

# Design und Untersuchungen zur Synthese von trivalenten Inhibitoren des Hämagglutinins von Influenzaviren

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
am Institut für Organische Chemie im Fachbereich Chemie  
der Universität Hamburg

vorgelegt von

**Anna-Lena Giertz**

aus Hamburg

2021



1. Gutachter: Prof. Dr. Bernd Meyer

2. Gutachter: Prof. Dr. Christian B. W. Stark

Tag der Disputation: 4. März 2022

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2014 bis Oktober 2021 im Arbeitskreis von Prof. Dr. Bernd Meyer am Institut für Organische Chemie im Fachbereich Chemie der Universität Hamburg, Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. Christian B. W. Stark, durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Bernd Meyer danke ich für die interessante Themenstellung sowie für die wertvolle und stets motivierende Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Christian B. W. Stark danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>5</b>
<b>3</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>7</b>
<b>3.1</b>	<b>Influenza.....</b>	<b>8</b>
3.1.1	Nomenklatur und Aufbau von Influenza A-Viren.....	9
3.1.2	Replikationszyklus .....	11
<b>3.2</b>	<b>Aviäre Influenza .....</b>	<b>13</b>
<b>3.3</b>	<b>Hämagglutinin .....</b>	<b>14</b>
3.3.1	Influenzawirkstoffe - Hämagglutinininhibitoren .....	16
<b>3.4</b>	<b>Arzneimittelforschung und Protein-Ligand-Wechselwirkungen .....</b>	<b>19</b>
3.4.1	Arten von Protein-Ligand-Wechselwirkungen .....	21
3.4.2	Prodrugs - Resorptionsester.....	23
<b>3.5</b>	<b>Multivalenz.....</b>	<b>24</b>
3.5.1	Monovalente vs. Multivalente Wechselwirkungen .....	25
3.5.2	Aufbau und Funktion multivalenter Liganden - Topologie multivalenter Bindungen ..	27
3.5.3	Bindungsmechanismen multivalenter Liganden.....	30
3.5.4	Kooperative Bindungsverstärkung aufgrund von Rückbindungseffekten als Grundlage hochaffiner multivalenter Binder.....	31
<b>4</b>	<b>METHODEN.....</b>	<b>33</b>
<b>4.1</b>	<b><i>Molecular Modeling</i>.....</b>	<b>33</b>
<b>4.2</b>	<b>Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) .....</b>	<b>34</b>
<b>5</b>	<b>AUFGABENSTELLUNG .....</b>	<b>39</b>
<b>6</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....</b>	<b>41</b>
<b>6.1</b>	<b>Molecular Modeling - Vorbereitung der <i>in silico</i> Studien.....</b>	<b>41</b>
6.1.1	Modellierung eines trimeren Hämagglutinins .....	41
6.1.2	Untersuchung der Rezeptorbindungsdomänen des H5.....	42

<b>6.2</b>	<b>Design von Liganden für das Hämagglutinin H5 und <i>in silico</i> Studien .....</b>	<b>45</b>
6.2.1	Design eines trivalenten Liganden – Variation der Linkerlänge .....	46
6.2.2	<i>In silico</i> Bindungsmodus des Liganden <b>1</b> .....	49
6.2.3	Design weiterer trivalenter Liganden – Variation der Fragmente.....	51
6.2.4	<i>In silico</i> Bindungsmodi der Liganden <b>3</b> und <b>4</b> , sowie Überprüfung auf die Eignung als potenzielle Inhibitoren des Hämagglutinins H5 .....	52
6.2.5	Moleküldynamik-Simulationen (MD) .....	56
<b>6.3</b>	<b>Biacore - SPR .....</b>	<b>72</b>
6.3.1	Etablierung eines SPR-Basisassays für Hämagglutinin H5 und Überprüfung des Systems mit Neu5Ac $\alpha$ 2Me .....	73
<b>6.4</b>	<b>Retrosyntheseplan und Weiterentwicklung der Syntheserouten .....</b>	<b>77</b>
6.4.1	Retrosynthesen der multivalenten Leitstrukturen.....	77
6.4.2	Retrosynthesen der Bausteine .....	85
<b>6.5</b>	<b>Synthesen .....</b>	<b>89</b>
6.5.1	Synthese der Azid-geschützten Linkerbausteine <b>6</b> und <b>17</b> , sowie der Boc-geschützten Analoga <b>10</b> und <b>24</b> .....	89
6.5.2	Synthese des aromatischen <i>core</i> -Bausteins <b>7</b> und des Neuraminsäure-Bausteins <b>5</b> ....	95
6.5.3	Kupplungsreaktionen.....	97
<b>7</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL.....</b>	<b>109</b>
<b>7.1</b>	<b>Verwendete Geräte .....</b>	<b>109</b>
<b>7.2</b>	<b>Verwendete Software.....</b>	<b>110</b>
<b>7.3</b>	<b>Verwendete Chemikalien .....</b>	<b>110</b>
<b>7.4</b>	<b>Molecular modeling .....</b>	<b>112</b>
7.4.1	Vorbereitung der Kristallstrukturen - Protein Preparation Wizard (PPW).....	112
7.4.2	Modelling einer trimeren Hämagglutininstruktur mittels Protein Structure Alignment (PSA) .....	113
7.4.3	Ligand modeling – Minimization .....	114
7.4.4	Ligand modeling – MM-GBSA.....	115
7.4.5	Ligand modeling – Macro Model.....	116
7.4.6	Moleküldynamik-Simulationen (MD) .....	116

<b>7.5</b>	<b>Biacore - SPR.....</b>	<b>118</b>
7.5.1	Immobilisierung des Hämagglutinins H5.....	118
7.5.2	Durchführung der Messungen und Auswertung.....	119
<b>7.6</b>	<b>Synthesen und Charakterisierungen .....</b>	<b>120</b>
7.6.1	Darstellung von 11-(Tosyloxy)-3,6,9-trioxaundecan-1-ol ( <b>22</b> ) <sup>120, 121</sup> .....	120
7.6.2	Darstellung von 11-Azido-3,6,9-trioxaundecan-1-ol ( <b>20</b> ) <sup>80, 120</sup> .....	122
7.6.3	Darstellung von <i>tert</i> -Butyl 14-Azido-3,6,9,12-tetraoxatradecanoat ( <b>18</b> ) <sup>119</sup> .....	123
7.6.4	Darstellung von 14-Azido-3,6,9,12-tetraoxatetradecansäure ( <b>6</b> ) <sup>118, 119</sup> .....	125
7.6.5	Darstellung von <i>tert</i> -Butyl 14-Amino-3,6,9,12-tetraoxatetradecanoat ( <b>10</b> ).....	127
7.6.6	Darstellung von <i>tert</i> -Butyl 29-Azido-16-oxo-3,6,9,12,18,21,24,27-octaoxa-15- azanonacosanoat ( <b>32</b> ) .....	128
7.6.7	Darstellung von <i>tert</i> -Butyl 29-Amino-16-oxo-3,6,9,12,18,21,24,27-octaoxa-15- azanonacosanoat ( <b>8</b> ) .....	130
7.6.8	Darstellung von 8-(Tosyloxy)-3,6-dioxaoctan-1-ol ( <b>23</b> ) <sup>116, 117, 120</sup> .....	131
7.6.9	Darstellung von 8-Azido-3,6-dioxaoctan-1-ol ( <b>21</b> ) <sup>120</sup> .....	133
7.6.10	Darstellung von <i>tert</i> -Butyl 11-Azido-3,6,9-trioxaundecanoat ( <b>19</b> ) <sup>119</sup> .....	134
7.6.11	Darstellung von 11-Azido-3,6,9-trioxaundecansäure ( <b>17</b> ) .....	136
7.6.12	Darstellung von <i>tert</i> -Butyl 11-Amino-3,6,9-trioxaundecanoat ( <b>24</b> ).....	138
7.6.13	Darstellung von <i>tert</i> -Butyl 23-Azido-13-oxo-3,6,9,15,18,21-hexaoxa-12-azatricosanoat ( <b>31</b> ) .....	139
7.6.14	Darstellung von <i>tert</i> -Butyl 23-Amino-13-oxo-3,6,9,15,18,21-hexaoxa-12-azatricosanoat ( <b>9</b> ) .....	140
7.6.15	Darstellung von Methyl-(5-acetamido-3,5-didesoxy- $\alpha$ -D- <i>glycero</i> -D- <i>galacto</i> -2- nonulopyranosid)onat ( <b>14</b> ) <sup>106-108</sup> .....	141
7.6.16	Darstellung von Methyl-(5-acetamido-2,4,7,8,9-tetra- <i>O</i> -acetyl-3,5-didesoxy- $\beta$ -D- <i>glycero</i> -D- <i>galacto</i> -2-nonulopyranosid)onat ( <b>13</b> ) <sup>106-108</sup> .....	142
7.6.17	Darstellung von Methyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra- <i>O</i> -acetyl-3,5-didesoxy- $\beta$ -D- D- <i>galacto</i> -2-nonulopyranosylchlorid)onat ( <b>12</b> ) <sup>106-108</sup> .....	143
7.6.18	Darstellung von Methyl-[ <i>n</i> -hex-5-enyl-(5-acetamido-4,7,8,9- tetra- <i>O</i> -acetyl-3,5- didesoxy-D- <i>glycero</i> - $\alpha$ -D- <i>galacto</i> -2-nonulopyranosid)]onat ( <b>11</b> ) <sup>51, 109, 110</sup> .....	145
7.6.19	Darstellung von Methyl-[ <i>n</i> -pent-5-ylsäure-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra- <i>O</i> -acetyl-3,5- didesoxy-D- <i>glycero</i> - $\alpha$ -D- <i>galacto</i> -2-nonulopyranosid)]onat ( <b>5</b> ) <sup>51, 111, 112</sup> .....	147

7.6.20	Darstellung von Methyl-(methyl-5-acetamido-3,5-didesoxy- $\alpha$ -D- <i>glycero</i> -D- <i>galacto</i> -2-nonulopyranosid)onat <sup>106, 126, 127</sup> .....	149
7.6.21	Darstellung von Methyl-5-acetamido-3,5-didesoxy- $\alpha$ -D- <i>glycero</i> -D- <i>galacto</i> -2-nonulopyranosidonsäure <sup>106, 126, 127</sup> .....	151
7.6.22	Darstellung von <i>N</i> -( <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl)-1,6- diaminohexan ( <b>16</b> ) <sup>115</sup> .....	153
7.6.23	<i>N</i> <sup>1</sup> , <i>N</i> <sup>3</sup> , <i>N</i> <sup>5</sup> -Tris(6- <i>tert</i> -butyloxycarbonylaminohex-1-yl)-1,3,5-benzentricarbonsäureamid ( <b>15</b> ) <sup>113, 114</sup> .....	154
7.6.24	Darstellung von <i>N</i> <sup>1</sup> , <i>N</i> <sup>3</sup> , <i>N</i> <sup>5</sup> -Tris(1-azido-14-oxo-3,6,9,12-tetraoxa-15-azahenicosan-21-yl)-1,3,5-benzentricarbonsäureamid ( <b>26</b> ).....	155
7.6.25	Darstellung von <i>N</i> <sup>1</sup> , <i>N</i> <sup>3</sup> , <i>N</i> <sup>5</sup> -Tris(1-azido-11-oxo-3,6,9-trioxa-12-azaoctadecan-18-yl)-1,3,5-benzentricarbonsäureamid ( <b>25</b> ).....	157
7.6.26	Darstellung von <i>N</i> <sup>1</sup> , <i>N</i> <sup>3</sup> , <i>N</i> <sup>5</sup> -Tris(1-amino-14-oxo-3,6,9,12-tetraoxa-15-azahenicosan-21-yl)-1,3,5-benzentricarbonsäureamid ( <b>28</b> ).....	159
7.6.27	Darstellung von <i>N</i> <sup>1</sup> , <i>N</i> <sup>3</sup> , <i>N</i> <sup>5</sup> -Tris(1-amino-11-oxo-3,6,9-trioxa-12-azaoctadecan-18-yl)-1,3,5-benzentricarbonsäureamid ( <b>27</b> ).....	161
7.6.28	Darstellung von <i>tert</i> -Butyl 14-Amino-3,6,9,12-tetraoxatetradecan-[methyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra- <i>O</i> -acetyl-3,5-didesoxy-D- <i>glycero</i> - $\alpha$ -D- <i>galacto</i> -2-nonulopyranosyl)onat- <i>n</i> -5-oxypentanoyl]onat ( <b>33</b> ).....	162
7.6.29	Darstellung des Trisialosids des <i>N</i> <sup>1</sup> , <i>N</i> <sup>3</sup> , <i>N</i> <sup>5</sup> -Trihexylbenzen-1,3,5-tricarbonsäureamids ( <b>3a</b> ).....	164
7.6.30	Darstellung des Trisialosids des <i>N</i> <sup>1</sup> , <i>N</i> <sup>3</sup> , <i>N</i> <sup>5</sup> -Trihexylbenzen-1,3,5-tricarbonsäureamids ( <b>4a</b> ).....	166
<b>8</b>	<b>TOXIKOLOGISCHE DATEN .....</b>	<b>169</b>
<b>9</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>175</b>
<b>10</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>183</b>
<b>11</b>	<b>EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>185</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
1D	eindimensional
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
abs.	absolut
Ac	Acetyl
arom.	aromatisch
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
bs	breites Singulett
$\delta$	chemische Verschiebung
CRD	<i>carbohydrate recognition domain</i>
d	Dublett
dd	Dublett vom Dublett
dq	Dublett vom Quartett
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
eq	Äquivalent
ESI-MS	Elektrospray-Ionisation Massenspektrometrie
Et	Ethyl
EtOAc	Ethylacetat
Gl.	Gleichung
GPC	Gel-Permeations-Chromatographie
gr.	griechisch
H5	Hämagglutinin (Subtyp 5) des Influenza A-Virus
HA	Hämagglutinin

