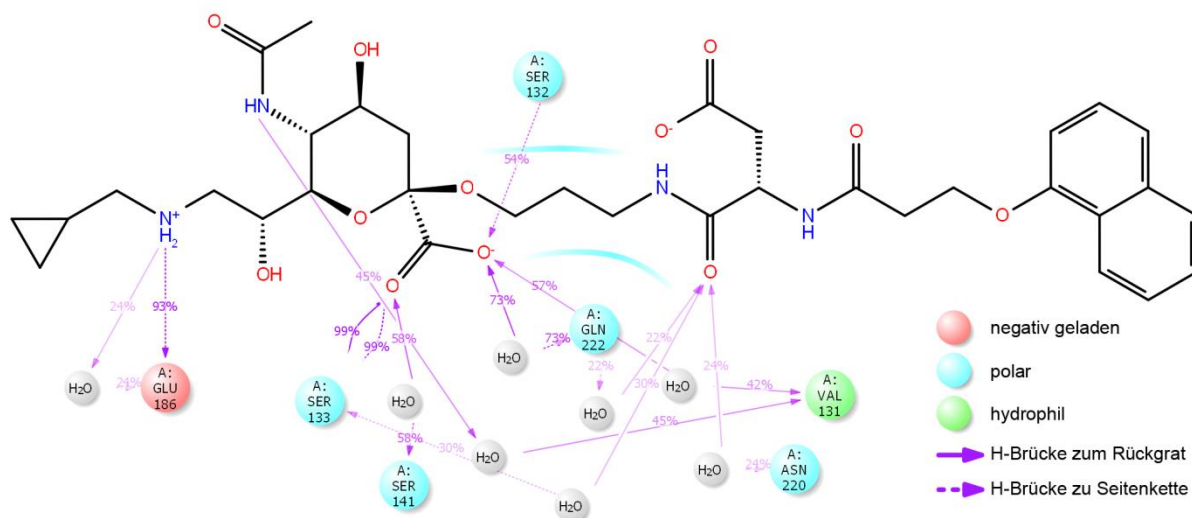


Abbildung 74: Darstellung der Ligand-Protein-Kontakte für den Liganden 48. Die prozentualen Werte sind die anteilige Kontaktdauer. Gezeigt sind nur Kontakte, die über mindestens 20 % der gesamten Laufzeit der Simulation von 4.8 ns existent waren.

Bei der Moleküldynamiksimulation des Liganden **49** konnte erneut festgestellt werden, dass das Aglycon nicht an der im ursprünglichen Entwurf vorgesehenen Stelle verweilte. Die Salzbrücke zwischen dem Aspartat des Aglycons und Lys218 des Proteins war über fast 1700 ps stabil (Abbildung 75). Damit bestand dieser Kontakt fast zehnmal so lange wie bei **48**. Obwohl dies eine stabilisierende Wirkung auf das Aglycon hatte, erwies sich die Naphthylgruppe als sehr mobil und entfernte sich bereits während der ersten wenigen Schritte der Simulation aus der Nähe des Proteins.

3 Ergebnisse und Diskussion

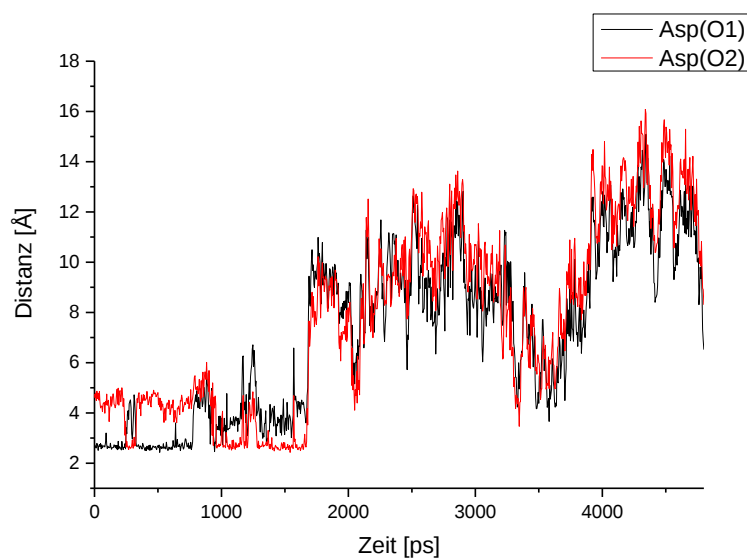


Abbildung 75: Auftragung der jeweiligen Distanzen der beiden Sauerstoffatome der Carboxylatgruppe des Aspartats des Aglycons von 49 und des Stickstoffs der Ammoniumgruppe des Lys218 im zeitlichen Verlauf der Moleküldynamiksimulation. Bei Distanzen über 3 Å sind die attraktiven Wechselwirkungen einer Salzbrücke nicht mehr existent. Dies ist hier nach ca. 1670 ps der Fall.

Nach dem Verlust der Salzbrücke ließen sich nur vereinzelte Schwache Kontakt zwischen Protein und Aglycon feststellen. Die Naphthylgruppe bewegte sich zumeist frei im Lösungsmittel, bevor sie zum Ende der Simulation erneut über Ser133 schwache Wechselwirkungen zum Protein aufbaute (Abbildung 76).

3 Ergebnisse und Diskussion

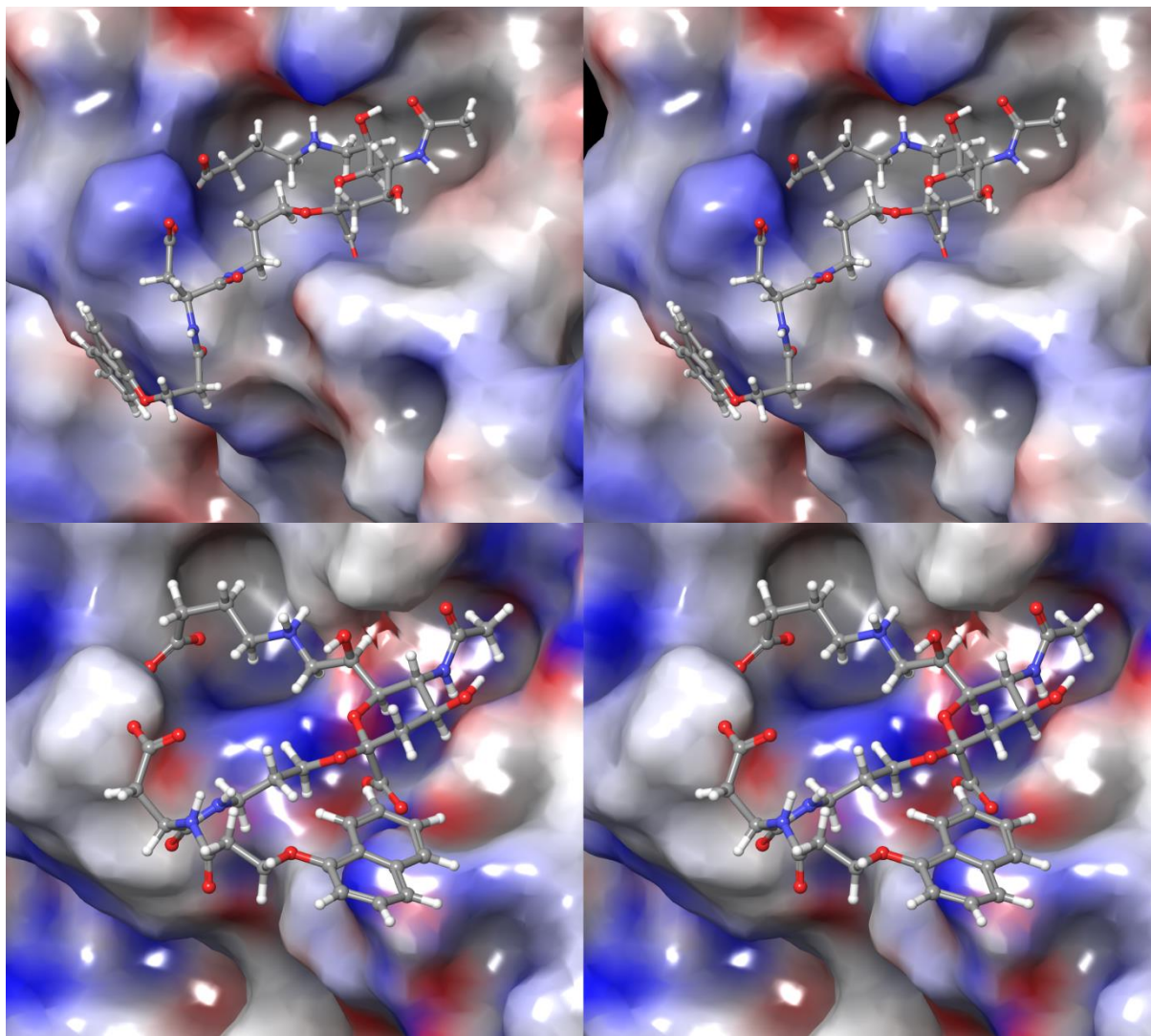


Abbildung 76: *Crossed-eye* Darstellung des Liganden 49 in der Bindungstasche des Hämagglutinins H5 zu Beginn (oben) und am Ende (unten) der Moleküldynamiksimulation nach 4.8 ns. Die Endlage des Aglycons ließ nur auf vereinzelte schwache Wechselwirkungen zum Protein schließen.

Die Auftragung der RMSF der Schweratome in Abbildung 77 zeigt, dass die Fluktuation ab Atomnummer 25, dem glycosidischen Sauerstoff, stetig zunahm. Während bei **48** als höchster Wert eine RMSF von 4.4 Å erreicht wurde, stiegen bei **49** aufgrund der ungehinderten Bewegungsfreiheit des Aglycons die Werte auf fast 10 Å an.

3 Ergebnisse und Diskussion

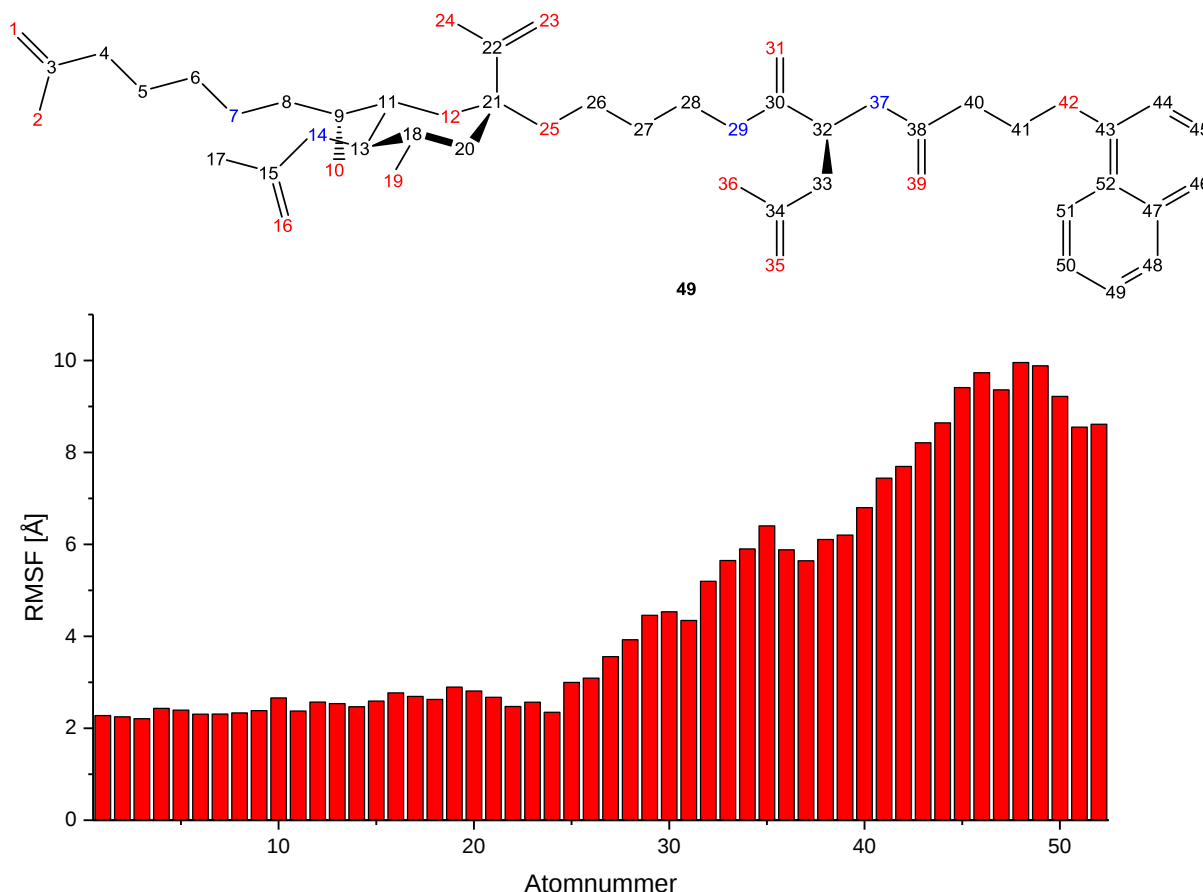


Abbildung 77: Auftragung der quadratisch gemittelten Fluktuation der Schweratome des Liganden 49 über den gesamten Zeitraum der Moleküldynamiksimulation. Die Atome der Naphthylgruppe und die der Seitenkette des Aspartats weisen eine besonders hohe Fluktuation auf.

Der Ligand-Protein-Kontaktplot zeigte ebenfalls eindeutig, dass das Aglycon keine stabilen Wechselwirkungen mit dem Protein über einen relevanten Zeitraum einging (Abbildung 78). Die restlichen Regionen des Liganden zeigten hingegen ein ausgeprägtes Netzwerk verschiedenartiger Wechselwirkungen, die teilweise über den kompletten Zeitraum der Simulation vorhanden waren. Die Ammoniumgruppe der funktionalisierten Seitenkette zeigte den beim Entwurf angestrebten Kontakt zum Carboxylat der Seitenkette von Glu186. Zusätzlich ergaben sich weitere über Wasser vermittelte Wechselwirkungen mit dem Proteinrückgrat. Gleichfalls konnten für die terminale Carboxylatgruppe der Seitenkette eine Vielzahl zusätzlicher Kontakte zum Protein festgestellt werden. Die primär angestrebte Wechselwirkung war der Aufbau einer Salzbrücke zu Lys218. Diese war auch über 86 % der Simulationsdauer feststellbar. Zusätzlich konnten weitere direkte und über Wasser vermittelte Kontakte zu Gly224, Gln222 und Ser223 erkannt werden. Ein derartiges Netzwerk von

3 Ergebnisse und Diskussion

Wechselwirkungen zu mehreren Aminosäuren erscheint aufgrund der real gemessenen Steigerung der Affinität dieses Liganden gegenüber **48** als durchaus wahrscheinlich. Der Einfluss einer Salzbrücke zu einer Lösungsmittel-exponierten Stelle auf die Bindungsenergie ist in der Regel gering, da vor der Bindung des Liganden die polare Gruppe zunächst desolvatisiert werden muss und dieser Prozess sehr energieaufwendig ist.

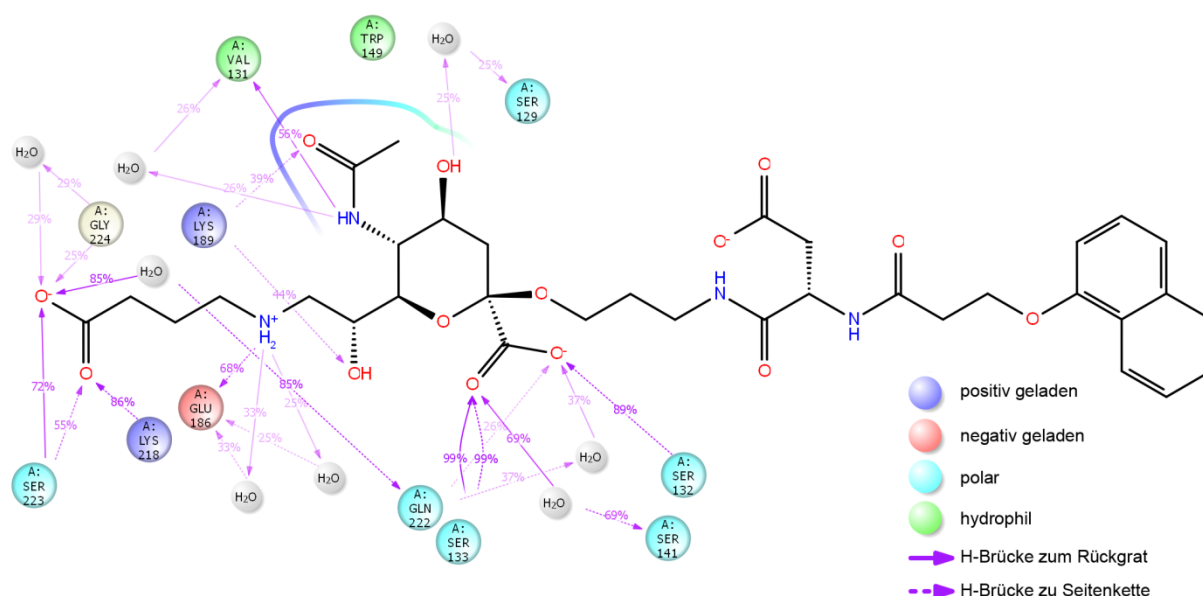


Abbildung 78: Darstellung der Ligand-Protein-Kontakte für den Liganden **49**. Die prozentualen Werte sind die anteilige Kontaktdauer. Gezeigt sind nur Kontakte, die über mindestens 20 % der gesamten Laufzeit der Simulation von 4.8 ns existent waren.

Die Moleküldynamiksimulation der beiden Liganden **48** und **49** haben äußerst interessante Aspekte der Bindungsmodi aufgezeigt. Die Relevanz der Simulationen wurde dadurch in Frage gestellt, dass beide suggerierten, die Bindung der Liganden sei schwach. Die experimentellen Daten zeigten hingegen durch niedrige K_D -Werte und besonders geringe *off rates*, dass der Protein-Ligand-Komplex sehr stabil war. Trotz dieser Diskrepanz boten einzelne Aspekte der Simulationen Hinweise auf die möglicherweise realen Gegebenheiten der Bindungsereignisse. Im Fall von **48** verblieb die Cyclopropylmethylammoniumgruppe trotz starker Bewegungen des restlichen Liganden und Deformation der Bindungstasche stets in dieser gebunden. Dies zeigte zum einen den Wert der Cyclopropylgruppe und vor allem, wie günstig die Ammoniumgruppe die im natürlichen Liganden vorhandene Hydroxyfunktion ersetzt. Bei **49** zeigte die Auswertung der Moleküldynamiksimulation, dass die Carboxylatfunktion in ein Netzwerk von Wechselwirkungen eingebunden war. Dieses

3 Ergebnisse und Diskussion

stabilisierte nicht nur deren Lage, sondern auch die der Ammoniumgruppe des Lys218. Die gesenkte Mobilität der Seitenkette könnte wiederum der Grund für den stabileren Kontakt von Lys218 zum Aspartat des Aglycons sein, welcher bei **48** direkt zu Beginn der Simulation zusammenbrach. Als abschließender Punkt verbleibt noch die Mobilität des Aglycons. Die sofortige Loslösung der Naphthylgruppe in der Simulation von **49** wurde als nicht repräsentativ angesehen, da der Ligand **42**, welcher nur mit dem funktionalisiertem Aglycon modifiziert war, bereits gute Affinitäten zum Protein aufwies. Dass die Naphthylgruppe sich jedoch über die Oberfläche des Proteins bewegt und verschiedene, annähernd gleichwertige Wechselwirkungen eingehen kann, wie es in der Moleküldynamiksimulation des Liganden **48** zu sehen war, mag realistisch sein. Im klassischen Wirkstoffdesign wurde die Flexibilität eines Liganden als negative Eigenschaft eingeschätzt, da dessen Bindung durch ein angenommen starres Protein oder in einem starren Komplex zu entropisch begründeten Einbußen an freier Bindungsenergie führen würde.^{111,112} Neuere Theorien zeigen, dass eine gewisse Flexibilität des Liganden in einigen Systemen durchaus von Vorteil sein kann. Bei dem Konzept der *conformational selection* liegt das Protein in vielen unterschiedlichen, miteinander im Gleichgewicht liegenden Konformationen gleichzeitig vor.¹¹³⁻¹¹⁵ Ein flexibler Ligand müsste dann nicht zwangsläufig eine bestimmte Konformation einnehmen, sondern kann unter Umständen in verschiedenen räumlichen Anordnungen eine jeweils passende Konformation des Proteins binden. Darüber hinaus kann die Bindungstasche auch während des Bindungsereignisses nicht starre Bereiche besitzen. Artifizielle Liganden, wie die in dieser Arbeit dargestellten, können zusätzlich an Regionen binden, die nicht mehr der Bindungstasche zugehörig sind und sich somit generell unabhängig von dieser bewegen oder nicht durch das Bindungsereignis rigidifiziert werden. In derartigen Systemen kann Flexibilität eine vorteilhafte Eigenschaft sein.¹¹⁶

4 Zusammenfassung

Die Influenza ist eine hochansteckende, durch Viren ausgelöste Krankheit. Bei saisonalen Ausbrüchen sterben bis zu 500 000 Menschen pro Jahr.² Bei besonders verheerenden pandemischen Ausbrüchen, wie der „Spanischen Grippe“ von 1918 stiegen die Zahlen der Todesopfer auf 20 – 50 Millionen.³ Auch wenn die Herkunft des Erregers bisher nicht eindeutig geklärt werden konnte, zeigte sich zumindest bei den späteren Pandemien von 1957 und 1968, dass es sich bei den Erregern um Viren handelte, welche sich durch genetische Reassortierung aus aviären Influenzaviren entwickelt hatten.¹¹⁷⁻¹²⁰ Seit 1997 treten wiederholt Fälle von Übertragung eines Vogelgrippevirus auf den Menschen auf. Der Erreger des Subtyps A/(H5N1) in seiner hochpathogenen Form weist hierbei eine extrem hohe Sterblichkeitsrate von über 50 % auf.³⁶ Das Ausbleiben einer Pandemie ist vor allem der bisher nicht auftretenden Übertragung von Mensch zu Mensch zuzuschreiben.

Der Primärkontakt eines Influenzavirus zu einer Zelle wird über das virale Hämagglutinin hergestellt. Es ist somit das *target* für den Entwurf eines *entry*-Inhibitors. Das homotrimere Lectin bindet an Sialinsäure-terminierte Strukturen der Glycocalyx. Im Rahmen dieser Arbeit wurden basierend auf einer Röntgenkristallstruktur eines Hämagglutinins H5 im Cokristall mit einem Rezeptoranalogen verschiedene Inhibitorkonzepte entwickelt. Zum einen wurden Liganden entworfen, die sich im Kern der Struktur der *N*-Acetylneuraminsäure bedienten und durch Modifikationen die Affinität deutlich steigerten. Zum anderen wurde aufbauend auf einem virtuellem *screening* ein Fragment-basiertes *de novo* Design durchgeführt.

Beim virtuellen *screening* wurden drei Substanzbibliotheken mit insgesamt mehr als 1400 Strukturen getestet. Aus dem Ergebnissatz konnte eine sehr gute strukturelle Basis für den weiteren Designprozess gewonnen werden. Zusätzlich konnte die Kenntnis sich wiederholender Anordnungen funktioneller Gruppen, bzw. ihrer elektrostatischen Potentiale, genutzt werden, um in nur wenigen Schritten aus der Basisstruktur den sehr vielversprechenden Liganden **8** zu entwickeln. Dieser verfügte über eine theoretische freie Bindungsenergie von -65.4 kcal/mol. Für die Darstellung des Moleküls konnte des Weiteren erfolgreich eine Synthesestrategie etabliert werden. Von Bindungsstudien wurde aufgrund zu geringer Löslichkeit in wässrigen Puffersystemen abgesehen.

Für die Sialinsäure-basierten Liganden wurden zunächst Untersuchungen zu C-9 Aminokonjugaten der *N*-Acetylneuraminsäure als strukturelle Alternativen getätigt. Diese

4 Zusammenfassung

waren von großem Interesse, da die Derivatisierung der Seitenkette nach Trunkierung aufgrund der auftretenden Nebenprodukte synthetisch problembehaftet war. Die *in silico* Studien zeigten, dass die Bindungsaffinitäten der C-9 Aminokonjugate und der analogen Aminokonjugate trunkierter *N*-Acetylneuraminsäure sehr ähnlich waren. Es gelang drei der entworfenen Liganden erfolgreich darzustellen und zu isolieren. Mittels SPR-Spektroskopie wurden die Dissoziationskonstanten des Ethylaminoderivats $K_{D,15} = 86.4 \mu\text{M}$, des *n*-Propylaminoderivats $K_{D,16} = 195 \mu\text{M}$ und des *iso*-Propylaminoderivats $K_{D,17} = 221 \mu\text{M}$ bestimmt. Diese waren damit in guter Übereinstimmung mit den virtuellen Bindungsstudien. Da die etablierte Syntheseroute nur zu einem eingeschränkten Produktspektrum einen einfachen Zugang bot, wurde von einer Kombination dieses Ligandenkonzepts mit dem funktionalisiertem Aglycon abgesehen, obwohl die Affinitäten bewahrt wurden.

Für die ursprünglichen Liganden mit funktionalisiertem Aglycon konnte eine Syntheseroute etabliert werden. Im Verlauf derer wurden vor allem Herausforderungen bezüglich der Isolation der Produkte überwunden. Es gelang drei verschiedene Liganden darzustellen, von denen zwei zusätzlich zu dem funktionalisierten Aglycon eine Modifikation der Glycerolseitenkette besaßen. Für beide Liganden wurden Moleküldynamiksimulationen durchgeführt, anhand derer das unterschiedliche Wirken der einzelnen Segmente der Liganden beschrieben und die Bindungsprozesse besser verstanden werden konnten. Für den Liganden ohne Seitenkettenmodifikation **42** und den Cyclopropylmethylamino-modifizierten Liganden **48** konnten mittels SPR-Spektroskopie die Bindungsstärken bestimmt werden. Starke unspezifische Wechselwirkungen beeinflussten jedoch die Messungen. So wurden bei der thermodynamischen Auswertung der Daten die Dissoziationskonstanten zu $K_{D,42} = 6.2 \text{ mM}$ und $K_{D,48} = 677 \mu\text{M}$ bestimmt. Die kinetische Auswertung hingegen ergab $K_{D,42} = 126 \mu\text{M}$ und $K_{D,48} = 6.38 \mu\text{M}$. Als alternatives Verfahren wurden zusätzlich kompetitive STD-NMR-Titrationsen durchgeführt. Aus den erhaltenen Daten wurden durch Anwendung des *one site competition* Modells die inhibitorischen Konstanten berechnet. Es wurden Werte von bis zu $K_{I,42} = 2.7 \mu\text{M}$, $K_{I,48} = 253 \text{ nM}$ und für den 4-Aminobuttersäure-modifizierten Liganden bis zu $K_{I,49} = 177 \mu\text{M}$ erhalten. Die Verbindungen **48** und **49** gehören somit zu den potentesten bisher beschriebenen monovalenten Liganden des Hämagglutinin H5.

5 Summary

Influenza is a highly infectious disease caused by a viral pathogen. Every year up to 500 000 humans die during seasonal outbreaks. The most devastating influenza pandemic was the "Spanish flu" in 1918. It resulted in 20 - 50 million deaths worldwide. Although the origin of the pathogen is still unproven today, it is known that the viruses leading to pandemics in 1957 and 1968 had evolved from avian influenza viruses through genetic reassortment. Since 1997 there have been hundreds of reported cases of humans contracting an infection of this zoonosis. The viruses are of the subtype A/(H5N1) in their highly pathogenic form. The mortality rate in these cases was exceptionally high, exceeding 50 %. The absence of pandemic outbreaks amongst humans is mainly due to the very improbable human-to-human-transmission. Up to now there has not been a verified case but adaptation to human hosts remains a threat.

The infection cycle starts with the influenza virus establishing a primary contact via its hemagglutinin, making it the target for entry inhibitors. The homotrimeric lectin binds to terminal sialic acid moieties of the glycocalyx. In the experimental part of the study, inhibitor structures were developed utilizing an X-ray crystal structure of hemagglutinin H5 co-crystallized with a receptor analog. Two different underlying concepts were applied in the design process. One approach was an entirely artificial ligand whose *de novo* design was based on a virtual screening of fragment libraries. The other concept made use of the known natural ligand. The *N*-acetylneuraminic acid moiety was modified, thus increasing its theoretical affinity significantly.

Virtual screening was carried out using three libraries containing more than 1400 structures. The docking results yielded one very promising structure as a strong basis for further design cycles. Careful analysis of the top scoring structures revealed repeating patterns in the positioning of functional groups or rather their electrostatic potentials. Based on these findings the highly promising ligand **8** was created in only a few iterations. The theoretical free binding energy was calculated to be -65.4 kcal/mol. Furthermore, a strategy for total synthesis was established. The resulting substance was not soluble in common water-based buffers, therefore no binding studies were conducted.

With respect to sialic acid-based ligands, studies on C-9 amino conjugates as structural alternatives to amino conjugates of truncated *N*-acetylneuraminic acid were undertaken. These

5 Summary

were of high interest because truncation and derivatization led to a variety of by-products hampering work up and reducing yields. *In silico* studies showed similar binding affinities for both classes of ligands. Three newly designed structures were successfully synthesized and isolated. Dissociation constants for all three were determined using SPR-spectroscopy: The ethylamino derivative $K_{D,15} = 86.4 \mu\text{M}$, the *n*-propylamino derivative $K_{D,16} = 195 \mu\text{M}$ and the *iso*-propylamino derivative $K_{D,17} = 221 \mu\text{M}$. These results were in good agreement with the virtual binding studies. Due to a limited synthesizable product spectrum, this ligand concept was not combined with the functionalized aglycone although affinities were retained.

Synthesis of *in silico* designed ligands with functionalized aglycone was successfully accomplished. While establishing the synthetic route, isolation of pure products proved to be difficult. Preventing the formation of certain by-products and optimizing work up protocols overcame these obstacles. Three ligands were synthesized, two of which were modified at the glycerol side chain in addition to the functionalized aglycone. For a better understanding of the binding processes, molecular dynamics simulations were carried out for the latter ligands. These gave a valuable insight into the collaboration of the various segments of each molecule. SPR-spectroscopy binding studies were used for the ligand with unmodified side chain **42** and the cyclopropylmethylamino-derivative **48**. Owing to the strong interference of unspecific interactions the interpretation of the results was difficult. Thermodynamic data analysis yielded dissociation constants $K_{D,42} = 6.2 \text{ mM}$ and $K_{D,48} = 677 \mu\text{M}$, whereas kinetic analysis resulted in $K_{D,42} = 126 \mu\text{M}$ and $K_{D,48} = 6.38 \mu\text{M}$. Respectively, as a complementary method competitive STD-NMR-titration was employed. The resulting data were consistent and matched the one site competition model well. Therefore, STD-NMR results were considered to be more reliable. The measured inhibitory constants were down to $K_{I,42} = 2.7 \mu\text{M}$, $K_{I,48} = 253 \text{ nM}$ and for the 4-aminobutyric acid modified ligand down to $K_{I,49} = 177 \text{ nM}$. Consequently, the compounds **48** and **49** are among the strongest known monovalent ligands of hemagglutinin H5 reported up to the present date.

6 Experimenteller Teil

6.1 Geräte, Software, Chemikalien und Materialien

6.1.1 Verwendete Geräte

ESI-TOF-MS: Agilent Technologies - 6224 ESI-TOF; Gefriertrocknungsanlage: Martin Christ - Alpha 1-2, Alpha 1-4; HPLC-MS: Agilent Technologies - 1200 Series mit 1260 Infinity Injector, DAD und Fraction Collector 6120 Quadrupol MS mit G1986C Active Splitter; MALDI-TOF-MS: Bruker Daltonics - Biflex III; NanoDrop: Thermo Scientific - ND-1000; NMR-Spektrometer: Bruker Biospin - AMX 400, DRX 500, Avance III HD 600, Avance 700 mit Cryoprobekopf; pH-Meter: WTW - pH 3110; Reinstwasseranlage: SG Water - 7SG Ultra Clear UV 18.2 Ω ; Schmelzpunktmessgerät: Barnstead Internatl. Electrothermal - Digital 9100; SPR: GE Healthcare - Biacore 3000; SPR Sensorchip: XanTec bioanalytics GmbH - CMD 200 M; Zentrifuge: Eppendorf - 5415 D.

6.1.2 Verwendete Software

Agilent Technologies: LC/MSD Chemstation Rev. B. 04.03 [54]; Bruker Biospin: TopSpin 3.1; CambridgeSoft: ChemDraw Pro 11.0; GE Healthcare: Biacore 3000 Control 3.2, BIAevaluation 4.1; Mestrelab Research S.L.: MestReNova 7.1.0-9185; Origin Lab: OriginPro 9.1G 64bit; Schrödinger: Maestro 2014-4.

6.1.3 Verwendete Chemikalien und Materialien

ABCR: Silbernitrat, Triisopropylsilan; Acros: Amberlite IR 120, 4-Aminobuttersäure, *tert*-Butylacrylat, Ethylacrylat, 1-Naphthol; Agilent Technologies: ESI *tuning mix*; Alfa Aesar: 3-Aminopropan-1-ol, 3-Brompropionsäure, Cyclohexylmethylbromid, Cyclopropylmethylamin, 3-Methyl-4-nitrophenol; Applichem: Ameisensäure; BCD Chemie: Ethanol vergällt; Biesterfeld: Toluol; Chempur: HATU; Eurisotop: Chloroform-*d*1, DMSO-*d*6, Methanol-*d*4; Fluka: Fmoc-OSu, Kieselgel 100 C18-RP, Natriumperiodat, PD/C (10 %), Pyridin, THF; Fluorochem: Cyclopropylbromid; Grüssing: Ammoniaklösung 25 %, Essigsäureanhydrid,

6 Experimenteller Teil

Kaliumhydroxid, Natriumhydrogencarbonat, Salzsäure 37 %, Triethylamin; Honeywell: Natriumiodid; IBT Bioservices: Hämagglutinin H5 (A/Vietnam/1203/2004 H5N1); IRIS Biotech: *N*-Acetylneuraminsäure, *N,N*-Dimethylformamid, Piperidin, TFA; Kraemer&Martin: Aceton, Chloroform, Dichlormethan, Ethylacetat, Methanol, Petrolether 60-80; Lancaster: Natriumcyanoborhydrid; Lehmann & Voss: Celite; Macherey-Nagel: DC-Folien ALUGRAM[®] Xtra SIL G/UV₂₅₄; Merck: Acetylchlorid, Acrylnitril, Chloracetylchlorid, Diisopropylethylamin, Ethanal, *N*-Hydroxysuccinimid, Kaliumcarbonat, Kieselgel 60, Natriumazid, Natriumhydroxid, Propanal, *iso*-Propylacetat, Salicylsäure, Triton B; Riedel de Haën: Natrium, Natriumcarbonat; Sigma-Aldrich: EDC, Methylacrylat, Silbercarbonat, *p*-Toluolsulfonsäurechloride; Th. Geyer: Lithiumaluminiumhydrid; VWR: Acetonitril, Essigsäure, Natriumchlorid; Westphalen: Wasserstoff.

6.2 Computergestützte Methoden

Die virtuellen Studien wurden mit dem Programm Maestro 2014-4 (Maestro, version 10.0, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2014.) durchgeführt. Soweit keine anderen Parameter angegeben werden, wurden stets die Standardwerte in den Einstellungen der Konfigurationsdialoge verwendet. Als Grundlage aller Arbeiten diente die Kristallstruktur des Hämagglutinins H5 A/Schwein/Hong Kong/3/97 (PDB ID: 1JSO).¹²¹

6.2.1 Vorbereitung der Kristallstruktur

Nach dem Laden der Struktur in Maestro wurde sie mit dem *Protein Preparation Wizard* bearbeitet.¹²² Hierbei wurden zusätzlich die Optionen zum Generieren fehlender Seitenketten und *loops* mittels Prime und das *cappen* der Termini aktiviert. Des Weiteren wurden die sich in den Originaldaten befindlichen Wasserstoffe gelöscht und neu hinzugefügt. Danach wurden alle Wassermoleküle aus der Struktur gelöscht. Abschließend wurde im *Protein Preparation Wizard* die Wasserstoffbrückenzuordnung optimiert und eine Minimierung durchgeführt.

6.2.2 Virtuelles screening von Liganddatenbanken

Vor dem eigentlichen *docking* wurde mit dem *Receptor Grid Generation* Werkzeug von Glide ein *grid* erstellt.¹²³⁻¹²⁵ Für die Box wurde eine Größe von 14 Å in alle drei Raumdimensionen gewählt. Der Mittelpunkt der Box verblieb in der Mitte des natürlichen Liganden. Das Glide *docking* wurde mit der Option *Precision: XP (extra precision)* durchgeführt. Die Ligandendatenbanken wurden von Schrödingers Onlineangebot bezogen. Hierbei handelte es sich um 1000 Strukturen aus dem „Glide Drug-Like Ligand Decoys Set“ und 441 Strukturen aus der „Glide Fragment Library“ in der zuletzt am 28.06.2009 aktualisierten Version.^{123,124,126} Die Ladungszustände wurden aus den Datenbanken übernommen.

6.2.3 Design der Neuraminsäure-basierten Liganden

Die Erstellung der Neuraminsäure-basierten Liganden erfolgte ausgehend von der *N*-Acetylneuraminsäure, welche bereits in der Kristallstruktur vorhanden war. Das Einpassen der neuen Strukturelemente erfolgte dabei manuell. Anschließend wurde für jeden Liganden mittels MacroModel eine Minimierung mit dem Protein durchgeführt. Für die im Folgenden berechneten Bindungsenergien wurden die Liganden aus den minimierten Komplexen extrahiert. Die Berechnung der Bindungsenergie erfolgte mittels Prime MM-GBSA.^{127,128} Als Rezeptor wurde die Struktur des ursprünglich aus der Proteinvorbereitung erhaltenen Hämagglutinins verwendet.

6.2.4 Durchführung von molecular dynamics Simulationen

Die Protein-Ligand-Komplexe wurden in den Desmond System Builder geladen.¹²⁹⁻¹³¹ Hier wurde eine orthorombische Box definiert. Als *box size calculation method* wurde *buffer* gewählt und die Distanzen auf $a = b = 10 \text{ Å}$ und $c = 17 \text{ Å}$ gesetzt. Abschließend wurde das Skript zur Minimierung des Volumens durchlaufen gelassen. Etwaige Überschüsse negativer Ladungen wurden durch hinzufügen von Natriumionen neutralisiert und anschließend als Lösungsmittel eine 150 mM NaCl-Lösung eingestellt. Mit diesen Einstellungen wurde dann das System generiert und in Desmond Molecular Dynamics geladen. Die Simulationen wurden über einen Zeitraum von 4.8 ns durchgeführt. Dabei wurde der Energieverlauf alle 1.2 ps und ein Schritt in der Trajektorie alle 4.8 ps gespeichert. Als *ensemble class* wurde der Modus NPT und eine Temperatur von 300 K und ein Druck von 1.01325 bar eingestellt. Zur

6 Experimenteller Teil

Auswertung der Daten der Simulation wurden Desmond Simulation Event Analysis und Desmond Simulation Interactions Diagram verwendet.

6.3 SPR Bindungsstudien

6.3.1 Immobilisierung des Hämagglutinins H5

Das kommerziell bezogene Hämagglutinin H5 befand sich gelöst in einem Tris-Puffer mit einem angegebenen Gehalt von 145 µg/mL. Um Tris abzutrennen, wurde das Protein durch Dialyse in den Immobilisierungspuffer unter Zusatz von 20 mM *N*-Acetylneuraminsäure-methylglycosid überführt. Hierfür wurden Amicon[®] Ultracel[®] Zentrifugenfilter (MWCO 3 kDa) eingesetzt. Als Immobilisierungspuffer wurde ein 10 mM Acetatpuffer pH 5.5 verwendet. Das Protein wurde auf einem Sensorchip CMD 200 m von XanTec bioanalytics GmbH immobilisiert. Als Messgerät wurde ein Biacore 3000 der Firma Biacore verwendet. Der Sensorchip wurde am Tag vor der eigentlichen Messung in das Gerät eingesetzt und über Nacht mit Laufpuffer unter Verwendung der *standby*-Methode gespült. Als Laufpuffer wurde kommerziell erworbener HBS-EP+ Puffer verwendet. Für die Aktivierung, Immobilisierung und das *capping* wurde eine Flussrate von 5 µL/min eingestellt. Die Kupplung erfolgte unter Standardbedingungen mit frisch angesetzter EDC/NHS-Lösung, welche für 21 min. über zwei Flusszellen geleitet wurde. Von der Proteinlösung wurden 55.2 µL (entspricht 8 µg H5) dialysiert. Das Protein im Immobilisierungspuffer wurde für 22 min über eine Flusszelle geleitet. Danach wurden beide Flusszellen für 10 min mit Ethanolamin gecapped.

6.3.2 Durchführung der Messungen und Auswertung

Die Verdünnungen der verschiedenen Liganden wurden in kommerziell erworbenen HBS-EP+ Puffer angesetzt. Die Messreihen wurden mit einer Flussrate von 20 µL/min durchgeführt. Die Kontaktzeit der Liganden betrug 10 min. Anschließend wurde 15 min mit Laufpuffer gespült. Die Konzentrationsreihen aller Liganden bestanden jeweils aus fünf Proben. Die Vermessung erfolgte von der kleinsten zur größten Konzentration, gefolgt von einer erneuten Messung der geringsten Konzentration. Die erste Bearbeitung der Daten erfolgte mit der BIAevaluation 4.1 Software. Mit diesem Programm wurden die Daten importiert und die Sensorgramme der einzelnen Messzyklen normiert. Anschließend wurde

6 Experimenteller Teil

mit dem Programm Origin 9.1 eine lineare Basislinienkorrektur anhand der negativen Steigung der Sensorgramme vor der Injektion durchgeführt. Die so normierten und korrigierten Daten wurden dann durch Kurvenanpassungen ebenfalls mit Origin 9.1 ausgewertet. Für die thermodynamische Analyse wurden von jedem Messzyklus die RU-Antworten 595 s nach Injektion beginnend über 5 s arithmetisch gemittelt und gegen die entsprechende Konzentration aufgetragen. Zusätzlich wurde ein artifizieller Nullpunkt mit einer RU-Antwort von 0 bei einer Konzentration von 0 generiert. Die Anpassung der Datenpunkte erfolgte an das in Origin 9.1 implementierte *one site binding* Modell. Für die kinetische Auswertung wurde k_{off} durch die Anpassung der RU-Antworten eines jeden Messzyklus, soweit nicht anders beschrieben, 610 s nach Injektion beginnend über 495 s an folgende Funktion (3) bestimmt:

$$response = RU_{min} + A * e^{-k_{off}*(t-t_0)} \quad (3)$$

Hierbei wurde nur die Startzeit t_0 festgelegt. Die Kurvenanpassung zur Bestimmung von k_{on} wurde stets 10 s nach Injektion begonnen. Der Endzeitpunkt wurde so gewählt, dass der Einfluss unspezifischer Wechselwirkungen möglichst gering war. Die Anpassung erfolgte an folgende Funktion (4):

$$response = RU_{max} * \left(1 - e^{-(k_{on}*c_{Ligand}+k_{off})*(t-t_0)}\right) + RU_0 \quad (4)$$

Hierbei wurden die zuvor bestimmten Werte von k_{off} , sowie die Konzentration des Liganden c_{Ligand} und die Startzeit t_0 vorgegeben und festgelegt

6.4 STD-NMR Bindungsstudien

6.4.1 Vorbereitung der NMR-Proben

Das kommerziell bezogene Hämagglutinin H5 wurde zunächst durch Dialyse in einen deuterierten PBS-Puffer ($d\text{PBS}$) überführt. Hierfür wurden Amicon[®] Ultracel[®] Zentrifugenfilter (MWCO 10 kDa) verwendet. Der $d\text{PBS}$ -Puffer beinhaltete 10 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Na_2HPO_4 , 150 mM NaCl und 10 mM NaN_3 in Deuteriumoxid. Nach der Dialyse wurde die Konzentration des Proteins per NanoDrop UV Spektrophotometer bestimmt. Der Extinktionskoeffizient und die Masse des Proteins wurden aus dessen

6 Experimenteller Teil

Aminosäuresequenz berechnet ($\epsilon_{280} = 89420 \text{ L/mol}\cdot\text{cm}$, $M = 64.5 \text{ kDa}$).^{132,133} Die Konzentrationsbestimmung erfolgte sechsfach und die Messwerte wurden gemittelt. Von diesem Wert ausgehend wurden dann die gewünschte Proteinkonzentration von $1 \mu\text{M}$ durch Verdünnung mit *d*PBS eingestellt. Die Beifügung des Neu5Aca2Me als Kompetitor erfolgte durch Zugabe von $45 \mu\text{L}$ einer 80 mM Lösung des Methylglycosids in *d*PBS. Das Gesamtvolumen der NMR-Proben vor Zugabe der Ligandlösungen wurde stets auf $180 \mu\text{L}$ eingestellt. Die Liganden wurden ebenfalls in *d*PBS-Puffer mit 20 mM Neu5Aca2Me gelöst. Die Proben wurden in 3 mm MATCH™ Röhrchen gemessen.

6.4.2 Aufnahme und Prozessierung der STD-NMR-Spektren

Die Messung der STD-NMR-Spektren erfolgte an einem Bruker 700 MHz Spektrometer mit *cryo*-Probenkopf. Die verwendete Pulssequenz war „stddiffesgp“. Alle Spektren wurden mit 512 *scans* bei 298 K gemessen. Hierbei betrug die Sättigungs- und die Relaxationszeit jeweils $D1 = D20 = 2 \text{ s}$. Des Weiteren wurde mit folgenden Einstellungen gemessen: $PL1 = -4.5 \text{ dB}$; $PL10 = 12 \text{ dB}$; $PL29 = 5.59 \text{ dB}$; $D29 = 30 \text{ ms}$; $SP10 = 32.55 \text{ dB}$; $SP13 = 30 \text{ dB}$; $P13 = 50 \text{ ms}$.

Die gemessenen pseudo 2D-Spektren wurden in die entsprechenden *off*- und *on resonance* 1D Spektren separiert. Das FID des *on resonance* Spektrums wurde dann von einer Kopie des *off resonance* Spektrums subtrahiert. Die drei so erhaltenen Spektren wurden dann prozessiert. Hierbei wurde nach Fouriertransformation zunächst im Differenzspektrum die Phase manuell korrigiert und anschließend auf die anderen beiden Spektren übertragen. Auf das FID wurde ein *line broadening* von 1 Hz angewendet und die Fourier-transformierten Spektren wurden mit einem Polynom nullter Ordnung Basislinien-korrigiert. Nach automatischer Phasenkorrektur (apk) wurde die Phase in nullter und erster Ordnung manuell korrigiert.

6.4.3 Auswertung der STD-NMR-Spektren

Es wurden mittels serieller Prozessierung die Integrale ausgewählter Signale bestimmt. Anhand dieser Werte wurden dann die STD% durch Division eines Integrals aus dem Differenzspektrum durch das entsprechende Integral aus dem *off resonance* Spektrum berechnet. Die STD% wurden dann in dem Programm Origin 9.1 zunächst so normiert, dass der größte Wert einer Messreihe auf 100% gesetzt wurde. Anschließend wurden die STD%

6 Experimenteller Teil

gegen den dekadischen Logarithmus der Konzentration aufgetragen. Bei der Auftragung wurde der Wert der Nullprobe weggelassen. Durch Anpassung der Datenpunkte an das *one site competition* Model konnte dann ein IC_{50} Wert erhalten werden. Anhand der Cheng-Prusoff-Gleichung (5) wurde anschließend mit der bekannten Konzentration des Kompetitors und einer Dissoziationskonstante für das Protein-Kompetitor-System von $K_D = 2$ mM die inhibitorische Konstante K_I berechnet.¹³⁴

$$K_I = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{C_{Kompetitor}}{K_{D,Kompetitor}}} \quad (5)$$

6.5 Synthesen und Charakterisierungen

6.5.1 Darstellung von *N*-[4-(Cyclohexylmethoxy)-2-methyl-phenyl]-2-(3-hydroxypropylamino)-acetamid 8

Analog zu einer literaturbekannten Vorschrift wurden 0.27 g (1.2 mmol) 4-(Cyclohexylmethoxy)-2-methylanilin und 1.4 g (16 mmol) Natriumhydrogencarbonat in 1.6 mL *iso*-Propylacetat suspendiert und anschließend auf 5 °C abgekühlt.¹³⁵ Dann wurden tropfenweise 0.15 mL (0.21 g, 1.9 mmol) Chloracetylchlorid innerhalb von 15 min zugegeben. Es wurde auf 25 °C erwärmt und 2 mL demin. Wasser zugegeben. Nach Entfernung der wässrigen Phase wurde die organische mit 0.33 mL (0.33 g, 4.4 mmol) 3-Aminopropan-1-ol versetzt und dann für 2 h bei 60 °C gerührt. Danach wurden 0.46 mL demin. Wasser und 0.19 mL *iso*-Propylacetat hinzugegeben und nochmals auf 60 °C erwärmt. Die organische Phase wurde abgetrennt und für 1 h auf 0 °C gekühlt. Der dabei ausgefallene Feststoff wurde durch Filtration abgetrennt und mit kaltem *iso*-Propylacetat gewaschen. Nach Trocknung im Feinvakuum wurde säulenchromatographisch gereinigt (Eluent: EtOH). Es wurden 42 mg (0.13 mmol) eines hellgelben Feststoffes erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 11 %.

6 Experimenteller Teil

Charakterisierung

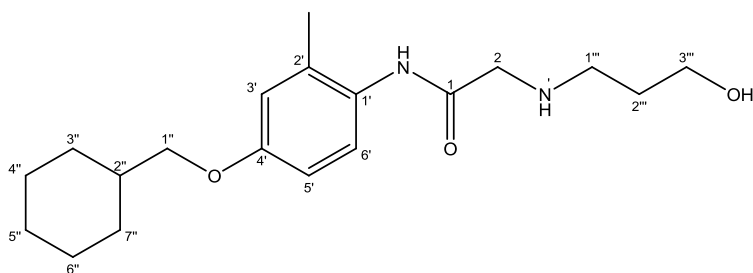
hellgelber Feststoff

Schmelzpunkt: 72 °C

R_f-Wert (EtOH): 0.25

ESI-MS: m/z berechnet: 335.2329 [M+H]⁺

gemessen: 335.2335 [M+H]⁺



C₁₉H₃₀N₂O₃
MG = 334.45 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 9.37 (s, 1H, NH-CO), 7.51-7.47 (m, 1H, H-6'), 6.81-6.70 (m, 2H, H-3', H-5'), 3.73 (d, 2H, H-1''), 3.48 (t, 2H, H-3'''), 3.29 (s, 2H, H-2), 2.65 (t, 2H, H-1'''), 2.17 (s, 3H, CH₃), 1.79 (2H, H-3''a, H-7''a), 1.74-1.58 (m, 6H, H-2'', H-4''a, H-5''a, H-6''a, H-2'''a, H-2'''b), 1.30-1.11 (m, 3H, H-4''b, H-5''b, H-6''b), 1.07-0.97 (dq, 2H, H-3''b, H-7''b).

²J_{3''a,3'''b} = ²J_{7''a,7'''b} = 12.3 Hz, ³J_{3''b,2'} = ³J_{7''b,2'} = 3.0 Hz, ³J_{2'',1''} = 6.5 Hz, ³J_{3''',2'''} = 6.2 Hz, ³J_{2''',1'''} = 7.2 Hz

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 169.3 (C-1), 155.8 (C-4'), 131.7 (C-1'), 129.0 (C-2'), 124.4 (C-6'), 116.1 (C-3'), 111.8 (C-5'), 72.8 (C-1''), 58.9 (C-3'''), 52.3 (C-2), 46.4 (C-1'''), 37.1 (C-2''), 32.4 (C-2'''), 29.3 (C-3'', C-7''), 26.1 (C-5''), 25.3 (C-4'', C-6''), 17.7 (CH₃).

6.5.2 Darstellung von 4-(Cyclohexylmethoxy)-2-methyl-1-nitrobenzol 9

Durchführung 1:

Es wurden 490 mg (8.73 mmol) Kaliumhydroxid in 7.1 mL Ethanol gelöst und erwärmt. Zu der Lösung wurden 590 mg (3.85 mmol) 3-Methyl-4-nitrophenol, 1.00 g (5.65 mmol) Cyclohexylmethylbromid und eine Spatelspitze Natriumiodid hinzugegeben und für 5 h zum

6 Experimenteller Teil

Rückfluss erhitzt. Nach Zugabe von 980 mg (17.5 mmol) Kaliumhydroxid in 7.1 mL bidest. Wasser wurde erneut für 17 h zum Rückfluss erhitzt. Die Lösung wurde nach dem Abkühlen auf Eis gegeben und mit konz. Salzsäure angesäuert. Die dabei entstandene Suspension wurde dreimal mit jeweils 20 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit jeweils 60 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und einmal mit 60 mL demin. Wasser gewaschen. Es wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und anschließend das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie (Eluent: PE/EE 10:1). Es wurden 136 mg (546 μ mol) eines gelben, viskosen Öls erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 14 %.