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
HPAI	<i>high pathogenic avian influenza</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
$K_A$	Assoziationskonstante
$K_D$	Dissoziationskonstante
$K_I$	inhibitorische Konstante
lat.	lateinisch
<i>LigPlot</i>	<i>ligand interaction plot</i>
LPAI	<i>low pathogenic avian influenza</i>
M1	Matrixprotein 1
M2	Matrixprotein 2
m	Multiplett
MD	<i>molecular dynamics</i>
MS	Massenspektrometrie
NA	Neuraminidase
Nd	Niederschlag
Neu5Ac	<i>N-Acetylneuraminsäure</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NP	<i>normal phase</i>
PDB	<i>protein data bank</i>
PE	Petrolether
RBD	Rezeptorbindungsdomäne
$R_f$	Retentionsfaktor
RMSD	<i>root mean square deviation</i>
RP	<i>reverse phase</i>
RU	<i>response units</i>
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
SPR	<i>surface plasmon resonance</i>
t	Triplett
Tab.	Tabelle

Abkürzung	Bedeutung
TEG	Tetraethylenglycol
THF	Tetrahydrofuran
Tol	Toluol
TRG	Triethylenglycol
TsCl	<i>para</i> -Toluolsulfonsäurechlorid
WHO	<i>world health organization</i>

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



## 1 Zusammenfassung

Die COVID-19 Pandemie ist der momentane Höhepunkt einer Reihe von Pandemien unter Menschen, die durch hoch infektiöse Virenstämme verursacht werden. In der jüngeren Geschichte war hauptsächlich das hochansteckende Influenzavirus, das Infektionskrankheiten des humanen Respirationstraktes auslöst, für vier große Pandemien verantwortlich, von denen die Spanische Grippe (1918 - 1920) mit 20 bis 50 Millionen Toten als die bisher verheerendste durch Viren ausgelöste Pandemie gilt. Die aviäre Influenza wiederum ist seit vielen Jahren vor allem in afrikanischen und asiatischen Ländern für epidemische Ausbrüche der Vogelgrippe unter Nutzgeflügel verantwortlich. Auch in Deutschland sind seit 2006 immer wieder Fälle von infizierten Tieren zu verzeichnen, die auf eine Übertragung durch Wildvögel während des saisonalen Vogelzugs zurückzuführen sind.<sup>1</sup> Bei infizierten Tieren verursacht die hochpathogene Form der Viren (HPAI) eine spontan einsetzende schwere Erkrankung, die nach kurzer Dauer eine Mortalitätsrate von fast 100 % besitzt. Seit 1997 sind zudem wiederholt Fälle einer Übertragung des Virus auf Menschen verzeichnet worden, in denen das Virus eine Mortalitätsrate von mehr als 50 % aufweist.<sup>2</sup> Die Infektion beginnt mit dem Hämagglutinin H5, welches für den Primärkontakt zwischen Virus und Wirtszelle verantwortlich ist und die Bindung an  $\alpha$ 2,3-glycosidisch verknüpfte Sialinsäurereste auf der Oberfläche der Epithelzellen im oberen Bereich des respiratorischen Traktes präferiert. Diese Präferenz ist der Hauptgrund einer bisher ausbleibenden humanen Pandemie, da menschliche Epithelzellen des oberen Respirationstraktes hauptsächlich  $\alpha$ 2,6-verknüpfte Sialinsäurereste präsentieren, wodurch Infektionen nur bei einer sehr hohen Viruskonzentration beobachtet wurden. Eine Mutation dieses hoch pathogenen Virus oder ein genetisches Reassortment mit anderen hoch infektiösen Virenstämmen könnten jedoch eine Adaption an menschliche Zellen und somit auch eine Mensch-zu-Mensch Übertragung ermöglichen.

Bei der Bekämpfung von Influenza gibt es unterschiedliche Ansätze. Zum einen die Vakzinierung gegen Influenzaviren zur Vermeidung einer Infektion und zum anderen verschiedene antivirale Medikamente zur Therapie bei einer bereits erfolgten Ansteckung. Bei der Behandlung mit antiviralen Wirkstoffen ist, neben der Hemmung der Endonuklease, des Matrixproteins M2 oder der Neuraminidase, die Inhibition des Hämagglutinins ein äußerst

vielversprechender Ansatzpunkt, um den Replikationszyklus der Viren zu unterbrechen. Dabei wird durch hochaffine Liganden die Rezeptorbindungsdomäne (RBD) des Proteins besetzt und so bereits das initiale Binden des Virus an die Wirtszelle verhindert. Da das Hämagglutinin H5 ein homotrimeres Lektin ist, besteht neben der Entwicklung von modifizierten Analoga des natürlichen Bindungsepitops die Möglichkeit, verschiedene multivalente Konzepte zur Affinitätssteigerung zu nutzen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, neue Konzepte für die Herstellung von trivalenten Liganden mit einfachen biokompatiblen Oligoethylenglykolresten als Spacer zu entwickeln. Basierend auf den Kristallstrukturen eines monomeren Hämagglutinins H5, welches mit dem nativen Bindungsepitop des Proteins kokristallisiert vorlag, und eines trimeren Hämagglutinins H5, wurden *in silico* Liganden entwickelt, die das Potential haben als *entry*-Inhibitoren den Infektionszyklus von aviären Influenzaviren zu blockieren. Aufgrund der  $C_3$ -Symmetrie des homotrimeren Hämagglutinins wurden zunächst trivalente Liganden mit Sialinsäuren als terminale antigene Bausteine und Oligoethylenglycolfragmenten als Spacer zum Binden aller drei Bindungstaschen erstellt. *In silico* wurde der Bindungsmodus des trivalenten Liganden **1** analysiert und in einer Moleküldynamik-Simulation (MD) validiert. Es konnte gezeigt werden, dass in dem der Simulation zugrundeliegende Modell das Binden aller Kohlenhydratbindungsstellen (*carbohydrate recognition domains*, CRD) gleichzeitig möglich ist und nicht durch negative Effekte gestört wird. Es zeigte sich allerdings auch, dass der Ligand aufgrund seiner ungewöhnlich langen Linkerstrukturen eine hohe Flexibilität besitzt, wodurch sich teilweise unspezifische Wechselwirkungen entlang der Proteinoberfläche ausbildeten. Auf Basis dieses trimeren Liganden wurden anschließend *in silico* die Liganden **3** und **4** entwickelt, welche sich andere multivalente Effekte zur Steigerung der Bindungsaffinität zu Nutzen machen sollten. Für diese Liganden wurden ebenfalls MD-Simulationen durchgeführt und ausgewertet. Die Ergebnisse der Computersimulationen dienten als Grundlage für die Entwicklung von Synthesestrategien zur Darstellung  $C_3$ -symmetrischer Liganden auf Basis der Bausteine *core*, Linker und Bindungsepitop.

Es konnten alle wichtigen Fragmente in meist guten Ausbeuten synthetisiert und zuverlässige Syntheserouten für die Linkerstrukturen in verschiedenen Längen etabliert werden. Die Realisierung der Synthese des Liganden **1** gelang dabei wegen Ausbeute- und Reinigungsproblemen allerdings nicht in reiner Substanz. Sowohl die erfolgreich

durchgeführten Synthesen als auch die Reinigung und Charakterisierung der Fragmente wurde für eine Anwendung des Konzeptes auf vergleichbare Systeme angepasst. Die Liganden **3** und **4** konnten als Vertreter der  $C_3$ -symmetrischen Liganden zudem erfolgreich in ihrer geschützten Variante dargestellt werden.



## 2 Abstract

The COVID-19 pandemic is the current pinnacle in a series of human pandemics caused by highly contagious viruses. In recent history they were mostly due to highly contagious influenza viruses that cause infections of the upper human respiratory tract. Four major pandemics occurred with the Spanish Flu (1918 - 1920) being the most devastating, causing 20 to 50 million deaths. Avian influenza has been known for number of years in African and Asian countries to cause epidemics of bird flu among poultry. In Germany returned cases of infected birds have been observed most of them caused by wild birds during the seasonal migration.<sup>1</sup> Animals infected with the highly pathogenic form of the virus (HPAI) developed a severe disease that leads to a mortality of about 100 %. Since 1997 many cases of human infection with the mortality rate of well over 50 % have been observed.<sup>2</sup> The infection starts with the hemagglutinin H5 of the virus binding to the  $\alpha$ 2,3-linked sialic acid residues on the surface of epithelial cells in the upper respiratory tract. In contrast to birds,  $\alpha$ 2,6-linked sialic acid residues are found in the respiratory tract of humans. This difference has probably prevented the outbreak of a human pandemic. Mutations of the highly pathogenic viruses or a genetic reassortment with other highly infectious viruses could easily lead to an adaptation to the epitopes on human cells and facilitate human to human transmission.

There are different approaches to controlling influenza. On the one hand, vaccination against influenza viruses to prevent infection and, on the other hand, various antiviral drugs for therapy of already infected individuals. In addition to inhibition of the endonuclease, the matrix protein M2 and the neuraminidase, inhibition of the hemagglutinin is an extremely promising approach to interrupt the replication cycle of the viruses. High-affinity ligands occupy the receptor-binding domain (RBD), thus preventing already the initial binding of the virus to the host cell. Hemagglutinin H5 as a homotrimeric lectin allows development of modified analogues of the natural binding epitope as well as testing of various multivalent concepts for affinity enhancement.

Goal of the present dissertation has been the development of new concepts for trivalent ligands based on biocompatible oligoethyleneglycol residues as a spacer. Based on the crystal structures of a monomeric hemagglutinin H5, which was co-crystallized with the native

binding epitope of the protein, and of a trimeric hemagglutinin H5, potential ligands were developed that have the potential to block as entry inhibitors the avian influenza virus infection cycle. Because of the  $C_3$ -symmetry of homotrimeric hemagglutinin, trivalent ligands were designed that terminate in sialic acid residues and have oligoethyleneglycol spacers to reach all three binding pockets. *In silico*, the binding mode of ligand **1** was analyzed and validated in a molecular dynamics (MD) simulation. It was shown that in the model underlying the simulation, binding of all carbohydrate recognition domains (CRD) simultaneously is possible and is not disturbed by negative effects. However, the ligand was also found to have high flexibility due to its unusually long linker structures, resulting in the partial formation of nonspecific interactions along the protein surface. Based on this trimeric ligand, ligands **3** and **4** were subsequently designed *in silico* to take advantage of further multivalent effects to increase binding affinity. MD simulations were also performed and evaluated for these ligands. The results of the simulations served as a basis for the development of synthesis strategies for the preparation of  $C_3$ -symmetric ligands based on the building blocks core, linker, and binding epitope.

All relevant fragments could be synthesized in mostly good yields and reliable synthesis routes for the linker structures in different lengths could be established. However, the final syntheses of ligand **1** as a pure molecule was not successful because of problems in yields and purification. The successful syntheses as well as the purification and characterization of the fragments were adapted for a broader application of the concept to comparable systems. Moreover, ligands **3** and **4**, as representatives of the  $C_3$ -symmetric ligands, could be successfully synthesized in their protected variant.

### 3 Einleitung

In Zeiten des Coronavirus SARS-CoV-2, welches das alltägliche Leben gewandelt hat, wird einmal mehr deutlich, welches Gefahrenpotential von Viren ausgeht. Doch nicht erst seit COVID-19 sind immer wieder Viren für verheerende Pandemien unter den Menschen verantwortlich. Dabei gibt es Erreger aus verschiedenen Virusfamilien die unterschiedliche aber teilweise sehr schwerwiegende Infektionen auslösen. Das ausschließlich humanpathogene Masernvirus zum Beispiel gehört der Familie der Paramyxoviridae an. Der Erreger des schweren akuten Atemwegssyndroms (*severe acute respiratory syndrome coronavirus*, SARS) hingegen gehört, wie auch das aktuell grassierende Virus der COVID-19-Pandemie, der Familie der Coronaviridae an und das Ebolavirus, welches beispielsweise von 2014 bis 2016 für einen epidemischen Ausbruch in Westafrika sorgte, gehört der Familie der Filoviridae an. Ein besonderes Virus sorgt jedoch sogar in regelmäßigen Abständen für pandemische Ausbrüche unter den Menschen. Das Influenzavirus, welches der Familie der Orthomyxoviridae angehört, zeichnet sich durch eine besonders große genetische Variabilität aus, welche für die Entstehung neuer Virusvarianten und -subtypen verantwortlich ist. Viele Epidemien und Pandemien des 20. und 21. Jahrhunderts gehen dabei auf Varianten von Influenzaviren zurück. Die Spanische Grippe beispielsweise, welche sich von 1918 bis 1920 in mehreren Wellen ausbreitete, war eine Influenza-Pandemie, die durch einen hochvirulenten Subtyp des Influenzavirus (A/H1N1) verursacht wurde. Laut Schätzungen der *World Health Organization* (Weltgesundheitsorganisation, WHO) infizierte sich ein Drittel der damaligen Weltbevölkerung, also ca. 500 Millionen Menschen mit dem Virus und es wird angenommen, dass rund 40 Millionen Menschen ihr Leben verloren.<sup>3</sup> Alle der Spanischen Grippe nachfolgenden Influenza A-Pandemien und fast alle Fälle von Influenza A-Ausbrüchen weltweit, mit Ausnahme menschlicher Infektionen durch Vogelgrippeviren wie H5N1 und H7N7, wurden seither durch „Nachkommen“ des Virus von 1918 verursacht.<sup>4-6</sup>

### 3.1 Influenza

In der jüngeren Geschichte sind vier verheerende Influenza-Pandemien aufgetreten: 1889 die „Russische Grippe“, 1918 die bereits erwähnte „Spanische Grippe“, sowie 1957 die „Asiatische Grippe“ und 1968 die „Hongkong-Grippe“.<sup>3, 4</sup> Die Influenza, welche auch als „echte Grippe“ bezeichnet wird, ist eine ansteckende, durch Viren ausgelöste Infektionskrankheit des respiratorischen Trakts bei Menschen. Nach Schätzungen der WHO erkrankten jährlich 10 bis 20 % der Weltbevölkerung an Influenza. Die jährliche Rückkehr der Krankheit wird durch die antigene Variabilität des Influenzavirus bestimmt.<sup>3</sup> Dabei werden die Risiken der echten Influenza in der Bevölkerung nach wie vor unterschätzt, da die Bezeichnung Grippe häufig auch als Synonym für den deutlich harmloser verlaufenden grippalen Infekt verwendet wird. Der grippale Infekt kann im Gegensatz zur echten Influenza durch eine Vielzahl an Viren oder auch unter zusätzlicher Beteiligung von Bakterien ausgelöst werden. Die Erreger können dabei unterschiedlichen Virusgattungen wie denen der Rhino-, Entero- und Mastadenoviren oder sogar den Familien der Corona- und Paramyxoviridae angehören.<sup>7-9</sup>

Eine Influenzainfektion besitzt aufgrund der aggressiven Ausbreitung der Viren im Körper eine sehr kurze Inkubationszeit von 1-3 Tage und äußert sich spontan durch ein starkes Krankheitsgefühl mit Kopf- und Gliederschmerzen, Schnupfen, Schüttelfrost und Schweißausbrüche. Die Dauer der Erkrankung beträgt in den meisten Fällen 1-2 Wochen und wird begleitet von teilweise sehr hohem Fieber mit Temperaturen um die 40 °C. Besonders gefährlich ist die Virusgrippe für ältere Menschen, sowie Kinder, Jugendliche und Erwachsene mit chronischen Vorerkrankungen der Atemwege, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Diabetes, Nieren- und Leberkrankheiten, Krebs, Immunschwäche, neurologischen Erkrankungen, sowie HIV/AIDS, da es in Folge der Erkrankung zu Sekundärinfektionen sowohl viraler als auch bakterieller Natur kommen kann, die mitunter tödlich verlaufen können.<sup>7</sup>

### 3.1.1 Nomenklatur und Aufbau von Influenza A-Viren

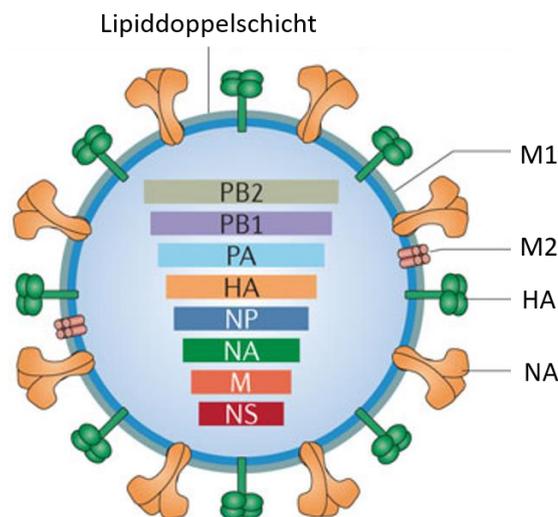
Die Erreger der Influenza sind Orthomyxoviren, welche in die Gattungen A, B, C und inzwischen auch D<sup>10</sup> unterteilt und anhand ihrer Nucleo- und Matrixproteine unterschieden werden. Für den Menschen sind vor allem Infektionen mit Influenza A- und B-Viren, welche zumeist saisonal auftreten, besonders relevant. Infektionen mit Influenza C-Viren oder den eng verwandten D-Viren spielen für den Menschen nur eine untergeordnete Rolle.<sup>8, 11</sup>

Influenza A-Viren lassen sich anhand ihrer Oberflächenantigene in unterschiedliche Subtypen einteilen. Influenza B-Viren werden nach dem Ort ihres Auftretens in zwei spezifische genetische Stammlinien (Victoria und Yamagata), welche wiederum anhand ihrer Oberflächenproteine unterschieden werden, eingeteilt. Die seit Jahren weltweit in der menschlichen Bevölkerung zirkulierenden Influenza B-Viren haben im Unterschied zu Influenza A-Viren eine niedrigere Mutationsrate und ein engeres, zumeist auf den Menschen beschränktes Wirtsspektrum.<sup>12</sup>

Die Nomenklatur der Influenza A-Virenstämme erfolgt nach einem von der WHO vorgegebenen internationalen Standard und enthält segmentiert alle Informationen zur Identifizierung des Virus. Das erste Segment steht für die Gattung des Virus, danach kann optional der ursprüngliche Wirt angegeben werden. Die folgenden Segmente stehen für den Fundort des Virus, die laufende Nummer des Isolats und das Jahr der Isolierung. Influenza A-Viren enthalten zudem die Kombination der Oberflächenantigene. Das Influenzavirus welches 1957 die Asiatische Grippe auslöste, welche nach der Spanischen Grippe die zweitschlimmste Influenza-Pandemie des 20. Jahrhunderts war, trägt beispielsweise die Bezeichnung A/Singapore/1/57(H2N2).<sup>13</sup>

Ein einzelnes Influenza A-Virion (Abb. 1) hat einen mittleren Durchmesser von 80-120 nm und liegt meist in sphärischer Form vor. Es besitzt ein segmentiertes Genom bestehend aus acht RNA-Einzelsträngen negativer Polarität, welches für zehn virale Proteine kodiert und von einer zweischichtig aufgebauten Zellwand umgeben ist. Die innere Hülle besteht aus dem Matrixprotein M1 und die äußere Hülle aus einer Lipiddoppelschicht.<sup>14</sup> Auf der Oberfläche der Viren befinden sich drei verschiedene Arten von Membranproteinen. Das Matrixprotein M2, welches als Protonenpumpe dient und die beiden Hauptantigene Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA), welche die charakteristische Oberflächenstruktur der Influenzaviren

ausbilden.<sup>15</sup> Diese beiden Transmembranproteine sind für den jeweiligen Influenzastamm charakteristisch und entscheidend für eine erfolgreiche Infektion und Vermehrung. Das Hämagglutinin ist durch das Binden von Kohlenhydratstrukturen auf der Zelloberfläche für den Primärkontakt zwischen Virus und Wirtszelle, sowie die Fusion von Virus- und Zellmembran während der Endozytose verantwortlich. Die Neuraminidase wiederum katalysiert nach erfolgreicher Vermehrung der Viren in der Wirtszelle die Abspaltung der Tochtervirionen. Bis heute sind 18 HA-Serotypen von Vogel- und Säugetierviren (H1 - H18) bekannt, wobei nur drei (H1, H2, H3) sich in der menschlichen Population manifestiert haben und von Mensch-zu-Mensch übertragbar sind. Die weiteren Subtypen werden bisweilen nur von infizierten Tieren auf den Menschen übertragen. Neben den 18 bekannten HA-Subtypen sind 11 verschiedene NA-Subtypen bekannt. Alle 16 ursprünglichen HA-Subtypen (H1 - H16), sowie alle 9 ursprünglichen NA-Subtypen (N1 - N9) wurden in Vögeln nachgewiesen. Die zwei HA-Subtypen H17 und H18, sowie die zwei NA-Subtypen N10 und N11 wurden bislang nur in Fledermäusen nachgewiesen.<sup>16</sup>



**Abb. 1.:** Die innere Hülle besteht aus dem Matrixprotein M1 und die äußere Hülle aus einer Lipiddoppelschicht. Im Inneren befinden sich die acht RNA-Segmente und die viralen RNA-Polymerasen. Auf der Hüllmembran sind die beiden Hauptantigene Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA), sowie das Matrixprotein M2 zu erkennen.<sup>17</sup>

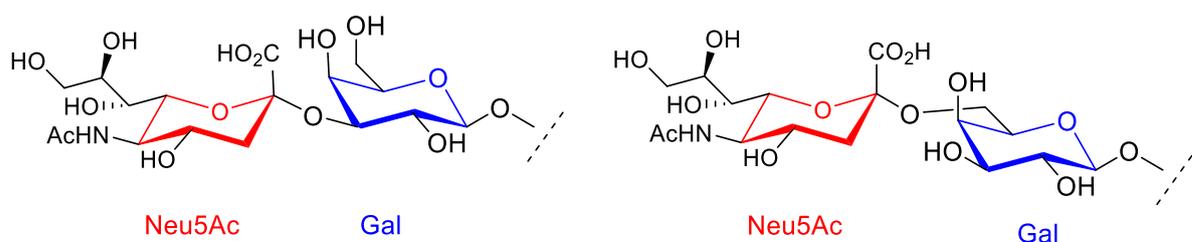
Die Hauptgründe für das große pandemische oder epidemische Potential der Influenzaviren sind zum einen das Fehlen einer Korrekturfunktion bei der Replikation des RNA-Genoms (RNA-Polymerasen sind um den Faktor 1000 ungenauer als DNA-Polymerasen), welches zu Punktmutationen, also einer schrittweisen Variation des viralen Genoms, führt (*antigenic drift*). Und zum anderen besteht das virale RNA-Genom aus 8 Segmenten, welche für zehn

strukturelle und nicht-strukturelle Proteine kodieren. Befinden sich in einer infizierten Zelle unterschiedliche Influenza A Genome, können die RNA-Segmente nach ihrer Replikation in beliebiger Kombination zu neuen Viren assembliert werden. Diese Eigenschaft wiederum lässt Reassortanten mit neuen pathogenen und immunologischen Eigenschaften entstehen (*antigenic shift*).<sup>18, 19</sup>

### 3.1.2 Replikationszyklus

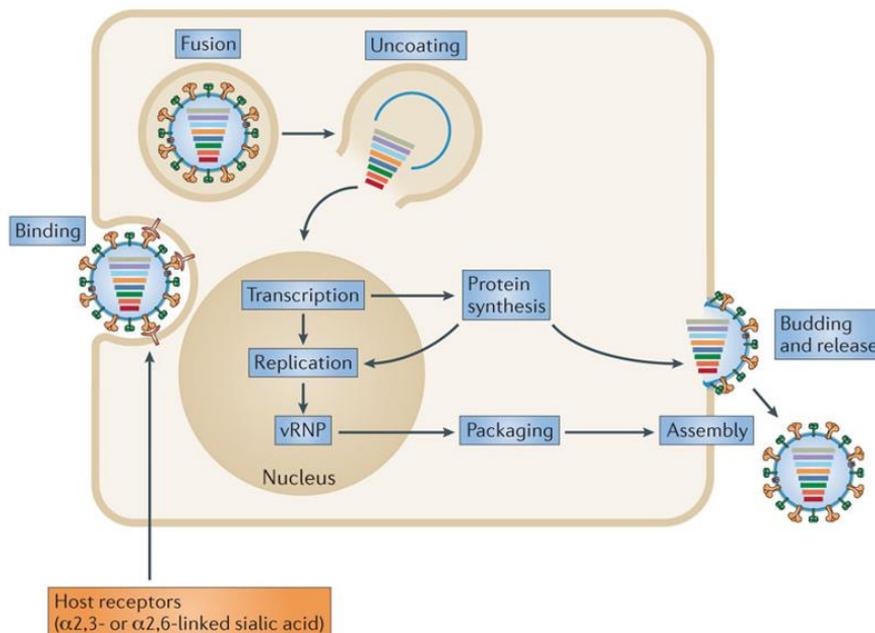
Die Infektion mit Influenza A-Viren beginnt durch die Bindung der Viruspartikel über membranständige Hämagglutinine an  $\alpha$ 2,3 oder  $\alpha$ 2,6 mit Galactose verknüpfte Sialinsäurereste der Zellen des oberen respiratorischen Flimmerepithels.