Durchführung 2:

Es wurden 720 mg (4.70 mmol) 3-Methyl-4-nitrophenol in 9.4 mL DMF gelöst und erwärmt. Dann wurden 1.00 g (5.65 mmol) Cyclohexylmethylbromid, 3.94 g (28.5 mmol) Kaliumcarbonat und eine Spatelspitze Natriumiodid hinzugegeben und der Reaktionsansatz für 20 h zum Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung auf Eis gegeben und viermal mit jeweils 20 mL Diethylether extrahiert. Es wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und anschließend das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie (Eluent: PE/EE 10:1). Es wurden 1.01 g (4.04 mmol) eines gelben, viskosen Öls erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 86 %.

Charakterisierung

gelbes, viskoses Öl

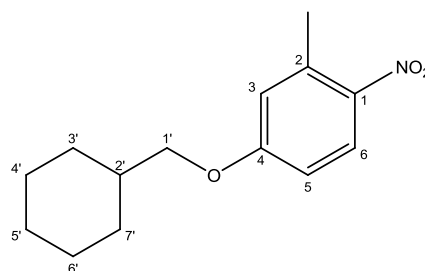
R_f-Wert (PE/EE 10:1): 0.58

ESI-MS: m/z berechnet: 250.1438 [M+H]⁺

272.1257 [M+Na]⁺

gemessen: 250.1442 [M+H]⁺

272.1261 [M+Na]⁺



6 Experimenteller Teil

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 8.09-8.06 (m, 1H, **H-6**), 6.79-6.75 (m, 2H, **H-3**, **H-5**), 3.81 (d, 2H, **H-1'**), 2.63 (s, 3H, **CH**₃), 1.88-1.69 (m, 6H, **H-2'**, **H-3'a**, **H-4'a**, **H-5'a**, **H-6'a**, **H-7'a**), 1.36-1.16 (m, 3H, **H-4'b**, **H-5'b**, **H-6'b**), 1.11-1.01 (dq, 2H, **H-3'b**, **H-7'b**).

$^2J_{3'a,3'b} = ^2J_{7'a,7'b} = 12.3$ Hz, $^3J_{3'b,2'} = ^3J_{7'b,2'} = 3.3$ Hz, $^3J_{1',2'} = 6.4$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 163.0 (**C-4**), 142.1 (**C-1**), 137.2 (**C-2**), 127.7 (**C-6**), 118.1 (**C-3**), 112.4 (**C-5**), 74.1 (**C-1'**), 37.7 (**C-2'**), 29.9 (**C-3'**, **C-7'**), 26.6 (**C-5'**), 25.9 (**C-4'**, **C-6'**), 21.9 (**CH**₃).

6.5.3 Darstellung von 4-(Cyclohexylmethoxy)-2-methylanilin 10

Durchführung 1:

Analog zu einer literaturbekannten Vorschrift⁹³ wurden 1.01 g (4.04 mmol) 4-(Cyclohexylmethoxy)-2-methyl-1-nitrobenzol in 30 mL Methanol gelöst und mit einer Spatelspitze Pd/C für 70 h. bei RT in einer Wasserstoffatmosphäre bei 50-60 bar im Autoklaven gerührt. Es wurde über Celite filtriert. Das Filtrat wurde unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung erfolgte durch dreimalige Säulenchromatographie (1. Eluent: PE/EE 10:1 + 1% Et₃N, 2. Eluent: Toluol + 0.001 % Essigsäure, 3. Eluent: Toluol/Aceton 10:1) gereinigt. Es wurden 269 mg (1.23 mmol) eines gelben, viskosen Öls erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 30 %.

Durchführung 2:

Die gesamte Reaktion wurde unter Stickstoff als Schutzgas durchgeführt. Es wurden 290 mg (7.64 mmol) Lithiumaluminiumhydrid in 16 mL abs. Tetrahydrofuran suspendiert und unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Dann wurden 300 mg (1.20 mmol) 4-(Cyclohexylmethoxy)-2-methyl-1-nitrobenzol in 3 mL abs. Tetrahydrofuran langsam zugetropft. Anschließend wurde für 20 h. zum Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden zunächst 290 μL demin. Wasser, dann 290 μL 15 %ige Natronlauge und anschließend erneut 870 μL demin. Wasser zugetropft. Es wurde filtriert und das Filtrat dreimal mit jeweils 75 mL Diethylether

6 Experimenteller Teil

extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Anschließend wurde im Feinvakuum getrocknet. Es wurden 160 mg (730 μmol) eines gelben, viskosen Öls erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 61 %.

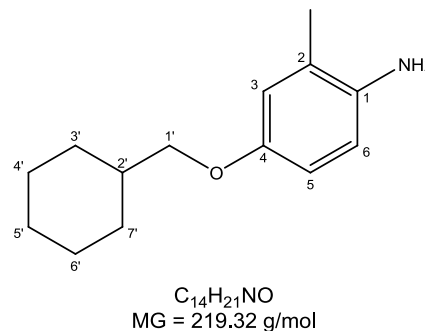
Charakterisierung

gelbes, viskoses Öl

R_f-Wert (Toluol/Aceton 10:1): 0.43

ESI-MS: m/z berechnet: 220.1696 [M+H]⁺

gemessen: 220.1698 [M+H]⁺



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 6.73-6.60 (m, 3H, **H-3**, **H-5**, **H-6**), 3.68 (d, 2H, **H-1'**), 2.20 (s, 3H, CH₃), 1.89-1.65 (m, 6H, **H-2'**, **H-3'a**, **H-4'a**, **H-5'a**, **H-6'a**, **H-7'a**), 1.35-1.16 (m, 3H, **H-4'b**, **H-5'b**, **H-6'b**), 1.08-0.97 (dq, 2H, **H-3'b**, **H-7'b**).

²J_{3'a,3'b} = ²J_{7'a,7'b} = 12.3 Hz, ³J_{3'b,2'} = ³J_{7'b,2'} = 3.1 Hz, ³J_{1',2'} = 6.6 Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 166.5 (C-4), 152.3 (C-1), 135.9 (C-2), 124.9 (C-6), 117.4 (C-3), 113.0 (C-5), 74.4 (C-1'), 37.9 (C-2'), 30.1 (C-3', C-7'), 26.7 (C-5'), 26.0 (C-4', C-6'), 17.9 (CH₃).

6.5.4 Darstellung von Methyl-5-acetamido-9-(ethyl-amino)-3,5,9-tridesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosidonsäure 15

Es wurden 27.1 mg (74.4 μmol) **26** in 4 mL 0.1 M Natronlauge gelöst und eine Stunde zum Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen auf RT wurde mit Essigsäure neutralisiert und anschließend gefriergetrocknet. Die Reinigung erfolgte mittels HPLC. Für diese wurde eine NUCLEODUR[®] C₁₈ Pyramid Säule (21x250 mm, 5 μm Partikelgröße, Macherey-Nagel)

6 Experimenteller Teil

verwendet und mit einer Flussrate von 20 mL/min eluiert. Als Laufmittel A wurde reines Wasser mit 0.1 % Ameisensäure und als Laufmittel B Acetonitril/reines Wasser 95:5 mit 0.1 % Ameisensäure verwendet. Gradient: 0 min, 0 % B; 5 min, 0 % B; 11 min, 100 % B; 17 min, 0 % B.

Nach Trocknung wurden 16.0 mg (45.7 μ mol) eines farblosen Feststoffs erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 61 %.

Charakterisierung

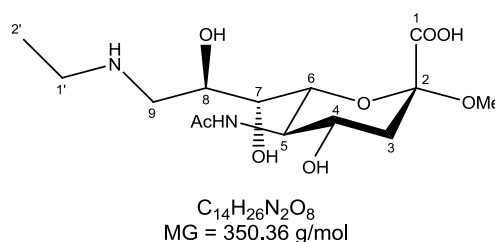
farbloser Feststoff

R_f-Wert (BuOH/AcOH/H₂O 5:2:2): 0.21

R_t-Wert (HPLC): 5.01 min.

ESI-MS: m/z berechnet: 351.1762 [M+H]⁺

gemessen: 351.1765 [M+H]⁺



¹H-NMR (400 MHz, MeOD-*d*4): δ [ppm] = 4.11 (ddd, 1H, **H-8**), 3.72 (ddd, 1H, **H-4**), 3.63 (dd, 1H, **H-5**), 3.57 (dd, 1H, **H-6**), 3.39 (dd, 1H, **H-7**), 3.35 (s, 3H, OCH₃), 3.35 (dd, 1H, **H-9a**), 3.10 (q, 2H, **H-1'**), 3.00 (dd, 1H, **H-9b**), 2.82 (dd, 1H, **H-3eq**), 2.02 (s, 3H, CH₃-CO-NH), 1.56 (dd, 1H, **H-3ax**), 1.32 (t, 3H, **H-2'**).

²J_{9a,9b} = 12.3 Hz, ³J_{9a,8} = 3.0 Hz, ³J_{9b,8} = 9.5 Hz, ³J_{8,7} = 8.6 Hz, ³J_{7,6} = 1.1 Hz, ³J_{6,5} = 10.3 Hz, ³J_{5,4} = 9.9 Hz, ³J_{4,3eq} = 4.8 Hz, ³J_{4,3ax} = 11.9 Hz, ²J_{3eq,3ax} = 12.3 Hz, ³J_{2',1'} = 7.2 Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD-*d*4): δ [ppm] = 175.7 (CH₃-CO-NH), 174.1 (**C-1**), 102.2 (**C-2**), 74.1 (**C-6**), 72.6 (**C-7**), 69.3 (**C-4**), 68.5 (**C-8**), 54.2 (**C-5**), 52.1 (OCH₃), 51.6 (**C-9**), 44.2 (**C-1'**), 42.3 (**C-3**), 22.6 (CH₃-CO-NH), 11.3 (**C-2'**).

6 Experimenteller Teil

6.5.5 Darstellung von Methyl-5-acetamido-9-(*n*-propyl-amino)-3,5,9-tridesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosidonsäure 16

Es wurden 2.3 mg (6.1 μ mol) **27** in 1 mL demin. Wasser gelöst. Durch Zugabe von 0.1 mL 1 M Natronlauge wurde ein pH-Wert von 12.5 eingestellt. Es wurde eine Stunde bei RT gerührt und anschließend mit Essigsäure schwach angesäuert. Danach wurde gefriergetrocknet. Die Reinigung erfolgte mittels HPLC. Für diese wurde eine NUCLEODUR[®] C₁₈ Pyramid Säule (21x250 mm, 5 μ m Partikelgröße, Macherey-Nagel) verwendet und mit einer Flussrate von 20 mL/min eluiert. Als Laufmittel A wurde reinst Wasser und als Laufmittel B Acetonitril/reinst Wasser 95:5 verwendet. Gradient: 0 min, 0 % B; 7.5 min, 7.5 % B; 13 min, 100 % B; 15 min, 80 % B.

Nach Trocknung wurden 1.7 mg (4.7 μ mol) eines farblosen Feststoffs erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 77 %.

Charakterisierung

farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 199 °C

R_t-Wert (HPLC): 7.55 min.

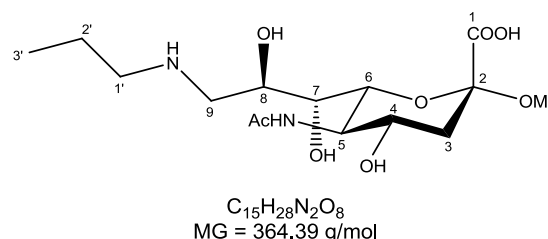
$[\alpha]_D^{23} = +28.4^\circ$ (c = 0.37, MeOH)

ESI-MS: m/z berechnet: 365.1918 [M+H]⁺

387.1738 [M+Na]⁺

gemessen: 365.1925 [M+H]⁺

387.1734 [M+Na]⁺



¹H-NMR (500 MHz, MeOD-*d*₄): δ [ppm] = 4.11 (ddd, 1H, **H-8**), 3.71 (ddd, 1H, **H-4**), 3.62 (t, 1H, **H-5**), 3.55 (dd, 1H, **H-6**), 3.38 (dd, 1H, **H-7**), 3.36 (dd, 1H, **H-9a**), 3.35 (s, 3H, OCH₃),

6 Experimenteller Teil

3.02-2.96 (m, 2H, **H-1'**), 2.99 (dd, 1H, **H-9b**), 2.82 (dd, 1H, **H-3eq**), 2.02 (s, 3H, **CH₃-CO-NH**), 1.78-1.66 (m, 2H, **H-2'**), 1.55 (dd, 1H, **H-3ax**), 1.02 (t, 3H, **H-3'**).

$^3J_{9a,9b} = 12.6$ Hz, $^3J_{9a,8} = 3.2$ Hz, $^3J_{9b,8} = 9.4$ Hz, $^3J_{8,7} = 8.6$ Hz, $^3J_{7,6} = 1.9$ Hz, $^3J_{6,5} = 10.2$ Hz, $^3J_{5,4} = 9.8$ Hz, $^3J_{4,3eq} = 4.9$ Hz, $^3J_{4,3ax} = 11.5$ Hz, $^2J_{3ax,3eq} = 12.3$ Hz, $^3J_{3',2'} = 7.4$ Hz.

^{13}C -NMR (126 MHz, MeOD-*d*₄): δ [ppm] = 175.7 (**CH₃-CO-NH**), 174.0 (**C-1**), 102.2 (**C-2**), 74.1 (**C-6**), 72.7 (**C-7**), 69.3 (**C-4**), 68.4 (**C-8**), 54.1 (**C-5**), 52.1 (**C-9**), 52.0 (**OCH₃**), 50.8 (**C-1'**), 42.4 (**C-3**), 22.5 (**CH₃-CO-NH**), 20.5 (**C-2'**), 11.2 (**C-3'**).

6.5.6 Darstellung von Methyl-5-acetamido-9-(*iso*-propyl-amino)-3,5,9-tridesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosidonsäure 17

Es wurden 21.5 mg (56.8 μmol) **25** in 9 mL Natronlauge bei pH 12 gelöst und 90 min. bei RT gerührt. Das Reaktionsende wurde per DC detektiert. Nach Neutralisation mit Amberlite IR 120(H^+) wurde filtriert und das Filtrat gefriergetrocknet. Die Reinigung erfolgte mittels Gelpermeationschromatographie an Biogel P2. Nach Trocknung wurden 13.8 mg (37.9 μmol) eines farblosen Feststoffs erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 67 %.

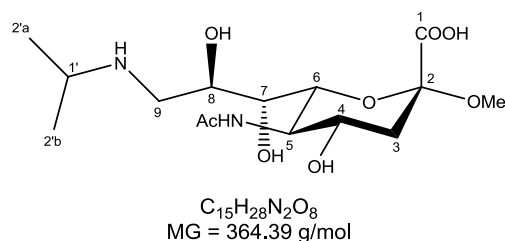
Charakterisierung

farbloser Feststoff

R_f-Wert (EE/MeOH/H₂O/AcOH

10:3:3:1): 0.41

$[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +19.2^\circ$ (c = 0.5, MeOH)



6 Experimenteller Teil

ESI-MS: m/z berechnet: 365.1918 [M+H]⁺

387.1738 [M+Na]⁺

gemessen: 365.1923 [M+H]⁺

387.1723 [M+Na]⁺

¹H-NMR (500 MHz, MeOD-*d*4): δ [ppm] = 4.10 (ddd, 1H, **H-8**), 3.72 (ddd, 1H, **H-4**), 3.62 (dd, 1H, **H-5**), 3.56 (dd, 1H, **H-6**), 3.41 (sept, 1H, **H-1'**), 3.39 (dd, 1H, **H-7**), 3.35 (s, 3H, OCH₃), 3.34 (dd, 1H, **H-9a**), 3.00 (dd, 1H, **H-9b**), 2.82 (dd, 1H, **H-3eq**), 2.02 (s, 3H, CH₃-CO-NH), 1.55 (dd, 1H, **H-3ax**), 1.34 (d, 1H, **H-2'a**), 1.34 (d, 1H, **H-2'b**).

²J_{9a,9b} = 12.7 Hz, ³J_{9a,8} = 2.7 Hz, ³J_{9b,8} = 9.5 Hz, ³J_{8,7} = 8.7 Hz, ³J_{7,6} = 2.0 Hz, ³J_{6,5} = 10.4 Hz, ³J_{5,4} = 9.5 Hz, ³J_{4,3eq} = 4.9 Hz, ³J_{4,3ax} = 11.6 Hz, ²J_{3eq,3ax} = 12.9 Hz, ³J_{2',1'} = 6.6 Hz.

¹³C-NMR (126 MHz, MeOD-*d*4): δ [ppm] = 175.7 (CH₃-CO-NH), 174.0 (**C-1**), 102.2 (**C-2**), 74.1 (**C-6**), 72.7 (**C-7**), 69.3 (**C-4**), 68.6 (**C-8**), 54.2 (**C-5**), 52.0 (OCH₃), 51.9 (**C-1'**), 49.2 (**C-9**), 42.4 (**C-3**), 22.6 (CH₃-CO-NH), 19.3 (**C-2'a**), 18.9 (**C-2'b**).

6.5.7 Darstellung von Methyl [methyl-5-acetamido-9-(iso-propyl-amino)-3,5,9-tridesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid]onat 25

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 33.9 mg (89.6 μ mol unter Berücksichtigung von 70 mol% AcOH) **24** mit 3.16 mL (2.50 g, 43.0 mmol) Aceton und 3 mL abs. Methanol gelöst und mit 0.1 mL Essigsäure angesäuert. Danach wurden 3.7 mg (60 μ mol) NaCNBH₃ in 0.5 mL abs. Methanol zugegeben. Nach 96 stündigem Rühren bei RT wurden alle flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie (Eluent: EE/MeOH 4:1 + 1 % Et₃N). Nach Trocknung wurden 27.0 mg (71.3 μ mol) eines farblosen Feststoffs erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 80 %.

6 Experimenteller Teil

Charakterisierung

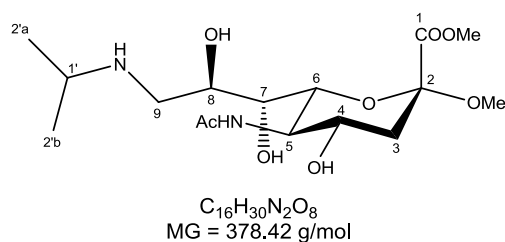
farbloser Feststoff

R_f-Wert (EE/MeOH/H₂O/AcOH 10:3:3:1): 0.55

$[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +44.6^{\circ}$ (c = 0.83, MeOH)

ESI-MS: m/z berechnet: 379.2075 [M+H]⁺

gemessen: 379.2093 [M+H]⁺



¹H-NMR (500 MHz, MeOD-*d*4): δ [ppm] = 4.11 (ddd, 1H, **H-8**), 3.86 (s, 3H, COOCH₃), 3.72 (dd, 1H, **H-5**), 3.66 (ddd, 1H, **H-4**), 3.55 (dd, 1H, **H-6**), 3.50 (dd, 1H, **H-7**), 3.42 (sept, 1H, **H-1'**), 3.37 (dd, 1H, **H-9a**), 3.34 (s, 3H, OCH₃), 3.10 (dd, 1H, **H-9b**), 2.67 (dd, 1H, **H-3eq**), 2.01 (s, 3H, CH₃-CO-NH), 1.74 (dd, 1H, **H-3ax**), 1.35 (d, 1H, **H-2'a**), 1.34 (d, 1H, **H-2'b**).

²J_{9a,9b} = 12.8 Hz, ³J_{9a,8} = 3.4 Hz, ³J_{9b,8} = 9.0 Hz, ³J_{8,7} = 7.9 Hz, ³J_{7,6} = 1.7 Hz, ³J_{6,5} = 10.1 Hz, ³J_{5,4} = 10.0 Hz, ³J_{4,3eq} = 4.6 Hz, ³J_{4,3ax} = 11.5 Hz, ²J_{3ax,3eq} = 12.9 Hz, ³J_{CH,Me} = 6.5 Hz.

¹³C-NMR (126 MHz, MeOD-*d*4): δ [ppm] = 175.4 (CH₃-CO-NH), 170.8 (C-1), 100.5 (C-2), 74.8 (C-6), 72.3 (C-7), 68.5 (C-8), 68.1 (C-4), 53.9 (C-5), 53.5 (COO-CH₃), 52.1 (OCH₃), 52.0 (C-1'), 49.0 (C-9), 41.3 (C-3), 22.7 (CH₃-CO-NH), 19.3 (C-2'a), 18.9 (C-2'b).

6.5.8 Darstellung von Methyl [methyl-5-acetamido-9-(ethyl-amino)-3,5,9-tridesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid]onat 26

Es wurden 50.0 mg (132 μ mol unter Berücksichtigung von 70 mol% AcOH) **24** bei 6 °C in 3 mL Methanol gelöst. Dann wurden 8.00 μ L (6.32 mg, 143 μ mol) Acetaldehyd und 250 μ L Essigsäure zugegeben und 5 min. bei 6 °C gerührt. Anschließend wurde 10 min. bei RT gerührt und dann 123 μ L einer 1 M NaCNBH₃-Lösung in Tetrahydrofuran zugegeben.

6 Experimenteller Teil

Nachdem für weitere 16 h. bei RT gerührt wurde, wurden alle flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt und dreimal mit Toluol codestilliert. Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie (Eluent: EE/EtOH 2:1 + 1 % AcOH) und anschließender HPLC. Für die HPLC wurde eine NUCLEODUR® C₁₈ Pyramid Säule (21x250 mm, 5 µm Partikelgröße, Macherey-Nagel) verwendet und mit einer Flussrate von 20 mL/min eluiert. Als Laufmittel A wurde reinst Wasser mit 0.1 % Ameisensäure und als Laufmittel B Acetonitril/reinst Wasser 95:5 mit 0.1 % Ameisensäure verwendet. Gradient: 0 min, 0 % B; 5 min, 0 % B; 11 min, 100 % B; 17 min, 0 % B.

Nach Trocknung wurden 6.5 mg (18 µmol) eines farblosen Feststoffs erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 14 %.

Charakterisierung

farbloser Feststoff

R_f-Wert (EE/EtOH 2:1 + 1 % AcOH): 0.11

R_t-Wert (HPLC): 4.07 min.

ESI-MS: m/z berechnet: 365.1918 [M+H]⁺

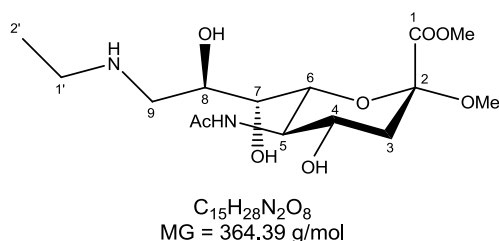
387.1738 [M+Na]⁺

gemessen: 365.1923 [M+H]⁺

387.1734 [M+Na]⁺

¹H-NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄): δ [ppm] = 4.11 (ddd, 1H, **H-8**), 3.86 (s, 3H, COOCH₃), 3.72 (dd, 1H, **H-5**), 3.66 (ddd, 1H, **H-4**), 3.55 (dd, 1H, **H-6**), 3.49 (dd, 1H, **H-7**), 3.36 (dd, 1H, **H-9a**), 3.34 (s, 3H, OCH₃), 3.15-3.06 (m, 3H, **H-9a**, **H-1'**), 2.67 (dd, 1H, **H-3eq**), 2.01 (s, 3H, CH₃-CO-NH), 1.74 (dd, 1H, **H-3ax**), 1.32 (t, 3H, **H-2'**).

²J_{9a,9b} = 12.7 Hz, ³J_{9a,8} = 3.3 Hz, ³J_{9b,8} = 9.2 Hz, ³J_{8,7} = 7.9 Hz, ³J_{7,6} = 1.3 Hz, ³J_{6,5} = 10.0 Hz, ³J_{5,4} = 9.9 Hz, ³J_{4,3eq} = 4.4 Hz, ³J_{4,3ax} = 11.4 Hz, ²J_{3eq,3ax} = 12.9 Hz.



6 Experimenteller Teil

^{13}C -NMR (100 MHz, $\text{MeOD-}d_4$): δ [ppm] = 175.4 ($\text{CH}_3\text{-CO-NH}$), 170.8 (C-1), 100.5 (C-2), 74.8 (C-6), 72.3 (C-7), 68.3 (C-8), 68.2 (C-4), 53.8 (C-5), 53.5 (COOCH_3) 52.1 (OCH_3), 51.4 (C-9), 44.3 (C-1'), 41.3 (C-3), 22.7 ($\text{CH}_3\text{-CO-NH}$), 11.4 (C-2').

6.5.9 Darstellung von Methyl [methyl-5-acetamido-9-(*n*-propyl-amino)-3,5,9-tridesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid]onat 27

Es wurden 50.0 mg (132 μmol unter Berücksichtigung von 70 mol% AcOH) **24** in 1.5 mL Methanol und 1.5 mL demin. Wasser gelöst. Dann wurden 11.3 μL (9.04 mg, 156 μmol) Propionaldehyd und 250 μL Essigsäure zugegeben und 15 min. bei RT gerührt. Anschließend wurden 123 μL einer 1 M NaCNBH_3 -Lösung in Tetrahydrofuran zugegeben. Nachdem für weitere 16 h. bei RT gerührt wurde, wurden alle flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt und dreimal mit Toluol codestilliert. Die Reinigung erfolgte zunächst mittels HPLC. Für diese wurde eine NUCLEODUR[®] C₁₈ Pyramid Säule (21x250 mm, 5 μm Partikelgröße, Macherey-Nagel) verwendet und mit einer Flussrate von 20 mL/min eluiert. Als Laufmittel A wurde reinst Wasser mit 0.1 % Ameisensäure und als Laufmittel B Acetonitril/reinst Wasser 95:5 mit 0.1 % Ameisensäure verwendet. Gradient: 0 min, 0 % B; 9 min, 13.5 % B; 13 min, 100 % B; 19 min, 0 % B.

Die weitere Reinigung erfolgte mittels dreimaliger Säulenchromatographie (Eluent 1 & 2: EE/EtOH 2:1 + 1 % AcOH, Eluent 3: EtOH + 1 % AcOH). Nach Trocknung wurden 16.6 mg (43.9 μmol) eines farblosen Feststoffs erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 33 %.