Zunächst gelangen die Viren durch das Mucin (lat. *mucus* = Schleim) an die Oberfläche der Wirtszellen, wobei die Neuraminidase durch Verflüssigung des Schleims dafür sorgt, dass die Viruspartikel nicht verkleben. Die Infektion der Zellen wird anschließend durch die Bindung des Virus über Hämagglutinin an sialylierte Rezeptoren initiiert. Die spezifische Bindung des Hämagglutinins beruht dabei nicht nur auf der Art der Verknüpfung selbst, sondern vor allem auf der resultierenden charakteristischen Topologie der Basisstrukturen.<sup>20</sup> Die Zellen des oberen respiratorischen Epithels bei Menschen weisen meist  $\alpha$ 2,6-verknüpfte Sialinsäurereste auf, wohingegen beispielsweise bei Vögeln hauptsächlich die  $\alpha$ 2,3-Verknüpfung vorliegt (Abb. 2). Diese Strukturvariante ist wiederum bei Menschen fast ausschließlich auf Zellen zu finden, mit denen die Alveolen der Lungen ausgekleidet sind. Dadurch ist die Infektionen von Menschen mit Vogelgrippeviren (vgl. Kapitel 3.2) nur möglich, wenn die Erreger in einer großen Anzahl bis tief in die Lunge gelangen.<sup>20</sup>



**Abb. 2:**  $\alpha$ 2,3- (links) und  $\alpha$ 2,6- (rechts) Verknüpfung der Sialinsäure (rot) mit Galactose (blau).

Nach der initialen Bindung und anschließendem Endocytose-vermitteltem Eintritt der Viren in die Zelle aktiviert der niedrige pH-Wert im Endosom das Matrixprotein M2 und induziert eine Konformationsänderung im HA. Durch die einströmenden Protonen sinkt der pH-Wert im Inneren des Virus weiter und führt dadurch zur Auflösung des Matrixproteins M1 und somit zur Fusion von viraler und endosomaler Membran, wodurch die Freisetzung des segmentierten viralen Genoms in das Cytosol ermöglicht wird (*uncoating*).<sup>21</sup> Die virale RNA wird anschließend in den Nucleus der Wirtszelle transloziert, wo sie durch die viruseigene Polymerasen PB1, PB2 und PA transkribiert und repliziert wird.<sup>22</sup> Nach abschließender Synthese im Cytoplasma werden die viralen Proteine im Kern zu viralen Ribonukleoproteinen (vRNPs) zusammengesetzt und mittels M1 und NS2 zur Zellmembran der Wirtszelle exportiert. Die dort zusammengesetzten Viruspartikel werden während der anschließenden Virusknospung (*budding*) durch viruseigene Neuraminidase die Sialinsäureglycoside auf der Oberfläche der Wirtszelle abgespalten, wodurch die neu entstandenen Virionen in den extrazellulären Raum freigegeben werden (Abb. 3).<sup>23</sup>



**Abb. 3:** Schematische Darstellung des Reproduktionszyklus von Influenza A-Viren. Nach erfolgreichem Primärkontakt und Endocytose-vermitteltem Eintritt in die Zelle wird die virale RNA durch viruseigene Polymerasen repliziert und transkribiert. Nach abschließender Synthese im Cytoplasma werden die viralen Proteine im Kern zu viralen Ribonukleoproteinen (vRNPs) und an der Zellmembran der Wirtszelle zu Viruspartikel zusammengesetzt. Anschließend erfolgt die Ausknospung der Tochtervirionen.<sup>17</sup>

### 3.2 Aviäre Influenza

Der Begriff der aviären Influenza leitet sich vom lateinischen Ausdruck für Vogel (lat. *avis*) ab. Diese, durch spezielle Influenza A-Viren, in erster Linie der Subtypen H5 und H7, hervorgerufene Tierseuche, wird umgangssprachlich als Vogelgrippe oder Geflügelpest bezeichnet. Die Erreger der Vogelgrippe treten in zwei Varianten, sowie verschiedenen Subtypen auf. Normalerweise persistieren die Viren in einer niedrigpathogenen Form (LPAI - *low pathogenic avian influenza*) asymptomatisch in ihrem natürlichen Reservoirwirt der Gattung Gänsevögel (*Anseriformes*), wie beispielsweise Gänsen, Enten und Schwänen. Durch Modifikation im Bereich der HA-Spaltstellenregion aufgrund von Mutationen des Genoms oder Rekombination mit Genen anderer Proteine können sich die Viren jedoch in eine hochpathogene Form (HPAI - *high pathogenic avian influenza*) umwandeln.<sup>24-26</sup> Diese HPAI-Viren verursachen bei infizierten Tieren eine spontan einsetzende schwere Erkrankung, die nach kurzer Dauer eine Mortalitätsrate von fast 100 % besitzt.<sup>18, 27</sup>

Die aviäre Influenza mit der Kombination an Oberflächenantigenen H5 und N1 wurde erstmals 1878 in Italien beobachtet.<sup>28</sup> Sie wurde jedoch erst 1997, nach einem Ausbruch unter domestiziertem Geflügel in Hongkong, mit einer Übertragung auf den Menschen in Verbindung gebracht.<sup>11</sup> Die Übertragung des Virus-Subtyps H5N1 auf den Menschen erfolgte jedoch nur bei engem Kontakt mit erkrankten oder verendeten Vögeln sowie deren Produkten oder Ausscheidungen. Um eine Ausbreitung des Virus zu verhindern, wurden Ende der 2000er groß angelegte Massentötungen des Nutzgeflügels durchgeführt. Zunächst schien damit die Ausbreitung einer Pandemie erfolgreich verhindert worden zu sein. 2003 wurde jedoch in Asien ein erneuter Ausbruch der aviären Influenza durch einen Erreger des gleichen Subtyps festgestellt, worauf 2004 dann auch große pandemische Ausbrüche in Thailand und Vietnam verzeichnet wurden, welchen später auch eine Verbreitung bis nach Europa und Afrika folgte. Beunruhigend in diesem Zusammenhang war die Beobachtung, dass beispielsweise Enten teilweise asymptomatisch das hochpathogene H5N1-Virus ausscheiden. Diese Tiere stellen somit ein verborgenes Reservoir für die hochpathogene Virenstämme dar.<sup>18, 27</sup>

Von Januar 2003 bis Januar 2021 registrierte die WHO 862 Fälle von H5N1-Infektionen beim Menschen, wobei 455 Erkrankungen tödlich verliefen. Mit einer Mortalitätsrate von mehr als 50 % gehört das H5N1 somit zu den gefährlichsten bisher bekannten Influenzaviren.<sup>2</sup> Die hohe

Infektionsrate des H5N1 ist auf das Hämagglutinin H5 (vgl. Kapitel 3.3) zurückzuführen. Dieses kann sich in seiner hoch pathogenen Form, im Gegensatz zu der niedrig pathogenen Form, welche nur Zellen des Respirations- und Gastrointestinaltraktes befällt, in Zellen des ganzen Körpers ausbreiten.<sup>21, 29, 30</sup> Eine Anpassung des Virus an humane Hämagglutinin-Rezeptoren könnte zudem eine effiziente Mensch-zu-Mensch Übertragung gewährleisten. So konnte *in vitro* gezeigt werden, dass der simultane Austausch zweier Aminosäuren innerhalb der Rezeptorbindestelle des Hämagglutinins der asiatischen HPAIV H5N1-Linie die Bindung an humane  $\alpha$ 2,3-verknüpfte Rezeptoren um den Faktor 2 bis 6 verbessert. Dies entspricht einer für humane Influenza A-Viren charakteristischen Affinität.<sup>31, 32</sup> Gambaryan *et al.*<sup>33</sup> konnte zudem 2005, anhand zweier Isolate aus 2003, zwei Virus-Varianten beschreiben, die eine verminderte Affinität gegenüber aviären Rezeptoren und eine erhöhte Affinität für humane Rezeptoren aufwiesen. Es konnte in diesem Fall gezeigt werden, dass eine einzelne Mutation von einem Serin nach Asparagin innerhalb der Rezeptorbindestelle für diesen „Präferenzwechsel“ verantwortlich war.<sup>18, 31-33</sup>

### 3.3 Hämagglutinin

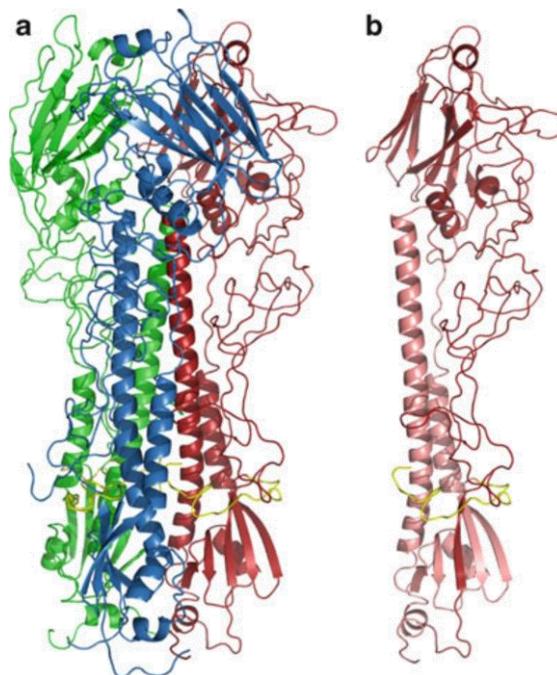
Das von G. Hirst<sup>34</sup> 1941 in New York entdeckte Virusprotein Hämagglutinin ist in der Lage, rote Blutzellen zu verklumpen. Dieser Vorgang, von dem sich der Name Hämagglutinin ableitet, wird als Hämagglutination (gr. *Häm* = Blut; lat. *agglutinare* = anheften) bezeichnet. Dabei bindet das Hämagglutinin an Sialinsäure-haltige Glycoproteine, die sich auf der äußeren Membran der roten Blutzellen befinden.<sup>35</sup>

Das trimere Hämagglutinin (Abb. 4) ist ein membranständiges Glycoprotein und neben der Neuraminidase eines der zwei Hauptantigene von Influenzaviren der Gattung A und B. Es ist für die Anlagerung des Virus an Sialinsäure-haltige Rezeptoren auf der Oberfläche der Wirtszellen verantwortlich und ermöglicht während der Endozytose durch einen pH-induzierten Konformationswechsel die Fusion der viralen und endosomalen Membran.<sup>36-38</sup>

Das Hämagglutinin ist ein homotrimeres Lektin mit einer Länge von 135 Å<sup>38</sup> und einem Molekulargewicht von bis zu 225 kDa<sup>38</sup>, welches auf der Oberfläche der Viren mit 2-4 Kopien pro 100 nm<sup>2</sup> und entsprechend ca. 600-1200 Kopien pro Virion präsentiert wird. Es kann durch Bromelain-Verdau aus der Virusmembran gelöst werden, wodurch ein C-terminales

hydrophobes Anker-Peptid mit einem Molekulargewicht von ~5 kDa aus jeder Untereinheit entfernt wird.<sup>38</sup>

Durch die hohe Anzahl an Antigenen ist das Virus trotz seiner relativ geringen Affinität eines einzelnen Hämagglutinins zur Sialinsäure ( $K_D \approx 10^{-3} \text{ M}$ ) in der Lage, aufgrund der resultierenden polyvalenten Wechselwirkungen (vgl. Kapitel 3.5), eine um den Faktor  $10^{10}$  gesteigerte Bindungsstärke beim Anheften an die Wirtszelle zu erreichen.<sup>39</sup> Das Hämagglutinin besteht aus drei identischen monomeren Einheiten mit einem Molekulargewicht von 60 bis maximal 76 kDa.<sup>40, 41</sup> Jedes Monomere besteht aus zwei Untereinheiten, der HA1- (~50 kDa) und der HA2-Domäne (~25 kDa), welche über eine Disulfidbrücke kovalent miteinander verbunden sind.<sup>41</sup> Die beiden Untereinheiten wiederum gehen aus der Spaltung des Vorgängerproteins HA0 durch viruseigene Protease hervor.<sup>37, 42</sup> Die räumliche Struktur des trimeren (**A**) und des monomeren (**B**) Hämagglutinins sind als *ribbon*-Model in Abb. 4 dargestellt.