Charakterisierung

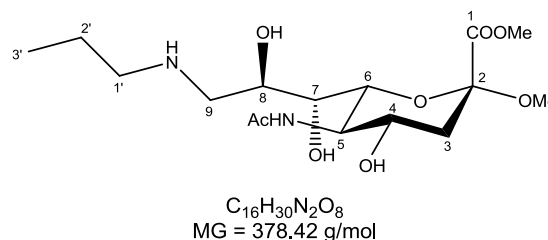
farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 107 °C

R_f -Wert (EE/EtOH 2:1 + 1 % AcOH): 0.03

R_t -Wert (HPLC): 6.91 min.

$[\alpha]_D^{23} = +28.0^\circ$ ($c = 0.5$, MeOH)



6 Experimenteller Teil

ESI-MS: m/z berechnet: 379.2075 [M+H]⁺

gemessen: 379.2074 [M+H]⁺

¹H-NMR (500 MHz, MeOD-*d*4): δ [ppm] = 4.12 (ddd, 1H, **H**-8), 3.86 (s, 3H, COOCH₃) 3.72 (dd, 1H, **H**-5), 3.66 (ddd, 1H, **H**-4), 3.55 (dd, 1H, **H**-6), 3.49 (dd, 1H, **H**-7), 3.36 (dd, 1H, **H**-9a), 3.34 (s, 3H, OCH₃), 3.10 (dd, 1H, **H**-9b), 2.99 (t, 2H, **H**-1'), 2.67 (dd, 1H, **H**-3eq), 2.01 (s, 3H, CH₃-CO-NH), 1.77-1.69 (m, 2H, **H**-2'), 1.74 (dd, 1H, **H**-3ax), 1.02 (t, 3H, **H**-3').

³J_{9a,9b} = 12.6 Hz, ³J_{9a,8} = 3.4 Hz, ³J_{9b,8} = 8.8 Hz, ³J_{8,7} = 8.0 Hz, ³J_{7,6} = 1.6 Hz, ³J_{6,5} = 10.1 Hz, ³J_{5,4} = 10.0 Hz, ³J_{4,3eq} = 4.5 Hz, ³J_{4,3ax} = 11.5 Hz, ²J_{3ax,3eq} = 12.9 Hz, ³J_{3',2'} = 7.4 Hz, ³J_{2',1'} = 7.9 Hz.

¹³C-NMR (126 MHz, MeOD-*d*4): δ [ppm] = 175.4 (CH₃-CO-NH), 170.9 (**C**-1), 100.5 (**C**-2), 74.8 (**C**-6), 72.4 (**C**-7), 68.3 (**C**-8), 68.2 (**C**-4), 53.8 (**C**-5), 53.5 (COOCH₃), 52.1 (OCH₃), 51.9 (**C**-9), 50.8 (**C**-1'), 41.3 (**C**-3), 22.7 (CH₃-CO-NH), 20.5 (**C**-2'), 11.2 (**C**-3').

6.5.10 Versuch der Darstellung von Methyl [methyl-5-acetamido-9-(cyclopropylamino)-3,5,9-tridesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid]onat 28

Die gesamte Reaktion wurde unter Stickstoff als Schutzgas durchgeführt. Es wurden 80 mg (0.24 mmol) **24** in 5 mL DMF gelöst und mit 36 μ L DIPEA versetzt. Anschließend wurden 20 μ L (30 mg, 0.22 mmol) Cyclopropylbromid und eine Spatelspitze Natriumiodid zugegeben. Es wurde über Nacht unter Rühren zum Rückfluss erhitzt. Danach wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und einmal mit Toluol codestilliert. Die Reinigung erfolgte mittels RP-Säulenchromatographie an C₁₈ Kieselgel (Eluent: Acetonitril/H₂O 1:1). Es konnte kein Produkt isoliert werden.

6 Experimenteller Teil

6.5.11 Darstellung von Methyl {[3-*N*-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-amino-propan-1-yl]-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy-*D*-glycero- α -*D*-galacto-2-nonulopyranosid}-onat **29**

Durchführung 1:

Es wurden 4.70 g (15.8 mmol) 3-*N*-(Fluorenylmethoxycarbonyl)-aminopropan-1-ol in 72 mL Dichlormethan zu 1.85 g (3.63 mmol) **18** und einer Spatelspitze Molsieb 3 Å gegeben und auf 0 °C gekühlt. Dann wurden unter Lichtausschluss 1.38 g (5.63 mmol) Silbersalicylat zugegeben. Im Anschluss wurde auf RT erwärmt und 24 h. rühren gelassen. Danach wurde unter Zuhilfenahme der Filtrationshilfe Celite filtriert. Das Filtrat wurde dann zweimal mit je 30 mL %iger NaHCO₃-Lösung, einmal mit 30 mL 5 %iger Na₂S₂O₃-Lösung und abschließend noch zweimal mit je 30 mL demin. Wasser gewaschen. Es wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der überschüssige Glycosylakzeptor wurde säulenchromatographisch abgetrennt (Eluent: erst PE/EE 1:1 dann EE). Eine Isolation des Produkts war auch nach weiteren säulenchromatographischen Reinigungen (Eluent: EE) nicht möglich. Eine Probe des Produktgemisches wurde mittels HPLC untersucht. Hierbei wurde eine NUCLEODUR® C₁₈ Isis Säule (21x250 mm, 5 µm Partikelgröße, Macherey-Nagel) verwendet und mit einer Flussrate von 20 mL/min eluiert. Als Laufmittel A wurde reinst Wasser/Acetonitril 95:5 und als Laufmittel B Acetonitril/reinst Wasser 95:5 verwendet. Gradient: 0 min, 20 % B; 2 min, 40 % B; 15 min, 100 % B; 16 min, 100 % B; 21 min, 20 % B.

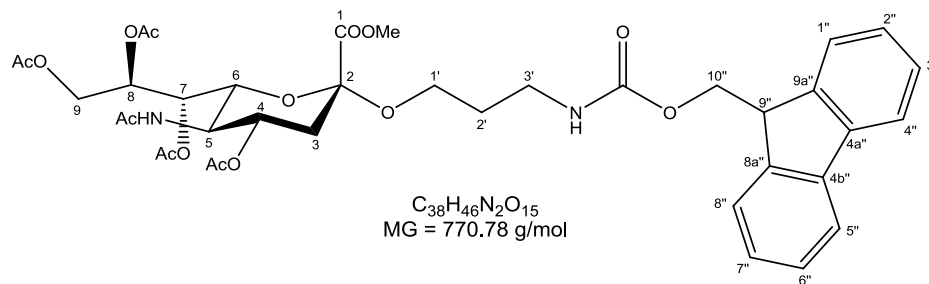
Die Untersuchung zeigte, dass das Produkt zwar enthalten, aber eine Reinigung der gesamten Menge aufgrund zu starker und schlecht abtrennbaren Verunreinigungen nicht praktikabel war. Dementsprechend wurde kein Produkt isoliert.

Durchführung 2:

Es wurden 1.39 g (4.67 mmol) 3-*N*-(Fluorenylmethoxycarbonyl)-aminopropan-1-ol in 11 mL Chloroform gelöst. Dann wurden 967 mg (3.51 mmol) Silbercarbonat in dieser Lösung suspendiert. Anschließend wurden unter Lichtausschluss 1.15 g (2.26 mmol) **18** gelöst in 10 mL Chloroform langsam zugetropft. Danach wurde zwei Tage bei RT gerührt. Darauf folgend wurde unter Zuhilfenahme der Filtrationshilfe Celite filtriert und das Filtrat unter

6 Experimenteller Teil

vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung erfolgte mittels zweimaliger Säulenchromatographie (Eluent 1: erst PE/EE 1:1 dann EE, Eluent 2: Toluol/Aceton 2:1). Nach Trocknung wurden 1.26 g (1.63 mmol) eines farblosen Feststoffs erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 72 %.



Charakterisierung

farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 74 °C

R_f-Wert (EE): 0.30

R_t-Wert (HPLC): 11.29 min.

$[\alpha]_D^{23} = -11.0^\circ$ (c = 1, CHCl₃)

ESI-MS: m/z berechnet: 771.2971 [M+H]⁺

793.2790 [M+Na]⁺

809.2530 [M+K]⁺

gemessen: 771.3004 [M+H]⁺

793.2826 [M+Na]⁺

809.2562 [M+K]⁺

6 Experimenteller Teil

^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.79-7.74 (m, 2H, **H-5''**, **H-4''**), 7.64-7.58 (m, 2H, **H-8''**, **H-1''**), 7.43-7.37 (m, 2H, **H-6''**, **H-3''**), 7.34-7.28 (m, 2H, **H-7''**, **H-2''**), 5.41 (ddd, 1H, **H-8**), 5.36 (t, br, 1H, C-3'-NH), 5.33 (dd, 1H, **H-7**), 5.20 (d, 1H, $\text{CH}_3\text{-CO-NH}$), 4.87 (ddd, 1H, **H-4**), 4.40 (d, 2H, **H-10''**), 4.32 (dd, 1H, **H-9_a**), 4.22 (t, 1H, **H-9''**), 4.15 (dd, 1H, **H-6**), 4.10 (dd, 1H, **H-5**), 4.09 (dd, 1H, **H-9_b**), 3.87 (dt, 1H, **H-1'a**), 3.76 (s, 3H, COOCH_3), 3.35 (dt, 1H, **H-1'b**), 3.35-3.26 (m, 2H, **H-3'**), 2.58 (dd, 1H, **H-3_{eq}**), 2.15, 2.13 (s, 6H, 2 x $\text{CH}_3\text{-COO}$), 2.03-2.02 (s, 6H, 2 x $\text{CH}_3\text{-COO}$), 1.96 (dd, 1H, **H-3_{ax}**), 1.89 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-CO-NH}$), 1.78 (quint, 2H, **H-2'**).

$^2J_{9a,9b} = 12.5$ Hz, $^3J_{9a,8} = 2.7$ Hz, $^3J_{9b,8} = 5.9$ Hz, $^3J_{8,7} = 8.6$ Hz, $^3J_{7,6} = 2.2$ Hz, $^3J_{6,5} = 10.7$ Hz, $^3J_{5,4} = 10.0$ Hz, $^3J_{4,3eq} = 4.6$ Hz, $^3J_{4,3ax} = 12.2$ Hz, $^2J_{3ax,3eq} = 12.9$ Hz, $^3J_{\text{NH},3'} = 5.9$ Hz, $^3J_{3',2'} = 6.1$ Hz, $^3J_{2',1'a} = 6.0$ Hz, $^3J_{2',1'b} = 6.0$ Hz, $^2J_{1'a,1'b} = 9.7$ Hz, $^3J_{10'',9''} = 7.0$ Hz.

^{13}C -NMR (126 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 170.9, 170.7 (2 x $\text{CH}_3\text{-COO}$), 170.2, 170.1, 170.1 (2 x $\text{CH}_3\text{-COO}$, $\text{CH}_3\text{-CONH}$), 168.4 (**C-1**), 144.0 (**C-9a''**, **C-8a''**), 156.3 (NH-CO-O), 140.9 (**C-4a''**, **C-4b''**), 127.6 (**C-6''**, **C-3''**), 127.0 (**C-7''**, **C-2''**), 125.1 (**C-8''**, **C-1''**), 120.0 (**C-5''**, **C-4''**), 98.9 (**C-2**), 72.5 (**C-6**), 69.0 (**C-8**, **C-4**), 68.4 (**C-7**), 66.1 (**C-10''**), 63.3 (**C-1'**), 62.5 (**C-9**), 53.0 (COOCH_3), 49.6 (**C-5**), 47.3 (**C-9''**), 38.5 (**C-3''**), 38.0 (**C-3**), 31.3 (**C-2'**), 23.3 ($\text{CH}_3\text{-CO-NH}$), 21.2 20.9, 20.8 20.8 (4 x $\text{CH}_3\text{-COO}$).

6.5.12 Darstellung von 3-(1-Naphthyloxy)-propansäure 32

Die gesamte Reaktion wurde unter Stickstoff als Schutzgas durchgeführt. Es wurden 4.08 g (28.3 mmol) 1-Naphthol und 4.36 g (62.3 mmol) Kaliumhydroxid in 50 mL Ethanol in der Siedehitze gelöst. Dann wurden 3.85 g (31.1 mmol) 3-Brompropionsäure in 60 mL Ethanol langsam zugetropft. Nach vollendeter Zugabe wurde auf RT abgekühlt und über Nacht gerührt. Anschließend wurde filtriert und das Filtrat unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde dann zweimal aus Wasser umkristallisiert, wobei heiß filtriert wurde. Es wurden 602 mg (2.78 mmol) eines farblosen Feststoffs erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 10 %.

6 Experimenteller Teil

Charakterisierung

farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 128 °C

MALDI-TOF-MS: m/z

berechnet: 216.1 [M]⁺

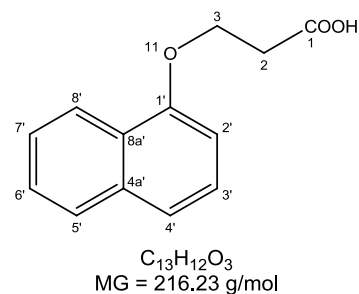
239.1 [M+Na]⁺

255.0 [M+K]⁺

gemessen: 216.0 [M]⁺

239.0 [M+Na]⁺

254.9 [M+K]⁺



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8.27-8.19 (m, 1H, **H-8'**), 7.83-7.76 (m, 1H, **H-5'**), 7.52-7.41 (m, 3H, **H-7'**, **H-6'**, **H-4'**), 7.41-7.33 (m, 1H, **H-3'**), 6.88-6.80 (m, 1H, **H-2'**), 4.45 (t, 2H, **H-3**), 3.01. (t, 2H, **H-2**).

³J_{3,2} = 6.3 Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 175.4 (**C-1**), 154.2 (**C-1'**), 134.5 (**C-4°**), 127.4 (**C-5'**), 126.5 (**C-7'**), 125.7 (**C-3**), 125.3 (**C-6**), 125.6 (**C-8°**), 121.9 (**C-8'**), 120.8 (**C-4'**), 104.9 (**C-2'**), 63.4 (**C-3**), 34.3 (**C-2**).

6.5.13 Darstellung von 3-(1-Naphthyloxy)-propannitril 33

Die gesamte Reaktion wurde unter Stickstoff als Schutzgas durchgeführt. Es wurde 1.00 g (6.93 mmol) 1-Naphthol in 5.00 mL (4.05 g, 76.3 mmol) Acrylnitril und 1.19 mL (883 mg, 6.83 μmol) DIPEA gelöst. Danach wurde über Nacht zum Rückfluss erhitzt und anschließend zwei weitere Tage bei RT gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurden alle flüchtigen

6 Experimenteller Teil

Bestandteile im Feinvakuum abgetrennt und der Rückstand anschließend säulenchromatographisch gereinigt (Eluent: PE/EE/Aceton 9:1:1). Nach Trocknung wurde der Rückstand in Diethylether aufgenommen und zweimal mit 0.01 M Natronlauge, zweimal mit 0.1 M Natronlauge und zweimal mit demin. Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde dann über Natriumsulfat getrocknet. Nach Trocknung wurden 903 mg (4.58 mmol) eines farblosen Feststoff erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 66 %.

Charakterisierung

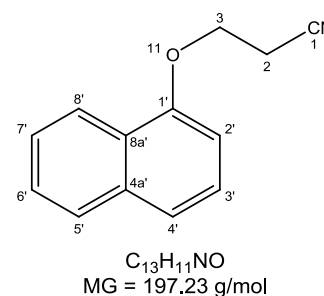
farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 63 °C

R_f-Wert (PE/EE/Aceton 9:1:1): 0.26

ESI-MS: m/z berechnet: 198.0913 [M+H]⁺

gemessen: 198.0912 [M+H]⁺



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8.32-8.23 (m, 1H, **H-8'**), 7.84-7.78 (m, 1H, **H-5'**), 7.54-7.46 (m, 3H, **H-7'**, **H-6'**, **H-4'**), 7.41-7.33 (m, 1H, **H-3'**), 6.82-6.77 (m, 1H, **H-2'**), 4.38 (t, 2H, **H-3**), 2.98 (t, 2H, **H-2**).

³J_{3,2} = 6.3 Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 153.6 (**C-1'**), 134.7 (**C-4''**), 127.6 (**C-5'**), 126.9 (**C-6'**), 125.8 (**C-7'**), 125.7 (**C-3'**), 125.6 (**C-8''**), 122.0 (**C-8'**), 121.7 (**C-4'**), 117.3 (**C-1**), 105.2 (**C-2'**), 63.0 (**C-3**), 18.9 (**C-2**).

6 Experimenteller Teil

6.5.14 Darstellung von (2S)-4-*tert*-Butoxy-2-[3-(naphthyl-1-oxy)propanoylamino]-4-oxo-butansäure **35**

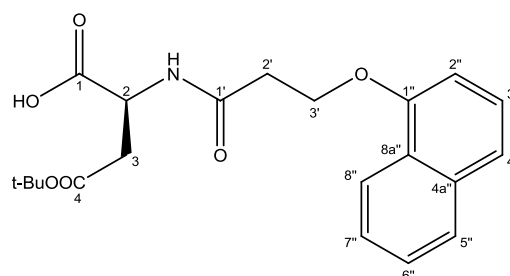
Es wurden 200 mL einer 0.05 M NaHCO₃-Lösung mit 0.1 M Natronlauge auf pH 10 eingestellt. Hierzu wurden 897 mg (2.23 mmol) Methyl-(2S)-4-*tert*-butoxy-2-[3-(naphthyl-1-oxy)propanoylamino]-4-oxo-butanoat **34** in 5 mL Aceton gegeben. Danach wurden der Lösung weitere 15 mL Aceton zugegeben. Anschließend wurde fünf Tage bei RT gerührt. Der pH Wert wurde regelmäßig kontrolliert und nach Bedarf mit Natronlauge erneut auf 10 eingestellt. Das Reaktionsende wurde per DC detektiert. Die Reaktionslösung wurde mit Essigsäure neutralisiert und anschließend das Aceton unter vermindertem Druck entfernt. Danach wurde gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde in demin. Wasser aufgenommen und mit Essigsäure auf pH 3 eingestellt. Danach wurde die Lösung so lange mit Dichlormethan extrahiert, bis sich mittels DC-Folie in der wässrigen Phase keine UV-aktiven Substanzen mehr nachweisen ließen. Die vereinigten organischen Extrakte wurden dann über Natriumsulfat getrocknet und anschließend unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Es wurden 824 mg (2.13 mmol) eines gelben, viskosen Öls erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 96 %.

Charakterisierung

gelbes, viskoses Öl

R_f-Wert (EE/EtOH 9:1 + 1 % AcOH): 0.43

$[\alpha]_D^{22} = +21.8^\circ$ (c = 1, CHCl₃)



C₂₁H₂₅NO₆
MG = 387.43 g/mol

6 Experimenteller Teil

MALDI-TOF-MS: m/z	berechnet:	387.2 [M] ⁺
		410.2 [M+Na] ⁺
		426.1 [M+K] ⁺
	gemessen:	387.0 [M] ⁺
		410.0 [M+Na] ⁺
		426.9 [M+K] ⁺

¹H-NMR (400 MHz, MeOD-*d*4): δ [ppm] = 8.28-8.22 (m, 1H, **H-8''**), 7.81-7.75 (m, 1H, **H-5''**), 7.49-7.40 (m, 3H, **H-7''**, **H-6''**, **H-4''**), 7.39-7.33 (m, 1H, **H-3''**), 6.95-6.90 (m, 1H, **H-2''**), 4.75 (dd, 1H, **H-2**), 3.49-3.38 (m, 2H, **H-3'**), 2.88 (t, 2H, **H-2'**), 2.81 (dd, 1H, **H-3a**), 2.71 (dd, 1H, **H-3b**), 1.39 (s, 9H, C(CH₃)₃).

³J_{3a,3b} = 16.1 Hz, ³J_{3a,2} = 5.2 Hz, ³J_{3b,2} = 7.0 Hz, ³J_{3',2'} = 6.1 Hz.

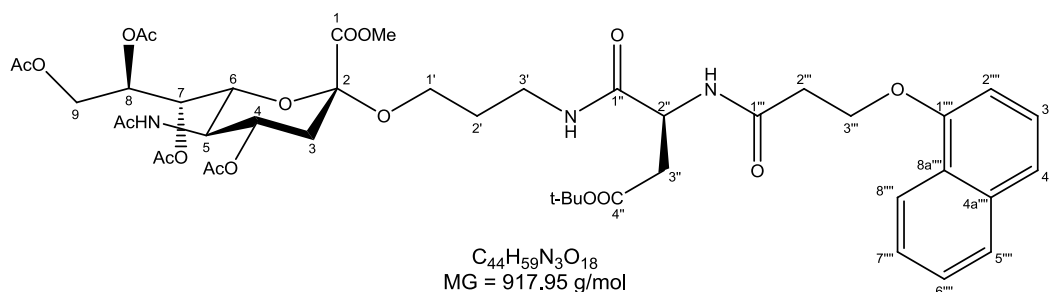
¹³C-NMR (100 MHz, MeOD-*d*4): δ [ppm] = 175.1 (C-1), 172.9 (C-1'), 171.7 (C-4'), 155.7 (C-1''), 136.0 (C-4''a), 128.4 (C-5''), 127.3 (C-7''), 126.9 (C-3''), 126.1 (C-6''), 123.2 (C-8''), 121.4 (C-4''), 106.0 (C-2''), 82.2 (C(CH₃)₃), 65.6 (C-3'), 51.4 (C-2), 39.0 (C-3), 37.2 (C-2'), 28.3 (C(CH₃)₃).

6.5.15 Darstellung von Methyl {2-[3-({(2S)-4-*tert*-butoxy-2-[3-(naphthyl-1-oxy)propanoylamino]-4-oxo-butanoyl}amino)propan-1-yl]-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy-D-glycero- α -D-galacto-2-nonulopyranosid}-onat **38**

Es wurden 294 mg (381 μ mol) **29** in 20 mL Piperidin/DMF 1:4 gelöst und 5 min. bei RT gerührt. Danach wurden alle flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand dreimal mit Toluol coevaporiert. In einem weiteren Reaktionskolben wurden

6 Experimenteller Teil

185 mg (478 μ mol) **35** gelöst in 16 mL DMF vorgelegt und dann mit einer Lösung aus 200 mg (525 μ mol) HATU und 194 μ L DIPEA in 13 mL DMF versetzt und 2 min. bei 0 °C gerührt. Dann wurde der gesamte anfangs erhaltene Rückstand des entschützten **29** mit 167 μ L DIPEA in 16 mL DMF gelöst und zu dem restlichen Ansatz gegeben. Anschließend wurde über Nacht bei RT gerührt. Danach wurden alle flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Die Reinigung erfolgte mittels dreimaliger Säulenchromatographie (Eluent 1: EE, Eluent 2: erst PE/EE 1:1 dann EE/EtOH 9:1, Eluent 3: Toluol/Aceton 9:1). Nach Trocknung wurden 303 mg (330 μ mol) eines farblosen Feststoffs erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 87 %.



Charakterisierung

farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 85 °C

R_f-Wert (EE/EtOH 5:1): 0.41

$[\alpha]_D^{18} = -16.9^\circ$ (c = 1, CHCl₃)

ESI-MS: m/z berechnet: 918.3866 [M+H]⁺

940.3686 [M+Na]⁺

gemessen: 918.3899 [M+H]⁺

940.3715 [M+Na]⁺

6 Experimenteller Teil

^1H -NMR (400 MHz, MeOD- d_4): δ [ppm] = 8.23-8.18 (m, 1H, **H-8''''**), 7.82-7.77 (m, 1H, **H-5''''**), 7.51-7.46 (m, 2H, **H-7''''**, **H6''''**), 7.46-7.42 (m, 1H, **H-4''''**), 7.40-7.34 (m, 1H, **H-3''''**), 7.27-7.23 (m, 1H, **NH''**), 6.88-6.84 (m, 1H, **H-2''''**), 6.70 (t, 1H, **NH'**), 5.39 (ddd, 1H, **H-8**), 3.51 (dd, 1H, **H-7**), 5.10 (d, 1H, **CH₃-CO-NH**), 3.63 (ddd, 1H, **H-4**), 4.81-4.77 (m, 1H, **H-2''**), 4.52-4.41 (m, 2H, **H-3'''**), 4.32 (dd, 1H, **H-9a**), 4.12-4.00 (m, 3H, **H-9b**, **H-6**, **H-5**), 3.78 (s, 3H, **COOCH₃**), 3.76-3.69 (m, 1H, **H-1'a**), 3.26-3.17 (m, 3H, **H-3'**, **H-1'b**), 2.85 (t, 2H, **H-2'''**), 2.84 (dd, 1H, **H-3''a**), 2.60 (dd, 1H, **H-3''b**), 2.56 (dd, 1H, **H-3eq**), 2.15, 2.12, 2.03, 2.02 (s, 4x3H, 4xAcO), 1.93 (t, 1H, **H-3ax**), 1.88 (s, 3H, **CH₃-CO-NH**), 1.69-1.53 (m, 2H, **H-2'**), 1.42 (s, 9H, **C(CH₃)₃**).

$^3J_{9a,9b} = 12.4$ Hz, $^3J_{9a,8} = 2.6$ Hz, $^3J_{9b,8} = 5.7$ Hz, $^3J_{8,7} = 8.4$ Hz, $^3J_{7,6} = 1.5$ Hz, $^3J_{5,4} = 10.0$ Hz, $^3J_{4,3eq} = 4.6$ Hz, $^3J_{4,3ax} = 12.4$ Hz, $^2J_{3ax,3eq} = 12.7$ Hz, $^3J_{\text{NH}',3'} = 5.5$ Hz, $^2J_{3'',a,3''b} = 16.8$ Hz, $^3J_{3'',a,2''} = 5.8$ Hz, $^3J_{3'',2''} = 6.7$ Hz, $^3J_{3''',2'''} = 5.8$ Hz.

^{13}C -NMR (100 MHz, MeOD- d_4): δ [ppm] = 171.2 (**CH₃-COO**), 171.0 (**C-1''**), 171.0 (**C-4''**), 170.8 (**CH₃-COO**), 170.4 (**C-1'''**), 170.4 (**CH₃-COO**), 170.3 (**CH₃-COO**), 170.2 (**CH₃-CON**), 168.4 (**C-1**), 154.1 (**C-1''''**), 134.5 (**C-4a''''**), 127.5 (**C-5''''**), 126.4 (**C-6''''**), 125.8 (**C-3''''**), 125.5 (**C-8a''''**), 125.4 (**C-7''''**), 121.8 (**C-8''''**), 120.8 (**C-4''''**), 105.2 (**C-2''''**), 98.8 (**C-2**), 81.6 (**C(CH₃)₃**), 72.5 (**C-6**), 69.0 (**C-4**), 68.5 (**C-8**), 67.3 (**C-7**), 64.5 (**C-3'''**), 63.1 (**C-1'**), 62.4 (**C-9**), 52.8 (**COOCH₃**), 49.5 (**C-2''**), 49.5 (**C-5**), 38.0 (**C-3**), 37.2 (**C-3''**), 37.1 (**C-3'**), 36.8 (**C-2'''**), 29.2 (**C-2'**), 28.0 (**C(CH₃)₃**), 23.2 (**CH₃-CO-NH**), 21.1 (**CH₃-COO**), 20.8 (**CH₃-COO**), 20.8 (**CH₃-COO**), 20.8 (**CH₃-COO**).

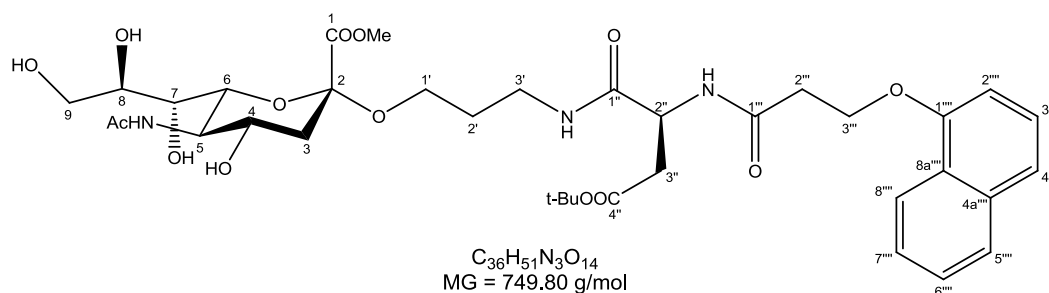
6.5.16 Darstellung von Methyl {2-[3-((2S)-4-*tert*-butoxy-2-[3-(naphthyl-1-oxy)propanoylamino]-4-oxo-butanoyl)amino)propan-1-yl]-5-acetamido-3,5-didesoxy-D-glycero- α -D-galacto-2-nonulopyranosid}-onat **39**

Die gesamte Reaktion wurde unter Stickstoff als Schutzgas durchgeführt. Es wurden 20 mL abs. MeOH mit einer frisch hergestellten methanolischen NaOMe-Lösung auf pH 10 eingestellt. Dann wurden 103 mg (112 μmol) **38** in 2 mL abs. MeOH zugegeben und für 90

6 Experimenteller Teil

min. bei RT gerührt. Das Reaktionsende wurde per DC detektiert. Anschließend wurde mit Essigsäure schwach angesäuert. Danach wurden alle flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Die Reinigung erfolgte mittels HPLC. Für diese wurde eine NUCLEODUR[®] C₁₈ Isis Säule (21x250 mm, 5 µm Partikelgröße, Macherey-Nagel) verwendet und mit einer Flussrate von 20 mL/min eluiert. Als Laufmittel A wurde reinst Wasser/Acetonitril 95:5 und als Laufmittel B Acetonitril/reinst Wasser 95:5 verwendet. Gradient: 0 min, 0 % B; 20 min, 100 % B; 25 min, 0 % B.

Nach Trocknung wurden 47.6 mg (63.5 µmol) eines farblosen Feststoffs erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 57 %.



Charakterisierung

farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 91 °C

R_f-Wert (EE/MeOH 4:1): 0.24

R_t-Wert (HPLC): 11.07 min.

$[\alpha]_D^{22} = -21.4^\circ$ (c = 1, MeOH)

6 Experimenteller Teil

ESI-MS: m/z berechnet: 750.3444 [M+H]⁺

772.3263 [M+Na]⁺

gemessen: 750.3440 [M+H]⁺

772.3268 [M+Na]⁺

¹H-NMR (400 MHz, MeOD-*d*4): δ [ppm] = 8.26-8.19 (m, 1H, **H-8''''**), 7.83-7.75 (m, 1H, **H-5''''**), 7.51-7.40 (m, 3H, **H-7''''**, **H-6''''**, **H-4''''**), 7.40-7.33 (m, 1H, **H-3''''**), 6.97-6.89 (m, 1H, **H-2''''**), 4.76 (dd, 1H, **H-2''**), 4.51-4.39 (m, 2H, **H-3'''**), 3.86 (ddd, 1H, **H-8**), 3.85 (dd, 1H, **H-9a**), 3.80 (s, 3H, COOCH₃), 3.77 (t, 1H, **H-5**), 3.73-3.67 (m, 1H, **H-1'a**), 3.65 (dd, 1H, **H-9b**), 3.63 (ddd, 1H, **H-4**), 3.57 (dd, 1H, **H-6**), 3.51 (dd, 1H, **H-7**), 3.28-3.21 (m, 1H, **H-1'b**), 3.20-3.04 (m, 2H, **H-3'**), 2.95-2.81 (m, 2H, **H-2'''**), 2.79 (dd, 1H, **H-3''a**), 2.64 (dd, 1H, **H-3eq**), 2.61 (dd, 1H, **H-3''b**), 2.00 (s, 3H, CH₃-CO-NH), 1.72 (dd, 1H, **H-3ax**), 1.63-1.47 (m, 2H, **H-2'**), 1.41 (s, 9H, C(CH₃)₃).

²J_{9a,9b} = 12.0 Hz, ³J_{9a,8} = 2.8 Hz, ³J_{9b,8} = 6.4 Hz, ³J_{8,7} = 8.8 Hz, ³J_{7,6} = 1.5 Hz, ³J_{6,5} = 10.3 Hz, ³J_{5,4} = 10.1 Hz, ³J_{4,3eq} = 4.7 Hz, ³J_{4,3ax} = 11.9 Hz, ²J_{3ax,3eq} = 13.0 Hz, ²J_{3''a,3''b} = 16.2 Hz, ³J_{3''a,2''} = 6.2 Hz, ³J_{3''b,2''} = 7.5 Hz.

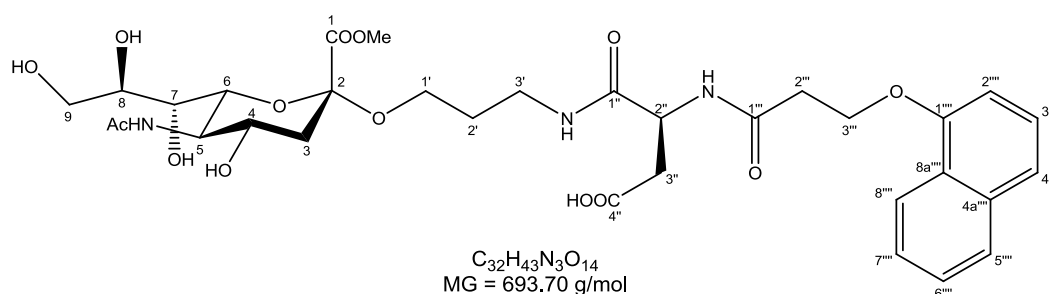
¹³C-NMR (100 MHz, MeOD-*d*4): δ [ppm] = 175.2 (CH₃-CO-NH), 173.5 (C-1'''), 172.7 (C-1''), 171.3 (C-4''), 171.0 (C-1), 155.6 (C-1'''), 136.3 (C-4a''), 128.5 (C-5), 127.4 (C-6'''), 127.0 (C-3'''), 126.9 (C-8a'''), 126.3 (C-7'''), 123.0 (C-8'''), 121.6 (C-4'''), 106.2 (C-2'''), 100.1 (C-2), 82.4 (C(CH₃)₃), 74.9 (C-6), 72.5 (C-8), 70.2 (C-7), 68.6 (C-4), 65.7 (C-3'''), 64.9 (C-9), 62.7 (C-1'), 53.8 (C-5), 53.4 (COOCH₃), 51.4 (C-2''), 41.6 (C-3), 38.4 (C-3''), 37.7 (C-3'), 37.2 (C-2'''), 30.3 (C-2'), 28.3 (C(CH₃)₃), 22.7 (CH₃-CO-NH).

6 Experimenteller Teil

6.5.17 Darstellung von Methyl {2-[3-({(2S)-4-carboxy-2-[3-(naphthyl-1-oxy)propanoylamino]-butanoyl}amino)propan-1-yl]-5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galacto-2-nonulopyranosid}-onat 41

Es wurden 9.4 mg (13 μ mol) **39** mit 50 μ L TIPS und 1 mL TFA versetzt und 30 min. bei RT geschüttelt. Danach wurden alle flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Die Reinigung erfolgte mittels HPLC. Für diese wurde eine NUCLEODUR[®] C₁₈ Isis Säule (21x250 mm, 5 μ m Partikelgröße, Macherey-Nagel) verwendet und mit einer Flussrate von 20 mL/min eluiert. Als Laufmittel A wurde reinst Wasser/Acetonitril 95:5 mit 0.1 % Ameisensäure und als Laufmittel B Acetonitril/reinst Wasser 95:5 mit 0.1 % Ameisensäure verwendet. Gradient: 0 min, 0 % B; 15 min, 50 % B; 18 min, 100 % B; 20 min, 80 % B.

Nach Trocknung wurden 3.6 mg (5.2 μ mol) eines farblosen Feststoffs erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 40 %.



Charakterisierung

farbloser Feststoff

R_t-Wert (HPLC): 13.06 min.

6 Experimenteller Teil

ESI-MS: m/z berechnet: 694.2818 [M+H]⁺

716.2637 [M+Na]⁺

732.2377 [M+K]⁺

gemessen: 694.2819 [M+H]⁺

716.2631 [M+Na]⁺

732.2310 [M+K]⁺

¹H-NMR (500 MHz, MeOD-*d*4): δ [ppm] = 8.25-8.17 (m, 1H, **H-8''''**), 7.82-7.75 (m, 1H, **H-5''''**), 7.50-7.40 (m, 3H, **H-7''''**, **H6''''**, **H4''''**), 7.40-7.34 (m, 1H, **H-3''''**), 6.97-6.90 (m, 1H, **H-2''''**), 4.76 (t, 1H, **H-2''**), 4.50-4.39 (m, 2H, **H-3'''**), 3.87 (ddd, 1H, **H-8**), 3.85 (dd, 1H, **H-9a**), 3.80 (s, 3H, COOCH₃), 3.77 (dd, 1H, **H-5**), 3.70 (ddd, 1H, **H-1'a**), 3.64 (dd, 1H, **H-9b**), 3.63 (ddd, 1H, **H-4**), 3.57 (dd, 1H, **H-6**), 3.50 (dd, 1H, **H-7**), 3.26 (ddd, 1H, **H-1'b**), 3.21-3.13 (m, 1H, **H-3'a**), 3.13-3.04 (m, 1H, **H-3'b**), 2.95-2.83 (m, 2H, **H-2'''**), 2.80 (dd, 1H, **H-3''a**), 2.71 (dd, 1H, **H-3''b**), 2.64 (dd, 1H, **H-3eq**), 2.00 (s, 3H, CH₃-CO-NH), 1.73 (dd, 1H, **H-3ax**), 1.61-1.46 (m, 2H, **H-2'**).

²J_{9a,9b} = 11.8 Hz, ³J_{9a,8} = 2.8 Hz, ³J_{9b,8} = 5.9 Hz, ³J_{8,7} = 9.2 Hz, ³J_{7,6} = 1.6 Hz, ³J_{6,5} = 10.4 Hz, ³J_{5,4} = 10.2 Hz, ³J_{4,3eq} = 4.7 Hz, ³J_{4,3ax} = 11.8 Hz, ²J_{3ax,3eq} = 12.9 Hz, ²J_{1'a,1'b} = 9.6 Hz, ³J_{1'a,2'a} = 6.7 Hz, ³J_{1'a,2'b} = 5.5 Hz, ³J_{1'b,2'a} = 6.7 Hz, ³J_{1'b,2'b} = 5.6 Hz, ²J_{3''a,3''b} = 16.6 Hz, ³J_{3''a,2''} = 6.3 Hz, ³J_{3''b,2''} = 6.6 Hz.

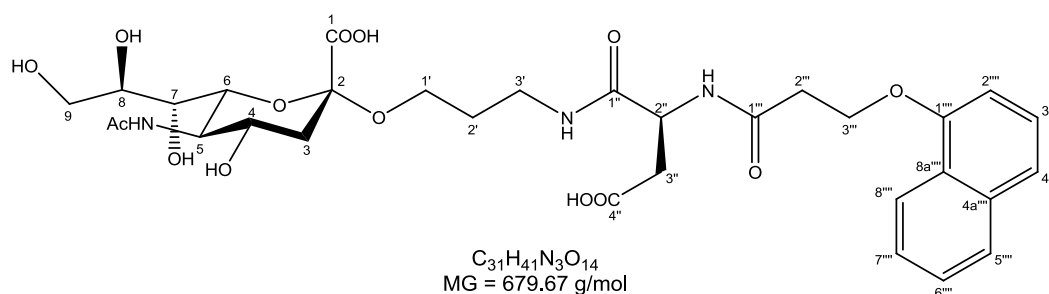
¹³C-NMR (126 MHz, MeOD-*d*4): δ [ppm] = 175.2 (CH₃-CO-NH), 174.9 (**C-4''**), 173.5 (**C-1''''**), 173.2 (**C-1''**), 171.0 (**C-1**), 155.6 (**C-1''''**), 136.0 (**C-4a''''**), 128.5 (**C-5**), 127.4 (**C-6''''**), 127.0 (**C-3''''**), 126.9 (**C-8a''''**), 126.3 (**C-7''''**), 123.0 (**C-8''''**), 121.5 (**C-4''''**), 106.1 (**C-2''''**), 100.1 (**C-2**), 74.8 (**C-6**), 72.4 (**C-8**), 70.3 (**C-7**), 68.6 (**C-4**), 65.8 (**C-3'''**), 64.9 (**C-9**), 62.7 (**C-1'**), 53.8 (**C-5**), 53.4 (COOCH₃), 51.7 (**C-2''**), 41.5 (**C-3**), 37.7 (**C-3''**), 37.6 (**C-3'**), 37.2 (**C-2'''**), 30.3 (**C-2'**), 22.7 (CH₃-CO-NH).

6 Experimenteller Teil

6.5.18 Darstellung von 2-[3-({(2S)-4-carboxy-2-[3-(naphthyl-1-oxy)propanoyl]-amino]-butanoyl}amino)propan-1-yl]-5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galacto-2-nonulopyranosidonsäure **42**

Es wurden 3.6 mg (5.2 μ mol) **41** in 5 mL $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ -Puffer pH 10 aufgenommen und drei Tage bei RT gerührt. Anschließend wurde mit Essigsäure schwach angesäuert und gefriergetrocknet. Die Reinigung erfolgte mittels HPLC. Für diese wurde eine NUCLEODUR[®] C₁₈ Pyramid Säule (21x250 mm, 5 μ m Partikelgröße, Macherey-Nagel) verwendet und mit einer Flussrate von 20 mL/min eluiert. Als Laufmittel A wurde reinst Wasser mit 0.1 % Ameisensäure und als Laufmittel B Acetonitril/reinst Wasser 95:5 mit 0.1 % Ameisensäure verwendet. Gradient: 0 min, 0 % B; 17 min, 42.5 % B; 22 min, 100 % B; 24 min, 80 %.

Nach Trocknung wurden 2.4 mg (3.5 μ mol) eines farblosen Feststoffs erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 67 %.



Charakterisierung

farbloser Feststoff

R_t-Wert (HPLC): 14.78 min.

6 Experimenteller Teil

ESI-MS: m/z berechnet:	680.2661 [M+H] ⁺
	702.2481 [M+Na] ⁺
	718.2220 [M+K] ⁺
gemessen:	680.2661 [M+H] ⁺
	702.2415 [M+Na] ⁺
	718.2141 [M+K] ⁺

¹H-NMR (500 MHz, MeOD-*d*4): δ [ppm] = 8.25-8.18 (m, 1H, **H-8''''**), 7.80-7.75 (m, 1H, **H-5''''**), 7.50-7.40 (m, 3H, **H-7''''**, **H6''''**, **H4''''**), 7.40-7.34 (m, 1H, **H-3''''**), 6.97-6.91 (m, 1H, **H-2''''**), 4.77 (t, 1H, **H-2''**), 4.50-4.40 (m, 2H, **H-3'''**), 3.88 (ddd, 1H, **H-8**), 3.86 (dd, 1H, **H-9a**), 3.73 (dd, 1H, **H-5**), 3.73 (ddd, 1H, **H-4**), 3.73-3.66 (m, 1H, **H-1'a**), 3.63 (dd, 1H, **H-9b**), 3.58 (dd, 1H, **H-6**), 3.51 (dd, 1H, **H-7**), 3.38 (ddd, 1H, **H-1'b**), 3.25-3.10 (m, 2H, **H-3'**), 2.92-2.87 (m, 2H, **H-2'''**), 2.84 (dd, 1H, **H-3''a**), 2.74 (dd, 1H, **H-3''b**), 2.74 (dd, 1H, **H-3eq**), 2.00 (s, 3H, **CH₃-CO-NH**), 1.67 (dd, 1H, **H-3ax**), 1.64-1.52 (m, 2H, **H-2'**).

²*J*_{9a,9b} = 11.2 Hz, ³*J*_{9a,8} = 2.7 Hz, ³*J*_{9b,8} = 5.4 Hz, ³*J*_{8,7} = 8.9 Hz, ³*J*_{7,6} = 1.9 Hz, ³*J*_{6,5} = 9.9 Hz, ³*J*_{5,4} = 10.0 Hz, ³*J*_{4,3eq} = 4.8 Hz, ³*J*_{4,3ax} = 11.6 Hz, ²*J*_{3ax,3eq} = 12.3 Hz, ²*J*_{1'a,1'b} = 9.7 Hz, ³*J*_{1'b,2'a} = 6.0 Hz, ³*J*_{1'b,2'b} = 6.0 Hz, ²*J*_{3''a,3''b} = 16.6 Hz, ³*J*_{3''a,2''} = 5.8 Hz, ³*J*_{3''b,2''} = 6.8 Hz.

¹³C-NMR (126 MHz, MeOD-*d*4): δ [ppm] = 175.5 (**CH₃-CO-NH**), 173.5 (**C-1'''**), 174.4 (**C-4''**), 173.3 (**C-1**), 172.9 (**C-1''**), 155.6 (**C-1''''**), 136.0 (**C-4a''**), 128.4 (**C-5**), 127.4 (**C-6''''**), 127.4 (**C-3''''**), 127.0 (**C-8a''''**), 126.3 (**C-7''''**), 123.0 (**C-8''''**), 121.5 (**C-4''''**), 106.1 (**C-2''''**), 100.9 (**C-2**), 74.7 (**C-6**), 72.9 (**C-8**), 70.3 (**C-7**), 69.1 (**C-4**), 65.7 (**C-3'''**), 64.6 (**C-9**), 62.6 (**C-1'**), 54.0 (**C-5**), 51.5 (**C-2''**), 42.1 (**C-3**), 37.8 (**C-3''**), 37.2 (**C-3'**), 37.2 (**C-2'''**), 30.2 (**C-2'**), 22.6 (**CH₃-CO-NH**).

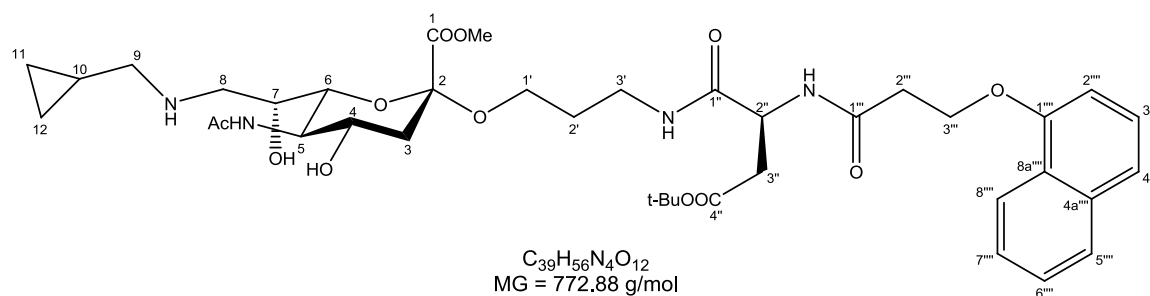
6.5.19 Darstellung von Methyl {5-acetamido-2-[3-((2S)-4-*tert*-butoxy-2-[3-(naphthyl-1-oxy)propanoylamino]-4-oxo-butanoyl)amino)propan-1-yl]-8-(cyclopropylmethylamino)-3,5,8-tridesoxy- α -D-galacto-2-octulopyranosid}-onat **44**

Es wurden 22.4 mg (29.8 μ mol) **39** in 3.5 mL demin. Wasser gelöst und auf 0 °C gekühlt. In der Kälte wurden dann 5.11 mg (23.9 μ mol) NaIO₄ gelöst in 1 mL Wasser langsam zugetropft. Anschließend wurden 7.4 mg (47 μ mol) Na₂S₂O₃ gelöst in 0.5 mL demin. Wasser zugegeben und dann gefriergetrocknet. Es wurde per HPLC gereinigt. Hierfür wurde eine NUCLEODUR® C₁₈ Isis Säule (21x250 mm, 5 μ m Partikelgröße, Macherey-Nagel) verwendet und mit einer Flussrate von 20 mL/min eluiert. Als Laufmittel A wurde reinst Wasser/Acetonitril 95:5 und als Laufmittel B Acetonitril/reinst Wasser 95:5 verwendet. Gradient: 0 min, 20 % B; 5 min, 40 % B; 12.5 min, 45 % B; 16 min, 100 %; 17 min, 100 %; 19 min, 80 %.

Nach Trocknung wurde der gesamte Rückstand in 1.4 mL Methanol aufgenommen und mit 42 μ L Essigsäure angesäuert. Dann wurden 13.5 μ L (11.1 mg, 156 μ mol) Cyclopropylmethylamin zugegeben und 2 min bei RT gerührt. Anschließend wurden 21.6 μ L einer 1 M methanolischen NaCNBH₃-Lösung zugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Danach wurden alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgte mittels HPLC. Für diese wurde eine NUCLEODUR® C₁₈ Isis Säule (21x250 mm, 5 μ m Partikelgröße, Macherey-Nagel) verwendet und mit einer Flussrate von 20 mL/min eluiert. Als Laufmittel A wurde reinst Wasser/Acetonitril 95:5 mit 0.1 % Ameisensäure und als Laufmittel B Acetonitril/reinst Wasser 95:5 mit 0.1 % Ameisensäure verwendet. Gradient: 0 min, 20 % B; 19.5 min, 72 % B; 21 min, 100 % B; 23 min, 80 %.

Nach Trocknung wurden 6.4 mg (8.3 μ mol) eines farblosen Feststoffs erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 35 %.

6 Experimenteller Teil



Charakterisierung

farbloser Feststoff

R_t -Wert (HPLC): 9.96 min.

$[\alpha]_D^{23} = -5.7^\circ$ ($c = 0.14$, MeOH)

ESI-MS: m/z berechnet: 773.3967 $[M+H]^+$

795.3787 $[M+Na]^+$

gemessen: 773.3943 $[M+H]^+$

795.3779 $[M+Na]^+$

1H -NMR (500 MHz, MeOD- d_4): δ [ppm] = 8.25-8.19 (m, 1H, **H-8'''**), 7.82-7.77 (m, 1H, **H-5'''**), 7.51-7.42 (m, 3H, **H-7'''**, **H-6'''**, **H-4'''**), 7.41-7.34 (m, 1H, **H-3'''**), 6.98-6.91 (m, 1H, **H-2'''**), 4.80 (dd, 1H, **H-2''**), 4.45 (t, 2H, **H-3''**), 3.91 (ddd, 1H, **H-7**), 3.79 (s, 3H, COOCH₃), 3.72 (dd, 1H, **H-5**), 3.70-3.66 (m, 1H, **H-1'a**), 3.62 (ddd, 1H, **H-4**), 3.43-3.34 (m, 2H, **H-8a**, **H-6**), 3.30-3.20 (m, 1H, **H-1'b**), 3.26-3.21 (m, H, **H-3'a**), 3.12-3.07 (m, 2H, **H-8b**, **H-3'b**), 2.96 (dd, 1H, **H-9a**), 2.88 (t, 2H, **H-2''**), 2.86 (dd, 1H, **H-9b**), 2.81 (dd, 1H, **H-3''a**), 2.63 (dd, 1H, **H-3''b**), 2.62 (dd, 1H, **H-3eq**), 2.02 (s, 3H, CH₃-CO-NH), 1.74 (dd, 1H, **H-3ax**), 1.59-1.51 (m, 2H, **H-2'**), 1.43 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.09-1.00 (m, 1H, **H-10**), 0.59-0.54 (m, 2H, **H-11a**, **H-12a**), 0.30-0.24 (m, 2H, **H-11b**, **H-12b**).

6 Experimenteller Teil

$^3J_{10,9a} = 7.1$ Hz, $^3J_{10,9b} = 2.1$, $^2J_{9a,9b} = 12.4$ Hz, $^3J_{8a,7} = 10.4$ Hz, $^3J_{8b,7} = 3.0$ Hz, $^3J_{7,6} = 0.9$ Hz, $^3J_{6,5} = 10.1$ Hz, $^3J_{5,4} = 10.1$ Hz, $^3J_{4,3eq} = 4.8$ Hz, $^3J_{4,3ax} = 11.8$ Hz, $^2J_{3ax,3eq} = 12.6$ Hz, $^2J_{3''a,3''b} = 16.5$ Hz, $^3J_{3''a,2''} = 6.2$ Hz, $^3J_{3''b,2''} = 7.7$ Hz, $^3J_{3''',2'''} = 6.0$ Hz.

^{13}C -NMR (126 MHz, MeOD- d_4): δ [ppm] = 175.7 (CH₃-CO-NH), 173.8 (C-1'''), 172.9 (C-1''), 171.6 (C-4''), 170.2 (C-1), 155.8 (C-1'''), 136.3 (C-4a'''), 128.4 (C-5), 127.1 (C-7'''), 126.9 (C-8a'''), 126.8 (C-3'''), 126.3 (C-6'''), 122.7 (C-8'''), 121.4 (C-4'''), 106.0 (C-2'''), 100.3 (C-2), 76.2 (C-6), 67.5 (C-4), 66.6 (C-7), 65.5 (C-3''), 62.3 (C-1'), 53.8 (C-5), 53.8 (C-9), 52.9 (OCH₃), 51.3 (C-2''), 50.5 (C-8), 41.2 (C-3), 37.9 (C-3''), 37.0 (C-2'''), 37.0 (C-3'), 30.1 (C-2'), 22.5 (CH₃-CO-NH), 7.9 (C-10), 4.4 (C-11), 4.4 (C-12).