**Abb. 4:** **A)** Räumliche Struktur des trimeren Hämagglutinins als ribbon-Model: Jede HA-Untereinheit ist rot, grün bzw. blau gefärbt und die Fusionspeptide sind gelb hervorgehoben. **B)** Räumliche Struktur des monomeren Hämagglutinins als *ribbon*-Model: Die HA1-Domäne ist rot und die HA2-Domäne hellrot gefärbt. Das Fusionspeptid ist gelb hervorgehoben. Die Bindungstasche für die Sialinsäurereste befindet sich im distal zur Virusmembran gelegenen, globulären Teil des Proteins.<sup>36</sup>

Die drei Monomere bilden zusammengesetzt ein zentrales alpha-helikales coiled-coil Strukturmotiv. Der distal zur Virusmembran befindliche Abschnitt des Proteins liegt in einer

kompakten globulären Konformation vor. Jede dieser globulären Kopfregionen, welche ausschließlich aus HA1 besteht, besitzt eine Rezeptorbindungsdomäne (RBD). Der proximale Teil des Moleküls, welcher als Stiel- oder Stammregion bezeichnet wird, liegt durch die enge Assoziation von zwei langen  $\alpha$ -Helices von HA2 mit  $\beta$ -Faltblättern des HA1 in einer langgestreckten Form vor, wobei die Helices und Faltblätter durch hochvariable Schleifen aus Polypeptidketten, die sich meist an der Oberfläche des Proteinmoleküls befinden, miteinander verbunden sind. Das für die Fusion der Virushülle mit der Zellmembran der Wirtszelle verantwortliche Peptid ist in der HA2-Domäne zu finden. Die übergeordnete Quartärstruktur des trimeren Hämagglutinins wird hauptsächlich durch laterale Wechselwirkungen der langen Helices in der Stielregion stabilisiert.<sup>36, 37, 43</sup>

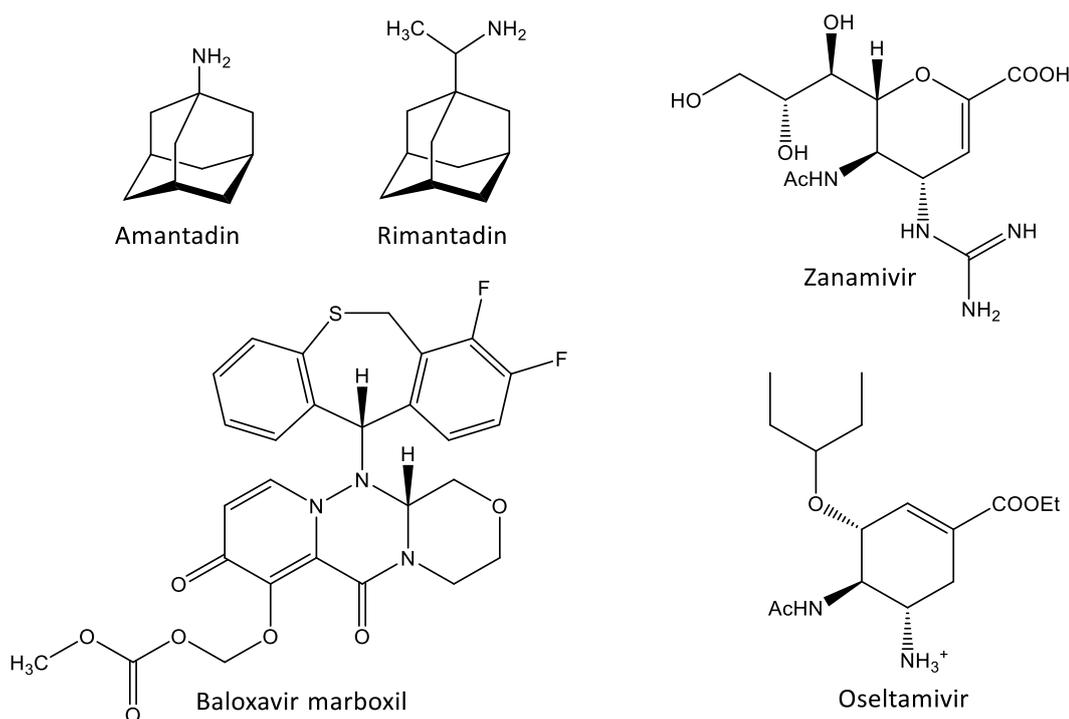
### 3.3.1 Influenzawirkstoffe - Hämagglutinininhibitoren

Bei der Bekämpfung von Influenza gibt es unterschiedliche therapeutische Ansätze. Die Vakzinierung ist dabei eine sehr wirksame Methode zur Bekämpfung der Influenza. Ein großes Problem der Schutzimpfung stellt jedoch die jährliche Auswahl der Virusstämme, aus denen die Impfstoffe hergestellt werden, dar. Aufgrund der rasanten Entwicklung der Viren passen die Impfstoffhersteller die verwendeten Antigene zweimal pro Jahr, jeweils einmal jährlich für die nördliche und die südliche Hemisphäre, an die aktuelle WHO-Empfehlung der zirkulierenden Influenza-Viren an. Seit November 2017 werden für Personen im Alter von  $\geq 60$  Jahren von der „Ständigen Impfkommission am Robert-Koch-Institut“ (STIKO) ausschließlich quadrivalente Influenza-Impfstoffe aus inaktivierten Oberflächenantigenen empfohlen. Diese enthalten Antigene jeweils für Influenza A(H1N1) und A(H3N2) sowie für die beiden Influenza B-Linien.<sup>12, 44</sup>

Neben der Gripeschutzimpfung gibt es zur Behandlung akuter Grippeerkrankungen verschiedene antivirale Medikamente, welche sich auf der Basis ihrer Wirkansätze in unterschiedliche Wirkstoffklassen einteilen lassen.<sup>45</sup> Die Adamantanderivate Amantadin und Rimantadin gehören zur Wirkstoffklasse der M2-Ionenkanalblocker (Abb. 5). Sie wirken hemmend auf das *uncoating*, indem sie das in der Virushülle enthaltene Ionenkanal-Protein M2 blockieren, wodurch der Einstrom an Protonen in das Virusinnere und damit die

Freisetzung des viralen Genoms in das Cytoplasma der Wirtszelle verhindert wird. Neuraminidase-Hemmer, wie Zanamivir (Relenza®) und Oseltamivir (Tamiflu®) (Abb. 5) wiederum blockieren das aktive Zentrum der viralen Neuraminidase, wodurch die enzymatische Aktivität der Neuraminidase, welche für die Freisetzung von neu gebildeten Viruspartikeln aus infizierten Zellen entscheidend ist, unterbunden wird. Seit 2018 ist zudem Baloxavir (Abb. 5) als erster Vertreter einer neuen antiviralen Wirkstoffklasse gegen Influenza A und B Viren in den USA und Japan zugelassen (Zulassung in Deutschland steht aus, Stand: 16.11.2020). Das Prodrug (vgl. Kapitel 3.4.2) Baloxavir marboxil wird als Einzeldosis verabreicht und hemmt nach Metabolisierung zu Baloxavirsäure die Cap-abhängige Endonuklease, wodurch die Bildung der viralen mRNA unterbunden wird.<sup>46</sup>

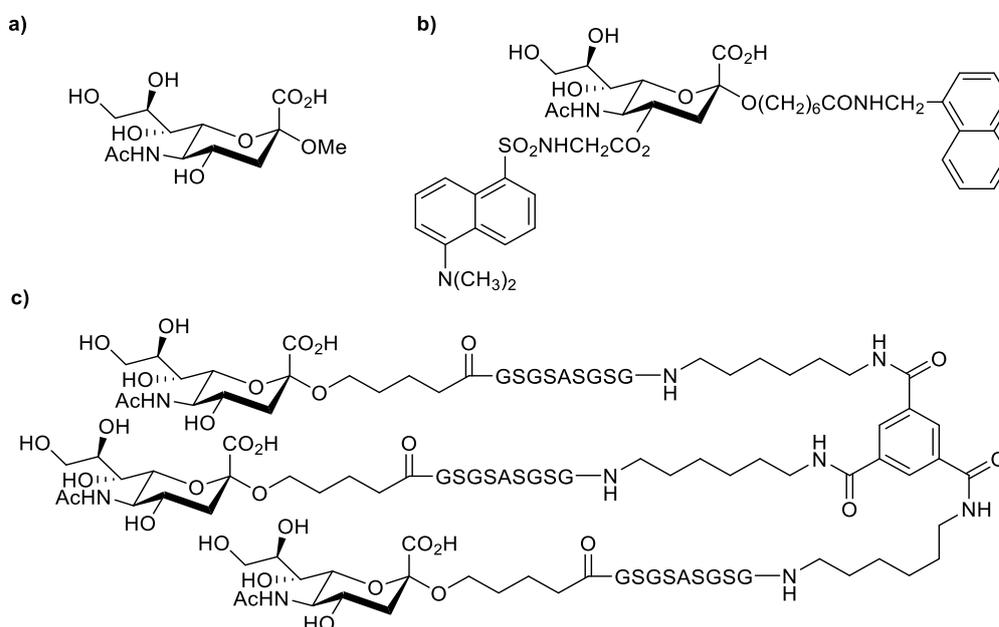
Durch bereits geringe Mutationen können sich jedoch die für die spezifische Affinität der Wirkstoffe notwendigen Struktur motive so weit verändern, dass die Inhibitoren nicht mehr effektiv sind, was dann wiederum zur Ausbildung von Resistenzen führt.<sup>47, 48</sup>



**Abb. 5:** Strukturformeln der M2-Ionenkanalblocker Amantadin und Rimantadin, sowie der Neuraminidase-Hemmer Zanamivir und Oseltamivir und der Endonuklease-Hemmer Baloxavir marboxil.

In der Influenzatherapie ist, neben der Hemmung der Endonuklease des Matrixproteins M2 und der Neuraminidase, die Inhibition des Hämagglutinins ein weiterer möglicher Ansatzpunkt im Replikationszyklus der Viren. Dabei wird durch hochaffine Liganden die

Rezeptorbindungsdomäne besetzt und so bereits das initiale Binden des Virus an die Wirtszelle verhindert. Zu diesem Zweck wurden bisher vor allem Peptide, RNA-Aptamere und Sialinsäurederivate, bei denen es sowohl mono- als auch polyvalente Ansätze gibt, auf ihr Potential als Inhibitoren untersucht. Die Entwicklung monovalenter Inhibitoren mit ausreichender Bindungsstärke ist jedoch aufgrund der geringen Affinität der Rezeptorbindungsdomäne eine Herausforderung. Ein von Weinhold und Knowles<sup>49</sup> publizierter Ligand (Abb. 6/b) ist mit einer Dissoziationskonstante von 3.7  $\mu\text{M}$  zum Hämagglutinin einer der bekanntesten monovalenten kompetitiven Inhibitoren. Im Vergleich zum Methylglycosid der Neuraminsäure (Abb. 6/a), mit einer Dissoziationskonstante von 2.8 mM, weist er eine um den Faktor  $10^3$  gesteigerte Affinität zum Hämagglutinin auf.<sup>50</sup>



**Abb. 6:** Inhibitoren des Hämagglutinins H5. **a)** Methylglycosid der Neuraminsäure mit einer Dissoziationskonstante von 2.8 mM.<sup>50</sup> **b)** Von Weinhold und Knowles erstmals 1992 publizierter monovalenter Ligand mit einer Dissoziationskonstante von 3.7  $\mu\text{M}$ .<sup>49, 50</sup> **c)** Von Waldmann *et al.* 2014 publizierter multivalenter Ligand mit einer Dissoziationskonstante von 446 nM.<sup>51</sup>

Im Bereich der Hämagglutinin-Inhibitoren wurde in klassischen Therapieansätzen bis vor einigen Jahren hauptsächlich monovalente Wirkstoffe eingesetzt, welche aufgrund ihrer geringen Affinität jedoch nur bei sehr hohen Konzentrationen eine kompetitive Hemmung erzielen konnten.<sup>49</sup> Im Fokus neuerer Forschungen, wie der von Lu *et al.*<sup>52</sup>, Bhatia *et al.*<sup>53</sup> oder Waldmann *et al.*<sup>51</sup>, stehen heute zumeist Liganden mit übergeordneten multivalenten Strukturen, welche deutlich bessere Affinitäten besitzen. Beispielsweise konnte für den 2014 von Waldmann *et al.*<sup>51</sup> publizierten multivalenten Liganden (Abb. 6/c), welcher aufgrund

seiner Beschaffenheit das gleichzeitige Binden mehrerer Rezeptorbindungsstellen ermöglicht, in SPR-Studien mit immobilisierten Hämagglutinin H5 eine Dissoziationskonstanten von 446 nm ermittelt werden.

### 3.4 Arzneimittelforschung und Protein-Ligand-Wechselwirkungen

Als Arzneimittel für den Menschen gelten nach § 2 Abs. 1 des Arzneimittelgesetzes „alle Stoffe oder Zubereitungen, die zur Anwendung am oder im menschlichen Körper bestimmt sind, welche Krankheiten heilen, lindern oder verhindern sollen.“ Unterschieden wird in Stoffe mit einer Zweckbestimmung, losgelöst von ihrer tatsächlichen Wirksamkeit, sowie in Stoffe mit einer vorhandenen pharmakologischen, immunologischen oder metabolischen Wirkung.

Ein Arzneimittel kann seine Wirkung nur bei einer vorhandenen Interaktion zwischen Wirkstoff und Zielmolekül entfalten. Damit sich spezifischen Wechselwirkungen ausbilden können ist es notwendig, dass ein Ligand (Antigen) mit seinen Oberflächeneigenschaften vollständig in die Bindungstasche eines Proteins (Antikörper) hineinpasst. Die in diesem Zusammenhang auftretende Bindungsaffinität ist ein Maß für die Kraft einer einzelnen Protein-Ligand-Bindung. Die Gesamtheit der Affinitäten wird wiederum durch die Avidität wiedergegeben. Sie ist ein Maß für die Stärke multivalenter Bindungen zwischen einem Liganden und einem Protein (vgl. Abschnitt 3.4 und 6.2).

Die Bindungsstärke eines Protein-Ligand-Komplexes lässt sich experimentell bestimmen und durch die Assoziationskonstante  $K_A$  oder durch das reziproke Maß der Assoziationskonstante, die Dissoziationskonstante  $K_D$  (Gl. 1), bei Enzymen oft auch als Inhibitionskonstante  $K_I$  definiert, beschreiben.<sup>29, 54</sup>

$$K_A = \frac{1}{K_D}$$

**Gl. 1:** Die Dissoziationskonstante  $K_D$  entspricht dem reziproken Maß der Assoziationskonstante  $K_A$ .

$K_A$  ist ein Maß für das dynamische Gleichgewicht zwischen den Geschwindigkeitskonstanten  $k_{on}$  (Bildung des Komplexes) und  $k_{off}$  (Dissoziation des Komplexes) (Gl. 2).<sup>29</sup>

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

**Gl. 2:** Die Assoziationskonstante  $K_A$  ist ein Maß für das dynamische Gleichgewicht zwischen den Geschwindigkeitskonstanten  $k_{on}$  und  $k_{off}$ .

Die zur Beschreibung von Bindungsaffinitäten häufiger genutzte Dissoziationskonstante  $K_D$  ist eine thermodynamische Größe und hat die Dimension einer Konzentration mit der Einheit mol/L (M), welche angibt wie hoch der Anteil der am Protein gebundenen Liganden ist. Sie ergibt sich nach Gl. 3.<sup>29, 54</sup>

$$K_D = \frac{[L] \cdot [P]}{[PL]}$$

**Gl. 3:** Die Dissoziationskonstante  $K_D$  entspricht dem Quotienten aus dem Produkt der Konzentration des Liganden  $[L]$  multipliziert mit der Konzentration des Proteins  $[P]$  und der Konzentration des Ligand-Protein-Komplexes  $[PL]$ .

Es gilt, je kleiner der Wert von  $K_D$  ist, desto stärker ist die Bindung zwischen Ligand und Protein. Ist die Konzentration des Liganden deutlich kleiner als der  $K_D$ -Wert, sind nur wenige Ligandmoleküle gebunden und es wird kein biologischer Effekt, wie die Hemmung eines Enzyms, zu beobachten sein. Entspricht die Ligandkonzentration dem  $K_D$ -Wert, ist die Hälfte der Bindungsstellen durch Ligandmoleküle belegt.<sup>29, 54</sup>

Statt  $K_D$  wird häufig auch die freie Bindungsenthalpie  $\Delta G_0$  angegeben. In Gl. 4 ist der Zusammenhang zwischen  $K_D$  und  $\Delta G_0$  in Abhängigkeit von der idealen Gaskonstanten  $R$  und der Temperatur  $T$  aufgeführt.<sup>29</sup>

$$\Delta G_0 = -RT \ln K_D$$

**Gl. 4:** Zusammenhang zwischen freier Bindungsenthalpie  $\Delta G_0$  und der Dissoziationskonstanten  $K_D$  in Abhängigkeit der idealen Gaskonstanten  $R$  und der Temperatur  $T$ .

Ein  $K_D$ -Wert von 1 nM entspricht somit bei 298 K einer freien Bindungsenthalpie von -51 kJ/mol. Die  $K_D$ -Werte für Komplexe zwischen Biomolekülen liegen meist im Bereich von  $10^{-3}$  bis  $10^{-12}$  M, wobei der Komplex aus dem tetrameren Protein Streptavidin und dem Vitamin Biotin mit einem  $K_D$ -Wert von  $\sim 10^{-15}$  M eine der bisher größten bekannte Affinität zwischen Biomolekülen aufweist.<sup>29, 54, 55</sup>

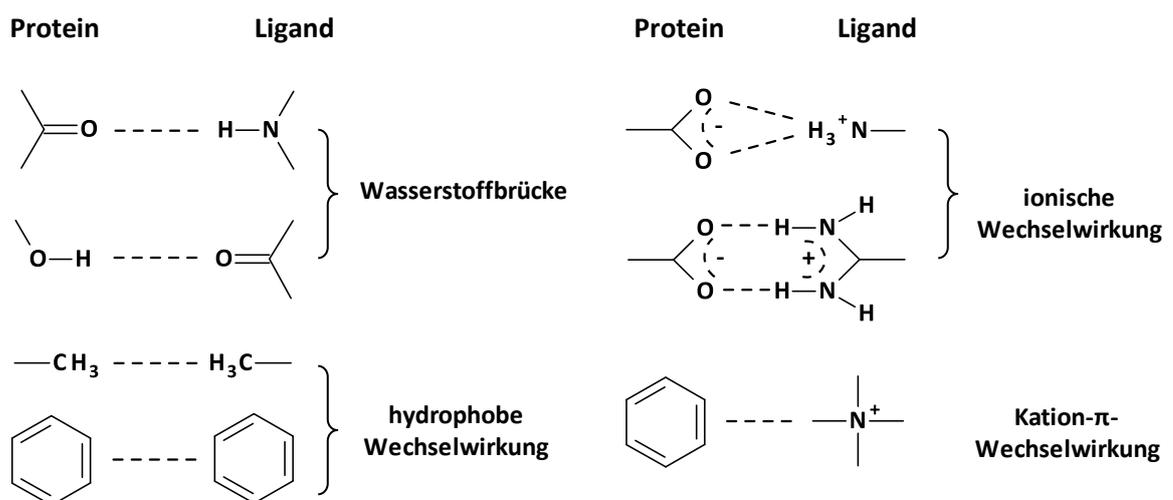
Eine weitere Größe in diesem Zusammenhang ist die mittlere inhibitorische Konzentration  $IC_{50}$ . Sie gibt an, bei welcher Ligandkonzentration die Aktivität des Proteins auf die Hälfte gesunken ist und somit die halbmaximale Inhibition beobachtet wird. Daraus folgt, je kleiner der  $IC_{50}$ -Wert, desto potenter der Inhibitor. Die Cheng-Prusoff-Gleichung (Gl. 5) beschreibt dabei den Zusammenhang zwischen der konzentrationsunabhängigen inhibitorischen Konstante  $K_I$  und der  $IC_{50}$ . Je niedriger die Ligandkonzentration, desto mehr gleichen sich die Werte für  $IC_{50}$  und  $K_I$ .<sup>56,57</sup>

$$K_I = \frac{IC_{50}}{\left(1 + \frac{[L]}{K_D}\right)}$$

**Gl. 5:** Die Cheng-Prusoff-Gleichung beschreibt den Zusammenhang zwischen der konzentrationsunabhängigen inhibitorischen Konstante  $K_I$  und der  $IC_{50}$ .

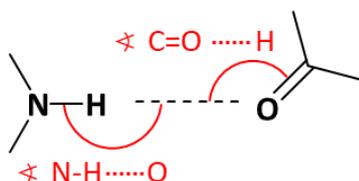
### 3.4.1 Arten von Protein-Ligand-Wechselwirkungen

Organische Moleküle können unter Ausbildung chemischer Bindungen oder über nichtkovalente Wechselwirkungen an Proteine gebunden sein (Abb. 7). Häufig auftretende polare Protein-Ligand-Wechselwirkungen sind Wasserstoffbrücken und ionische Wechselwirkungen. Daneben gibt es noch die unpolaren Teile des Proteins und des Liganden die durch hydrophobe Wechselwirkungen zur Bindung beitragen, sowie die speziellen Kation- $\pi$ -Wechselwirkungen, die zwischen quartären Aminen und Aromaten entstehen.<sup>29</sup>



**Abb. 7:** Häufig auftretende polare und unpolare Protein-Ligand-Wechselwirkungen: Wasserstoffbrücken, ionische Wechselwirkungen („Salzbrücken“), hydrophobe Wechselwirkungen und Kation- $\pi$ -Wechselwirkungen.

Wasserstoffbrücken sind häufig entscheidend für eine erfolgreiche Ligandbindung und die Berücksichtigung ihrer Bindungseigenschaften beim Wirkstoffdesign ist daher besonders wichtig. Wasserstoffbrücken haben einen essenziellen Einfluss auf die Wirkstoffspezifität, die Metabolisierung und die Adsorption des Wirkstoffs. Bei Wasserstoffbrücken wird die Protontragende funktionelle Gruppe, meist NH- oder OH-Gruppen, als Wasserstoffbrückendonator bezeichnet und die entsprechend wechselwirkende Gruppe, ein elektronegatives Atom, meist ein Sauerstoff- oder Stickstoffatom mit einer negativen Partialladung und wird als Wasserstoffbrückenakzeptor bezeichnet. Zwischen einem Protein und einem Liganden können diese Wasserstoffbrücken weiter in vier Subtypen unterteilt werden: Rückgratakzeptor, Rückgratdonor, Seitenkettenakzeptor, Seitenkettendonor. Wasserstoffbrückenbindungen sind durch eine ausgeprägte Abstands- und Winkelabhängigkeit gekennzeichnet. Die Bindungspartner nehmen eine nahezu lineare Anordnung zueinander an. Der Abstand zwischen Wasserstoffdonor und Wasserstoffakzeptor liegt im Bereich zwischen 2.8 und 3.2 Å. Der Winkel zwischen N–H und O ist meist größer als 150°. Der Winkel zwischen C=O und H liegt zwischen 100 und 180° (Abb. 8).<sup>29</sup>



**Abb. 8:** Geometrie einer Wasserstoffbrücke. N, H und O nehmen eine fast lineare Anordnung zueinander an. Der Abstand zwischen N und O liegt zwischen 2.8 und 3.2 Å. Der Winkel zwischen N–H und O ist meist größer als 150°. Der Winkel zwischen C=O und H liegt zwischen 100 und 180°.

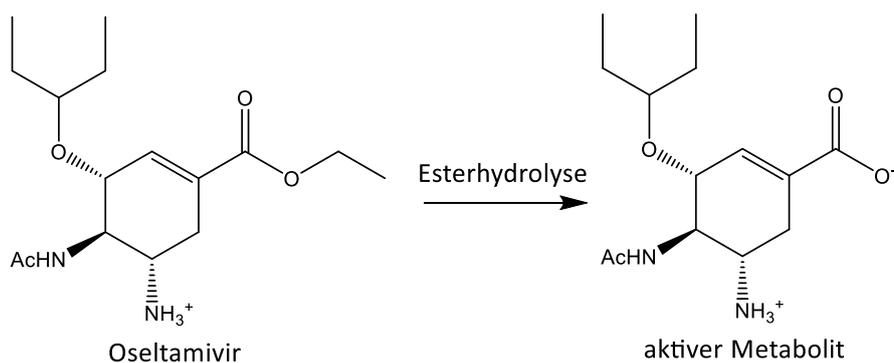
Protein-Ligand-Wechselwirkungen, die durch ein Wassermolekül vermittelt werden („Wasserbrücken“), besitzen im Vergleich zur Standarddefinition einer Wasserstoffbrückenbindung eine etwas weniger strenge Wasserstoffbrückengeometrie. Weitere polare Wechselwirkungen sind die ionischen Wechselwirkungen („Salzbrücken“) zwischen Gruppen entgegengesetzter Ladungen. Besonders stark sind diese in einem Abstand von 2.7 bis 3.0 Å. Salzbrücken zwischen Protein und Ligand können in die vom Proteinrückgrad vermittelten und die von den Seitenketten vermittelten Subtypen unterteilt werden. Wenn sich eine ionische Wechselwirkung mit einer Wasserstoffbrücke überlagert, liegt eine ladungsunterstützte Wasserstoffbrücke vor.<sup>29</sup>

Neben den polaren Protein-Ligand-Wechselwirkungen gibt es noch die Wechselwirkungen der unpolaren Teile des Liganden und des Proteins. Die hydrophoben Wechselwirkungen entstehen durch enge Nachbarschaft zwischen unpolaren Aminosäureseitenketten des Proteins und lipophilen Gruppen des Liganden. Im Gegensatz zu Wasserstoffbrücken sind die hydrophoben Wechselwirkungen meist nicht gerichtet. Eine Ausnahme bilden die Aromaten, für die es bevorzugte, relative Anordnungen gibt. Der Beitrag hydrophober Wechselwirkungen zur Bindungsaffinität beruht im Gegensatz zu den polaren Wechselwirkungen nicht auf direkter Anziehungskraft zwischen den Gruppen, sondern auf der Verdrängung des Hydratwassers in diesem Teil der Bindungstasche, woraus sich ein zusätzlicher entropischer Bindungsenergiegewinn ergibt. Im Allgemeinen handelt es sich bei dieser Art von Wechselwirkungen um eine hydrophobe Aminosäure und eine aromatische oder aliphatische Gruppe am Liganden. Hydrophobe Kontakte lassen sich in drei Untertypen unterteilen: Kation- $\pi$ -Wechselwirkung,  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen und andere unspezifische Wechselwirkungen. Kation- $\pi$ -Wechselwirkungen beruhen auf einer Polarisationswechselwirkung zwischen einer positiven Ladung und dem  $\pi$ -Elektronensystem eines Aromaten und treten in Abständen von bis zu 4.5 Å auf.  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen sind Kräfte, die zwischen  $\pi$ -Systemen von aromatischen Ringen, entweder *face-to-face* oder *face-to-edge* ausgerichtet auftreten.<sup>29</sup>

### 3.4.2 Prodrugs - Resorptionsester

Der Begriff des Prodrug wurde 1958 von Adrien Albert<sup>58</sup> erstmals definiert. Als Prodrug werden modifizierte Vorläufersubstanzen ohne eigene biologische Aktivität bezeichnet, welche durch chemische oder enzymatische Vorgänge *in vivo* metabolisiert und somit in ihre aktive Form umgewandelt werden. Prodrug-Systeme dienen der Verbesserung verschiedener physikochemischen, biopharmazeutischen und pharmakokinetischen Eigenschaften von Wirkstoffen. Beispielsweise verbessern Prodrugs die orale Resorption oder Bioverfügbarkeit, sie verringern den First-Pass-Effekt oder ermöglichen Arzneistoffen die Blut-Hirn-Schranke zu passieren.<sup>58, 59</sup>