6.5.20 Darstellung von Methyl {5-acetamido-2-[3-({(2S)-4-tert-butoxy-2-[3-(naphthyl-1-oxy)propanoylamino]-4-oxo-butanoyl}amino)propan-1-yl]-8-(butansäure-4-yl-amino)-3,5,8-tridesoxy- α -D-galacto-2-octulopyranosid]}-onat 45

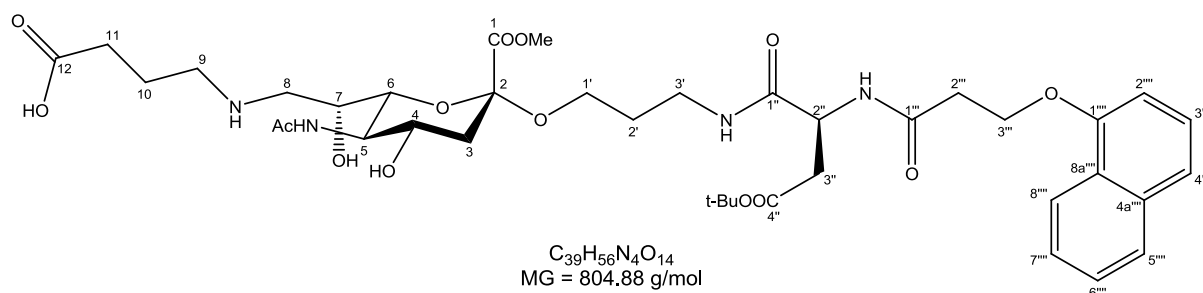
Es wurden 26.0 mg (38.3 μmol) **39** in 4 mL demin. Wasser gelöst und auf 0 °C gekühlt. In der Kälte wurden dann 5.93 mg (27.7 μmol) NaIO₄ gelöst in 1 mL Wasser langsam zugetropft. Anschließend wurden 8.6 mg (54 μmol) Na₂S₂O₃ gelöst in 0.5 mL demin. Wasser zugegeben und dann gefriergetrocknet. Es wurde per HPLC gereinigt. Hierfür wurde eine NUCLEODUR® C₁₈ Isis Säule (21x250 mm, 5 μm Partikelgröße, Macherey-Nagel) verwendet und mit einer Flussrate von 20 mL/min eluiert. Als Laufmittel A wurde reinst Wasser/Acetonitril 95:5 und als Laufmittel B Acetonitril/reinst Wasser 95:5 verwendet. Gradient: 0 min, 20 % B; 5 min, 40 % B; 12.5 min, 45 % B; 16 min, 100 % B; 17 min, 100 % B; 19 min, 80 % B.

Nach Trocknung wurde der gesamte Rückstand in 1.6 mL Methanol aufgenommen und mit 48 μL Essigsäure angesäuert. Dann wurden 20.1 mg (195 μmol) 4-Aminobuttersäure zugegeben und 2 min. bei RT gerührt. Anschließend wurden 24.4 μL einer 1 M methanolischen NaCNBH₃-Lösung zugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Danach wurden alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgte mittels HPLC. Für diese wurde eine NUCLEODUR® C₁₈ Isis Säule (21x250 mm, 5 μm

6 Experimenteller Teil

Partikelgröße, Macherey-Nagel) verwendet und mit einer Flussrate von 20 mL/min eluiert. Als Laufmittel A wurde reinst Wasser/Acetonitril 95:5 mit 0.1 % Ameisensäure und als Laufmittel B Acetonitril/reinst Wasser 95:5 mit 0.1 % Ameisensäure verwendet. Gradient: 0 min, 20 % B; 3 min, 35 % B; 11 min, 45 % B; 14 min, 100 % B; 16 min, 80 % B.

Nach Trocknung wurden 8.5 mg (11 μ mol) eines farblosen Feststoffs erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 40 %.



Charakterisierung

farbloser Feststoff

R_t -Wert (HPLC): 7.07 min.

$[\alpha]_D^{22} = +1.0^\circ$ (c = 0.2, MeOH)

ESI-MS: m/z berechnet: 805.3866 $[M+H]^+$

gemessen: 805.3849 $[M+H]^+$

1H -NMR (500 MHz, MeOD- d_4): δ [ppm] = 8.25-8.18 (m, 1H, **H-8''''**), 7.83-7.76 (m, 1H, **H-5''''**), 7.51-7.41 (m, 2H, **H-7''''**, **H-6''''**), 7.41-7.35 (m, 1H, **H-4''''**), 7.41-7.34 (m, 1H, **H-3''''**), 6.97-6.91 (m, 1H, **H-2''''**), 4.79 (dd, 1H, **H-2''**), 4.44 (t, 2H, **H-3'''**), 3.96-3.86 (m, 1H, **H-7**), 3.78 (s, 3H, COOCH₃), 3.73 (dd, 1H, **H-5**), 3.70 (dt, 1H, **H-1'a**), 3.63 (ddd, 1H, **H-4**), 3.38 (dd, 1H, **H-6**), 3.32 (dd, 1H, **H-8a**), 3.26 (dt, 1H, **H-1'b**), 3.23-3.16 (m, 2H, **H-3'**), 3.11 (dd, 1H, **H-8b**), 3.11-3.05 (m, 1H, **H-9a**), 3.05-2.95 (m, 1H, **H-9b**), 2.90-2.84 (m, 2H, **H-2'''**), 2.80 (dd, 1H, **H-3''a**), 2.63 (dd, 1H, **H-3''b**), 2.62 (dd, 1H, **H-3eq**), 2.34-2.25 (m,

6 Experimenteller Teil

2H, **H-11**), 2.02 (s, 3H, CH₃-CO-NH), 1.83-1.78 (m, 2H, **H-10**), 1.72 (dd, 1H, **H-3ax**), 1.58-1.49 (m, 2H, **H-2'**), 1.43 (s, 9H, C(CH₃)₃).

$^2J_{8a,8b}$ = 13.6 Hz, $^3J_{8a,7}$ = 11.4 Hz, $^3J_{8b,7}$ = 6.5 Hz, $^3J_{7,6}$ = 0.8 Hz, $^3J_{6,5}$ = 10.2 Hz, $^3J_{5,4}$ = 10.2 Hz, $^3J_{4,3eq}$ = 4.6 Hz, $^3J_{4,3ax}$ = 11.5 Hz, $^2J_{3ax,3eq}$ = 12.8 Hz, $^3J_{2',1'a}$ = 6.1 Hz, $^3J_{2',1'b}$ = 5.6 Hz, $^2J_{1a,1b}$ = 9.5 Hz, $^2J_{3'',a,3'',b}$ = 16.3 Hz, $^3J_{3'',a,2''}$ = 6.0 Hz, $^3J_{3'',b,2''}$ = 7.8 Hz, $^3J_{3''',2'''} = 5.9$ Hz.

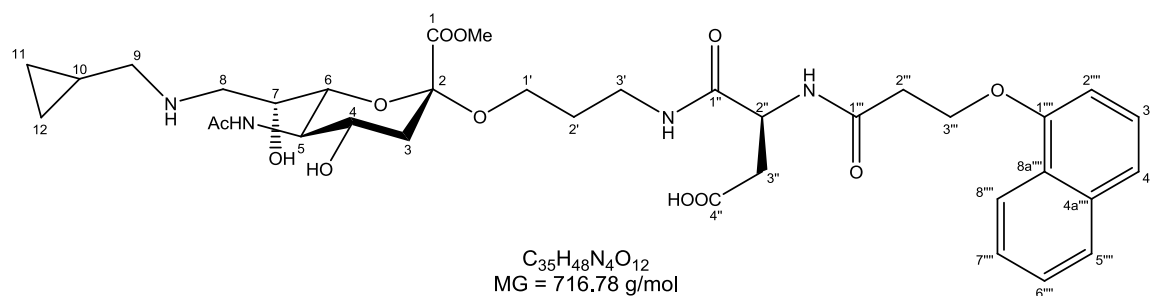
¹³C-NMR (126 MHz, MeOD-*d*₄): δ [ppm] = 174.5 (CH₃-CO-NH), 173.4 (C-1'''), 172.9 (C-1''), 171.5 (C-4''), 170.1 (C-1), 155.6 (C-1'''), 136.0 (C-4a'''), 128.5 (C-5), 127.4 (C-6'''), 127.0 (C-3'''), 126.3 (C-8a'''), 126.3 (C-7'''), 123.0 (C-8'''), 121.6 (C-4'''), 106.1 (C-2'''), 100.3 (C-2), 82.5 (C(CH₃)₃), 76.3 (C-6), 68.0 (C-4), 66.9 (C-7), 65.7 (C-3'''), 62.4 (C-1'), 54.0 (C-5), 53.2 (COOCH₃), 51.5 (C-2''), 50.9 (C-8), 49.8 (C-9), 41.5 (C-3), 38.3 (C-3''), 37.3 (C-3'), 37.1 (C-2'''), 36.8 (C-11), 30.2 (C-2'), 28.3 (C(CH₃)₃), 23.3 (C-10), 22.7 (CH₃-CO-NH).

6.5.21 Darstellung von Methyl {5-acetamido-2-[3-((2*S*)-4-carboxy-2-[3-(naphthyl-1-oxy)propanoylamino]butanoylamino)propan-1-yl]-8-(cyclopropylmethylamino)-3,5,8-tridesoxy- α -D-galacto-2-octulopyranosid]}-onat **46**

Es wurden 6.4 mg (8.3 μ mol) **44** mit 50 μ L TIPS und 1 mL TFA versetzt und 30 min bei RT geschüttelt. Danach wurden alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgte mittels HPLC. Für diese wurde eine Luna NH₂ Säule (10x250 mm, 5 μ m Partikelgröße, Phenomenex®) verwendet und mit einer Flussrate von 5 mL/min eluiert. Als Laufmittel A wurde reinst Wasser mit 0.1 % Ameisensäure und als Laufmittel B Acetonitril/reinst Wasser 95:5 mit 0.1 % Ameisensäure verwendet. Gradient: 0 min, 0 % B; 2 min, 0 % B; 12 min, 24 % B; 17 min, 100 %; 18 min, 100 %; 23 min, 0 %.

Nach Trocknung wurden 3.5 mg (4.9 μ mol) eines farblosen Feststoffs erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 59 %.

6 Experimenteller Teil



Charakterisierung

farbloser Feststoff

R_t -Wert (HPLC): 6.79 min.

ESI-MS: m/z berechnet: 717.3341 $[M+H]^+$

739.3161 $[M+Na]^+$

755.2900 $[M+K]^+$

gemessen: 717.3346 $[M+H]^+$

739.3152 $[M+Na]^+$

755.2855 $[M+K]^+$

1H -NMR (500 MHz, MeOD- d_4): δ [ppm] = 8.25-8.18 (m, 1H, **H-8'''**), 7.82-7.76 (m, 1H, **H-5'''**), 7.51-7.44 (m, 2H, **H-7'''**, **H-6'''**), 7.44-7.41 (m, 1H, **H-4'''**), 7.41-7.34 (m, 1H, **H-3'''**), 6.97-6.91 (m, 1H, **H-2'''**), 4.76 (t, 1H, **H-2''**), 4.44 (t, 2H, **H-3''**), 3.95 (ddd, 1H, **H-7**), 3.79 (s, 3H, COOCH₃), 3.78-3.71 (m, 1H, **H-1'a**), 3.74 (dd, 1H, **H-5**), 3.64 (ddd, 1H, **H-4**), 3.51 (ddd, 1H, **H-8a**), 3.41 (dd, 1H, **H-6**), 3.33-3.29 (m, 1H, **H-1'b**), 3.19-3.12 (m, 2H, **H-3'**), 3.11 (dd, 1H, **H-8b**), 2.97 (dd, 1H, **H-9a**), 2.90-2.87 (m, 2H, **H-2'''**), 2.84 (dd, 1H, **H-9b**), 2.75 (dd, 1H, **H-3''a**), 2.71 (dd, 1H, **H-3''b**), 2.62 (dd, 1H, **H-3eq**), 2.00 (s, 3H, CH₃-CO-NH), 1.75 (dd, 1H, **H-3ax**), 1.65-1.48 (m, 2H, **H-2'**), 1.15-1.00 (m, 1H, **H-10**), 0.59-0.50 (m, 2H, **H-11a**, **H-12a**), 0.32-0.24 (m, 2H, **H-11b**, **H-12b**).

6 Experimenteller Teil

$^2J_{8a,8b} = 13.0$ Hz, $^3J_{8a,7} = 10.2$ Hz, $^3J_{8b,7} = 2.9$ Hz, $^3J_{7,6} = 1.4$ Hz, $^3J_{6,5} = 10.2$ Hz, $^3J_{5,4} = 10.0$ Hz, $^3J_{4,3eq} = 4.6$ Hz, $^3J_{4,3ax} = 11.7$ Hz, $^2J_{3ax,3eq} = 13.0$ Hz, $^2J_{3''a,3''b} = 16.5$ Hz, $^3J_{3''a,2''} = 6.4$ Hz, $^3J_{3''b,2''} = 6.5$ Hz, $^3J_{3''',2'''} = 6.0$ Hz.

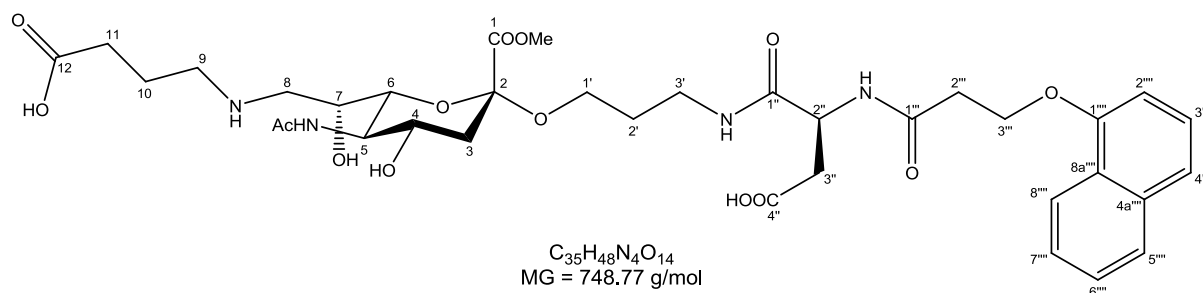
^{13}C -NMR (126 MHz, MeOD- d_4): δ [ppm] = 176.2 (C-4''), 175.2 (CH₃-CO-NH), 173.7 (C-1''), 173.5 (C-1'''), 170.2 (C-1), 155.6 (C-1'''), 136.0 (C-4a'''), 128.5 (C-5), 127.4 (C-6'''), 127.0 (C-3'''), 126.9 (C-8a'''), 126.4 (C-7'''), 123.0 (C-8'''), 121.6 (C-4'''), 106.1 (C-2'''), 100.2 (C-2), 76.2 (C-6), 68.0 (C-4), 66.6 (C-7), 65.7 (C-3''), 62.0 (C-1'), 54.1 (C-5), 53.7 (C-9), 53.2 (COOCH₃), 52.0 (C-2''), 50.8 (C-8), 41.4 (C-3), 38.7 (C-3''), 37.1 (C-2''), 36.8 (C-3'), 30.2 (C-2'), 22.7 (CH₃-CO-NH), 8.0 (C-10), 4.6 (C-11), 4.6 (C-12).

6.5.22 Darstellung von Methyl {5-acetamido-2-[3-((2S)-4-carboxy-2-[3-(naphthyl-1-oxy)propanoylamino]butanoyl)amino)propan-1-yl]-8-(butansäure-4-yl-amino)-3,5,8-tridesoxy- α -D-galacto-2-octulopyranosid]}-onat 47

Es wurden 8.3 mg (10 μmol) **45** mit 50 μL TIPS und 1 mL TFA versetzt und 30 min bei RT geschüttelt. Danach wurden alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgte mittels HPLC. Für diese wurde eine NUCLEODUR[®] C₁₈ Isis Säule (21x250 mm, 5 μm Partikelgröße, Macherey-Nagel) verwendet und mit einer Flussrate von 20 mL/min eluiert. Als Laufmittel A wurde reinst Wasser/Acetonitril 95:5 mit 0.1 % Ameisensäure und als Laufmittel B Acetonitril/reinst Wasser 95:5 mit 0.1 % Ameisensäure verwendet. Gradient: 0 min, 0 % B; 15 min, 50 % B; 18 min, 100 % B; 22 min, 0 % B.

Nach Trocknung wurden 5.9 mg (7.9 μmol) eines farblosen Feststoffs erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 79 %.

6 Experimenteller Teil



Charakterisierung

farbloser Feststoff

R_t-Wert (HPLC): 10.96 min.

ESI-MS: m/z berechnet: 749.3240 [M+H]⁺

gemessen: 749.3241 [M+H]⁺

¹H-NMR (500 MHz, MeOD-*d*₄): δ [ppm] = 8.27-8.17 (m, 1H, **H-8'''**), 7.83-7.75 (m, 1H, **H-5'''**), 7.53-7.44 (m, 2H, **H-7'''**, **H-6'''**), 7.44-7.40 (m, 1H, **H-4'''**), 7.40-7.33 (m, 1H, **H-3'''**), 6.99-6.90 (m, 1H, **H-2'''**), 4.71 (t, 1H, **H-2''**), 4.44 (t, 2H, **H-3''**), 3.96-3.89 (m, 1H, **H-7**), 3.78 (s, 3H, COOCH₃), 3.78-3.73 (m, 2H, **H-1'a**, **H-5**), 3.62 (ddd, 1H, **H-4**), 3.48 (dd, 1H, **H-8a**), 3.42 (dd, 1H, **H-6**), 3.28 (dt, 1H, **H-1'b**), 3.23-3.14 (m, 2H, **H-3'**), 3.13-3.06 (m, 1H, **H-9a**), 3.06-3.02 (m, 1H, **H-8b**), 3.02-2.95 (m, 1H, **H-9b**), 2.89 (t, 2H, **H-2''**), 2.68 (d, 2H, **H-3''**), 2.61 (dd, 1H, **H-3eq**), 2.34-2.25 (m, 2H, **H-11**), 2.00 (s, 3H, CH₃-CO-NH), 1.88-1.77 (m, 2H, **H-10**), 1.74 (dd, 1H, **H-3ax**), 1.64-1.49 (m, 2H, **H-2'**).

²J_{8a,8b} = 12.5 Hz, ³J_{8a,7} = 9.8 Hz, ³J_{7,6} = 0.6 Hz, ³J_{6,5} = 10.9 Hz, ³J_{5,4} = 9.9 Hz, ³J_{4,3eq} = 4.7 Hz, ³J_{4,3ax} = 11.9 Hz, ²J_{3ax,3eq} = 12.8 Hz, ³J_{2',1'b} = 5.4 Hz, ²J_{1a,1b} = 9.3 Hz, ³J_{3'',2''} = 6.3 Hz, ³J_{3''',2'''} = 6.0 Hz.

¹³C-NMR (126 MHz, MeOD-*d*₄): δ [ppm] = 177.3 (C-4''), 175.1 (CH₃-CO-NH), 174.1 (C-1''), 173.4 (C-1'''), 170.3 (C-1), 155.6 (C-1'''), 136.0 (C-4a'''), 128.5 (C-5), 127.4

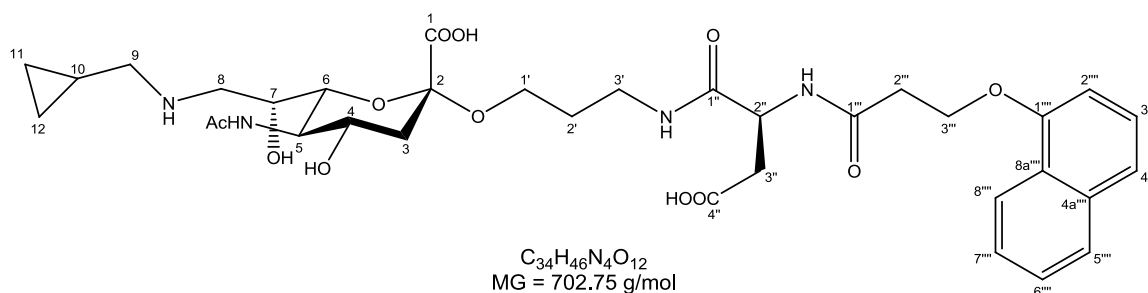
6 Experimenteller Teil

(C-6'''), 127.0 (C-3'''), 126.4 (C-7'''), 126.3 (C-8a'''), 123.0 (C-8'''), 121.5 (C-4'''), 106.1 (C-2'''), 100.2 (C-2), 76.1 (C-6), 68.2 (C-4), 66.8 (C-7), 65.8 (C-3''), 62.0 (C-1'), 54.0 (C-5), 53.2 (COOCH₃), 52.4 (C-2''), 51.0 (C-8), 49.2 (C-9), 41.5 (C-3), 39.5 (C-3''), 37.2 (C-2''), 36.8 (C-3'), 35.3 (C-11), 30.1 (C-2'), 22.9 (C-10), 22.8 (CH₃-CO-NH).

6.5.23 Darstellung von 5-Acetamido-2-[3-((2S)-4-carboxy-2-[3-(naphthyl-1-oxy)propanoylamino]butanoyl)amino)propan-1-yl]-8-(cyclopropylmethylamino)-3,5,8-tridesoxy- α -D-galacto-2-nonulopyranosidonsäure 48

Es wurden 3.5 mg (4.9 μ mol) **46** in 5 mL HCO₃⁻/CO₃²⁻-Puffer pH 10 aufgenommen und drei Tage bei RT gerührt. Anschließend wurde mit Essigsäure schwach angesäuert und gefriergetrocknet. Die Reinigung erfolgte mittels HPLC. Für diese wurde eine Luna NH₂ Säule (10x250 mm, 5 μ m Partikelgröße, Phenomenex®) verwendet und mit einer Flussrate von 5 mL/min eluiert. Als Laufmittel A wurde reines Wasser mit 0.1 % Ameisensäure und als Laufmittel B Acetonitril/reines Wasser 95:5 mit 0.1 % Ameisensäure verwendet. Gradient: 0 min, 0 % B; 10 min, 15 % B; 25 min, 37.5 % B; 30 min, 100 %; 35 min, 100 %; 37 min, 80 %.

Nach Trocknung wurden 2.4 mg (3.4 μ mol) eines farblosen Feststoffs erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 69 %.



6 Experimenteller Teil

Charakterisierung

farbloser Feststoff

R_t-Wert (HPLC): 18.77 min.

ESI-MS: m/z berechnet: 703.3185 [M+H]⁺

725.3004 [M+Na]⁺

gemessen: 703.3187 [M+H]⁺

725.3005 [M+Na]⁺

¹H-NMR (600 MHz, MeOD-*d*4): δ [ppm] = 8.25-8.18 (m, 1H, **H-8''''**), 7.82-7.76 (m, 1H, **H-5''''**), 7.49-7.43 (m, 2H, **H-7''''**, **H-6''''**), 7.43-7.40 (m, 1H, **H-4''''**), 7.39-7.34 (m, 1H, **H-3''''**), 6.96-6.92 (m, 1H, **H-2''''**), 4.76 (t, 1H, **H-2''**), 4.45 (t, 2H, **H-3''**), 3.94 (ddd, 1H, **H-7**), 3.75-3.69 (m, 1H, **H-1'a**), 3.73 (dd, 1H, **H-5**), 3.66 (ddd, 1H, **H-4**), 3.44-3.41 (m, 1H, **H-1'b**), 3.40 (dd, 1H, **H-6**), 3.24 (ddd, 1H, **H-8a**), 3.23 (t, 2H, **H-3'**), 3.17 (dd, 1H, **H-8b**), 2.94 (dd, 1H, **H-9a**), 2.91 (t, 2H, **H-2'''**), 2.80 (dd, 1H, **H-3eq**), 2.77 (t, 2H, **H-3''**), 2.76 (dd, 1H, **H-9b**), 2.00 (s, 3H, **CH₃-CO-NH**), 1.71-1.55 (m, 3H, **H-3ax**, **H-2'**), 1.20-1.08 (m, 1H, **H-10**), 0.61-0.50 (m, 2H, **H-11a**, **H-12a**), 0.42-0.26 (m, 2H, **H-11b**, **H-12b**).

²J_{8a,8b} = 12.6 Hz, ³J_{8a,7} = 5.6 Hz, ³J_{8b,7} = 5.2 Hz, ³J_{7,6} = 1.3 Hz, ³J_{6,5} = 10.0 Hz, ³J_{5,4} = 9.8 Hz, ³J_{4,3eq} = 4.9 Hz, ³J_{4,3ax} = 11.4 Hz, ²J_{3ax,3eq} = 12.5 Hz, ³J_{3'',2''} = 6.3 Hz, ³J_{3''',2'''} = 6.0 Hz.

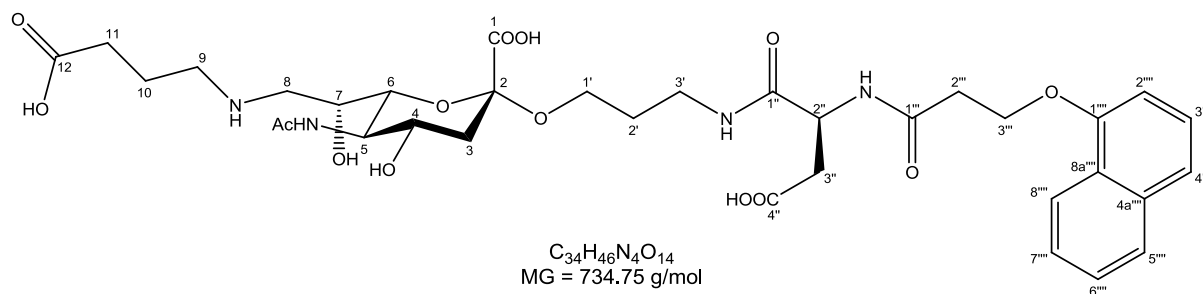
¹³C-NMR (151 MHz, MeOD-*d*4): δ [ppm] = 178.1 (**C-4''**), 174.7 (**CH₃-CO-NH**), 174.6 (**C-1**), 174.2 (**C-1''**), 173.4 (**C-1**), 155.7 (**C-1''''**), 136.0 (**C-4a'''**), 128.4 (**C-5**), 127.4 (**C-6''''**), 127.0 (**C-3''''**), 126.8 (**C-8a''''**), 126.3 (**C-7''''**), 123.0 (**C-8''''**), 121.5 (**C-4''''**), 106.3 (**C-2''''**), 102.9 (**C-2**), 75.7 (**C-6**), 69.6 (**C-4**), 65.8 (**C-3''**), 66.7 (**C-7**), 61.7 (**C-1'**), 54.2 (**C-5**), 54.1 (**C-9**), 53.3 (**C-8**), 52.3 (**C-2''**), 42.2 (**C-3**), 40.0 (**C-3''**), 37.3 (**C-2'''**), 36.9 (**C-3'**), 29.6 (**C-2'**), 22.8 (**CH₃-CO-NH**), 8.1 (**C-10**), 4.7, 4.5 (**C-11**, **C-12**).