Eine besondere Form der Prodrugs sind die Resorptionsester. Diese sind Wirkstoffe, welche ein oder mehrere Veresterungen besitzen, um besser oder überhaupt erst vom Körper resorbiert werden zu können. Die erhöhte Lipophilie der enthaltenen Estergruppen sorgt dafür, dass der Arzneistoff über die Darmschleimhaut resorbiert werden kann, wodurch seine orale Bioverfügbarkeit deutlich verbessert wird. Durch körpereigene Esterasen wird der Resorptionsester beim Passieren der Darmschleimhaut oder anschließend im Plasma hydrolysiert und somit der Metabolit freigesetzt. Ein Beispiel dafür sind die unter 3.2.1 beschriebenen Influenzawirkstoffe Oseltamivir (Abb. 9) und Baloxavir marboxil, welche nach oraler Einnahme aus dem Magen-Darm-Trakt resorbiert und durch hepatische Esterasen fast vollständig in ihre aktiven Metaboliten Oseltamivircarboxylat und Baloxavirsäure umgewandelt werden. Die orale Bioverfügbarkeit von Oseltamivir beispielsweise ist recht hoch, mindestens 75 % einer oral verabreichten Dosis gelangen als aktive Form in den Blutkreislauf.<sup>60</sup>



**Abb. 9:** Schematische Darstellung der Esterhydrolyse des Influenzawirkstoffs Oseltamivir zum aktiven Metaboliten.

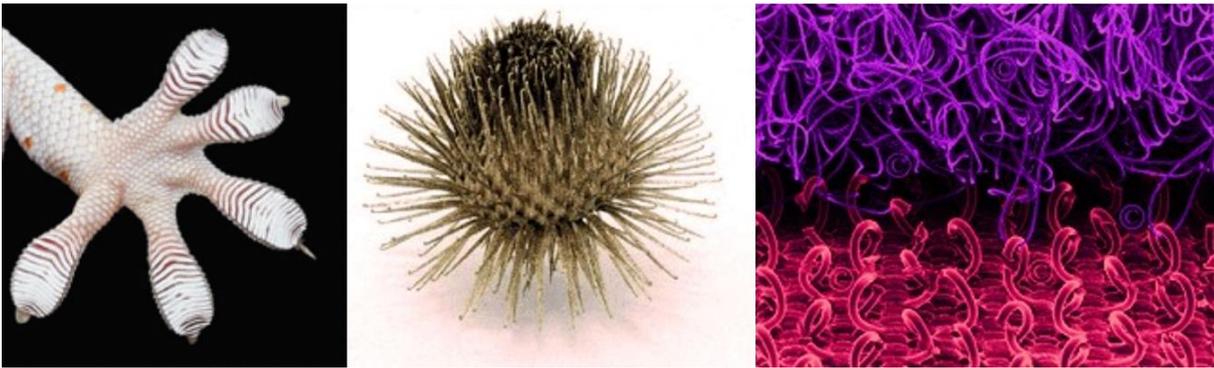
### 3.5 Multivalenz

Der Begriff Multivalenz (lat. *multi* = viele, *valence* = Wertigkeit) beschreibt die Wechselwirkung zweier Komponenten, meist Protein und Ligand, welche jeweils mehrere Bindungsstellen zur Interaktion besitzen. Eine multivalente Interaktion ist somit ein Vorgang, bei dem mehrere gleichartige Bindungsereignisse simultan stattfinden. Multivalente Wechselwirkungen sind ein Schlüsselprinzip biologischer Systeme, um starke aber gleichzeitig reversible Bindungen einzugehen, wobei die Ausbildung mehrerer schwacher Wechselwirkungen, gegenüber einer einzigen starken Wechselwirkung für das System vorteilhaft ist und somit meist bevorzugt

wird.<sup>30</sup> Laut Krishnamurthy *et al.* ist die Multivalenz ein Designprinzip, welches Inhibitoren mit einer niedrigen Affinität in Inhibitoren mit einer hohen Avidität und/oder biologischer Aktivität umwandeln kann.<sup>61</sup> Grundsätzlich wird die Multivalenz anhand ihrer Anzahl an Interaktionen ( $i$ ) in Bivalenz (zwei Interaktionen zwischen den Bindungsstellen zweier Spezies; mit  $i = 2$ ), Oligovalenz (eine diskrete Anzahl Interaktionen zwischen den Bindungsstellen zweier Spezies; mit  $i \leq 10$ ) und Polyvalenz (eine große Zahl Interaktionen zwischen den Bindungsstellen zweier Spezies; mit  $i > 10$ ) eingeteilt. Wobei unterschieden wird, ob zwischen den Komponenten zwei oder mehr gleichartige (Homomultivalenz) oder verschiedenartige (Heteromultivalenz) Bindungsereignisse auftreten.<sup>61</sup>

### 3.5.1 Monovalente vs. Multivalente Wechselwirkungen

Lektine sind komplexe Proteine, die mindestens eine nichtkatalytische Domäne aufweisen, die eine reversible Bindung an Mono- oder Oligosaccharide eingehen kann, wodurch sie in der Lage sind spezifisch Molekülstrukturen zu erkennen und zu binden.<sup>62</sup> Durch die Wechselwirkung der Oberflächenrezeptoren wird in der Zelle eine biochemische Reaktionskaskade ausgelöst. Zudem besitzen viele Lektine mehrere Rezeptorbindungsstellen und sind dadurch in der Lage gleichzeitig mehrere Bindungen einzugehen. Das Prinzip der Multivalenz kompensiert dabei die oft schwachen Affinitäten der einzelnen monomeren Interaktionen. Als natürliche Beispiele für effektiv genutzte multivalente Systeme gelten allgemein der Gecko oder auch eine Pflanze aus der Familie der Korbblütler. Der Gecko besitzt unzählige fein strukturierte Haftorgane an seinen Füßen, wodurch er in der Lage ist, selbst an nahezu glatten vertikalen Flächen emporzuklettern (Abb. 10, links). Die große Klette (*Arctium lappa*) wiederum, ist durch viele kleine Häkchen am Blütenkopf in der Lage sehr fest an strukturierte Oberflächen zu binden (Abb. 10, Mitte). Und der nach diesem natürlichen Vorbild von dem Schweizer Ingenieur Georges de Mestral entwickelte und 1951 zum Patent angemeldete textile Klettverschluss (Abb. 10, rechts) basiert auf dem Prinzip der ineinandergreifenden multiplen Häkchen und Schlaufen. Durch die große Anzahl schwacher monomerer Wechselwirkungen kommt es zu einer starken, reversiblen Verbindung beider Oberflächen. Dabei gilt, je größer die wechselwirkende Fläche und somit die Anzahl an monomeren Wechselwirkungen, desto stabiler die Verbindung.<sup>30</sup>



**Abb. 10:** Multivalenz in der Natur: Geckofuß (links) und die große Klette - *Arctium lappa* (Mitte); von der Natur inspiriertes künstliches System: der Klettverschluss (rechts).<sup>30, 63</sup>

Ein nichtkovalentes Bindungsereignis, wie beispielsweise das zwischen Rezeptor und Ligand, hinsichtlich der auftretenden Wechselwirkungen zu beurteilen ist schwierig. Eine Möglichkeit ist die Betrachtung der thermodynamischen Daten, welche nach Kitov und Bundle<sup>64</sup> einen Einblick in die tatsächlich vorliegende Bindungssituation ermöglicht. Kitov und Bundle haben dazu ein thermodynamisches Modell für Multivalenz entwickelt, welches unter anderem die Grundlage für die in biologischen Systemen beobachteten „Aviditätsgewinne“ parametrisiert.<sup>65-67</sup> Während die Bindungsstärke monovalenter Interaktion hauptsächlich durch die Bindungsaffinität der einzelnen Binder zueinander (Dissoziationskonstante  $K_D$ ) definiert ist, muss bei multivalenten Interaktionen auch der Einfluss der Valenz, der Flexibilität der Linker und der Abstände der einzelnen Bindungs epitope berücksichtigt werden. Die Avidität einer mehrwertigen Wechselwirkung ist demnach definiert als Dissoziationskonstante des vollständig assoziierten Rezeptor-Liganden-Komplexes mit der Anzahl ( $N$ ) an Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen ( $i = N$ ) relativ zu den vollständig dissoziierten ( $i = 0$ ) Formen des multivalenten Rezeptors und des Liganden (Gl. 6).<sup>61, 64</sup>

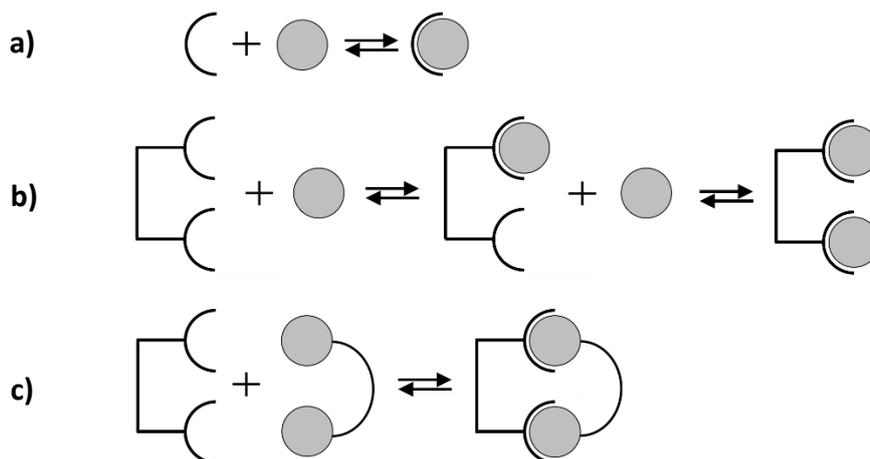
$$K_D^{avidity} = \left( \frac{1}{K_{D,N}} + \frac{1}{K_{D,N-1}} + \dots + \frac{1}{K_{D,1}} \right)^{-1}$$

**Gl. 6:** Definition der Avidität einer multivalenten Bindung nach Kitov und Bundle.  $K_{D,N}$ ,  $K_{D,N-1}$  und  $K_{D,1}$  = Dissoziationskonstanten von Rezeptor-Ligand-Komplexen mit  $N$  Rezeptor-Ligand Interaktionen ( $i = N$ ),  $N-1$  Interaktionen und einer Interaktion ( $i = 1$ ), jeweils im Verhältnis zum vollständig dissoziierten Rezeptor-Ligand-Komplex ( $i = 0$ ).

Ein umfangreiches thermodynamisches Modell zur Betrachtung multivalenter Effekte ist in der Arbeit von Kitov und Bundle<sup>64</sup>, sowie in der Arbeit zur Multivalenz im Liganddesign von Krishnamurthy *et al.*<sup>61</sup> zu finden.

Zusätzlich zur Differenzierung zwischen Affinität und Avidität, muss bei Interaktionen zwischen Rezeptor und Ligand unterschieden werden, ob es sich bei den auftretenden bindenden Wechselwirkungen um unabhängige, multiple monovalente Interaktionen oder um bindungsverstärkende, abhängige, multivalente Interaktionen handelt. Im Falle des Bindungsereignisses zwischen einem multivalenten Rezeptor und einem multivalenten Liganden wird laut Mammen *et al.*<sup>39</sup> postuliert, dass mit großer Sicherheit ein multivalentes Bindungsereignis eintritt.

Multivalente Systeme sind, nach einem initialen intermolekularen Bindungsereignis, durch spezifische intramolekulare Assemblierungsschritte gekennzeichnet. Dies unterscheidet multivalente Systeme (Abb. 11/c) sowohl thermodynamisch als auch kinetisch deutlich von den monovalenten (Abb. 11/a) und mehrfach monovalenten Systemen (Abb. 11/b), denen solche initialen intramolekularen Schritte fehlen.<sup>68</sup>



**Abb. 11:** Schematische Darstellung der Bindungsmodi zwischen Rezeptor und Ligand. **a)** Monovalente Interaktion eines monomeren Rezeptors und eines monomeren Liganden. **b)** Multiple monovalente Interaktion eines multivalenten Rezeptors und eines monomeren Liganden. **c)** Multivalente Interaktion eines multivalenten Rezeptors und eines multivalenten Liganden.