6 Experimenteller Teil

6.5.24 Darstellung von 5-Acetamido-2-[3-((2S)-4-carboxy-2-[3-(naphthyl-1-oxy)propanoylamino]butanoyl)amino]propan-1-yl]-8-(butansäure-4-yl-amino)-3,5,8-tridesoxy- α -D-galacto-2-octulopyranosidonsäure 49

Es wurden 5.9 mg (7.9 μ mol) **47** in 5 mL $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ -Puffer pH 10 aufgenommen und drei Tage bei RT gerührt. Anschließend wurde mit Essigsäure schwach angesäuert und gefriergetrocknet. Die Reinigung erfolgte mittels HPLC. Für diese wurde eine Luna NH2 Säule (10x250 mm, 5 μ m Partikelgröße, Phenomenex[®]) verwendet und mit einer Flussrate von 5 mL/min eluiert. Als Laufmittel A wurde reinst Wasser/Acetonitril 95:5 mit 0.1 % Ameisensäure und als Laufmittel B Acetonitril/reinst Wasser 95:5 mit 0.1 % Ameisensäure verwendet. Gradient: 0 min, 20 % B; 20 min, 40 % B; 30 min, 100 % B; 32 min, 100 %; 35 min, 80 % B.

Nach Trocknung wurden 2.1 mg (2.9 μ mol) eines farblosen Feststoffs erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 37 %.



Charakterisierung

farbloser Feststoff

R_t -Wert (HPLC): 22.45 min.

6 Experimenteller Teil

ESI-MS: m/z berechnet: 735.3038 [M+H]⁺

757.2903 [M+Na]⁺

773.2642 [M+K]⁺

gemessen: 735.3108 [M+H]⁺

757.2916 [M+Na]⁺

773.2582 [M+K]⁺

¹H-NMR (500 MHz, MeOD-*d*4): δ [ppm] = 8.26-8.17 (m, 1H, **H-8''''**), 7.81-7.75 (m, 1H, **H-5''''**), 7.51-7.40 (m, 3H, **H-7''''**, **H-6''''**, **H-4''''**), 7.40-7.33 (m, 1H, **H-3''''**), 6.98-6.91 (m, 1H, **H-2''''**), 4.76 (t, 1H, **H-2''**), 4.45 (t, 2H, **H-3''**), 3.95-3.92 (m, 1H, **H-7**), 3.73 (dd, 1H, **H-5**), 3.72-3.67 (m, 1H, **H-1'a**), 3.66 (ddd, 1H, **H-4**), 3.47-3.36 (m, 2H, **H-6**, **H-1'b**), 3.29-3.20 (m, 2H, **H-3'**), 3.19 (dd, 1H, **H-8a**), 3.16 (dd, 1H, **H-8b**), 3.09-2.95 (m, 2H, **H-9**), 2.91 (t, 2H, **H-2''**), 2.78 (dd, 1H, **H-3eq**), 2.76 (d, 2H, **H-3''**), 2.42-2.36 (m, 2H, **H-11**), 2.00 (s, 3H, **CH₃-CO-NH**), 2.00-1.94 (m, 2H, **H-10**), 1.69-1.59 (m, 3H, **H-3ax**, **H-2'**).

²*J*_{8a,8b} = 13.0 Hz, ³*J*_{8a,7} = 6.1 Hz, ³*J*_{8b,7} = 4.6 Hz, ³*J*_{6,5} = 9.8 Hz, ³*J*_{5,4} = 10.2 Hz, ³*J*_{4,3eq} = 4.0 Hz, ³*J*_{4,3ax} = 11.7 Hz, ²*J*_{3ax,3eq} = 12.4 Hz, ³*J*_{3'',2''} = 6.1 Hz, ³*J*_{3''',2'''} = 6.0 Hz.

¹³C-NMR (126 MHz, MeOD-*d*4): δ [ppm] = 175.1 (**CH₃-CO-NH**), 173.4 (**C-4''**), 155.5 (**C-1''''**), 136.0 (**C-4a''**), 128.5 (**C-5**), 127.7 (**C-6''''**), 127.1 (**C-3''''**), 126.4 (**C-7''''**), 126.7 (**C-8a''''**), 123.0 (**C-8''''**), 121.5 (**C-4''''**), 106.2 (**C-2''''**), 75.1 (**C-6**), 69.4 (**C-4**), 65.7 (**C-7**), 65.7 (**C-3''**), 62.3 (**C-1'**), 54.2 (**C-5**), 52.2 (**C-8**), 51.9 (**C-2''**), 49.2 (**C-9**), 42.1 (**C-3**), 38.2 (**C-3''**), 37.4 (**C-3'**), 37.3 (**C-2''**), 32.7 (**C-11**), 30.1 (**C-2'**), 23.0 (**C-10**), 22.7 (**CH₃-CO-NH**).

Aufgrund zu geringer Signalintensität konnten die chemischen Verschiebungen der Signale der quartären Kohlenstoffe **C-1**, **C-2**, **C-1''** und **C-1''''** nicht bestimmt werden.

7 Toxikologische Daten

7 Toxikologische Daten

Substanz	Gefahrenpiktogramm	H-Sätze	P-Sätze
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
Acrylnitril	    	225, 350, 331, 311, 301, 335, 315, 318, 317, 411	201, 210, 233, 280, 302+352, 305+351+338, 309, 310, 403+235
Ameisensäure		226, 314	280, 305+351+338, 310
4-Aminobuttersäure		315, 319, 335	261, 305+351+338
3-Aminopropan-1-ol	 	302, 312, 314	260, 301+330+331, 303+361+353, 305+351+338, 405
Ammoniaklösung 25 %	 	314, 400	260, 264, 273, 280, 405

7 Toxikologische Daten

Substanz	Gefahrenpiktogramm	H-Sätze	P-Sätze
3-Brompropionsäure		302, 314	260, 301+330+331, 303+361+353, 305+351+338, 405
Chloracetylchlorid		EUH14, EUH029, 331, 311, 301, 372, 314, 400	273, 280, 305+351+338, 310
Chloroform, CDCl ₃		302, 315, 351, 373	281
Cyclohexylmethylbromid		315, 319, 335	261, 280, 304+340, 305+351+338, 405
Cyclopropylbromid		225, 315, 319, 335	210, 261, 303+361+353, 305+351+338, 405
Cyclopropylmethylamin		225, 314	210, 280, 305+351+338, 309, 310
Dichlormethan		351	281
Diisopropylethylamin		225, 302, 314, 412	210, 233, 240, 241, 242
<i>N,N</i> -Dimethylformamid		226, 312, 319, 332, 360D	201, 280, 305+351+338, 310
Dimethylsulfoxid- <i>d</i> 6			

7 Toxikologische Daten

Substanz	Gefahrenpiktogramm	H-Sätze	P-Sätze
EDC		315, 318, 335	261, 264, 280, 302+352, 310
Essigsäure		226, 314	280, 305+351+338, 310
Essigsäureanhydrid		226, 302, 314, 332	210, 233, 240, 241, 310
Ethanal		224, 319, 335, 351	201, 202, 210, 240, 261
Ethanol		225, 319, 336	210, 261, 305+351+338
Ethylacetat		225, 319, 336	210, 261, 305+351+338
Fmoc-OSu		302, 317, 411	261, 264, 273, 280, 302+352, 330
HATU		315, 319, 335	261, 264, 280, 305+351+338, 321, 362
N-Hydroxysuccinimid		315, 319, 335	261, 280, 302+352, 305+351+338
Kaliumcarbonat		302, 315, 319, 335	261, 264, 280, 321, 330
Kaliumhydroxid		302, 314	260, 264, 280, 301+312, 405
Lithiumaluminiumhydrid		260, 314	223, 231+232, 260
Methanol, MeOD-d4		225, 301, 311, 331, 370	210, 260, 280, 301+310, 311

7 Toxikologische Daten

Substanz	Gefahrenpiktogramm	H-Sätze	P-Sätze
3-Methyl-4-nitrophenol		302, 315, 319, 335	280h, 305+351+338
1-Naphthol	 	302, 312, 315, 318, 335	261, 264, 280, 301+312, 302+352
Natrium	 	260, 314	223, 231+232, 280, 305+351+338, 370+378
Natriumazid	 	EUH032, 300, 410	264, 273, 301+310, 321, 330
Natriumcarbonat		319	264, 280, 305+351+338, 337+313
Natriumcyanoborhydrid	   	EUH032, 228, 261, 300, 310, 330, 314, 400, 410	210, 301+310, 303+361+353, 304+340, 305+351+338
Natriumhydrogencarbonat		319	264, 280, 305+351+338, 337+313
Natriumhydroxid		314	280, 305+351+338, 310
Natriumiodid		315, 319, 335	261, 280, 304+340, 305+351+338, 405

7 Toxikologische Daten

Substanz	Gefahrenpiktogramm	H-Sätze	P-Sätze
Natriumperiodat		302, 315, 319, 335	261, 264, 280, 305+351+338, 330
Palladium auf Aktivkohle		228	210, 240, 241, 280, 370+378c
Petrolether 60-80		225, 340, 350, 304	210, 280, 301+310, 303+361+353, 405
Piperidin		225, 311, 314, 331	210, 261, 280, 305+351+338, 310
Propanal		225, 315, 319, 335	210, 240, 241, 242, 261
iso-Propylacetat		EUH066, 225, 319, 336	210, 233, 240, 241, 242, 243
Pyridin		225, 302, 312, 332	210, 280
Salicylsäure		318, 302, 335, 315	261, 280, 304+340, 305+351+338, 405
Salzsäure 37 %		314, 335	261, 280, 305+351+338, 310
Silbercarbonat		318, 400, 410	273, 280, 305+351+338, 310, 391
Silbernitrat		272, 314, 410	210, 220, 221, 260, 280

7 Toxikologische Daten

Substanz	Gefahrenpiktogramm	H-Sätze	P-Sätze
Tetrahydrofuran		EUH019, 225, 319, 335, 351	201, 202, 210, 240, 261
Toluol		225, 304, 315, 336, 361d-373	210, 261, 281, 301+310, 331
<i>para</i> -Toluolsulfon- säurechlorid		314	260, 301+330+331, 303+361+353, 305+351+338, 405
Triethylamin		225, 302, 312, 314, 332	210, 233, 240, 241, 260
Trifluoressigsäure		314, 332, 412	273, 280, 305+351+338, 310
Triisopropylsilan		226, 315, 319, 335	260, 264, 280, 305+351+338, 310
Triton B		225, 311, 331, 370, 314	210, 303+361+353, 305+351+338, 405
Wasserstoff		220	210

8 Literaturverzeichnis

- 1 Morens, D. M.; Taubenberger, J. K.; Fauci, A. S., Predominant Role of Bacterial Pneumonia as a Cause of Death in Pandemic Influenza: Implications for Pandemic Influenza Preparedness. *J. Infect. Dis.* **2008**, *198*, (7), 962-970.
- 2 WHO-Mediacenter, Fact sheet N°211. Webseite: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/2003/fs211/en/>, aufgerufen **03.03.2016**.
- 3 Webster, R. G., 1918 Spanish influenza: The secrets remain elusive. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, (4), 1164-1166.
- 4 Hampson, A. W.; Mackenzie, J. S., The influenza viruses. *Med. J. Aust.* **2006**, *185*, (10 Suppl), 39-43.
- 5 Saif, Y. M.; Fadly, A. M.; J.R.Glisson; McDougald, L. R.; Nolan, L. K.; Swayne, D. E., *Diseases of Poultry*. 12th edition Aufl.; Blackwell Publishing: Ames, **2008**.
- 6 A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO memorandum. *Bull. World Health Organ.* **1980**, *58*, (4), 585-591.
- 7 Chen, W.; Calvo, P. A.; Malide, D.; Gibbs, J.; Schubert, U.; Bacik, I.; Basta, S.; O'Neill, R.; Schickli, J.; Palese, P.; Henklein, P.; Bennink, J. R.; Yewdell, J. W., A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat. Med.* **2001**, *7*, (12), 1306-1312.
- 8 Wise, H. M.; Foeglein, A.; Sun, J.; Dalton, R. M.; Patel, S.; Howard, W.; Anderson, E. C.; Barclay, W. S.; Digard, P., A Complicated Message: Identification of a Novel PB1-Related Protein Translated from Influenza A Virus Segment 2 mRNA. *J. Virol.* **2009**, *83*, (16), 8021-8031.
- 9 Jagger, B. W.; Wise, H. M.; Kash, J. C.; Walters, K.-A.; Wills, N. M.; Xiao, Y.-L.; Dunfee, R. L.; Schwartzman, L. M.; Ozinsky, A.; Bell, G. L.; Dalton, R. M.; Lo, A.; Efsthathiou, S.; Atkins, J. F.; Firth, A. E.; Taubenberger, J. K.; Digard, P., An Overlapping Protein-Coding Region in Influenza A Virus Segment 3 Modulates the Host Response. *Science* **2012**, *337*, (6091), 199-204.
- 10 Wise, H. M.; Hutchinson, E. C.; Jagger, B. W.; Stuart, A. D.; Kang, Z. H.; Robb, N.; Schwartzman, L. M.; Kash, J. C.; Fodor, E.; Firth, A. E.; Gog, J. R.; Taubenberger, J. K.; Digard, P., Identification of a Novel Splice Variant Form of the Influenza A Virus M2 Ion Channel with an Antigenically Distinct Ectodomain. *PLoS Pathog* **2012**, *8*, (11).
- 11 Muramoto, Y.; Noda, T.; Kawakami, E.; Akkina, R.; Kawaoka, Y., Identification of Novel Influenza A Virus Proteins Translated from PA mRNA. *J. Virol.* **2013**, *87*, (5), 2455-2462.
- 12 Martin, K.; Helenius, A., Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: The viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. *Cell* **1991**, *67*, (1), 117-130.
- 13 Chizhmakov, I. V.; Geraghty, F. M.; Ogden, D. C.; Hayhurst, A.; Antoniou, M.; Hay, A. J., Selective proton permeability and pH regulation of the influenza virus M2 channel expressed in mouse erythroleukaemia cells. *J. Physiol.* **1996**, *494*, (Pt 2), 329-336.
- 14 Fouchier, R. A. M.; Munster, V.; Wallensten, A.; Bestebroer, T. M.; Herfst, S.; Smith, D.; Rimmelzwaan, G. F.; Olsen, B.; Osterhaus, A. D. M. E., Characterization of a Novel Influenza A Virus Hemagglutinin Subtype (H16) Obtained from Black-Headed Gulls. *J. Virol.* **2005**, *79*, (5), 2814-2822.

8 Literaturverzeichnis

- 15 Herrler, G.; Klenk, H.-D.; Maramorosch, K.; Murphy, F. A.; Aaron, J. S., Structure and Function of the Hef Glycoprotein of Influenza C Virus. *Adv. Virus Res.* **1991**, *40*, 213-234.
- 16 Kaiser, J., A One-Size-Fits-All Flu Vaccine? *Science* **2006**, *312*, (5772), 380-382.
- 17 Chandrasekaran, A.; Srinivasan, A.; Raman, R.; Viswanathan, K.; Raguram, S.; Tumpey, T. M.; Sasisekharan, V.; Sasisekharan, R., Glycan topology determines human adaptation of avian H5N1 virus hemagglutinin. *Nat. Biotech.* **2008**, *26*, (1), 107-113.
- 18 Pinto, L. H.; Holsinger, L. J.; Lamb, R. A., Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell* **1992**, *69*, (3), 517-528.
- 19 Schroeder, C.; Ford, C. M.; Wharton, S. A.; Hay, A. J., Functional reconstitution in lipid vesicles of influenza virus M2 protein expressed by baculovirus: evidence for proton transfer activity. *J. Gen. Virol.* **1994**, *75*, (12), 3477-3484.
- 20 Martin, K.; Helenius, A., Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into the nucleus. *J. Virol.* **1991**, *65*, (1), 232-244.
- 21 Maeda, T.; Ohnishi, S.-i., Activation of influenza virus by acidic media causes hemolysis and fusion of erythrocytes. *FEBS Lett.* **1980**, *122*, (2), 283-287.
- 22 Carr, C. M.; Kim, P. S., A spring-loaded mechanism for the conformational change of influenza hemagglutinin. *Cell* **1993**, *73*, (4), 823-832.
- 23 Harrison, S. C., Viral membrane fusion. *Virology* **2015**, 479–480, 498-507.
- 24 Scheme of Influenza A virus replication. Webseite:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/VIRUSES/virusreplication_scheme.html,
aufgerufen **17.05.2010**.
- 25 Drake, J. W., Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, (9), 4171-4175.
- 26 Tsai, K.-N.; Chen, G.-W., Influenza genome diversity and evolution. *Microbes Infect.* **2011**, *13*, (5), 479-488.
- 27 Belshe, R. B.; Smith, M. H.; Hall, C. B.; Betts, R.; Hay, A. J., Genetic basis of resistance to rimantadine emerging during treatment of influenza virus infection. *J. Virol.* **1988**, *62*, (5), 1508-1512.
- 28 WHO, Oseltamivir-resistant pandemic (H1N1) 2009 influenza virus, October 2009. *Wkly. Epidemiol. Rec.* **2009**, *84*, (44), 453-459.
- 29 Yamada, S.; Suzuki, Y.; Suzuki, T.; Le, M. Q.; Nidom, C. A.; Sakai-Tagawa, Y.; Muramoto, Y.; Ito, M.; Kiso, M.; Horimoto, T.; Shinya, K.; Sawada, T.; Kiso, M.; Usui, T.; Murata, T.; Lin, Y.; Hay, A.; Haire, L. F.; Stevens, D. J.; Russell, R. J.; Gamblin, S. J.; Skehel, J. J.; Kawaoka, Y., Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. *Nature* **2006**, *444*, (7117), 378-382.
- 30 Treanor, J., Influenza Vaccine - Outmaneuvering Antigenic Shift and Drift. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *350*, (3), 218-220.
- 31 Matrosovich, M.; Tuzikov, A.; Bovin, N.; Gambaryan, A.; Klimov, A.; Castrucci, M. R.; Donatelli, I.; Kawaoka, Y., Early Alterations of the Receptor-Binding Properties of H1, H2, and H3 Avian Influenza Virus Hemagglutinins after Their Introduction into Mammals. *J. Virol.* **2000**, *74*, (18), 8502-8512.
- 32 Webster, R. G.; Yakhno, M.; Hinshaw, V. S.; Bean, W. J.; Copal Murti, K., Intestinal influenza: Replication and characterization of influenza viruses in ducks. *Virology* **1978**, *84*, (2), 268-278.
- 33 Aral, Y.; Yalcin, C.; Cevger, Y.; Sipahi, C.; Sariozkan, S., Financial effects of the highly pathogenic avian influenza outbreaks on the Turkish broiler producers. *Poultry Sci.* **2010**, *89*, (5), 1085-1088.

8 Literaturverzeichnis

- 34 Sartore, S.; Bonfanti, L.; Lorenzetto, M.; Cecchinato, M.; Marangon, S., The effects of control measures on the economic burden associated with epidemics of avian influenza in Italy. *Poultry Sci.* **2010**, *89*, (6), 1115-1121.
- 35 Chan, P. K. S., Outbreak of Avian Influenza A(H5N1) Virus Infection in Hong Kong in 1997. *Clin. Infect. Dis.* **2002**, *34*, (S2), S8-S64.
- 36 WHO, Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) Reported to WHO, 2003-2015. Webseite: http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/EN_GIP_20150623cumulativeNumberH5N1cases.pdf?ua=1, aufgerufen **23.07.2015**.
- 37 Neumann, G.; Chen, H.; Gao, G. F.; Shu, Y.; Kawaoka, Y., H5N1 influenza viruses: outbreaks and biological properties. *Cell. Res.* **2009**, *20*, (1), 51-61.
- 38 Obenauer, J. C.; Denson, J.; Mehta, P. K.; Su, X.; Mukatira, S.; Finkelstein, D. B.; Xu, X.; Wang, J.; Ma, J.; Fan, Y.; Rakestraw, K. M.; Webster, R. G.; Hoffmann, E.; Krauss, S.; Zheng, J.; Zhang, Z.; Naeve, C. W., Large-Scale Sequence Analysis of Avian Influenza Isolates. *Science* **2006**, *311*, (5767), 1576-1580.
- 39 Mammen, M.; Choi, S.-K.; Whitesides, G. M., Polyvalente Wechselwirkungen in biologischen Systemen: Auswirkungen auf das Design und die Verwendung multivalenter Liganden und Inhibitoren. *Angew. Chem.* **1998**, *110*, (20), 2908-2953.
- 40 Gamblin, S. J.; Haire, L. F.; Russell, R. J.; Stevens, D. J.; Xiao, B.; Ha, Y.; Vasisht, N.; Steinhauer, D. A.; Daniels, R. S.; Elliot, A.; Wiley, D. C.; Skehel, J. J., The Structure and Receptor Binding Properties of the 1918 Influenza Hemagglutinin. *Science* **2004**, *303*, (5665), 1838-1842.
- 41 Sauter, N. K.; Bednarski, M. D.; Wurzburg, B. A.; Hanson, J. E.; Whitesides, G. M.; Skehel, J. J.; Wiley, D. C., Hemagglutinins from two influenza virus variants bind to sialic acid derivatives with millimolar dissociation constants: a 500-MHz proton nuclear magnetic resonance study. *Biochemistry* **1989**, *28*, (21), 8388-8396.
- 42 Lazarowitz, S. G.; Compans, R. W.; Choppin, P. W., Influenza virus structural and nonstructural proteins in infected cells and their plasma membranes. *Virology* **1971**, *46*, (3), 830-843.
- 43 Lazarowitz, S. G.; Compans, R. W.; Choppin, P. W., Proteolytic cleavage of the hemagglutinin polypeptide of influenza virus. Function of the uncleaved polypeptide HA. *Virology* **1973**, *52*, (1), 199-212.
- 44 Porter, A. G.; Barber, C.; Carey, N. H.; Hallewell, R. A.; Threlfall, G.; Emtage, J. S., Complete nucleotide sequence of an influenza virus haemagglutinin gene from cloned DNA. *Nature* **1979**, *282*, (5738), 471-477.
- 45 Garten, W.; Linder, D.; Rott, R.; Klenk, H. D., The cleavage site of the hemagglutinin of fowl plague virus. *Virology* **1982**, *122*, (1), 186-190.
- 46 Klenk, H.-D.; Rott, R.; Orlich, M.; Blödorn, J., Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. *Virology* **1975**, *68*, (2), 426-439.
- 47 Lazarowitz, S. G.; Choppin, P. W., Enhancement of the infectivity of influenza A and B viruses by proteolytic cleavage of the hemagglutinin polypeptide. *Virology* **1975**, *68*, (2), 440-454.
- 48 Steinhauer, D. A., Role of Hemagglutinin Cleavage for the Pathogenicity of Influenza Virus. *Virology* **1999**, *258*, (1), 1-20.
- 49 Stanley, P.; Gandhi, S. S.; White, D. O., The polypeptides of influenza virus: VII. Synthesis of the hemagglutinin. *Virology* **1973**, *53*, (1), 92-106.
- 50 Compans, R. W.; Klenk, H.-D.; Caligui, L. A.; Choppin, P. W., Influenza virus proteins: I. Analysis of polypeptides of the virion and identification of spike glycoproteins. *Virology* **1970**, *42*, (4), 880-889.

8 Literaturverzeichnis

- 51 Maines, T. R.; Lu, X. H.; Erb, S. M.; Edwards, L.; Guarner, J.; Greer, P. W.; Nguyen, D. C.; Szretter, K. J.; Chen, L.-M.; Thawatsupha, P.; Chittaganpitch, M.; Waicharoen, S.; Nguyen, D. T.; Nguyen, T.; Nguyen, H. H. T.; Kim, J.-H.; Hoang, L. T.; Kang, C.; Phuong, L. S.; Lim, W.; Zaki, S.; Donis, R. O.; Cox, N. J.; Katz, J. M.; Tumpey, T. M., Avian Influenza (H5N1) Viruses Isolated from Humans in Asia in 2004 Exhibit Increased Virulence in Mammals. *J. Virol.* **2005**, *79*, (18), 11788-11800.
- 52 Klenk, H.-D.; Wöllert, W.; Rott, R.; Scholtissek, C., Association of influenza virus proteins with cytoplasmic fractions. *Virology* **1974**, *57*, (1), 28-41.
- 53 Wood, J. M., Developing vaccines against pandemic influenza. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **2001**, *356*, (1416), 1953-1960.
- 54 Zhirnov, O. P., Solubilization of matrix protein M1/M from virions occurs at different pH for orthomyxo- and paramyxoviruses. *Virology* **1990**, *176*, (1), 274-279.
- 55 Sakaguchi, T.; Leser, G. P.; Lamb, R. A., The ion channel activity of the influenza virus M2 protein affects transport through the Golgi apparatus. *J. Cell. Biol.* **1996**, *133*, (4), 733-747.
- 56 Wang, C.; Takeuchi, K.; Pinto, L. H.; Lamb, R. A., Ion channel activity of influenza A virus M2 protein: characterization of the amantadine block. *J. Virol.* **1993**, *67*, (9), 5585-5594.
- 57 Cass, L. M. R.; Efthymiopoulos, C.; Bye, A., Pharmacokinetics of Zanamivir After Intravenous, Oral, Inhaled or Intranasal Administration to Healthy Volunteers. *Clin. Pharmacokin.* **1999**, *36*, 1-11.
- 58 Li, W.; Escarpe, P. A.; Eisenberg, E. J.; Cundy, K. C.; Sweet, C.; Jakeman, K. J.; Merson, J.; Lew, W.; Williams, M.; Zhang, L.; Kim, C. U.; Bischofberger, N.; Chen, M. S.; Mendel, D. B., Identification of GS 4104 as an Orally Bioavailable Prodrug of the Influenza Virus Neuraminidase Inhibitor GS 4071. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, (3), 647-653.
- 59 Singh, S.; Barghoorn, J.; Bagdonas, A.; Adler, J.; Treanor, J.; Kinnersley, N.; Ward, P., Clinical Benefits with Oseltamivir in Treating Influenza in Adult Populations: Results of a Pooled and Subgroup Analysis. *Clin. Drug. Invest.* **2003**, *23*, (9), 561-569.
- 60 Aoki, F. Y.; Macleod, M. D.; Paggiaro, P.; Carewicz, O.; El Sawy, A.; Wat, C.; Griffiths, M.; Waalberg, E.; Ward, P.; on behalf of the, I. S. G., Early administration of oral oseltamivir increases the benefits of influenza treatment. *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, *51*, (1), 123-129.
- 61 Ward, P.; Small, I.; Smith, J.; Suter, P.; Dutkowski, R., Oseltamivir (Tamiflu(R)) and its potential for use in the event of an influenza pandemic. *J. Antimicrob. Chemother.* **2005**, *55*, (suppl_1), i5-21.
- 62 de Jong, M. D.; Thanh, T. T.; Khanh, T. H.; Hien, V. M.; Smith, G. J. D.; Chau, N. V.; Cam, B. V.; Qui, P. T.; Ha, D. Q.; Guan, Y.; Peiris, J. S. M.; Hien, T. T.; Farrar, J., Oseltamivir Resistance during Treatment of Influenza A (H5N1) Infection. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *353*, (25), 2667-2672.
- 63 Le, Q. M.; Kiso, M.; Someya, K.; Sakai, Y. T.; Nguyen, T. H.; Nguyen, K. H. L.; Pham, N. D.; Ngyen, H. H.; Yamada, S.; Muramoto, Y.; Horimoto, T.; Takada, A.; Goto, H.; Suzuki, T.; Suzuki, Y.; Kawaoka, Y., Avian flu: Isolation of drug-resistant H5N1 virus. *Nature* **2005**, *437*, (7062), 1108-1108.
- 64 Dharan, N. J.; Gubareva, L. V.; Meyer, J. J.; Okomo-Adhiambo, M.; McClinton, R. C.; Marshall, S. A.; St. George, K.; Epperson, S.; Brammer, L.; Klimov, A. I.; Bresee, J. S.; Fry, A. M.; for the Oseltamivir-Resistance Working, G., Infections With Oseltamivir-Resistant Influenza A(H1N1) Virus in the United States. *J. Am. Med. Assoc.* **2009**, *301*, (10), 1034-1041.

8 Literaturverzeichnis

- 65 Furuta, Y.; Takahashi, K.; Fukuda, Y.; Kuno, M.; Kamiyama, T.; Kozaki, K.; Nomura, N.; Egawa, H.; Minami, S.; Watanabe, Y.; Narita, H.; Shiraki, K., In Vitro and In Vivo Activities of Anti-Influenza Virus Compound T-705. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, 46, (4), 977-981.
- 66 Furuta, Y.; Takahashi, K.; Shiraki, K.; Sakamoto, K.; Smee, D. F.; Barnard, D. L.; Gowen, B. B.; Julander, J. G.; Morrey, J. D., T-705 (favipiravir) and related compounds: Novel broad-spectrum inhibitors of RNA viral infections. *Antiviral Res.* **2009**, 82, (3), 95-102.
- 67 Oestereich, L.; Lüdtke, A.; Wurr, S.; Rieger, T.; Muñoz-Fontela, C.; Günther, S., Successful treatment of advanced Ebola virus infection with T-705 (favipiravir) in a small animal model. *Antiviral Res.* **2014**, 105, 17-21.
- 68 Furuta, Y.; Gowen, B. B.; Takahashi, K.; Shiraki, K.; Smee, D. F.; Barnard, D. L., Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor. *Antiviral Res.* **2013**, 100, (2), 446-454.
- 69 Furuta, Y.; Takahashi, K.; Kuno-Maekawa, M.; Sangawa, H.; Uehara, S.; Kozaki, K.; Nomura, N.; Egawa, H.; Shiraki, K., Mechanism of Action of T-705 against Influenza Virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, 49, (3), 981-986.
- 70 Sangawa, H.; Komeno, T.; Nishikawa, H.; Yoshida, A.; Takahashi, K.; Nomura, N.; Furuta, Y., Mechanism of Action of T-705 Ribosyl Triphosphate against Influenza Virus RNA Polymerase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, 57, (11), 5202-5208.
- 71 Misono, T. S.; Kumar, P. K. R., Selection of RNA aptamers against human influenza virus hemagglutinin using surface plasmon resonance. *Anal. Biochem.* **2005**, 342, (2), 312-317.
- 72 Hanson, B. J.; Boon, A. C. M.; Lim, A. P. C.; Webb, A.; Ooi, E. E.; Webby, R. J., Passive immunoprophylaxis and therapy with humanized monoclonal antibody specific for influenza A H5 hemagglutinin in mice. *Resp. Res.* **2006**, 7, (1), 126.
- 73 Jones, J. C.; Turpin, E. A.; Bultmann, H.; Brandt, C. R.; Schultz-Cherry, S., Inhibition of Influenza Virus Infection by a Novel Antiviral Peptide That Targets Viral Attachment to Cells. *J. Virol.* **2006**, 80, (24), 11960-11967.
- 74 Ibañez, L. I.; De Filette, M.; Hultberg, A.; Verrips, T.; Temperton, N.; Weiss, R. A.; Vandeveld, W.; Schepens, B.; Vanlandschoot, P.; Saelens, X., Nanobodies With In Vitro Neutralizing Activity Protect Mice Against H5N1 Influenza Virus Infection. *J. Infect. Dis.* **2011**, 203, (8), 1063-1072.
- 75 Ekiert, D. C.; Bhabha, G.; Elsliger, M.-A.; Friesen, R. H. E.; Jongeneelen, M.; Throsby, M.; Goudsmit, J.; Wilson, I. A., Antibody Recognition of a Highly Conserved Influenza Virus Epitope. *Science* **2009**, 324, (5924), 246-251.
- 76 Mammen, M.; Dahmann, G.; Whitesides, G. M., Effective Inhibitors of Hemagglutination by Influenza Virus Synthesized from Polymers Having Active Ester Groups. Insight into Mechanism of Inhibition. *J. Med. Chem.* **1995**, 38, (21), 4179-4190.
- 77 Bovin, N. V.; Tuzikov, A. B.; Chinarev, A. A.; Gambaryan, A. S., Multimeric glycotherapeutics: New paradigm. *Glycoconj. J.* **2004**, 21, (8), 471-478.
- 78 Waldmann, M.; Jirmann, R.; Hoelscher, K.; Wienke, M.; Niemeyer, F. C.; Rehders, D.; Meyer, B., A Nanomolar Multivalent Ligand as Entry Inhibitor of the Hemagglutinin of Avian Influenza. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, (2), 783-788.
- 79 Sauter, N. K.; Hanson, J. E.; Glick, G. D.; Brown, J. H.; Crowther, R. L.; Park, S. J.; Skehel, J. J.; Wiley, D. C., Binding of influenza virus hemagglutinin to analogs of its cell-surface receptor, sialic acid: analysis by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy and x-ray crystallography. *Biochemistry* **1992**, 31, (40), 9609-9621.

8 Literaturverzeichnis

- 80 Kelm, S.; Paulson, J. C.; Rose, U.; Brossmer, R.; Schmid, W.; Bandgar, B. P.; Schreiner, E.; Hartmann, M.; Zbiral, E., Use of sialic acid analogues to define functional groups involved in binding to the influenza virus hemagglutinin. *Eur. J. Biochem.* **1992**, *205*, (1), 147-153.
- 81 Weinhold, E. G.; Knowles, J. R., Design and evaluation of a tightly binding fluorescent ligand for Influenza A hemagglutinin. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, (24), 9270-9275.
- 82 Hollinger, M. Design, Synthese und Analyse von Liganden als Inhibitoren des Hämagglutinins des aviären Influenza Virus H5N1. Doktorarbeit, Universität Hamburg, Hamburg, **2009**.
- 83 Toogood, P. L.; Galliker, P. K.; Glick, G. D.; Knowles, J. R., Monovalent sialosides that bind tightly to influenza A virus. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, (10), 3138-3140.
- 84 Lombardino, J. G.; Lowe, J. A., The role of the medicinal chemist in drug discovery then and now. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2004**, *3*, (10), 853-862.
- 85 Kubinyi, H., Drug research: myths, hype and reality. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2003**, *2*, (8), 665-668.
- 86 Greaves, P.; Williams, A.; Eve, M., First dose of potential new medicines to humans: how animals help. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2004**, *3*, (3), 226-236.
- 87 Adams, C. P.; Brantner, V. V., Estimating The Cost Of New Drug Development: Is It Really \$802 Million? *Health. Aff.* **2006**, *25*, (2), 420-428.
- 88 DiMasi, J. A.; Hansen, R. W.; Grabowski, H. G., The price of innovation: new estimates of drug development costs. *J. Health Econ.* **2003**, *22*, (2), 151-185.
- 89 Herfst, S.; Schrauwen, E. J. A.; Linster, M.; Chutinimitkul, S.; de Wit, E.; Munster, V. J.; Sorrell, E. M.; Bestebroer, T. M.; Burke, D. F.; Smith, D. J.; Rimmelzwaan, G. F.; Osterhaus, A. D. M. E.; Fouchier, R. A. M., Airborne Transmission of Influenza A/H5N1 Virus Between Ferrets. *Science* **2012**, *336*, (6088), 1534-1541.
- 90 Imai, M.; Watanabe, T.; Hatta, M.; Das, S. C.; Ozawa, M.; Shinya, K.; Zhong, G.; Hanson, A.; Katsura, H.; Watanabe, S.; Li, C.; Kawakami, E.; Yamada, S.; Kiso, M.; Suzuki, Y.; Maher, E. A.; Neumann, G.; Kawaoka, Y., Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets. *Nature* **2012**, *486*, (7403), 420-428.
- 91 Winkel, K. Untersuchungen zur Synthese Modifizierter Sialinsäureglycoside als Bausteine für Potentielle Inhibitoren des Hämagglutinins des Influenzavirus H5N1. Diplomarbeit, Universität Hamburg, Hamburg, **2010**.
- 92 Genheden, S.; Ryde, U., The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. *Expert Opin. Drug. Dis.* **2015**, *10*, (5), 449-461.
- 93 Chen, Y.; Li, Y.; Pan, L.; Liu, J.; Wan, Y.; Chen, W.; Xiong, L.; Yang, N.; Song, H.; Li, Z., Synthesis, insecticidal activities and SAR of novel phthalamides targeting calcium channel. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, (22), 6366-6379.
- 94 Nystrom, R. F.; Brown, W. G., Reduction of Organic Compounds by Lithium Aluminum Hydride. III. Halides, Quinones, Miscellaneous Nitrogen Compounds1. *J. Am. Chem. Soc.* **1948**, *70*, (11), 3738-3740.
- 95 Klebe, G., Wirkstoffdesign. In Spektrum Akademischer Verlag: 2009; S. 54 ff.
- 96 de Smet, L. C. P. M.; Pukin, A. V.; Stork, G. A.; Ric de Vos, C. H.; Visser, G. M.; Zuilhof, H.; Sudhölter, E. J. R., Syntheses of alkenylated carbohydrate derivatives toward the preparation of monolayers on silicon surfaces. *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, (15), 2599-2605.
- 97 Marra, A.; Sinay, P., Acetylation of N-acetylneuraminic acid and its methyl ester. *Carbohydr. Res.* **1989**, *190*, (2), 317-322.

8 Literaturverzeichnis

- 98 Roy, R., Laferrière, C. A., Synthesis of protein conjugates and analogues of N-acetylneuraminic acid. *Can. J. Chem.* **1990**, 68, (11), 10.
- 99 Isecke, R.; Brossmer, R., Synthesis of 5-N- and 9-N-thioacylated sialic acids. *Tetrahedron* **1994**, 50, (25), 7445-7460.
- 100 Schaafsma, S. E.; Steinberg, H.; de Boer, T. J., The synthesis of cyclopropanone: Short communication. *Recl. Trav. Chim. Pay.-B.* **1966**, 85, (11), 1170-1172.
- 101 Kraus, M. A., The Formylation of Aliphatic Amines by Dimethylformamide. *Synthesis* **1973**, 1973, (06), 361-362.
- 102 van der Vleugel, D. J. M.; van Heeswijk, W. A. R.; Vliegthart, J. F. G., A facile preparation of alkyl [alpha]-glycosides of the methyl ester of N-acetyl-neuraminic acid. *Carbohydr. Res.* **1982**, 102, (1), 121-130.
- 103 Giordano, C.; Pedone, F.; Fattibene, P.; Cellai, L., Oligonucleotide Labeling: Synthesis of a New Spin-Labeled 2'-Deoxyguanosine Analogue. *Nucleos. Nucleot. Nucl.* **2000**, 19, (8), 1301 - 1310.
- 104 Neffe, A. T.; Bilanz, M.; Meyer, B., Synthesis and optimization of peptidomimetics as HIV entry inhibitors against the receptor protein CD4 using STD NMR and ligand docking. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4, (17), 3259-3267.
- 105 Subramanian, L. M.; Misra, G. S., Synthesis of Naphthopyranoisoxazoles and Naphthopyranopyrazoles via Cyanoethylation. *Synthesis* **1984**, (12), 3.
- 106 Zemplén, G.; Kunz, A., Über die Natriumverbindungen der Glucose und die Verseifung der acylierten Zucker. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1923**, 56, (7), 1705-1710.
- 107 Zemplén, G.; Pacsu, E., Über die Verseifung acetylierter Zucker und verwandter Substanzen. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1929**, 62, (6), 1613-1614.
- 108 Mayer, M.; Meyer, B., Characterization of Ligand Binding by Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, (12), 1784-1788.
- 109 Meyer, B.; Peters, T., NMR Spectroscopy Techniques for Screening and Identifying Ligand Binding to Protein Receptors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, (8), 864-890.
- 110 Pritchett, T. J.; Brossmer, R.; Rose, U.; Paulson, J. C., Recognition of monovalent sialosides by influenza virus H3 hemagglutinin. *Virology* **1987**, 160, (2), 502-506.
- 111 Fischer, E., Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1894**, 27, (3), 2985-2993.
- 112 Koshland, D. E., Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1958**, 44, (2), 98-104.
- 113 Ma, B.; Kumar, S.; Tsai, C.-J.; Nussinov, R., Folding funnels and binding mechanisms. *Protein Eng.* **1999**, 12, (9), 713-720.
- 114 Tsai, C.-J.; Ma, B.; Nussinov, R., Folding and binding cascades: Shifts in energy landscapes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, (18), 9970-9972.
- 115 Berger, C.; Weber-Bornhauser, S.; Eggenberger, J.; Hanes, J.; Plückthun, A.; Bosshard, H. R., Antigen recognition by conformational selection. *FEBS Lett.* **1999**, 450, (1-2), 149-153.
- 116 Baum, B.; Muley, L.; Smolinski, M.; Heine, A.; Hangauer, D.; Klebe, G., Non-additivity of Functional Group Contributions in Protein-Ligand Binding: A Comprehensive Study by Crystallography and Isothermal Titration Calorimetry. *J. Mol. Biol.* **2010**, 397, (4), 1042-1054.
- 117 Reid, A. H.; Taubenberger, J. K.; Fanning, T. G., Evidence of an absence: the genetic origins of the 1918 pandemic influenza virus. *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, 2, (11), 909-914.
- 118 Taubenberger, J. K.; Reid, A. H.; Lourens, R. M.; Wang, R.; Jin, G.; Fanning, T. G., Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. *Nature* **2005**, 437, (7060), 889-893.

8 Literaturverzeichnis

- 119 Scholtissek, C.; Rohde, W.; Von Hoyningen, V.; Rott, R., On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2. *Virology* **1978**, 87, (1), 13-20.
- 120 Kawaoka, Y.; Krauss, S.; Webster, R. G., Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *J. Virol.* **1989**, 63, (11), 4603-4608.
- 121 Ha, Y.; Stevens, D. J.; Skehel, J. J.; Wiley, D. C., 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), 11181-11186.
- 122 Madhavi Sastry, G.; Adzhigirey, M.; Day, T.; Annabhimoju, R.; Sherman, W., Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *J. Comput. Aid. Mol. Des.* **2013**, 27, (3), 221-234.
- 123 Friesner, R. A.; Banks, J. L.; Murphy, R. B.; Halgren, T. A.; Klicic, J. J.; Mainz, D. T.; Repasky, M. P.; Knoll, E. H.; Shelley, M.; Perry, J. K.; Shaw, D. E.; Francis, P.; Shenkin, P. S., Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, (7), 1739-1749.
- 124 Halgren, T. A.; Murphy, R. B.; Friesner, R. A.; Beard, H. S.; Frye, L. L.; Pollard, W. T.; Banks, J. L., Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 2. Enrichment Factors in Database Screening. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, (7), 1750-1759.
- 125 Friesner, R. A.; Murphy, R. B.; Repasky, M. P.; Frye, L. L.; Greenwood, J. R.; Halgren, T. A.; Sanschagrin, P. C.; Mainz, D. T., Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein-Ligand Complexes. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, (21), 6177-6196.
- 126 Schrödinger, Glide Fragment Library. Webseite: <http://www.schrodinger.com/Glide/Fragment-Library>, aufgerufen
- 127 Jacobson, M. P.; Friesner, R. A.; Xiang, Z.; Honig, B., On the Role of the Crystal Environment in Determining Protein Side-chain Conformations. *J. Mol. Biol.* **2002**, 320, (3), 597-608.
- 128 Jacobson, M. P.; Pincus, D. L.; Rapp, C. S.; Day, T. J. F.; Honig, B.; Shaw, D. E.; Friesner, R. A., A hierarchical approach to all-atom protein loop prediction. *Proteins* **2004**, 55, (2), 351-367.
- 129 Bowers, K. J.; Chow, E.; Xu, H.; Dror, R. O.; Eastwood, M. P.; Gregersen, B. A.; Klepeis, J. L.; Kolossvary, I.; Moraes, M. A.; Sacerdoti, F. D.; Salmon, J. K.; Shan, Y.; Shaw, D. E. In *Proceedings of the 2006 ACM/IEEE conference on Supercomputing*, Tampa, Florida, 2006; ACM: Tampa, Florida, 2006; 746.
- 130 Guo, Z.; Mohanty, U.; Noehre, J.; Sawyer, T. K.; Sherman, W.; Krilov, G., Probing the α -Helical Structural Stability of Stapled p53 Peptides: Molecular Dynamics Simulations and Analysis. *Chem. Biol. Drug Des.* **2010**, 75, (4), 348-359.
- 131 Shivakumar, D.; Williams, J.; Wu, Y.; Damm, W.; Shelley, J.; Sherman, W., Prediction of Absolute Solvation Free Energies using Molecular Dynamics Free Energy Perturbation and the OPLS Force Field. *J. Chem. Theory Comput.* **2010**, 6, (5), 1509-1519.
- 132 Gill, S. C.; von Hippel, P. H., Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **1989**, 182, (2), 319-326.
- 133 Gill, S. C.; von Hippel, P. H., Peptide Property Calculator. Webseite: <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/proteincalc.html>, aufgerufen **Oktober 2015**.

8 Literaturverzeichnis

- 134 Cheng, Y.-C.; Prusoff, W. H., Relationship between the inhibition constant (KI) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **1973**, 22, (23), 3099-3108.
- 135 Weissman, S. A.; Lewis, S.; Askin, D.; Volante, R. P.; Reider, P. J., Efficient synthesis of N-arylpiperazinones via a selective intramolecular Mitsunobu cyclodehydration. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, (41), 7459-7462.

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Vater, der mich über die Jahre stets unterstützte und mir dadurch ermöglichte, meinen Weg nach meinen Vorstellungen zu gestalten.

Meinen Freunden, die trotz der teilweise wenigen Zeit, die ich für sie hatte, immer für mich da waren und den Zusammenhalt, der nach all den vielen Jahren unseren Freundeskreis zu etwas ganz besonderem machen.

Friederike Röhrs für die Freundschaft und die gegenseitige Vertrautheit.

Sophie Zimmermann für die wundervolle gemeinsame Zeit, die vielen Reisen und Unternehmungen und den nicht zu verleugnenden positiven Einfluss auf mein Leben.

Den bereits erleuchteten und noch zu erleuchtenden Mitgliedern des AKs BM:

- Anna-Lena Giertz für die beeindruckenden Leistungen im Rahmen ihrer Bachelorarbeit und des Synthesepraktikums, den vielen Spaß im Laboralltag und die unglaubliche Fähigkeit so gut mit meiner seltsamen Version von Humor auszukommen.
- Moritz Waldmann für seine unvergleichliche Art die Gruppe zu beleben und den vielen Spaß bei allen Unternehmungen von der Driving Range bis nach Tokio.
- Ilona Grüneberg für die unzähligen Synthesen, Säulen und natürlich ihr Wirken als die gute Seele des AKs. Ohne ihren Einsatz hätte die Organisation so mancher Veranstaltung in purem Chaos geendet.
- Insa Kühn, auch Dir danke ich für viele Synthesen und Hilfen bei meiner Arbeit. Deine „Da ist noch Luft nach oben“-Einstellung und deine Fröhlichkeit haben mir unheimlich imponiert und so manchen Tag aufgeheitert.
- Alexander Stark und Wei-Nien Liao für die gute gemeinsame Zeit in der 20. Es war sicher immer ein Labor mit seinem ganz eigenen Charm.
- Felix Niemeyer für die gehörige Portion Verrücktheit und den damit verbundenen Spaß. Des Weiteren danke ich dir und Tim Nagel, für die Einweisung an unseren NMR-Spektrometern.
- Patrizia Leccese für die vielen Hilfen bei SPR/STD und die immer mal wieder notwendigen Ablenkungen vom Zusammenschreiben.

9 Danksagung

- Moritz Fölsing für die Einweisung in die STD-NMR-Spektroskopie.
- Martin Hollinger für die hervorragende Vorarbeit, die er im Rahmen seiner Doktorarbeit geleistet hat.
- Martin Wienke für die unzähligen Gespräche über die wichtigen und unwichtigen Dinge des Lebens.
- Nicolle Dade für ihre Leistungen im Rahmen ihrer Bachelorarbeit.
- Brita Werner für die tolle Assistentenzeit im OC-Grund, die vielen Flurgespräche und nicht zuletzt für all die Kalorien in Form von Waffeln, Burgern und Süßigkeiten.
- Dirk Rehders und Dennis Wilhelm unter anderem für die Einführung in die haute cuisine du Schnitzel.
- Meinen Praktikanten Anna Drescher, Anke Bollen, Benjamin Bockelmann, Charlotte Feldhoff, Eugen Koch, Galina Kokorin, Mazlum Yesilmen, Thiago Dinis de Oliveira.
- Anna-Lena Giertz, Claas Strecker, Gudrun Parsons, Jan-Mirco Schulz, Raffael Jirmann, Sophie Zimmermann für das Korrekturlesen dieser Arbeit.
- Allen weiteren Mitgliedern für das beste Arbeitsklima, das man sich nur wünschen kann. Euretwegen musste ich mich nicht nur nie zur Arbeit schleppen, sondern bin sogar gegangen, wenn ich eigentlich zuhause oder im Krankenhaus liegen sollte.

Thies Köhli und Sophie Weißbach für die unzähligen Hilfen während meiner SPR-Messungen und der ganzen Arbeitsgruppe Peters für die freundliche Aufnahme während dieser Zeit.

Thomas Hackl und seinem NMR-Team für den riesigen Stapel an Spektren, die sie gemessen haben und im besonderen Vera Priegnitz für den ein oder anderen Scan mehr und das vereinzelte Vordrängeln.

Maria Riedner und ihrem MS-Team für das Wiegen meiner Moleküle.

Christian Schmidt, Sören Ziehe und dem gesamten IT-Service für die unkomplizierte, gute Zusammenarbeit und dafür, dass Hilfe immer nur ein kurzes Telefonat entfernt war.

Allen Arbeitskreisen des Instituts für Organische Chemie für all die „geliehenen“ Chemikalien und die Messzeit an ihren Gerätschaften.

10 Lebenslauf

10 Lebenslauf

Name	Karsten Marco Dieter Winkel
Geburtstag, –ort	19.02.1983, Hamburg
Nationalität	deutsch

Ausbildung

10/2010-06/2016	Doktorarbeit: „Design, Synthese und Analyse von Inhibitoren des Hämagglutinins der aviären Influenza H5N1“ am Institut für organische Chemie, Universität Hamburg betreut durch Prof. Dr. B. Meyer.
09/2009-06/2010	Diplomarbeit: „Untersuchungen zur Synthese modifizierter Sialinsäure-glycoside als Bausteine für potentielle Inhibitoren des Hämagglutinins des Influenzavirus H5N1“ am Institut für organische Chemie, Universität Hamburg betreut durch Prof. Dr. B. Meyer, Note: sehr gut
07/2010	Diplomhauptprüfungen, Gesamtnote: sehr gut
10/2003-06/2010	Studium der Chemie an der Universität Hamburg
02/2006	Diplomvorprüfungen, Gesamtnote: sehr gut
10/2002-06/2003	Grundwehrdienst bei der Bundeswehr im ABC-Abwehr-Bataillon 610
1993-2002	Gymnasium Dörpsweg, Hamburg
2002	Abitur, Gesamtnote: 1.9

10 Lebenslauf

Berufliche Erfahrungen

10/2009-03/2014	Betreuer im kleinen chemischen Praktikum für Naturwissenschaftler und in den Praktika der Allgemeinen Chemie für Studierende der Human- und der Zahnmedizin
10/2010-09/2013	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Fachbereich Chemie der Universität Hamburg
05/2010	Studentische Hilfskraft im Praktikum für Struktur-Biochemie
12/2009-02/2010	Studentische Hilfskraft im NMR-Service der organischen Chemie

Teilnahme an Konferenzen

07/2013	„17th European Carbohydrate Symposium“ in Tel Aviv, Israel • Posterpräsentation: „Design, Synthesis and Analysis of Ligands of Hemagglutinin H5 of Avian Influenza“
---------	--

11 Erklärungen

11 Erklärungen

11.1 Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.

Karsten Winkel

Hamburg, den 02.05.2016

11.2 Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich, dass vorher keine weiteren Promotionsversuche unternommen worden sind, oder an einer anderen Stelle vorgelegt wurden.

Karsten Winkel

Hamburg, den 02.05.2016