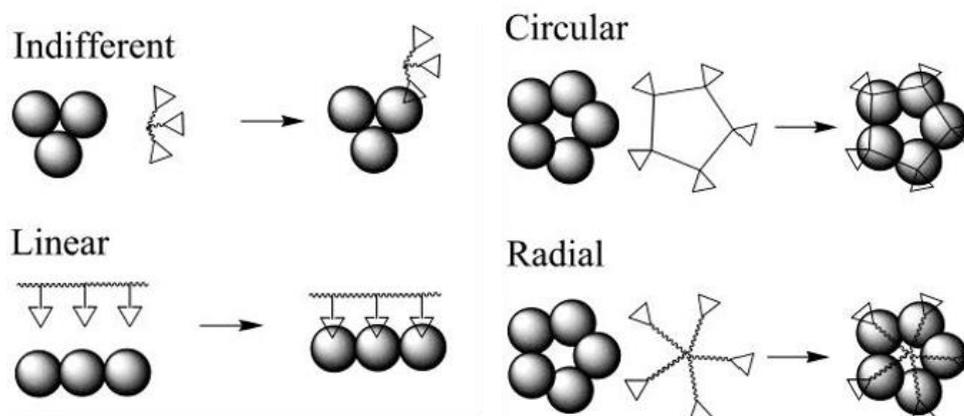
### 3.5.2 Aufbau und Funktion multivalenter Liganden - Topologie multivalenter Bindungen

Multivalente Liganden sind grundsätzlich aus einem zentralen Gerüst und mehreren Kopien eines Bindungsepitops aufgebaut. Diese Bindungsepitope oder auch Erkennungselemente (*recognition element*, RE) genannt, sind meist Kohlenhydrate, Peptide, Proteine oder andere niedermolekulare Verbindungen. Das zentrale Grundgerüst eines multivalenten Liganden

bestimmt seine Struktur, denn sowohl Form, Orientierung der REs, Flexibilität, Größe und Valenz sind ausschlaggebend für seine biologische Aktivität und Wirkmechanismus.<sup>69</sup>

Ein monovalenter Ligand aktiviert oder inhibiert zelluläre Prozesse und kann somit entweder als Agonist oder Antagonist bezeichnet werden. Die Übertragung dieser Nomenklatur auf multivalente Systeme birgt jedoch verschiedene Probleme, weshalb multivalente Liganden laut Kiessling *et al.*<sup>69</sup> besser als Effektoren oder Inhibitoren deklariert werden. Aus dieser Bezeichnung geht hervor, dass Inhibitoren bestimmte Rezeptorfunktionen blockieren und Effektoren zelluläre Prozesse aktivieren, ungeachtet der individuellen Aktivität ihrer Bindungsepitope oder der spezifischen Art ihrer Bindung.<sup>69</sup>

Bei der Entwicklung multivalenter Ligandenkonstrukte müssen neben der spezifischen Affinität der einzelnen Bindungsepitope auch die räumliche Orientierung und die Art ihrer Verknüpfung berücksichtigt werden, um ein multivalentes Wirkprinzip generieren zu können. Die Gerüststrukturen unterscheiden sich dabei in Form, Größe und physikalischen Eigenschaften. Vor allem der Aufbau der verbrückenden Spacer- oder Linker-Einheiten zwischen den Bindungsepitopen und deren Freiheitsgrade sorgen für eine unterschiedliche Präsentation der Bindungsepitope.<sup>64, 69</sup>



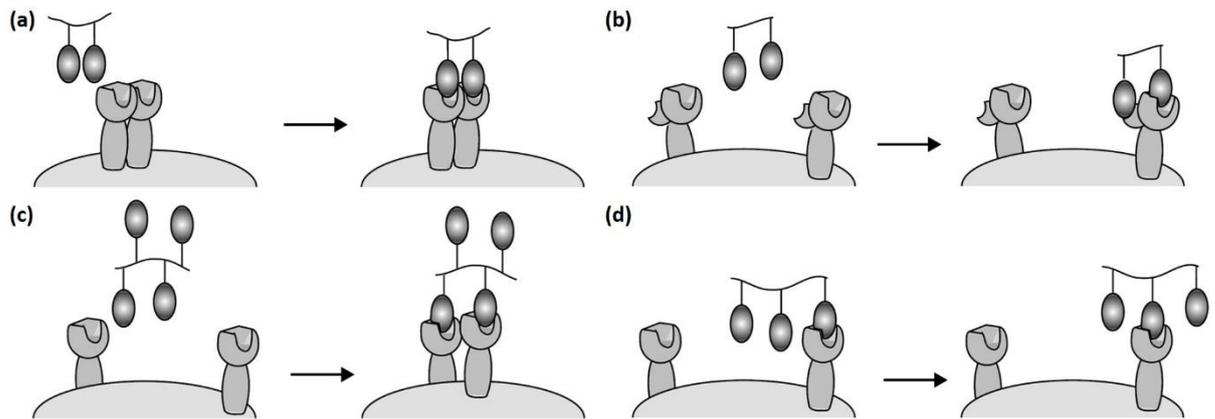
**Abb. 12:** Topologien multivalenter Bindungen.

Nach Kitov *et al.*<sup>64</sup> können vier elementare Topologien multivalenter Bindungen, also die Präsentation der Bindungsepitope unterschieden werden (Abb.12). Die indifferente Topologie ermöglicht die spezifische Wechselwirkung einer einzigen Ligandeneinheit mit dem Rezeptor, da die Länge der Spacer keine weitere Interaktion zulässt. Bei der linearen und circularen Topologie können mehrere Arme gleichzeitig eine spezifische Wechselwirkung eingehen, jedoch sind nach Ausbildung der initialen Wechselwirkung die Bindungsstellen aller

Ligandeneinheiten festgelegt. Für radial angeordnete Liganden gibt es keine topologischen Einschränkungen, wodurch jede Bindungsstelle für jede Rezeptoruntereinheit gleichermaßen zugänglich ist. Aus dieser flexiblen Verknüpfung der einzelnen Ligandeneinheiten resultiert thermodynamisch gesehen jedoch ein Verlust an Konformationsentropie. Wird eine starrere Verknüpfung der Ligandeneinheiten gewählt, wird dieser Entropieverlust verringert. Jedoch setzt diese Art der Verknüpfung eine optimale Positionierung des Liganden voraus, da ansonsten ein großer Anteil an Bindungsenthalpie verloren geht. Somit muss im Falle der radialen Topologie der Bindungsenthalpie- und der Bindungsentropieverlust gegenübergestellt und verglichen werden. In vielen Fällen eignet sich ein weniger komplexes System unter Berücksichtigung anderer multivalenter Effekte genauso gut oder besser, um eine stabile Bindung zu erzielen.<sup>30, 64</sup>

### 3.5.3 Bindungsmechanismen multivalenter Liganden

Neben der einfachen Bindung eines Liganden an einen Rezeptor ermöglicht der Aufbau multivalenter Liganden ihnen auf unterschiedliche Arten mit Rezeptoren in Wechselwirkung zu treten. Im Fall des Chelat-Effekts ist ein Ligand mit mehreren verbrückten Bindungsepitopen in der Lage gleichzeitig mehrere Rezeptorbindungsstellen eines einzelnen oligomeren Rezeptors zu binden (Abb. 13/a). Der notwendige Beitrag für die Translationsentropie wird beim erstmaligen Kontakt zwischen Rezeptor und Ligand aufgebracht. Alle nachfolgenden bindenden Wechselwirkungen bilden sich ohne zusätzlichen Entropieaufwand aus.<sup>69, 70</sup> Ähnlich verhält es sich bei der Ausbildung von Bindungen zu sekundären Bindungsstellen (Abb. 13/b), die einige Rezeptoren zusätzlich zu ihren primären Bindungsdomänen enthalten. Im Gegensatz zu monovalenten Liganden sind multivalente Liganden in der Lage, sogar aus weiter entfernten sekundären Bindungsstellen Gewinn an Bindungsenergie zu erzielen. Dabei ist es nicht essenziell, ob ein Bindungsepitop oder ein anderer Teil des Gerüsts in positive Wechselwirkung mit dem Rezeptor tritt.<sup>69, 71</sup> Zusätzlich zu ihrer Fähigkeit als Inhibitoren zu fungieren, können multivalente Liganden auch als Aktivatoren der Signalweiterleitung wirken. Dazu können multivalente Liganden beispielsweise durch die Aggregation signalauslösende Rezeptoren eine Signalkaskade initiieren (Abb. 13/c).<sup>39, 69</sup> Wenn multivalente Liganden monovalent an einen Rezeptor binden, ermöglicht die effektive lokale Konzentration an Bindungsepitopen in der Nähe des Rezeptors, im Falle der Dissoziation, die Rückbindung des multivalenten Liganden, wodurch ein Anstieg der Bindungsaffinität erzielt wird (Abb. 13/d).<sup>39, 67, 69</sup> Ein Beispiel für erhöhte Bindungsaffinität durch statistische Rückbindung ist das tetramere Protein Concanavalin A (ConA), ein für Mannose spezifisches Pflanzenlektin, welches vier Bindungsstellen in tetraedrischer Orientierung in einem Abstand von ca. 72 Å besitzt.<sup>67, 72</sup> Zusätzlich zu den unterschiedlichen Bindungsmechanismen sind multivalente Liganden durch ihre räumliche Beschaffenheit auch in der Lage eine sterische Stabilisierung der Oberfläche zu bewirken. Die große Raumerfüllung des gebundenen Liganden verhindert die weitere Interaktion des Rezeptors. Laut Mammen *et al.*<sup>39</sup> zählt diese Aktivität, neben der entropisch verstärkten Bindung, zu den wichtigsten hemmenden Wechselwirkungen multivalenter Liganden.<sup>69, 73, 74</sup>



**Abb. 13:** Interaktionsmechanismen multivalenter Liganden mit Zelloberflächenrezeptoren. **(a)** Chelatbildung - Gleichzeitiges Binden durch Überbrückung benachbarter Bindungsstellen eines oligomeren Rezeptors führt zu einer entropisch verstärkten Rezeptorbindung. **(b)** Bindung primärer und sekundärer Rezeptorbindungsstellen. **(c)** Clusterbildung - Bindung des Liganden führt zur Aggregation der Rezeptoren auf der Oberfläche. **(d)** Statistische Rückbindung zwischen einem monomeren Rezeptor und einem multivalenten Liganden. Eine hohe lokale Ligandkonzentration ermöglicht die Besetzung des Rezeptors bei Dissoziation durch einen anderen Liganden.<sup>67, 73</sup>

### 3.5.4 Kooperative Bindungsverstärkung aufgrund von Rückbindungseffekten als Grundlage hochaffiner multivalenter Binder

Viele Kooperativitätseffekte multivalenter Systeme beruhen auf der günstigen räumlichen Vororganisation der Bindungs epitope (Abb. 13/a), die zu einer Verringerung des Entropieverlusts im Falle einer Bindung führen sollen. Eine andere Möglichkeit, um eine positive Bindungsverstärkung zu erreichen, ist der in verschiedenen Arbeiten untersuchte Effekt der Rückbindung (Abb. 13/d).<sup>67, 72, 75, 76</sup> So bald ein einzelner Ligand-Rezeptor-Komplex dissoziiert, erhöht das Vorhandensein eines weiteren Liganden in der Nähe der Bindungsstelle die Wahrscheinlichkeit eines weiteren Bindungsereignisses. Das gesamte System wird so in einen Zustand gebracht, in dem alle Liganden gebunden sind.<sup>75</sup> In der Arbeit von Diestler und Knapp<sup>77</sup> wird eine lokal erhöhte Konzentration der Liganden als mögliche Erklärung für eine erhöhte Kooperativität der Binder angegeben. In der Arbeit von Rao *et al.*<sup>78</sup> wird sogar ein Beispiel für ein trivalentes System gezeigt, dessen hohe Affinität auf den Einfluss des Rückbindungseffekts zurückzuführen ist. Nach der Arbeit von Weber *et al.*<sup>75</sup> ist zusätzlich davon auszugehen, dass der thermodynamische Beitrag der Rückbindung mit der Wertigkeit des Systems zunimmt und dass der Beitrag der Rückbindung die Bildung eines stabilen rezeptorgebundenen Zustands induzieren kann.



## 4 Methoden

Teile dieser Arbeit wurden bereits im Rahmen der vorangegangenen Masterarbeit selbstständig erarbeitet. Einige Abschnitte und Durchführungen können daher ähnlich oder identisch sein. Die Masterarbeit wurde nicht veröffentlicht.

### 4.1 *Molecular Modeling*

Der englischsprachige Ausdruck *molecular modeling* impliziert zum einen eine Verbindung zu Molekülen und zum anderen wird der Begriff „Modell“ als eine vereinfachte oder idealisierte Beschreibung eines Systems oder Prozesses, oft in mathematischen Zusammenhang, um Berechnungen und Vorhersagen zu erleichtern, definiert. Das *molecular modeling* beschreibt somit die computerbasierte Darstellung, Bearbeitung und Berechnung des Verhaltens von Molekülen und molekularen Systemen.<sup>79</sup> Diese Technik ermöglicht neben der räumlichen Darstellung von komplexen Molekülen auch die Berechnung ihrer physikochemischen Moleküleigenschaften. Das Modellieren und Simulieren von Bindungsprozessen ist ein sehr komplexes Verfahren, da sowohl die Besonderheiten des Targetproteins, als auch die des untersuchten Liganden, sowie das Medium berücksichtigt werden müssen.<sup>29</sup> Als Grundlage dienen unter anderem empirisch ermittelte NMR-spektroskopische Strukturinformationen oder röntgenkristallographische Daten aus frei zugänglichen Datenbanken wie der *Brookhaven-Proteindatenbank* (PDB).<sup>80</sup> Molekulare Systeme aus Kristallstrukturen besitzen meist eine energetisch ungünstige Startkonformation, wodurch eine energetische Minimierung zu Anfang unerlässlich ist. Dieser Minimierung liegen verschiedene Kraftfeldkalkulationen zugrunde. Die Kraftfeldrechnung ermittelt dabei die energetisch günstigste dreidimensionale Struktur des Systems. Die verwendeten Kraftkonstanten und Gleichgewichtsgrößen werden entweder empirisch z.B. durch Röntgenstrukturanalyse oder theoretisch aus quantenmechanischen *ab initio* Berechnungen gewonnen. Die Geometrie des Moleküls wird dabei kontinuierlich so verändert bis ein Energieminimum und somit eine gute Startkonformation erreicht ist.<sup>81</sup> Anhand der optimierten Struktur kann dann computergestützt ein konformationell passender Ligand entwickelt werden, dessen

Wechselwirkungen optimal zum entsprechenden Protein passen. Dazu gibt es zwei grundlegende Ansätze: Zum einen das Einpassen kompletter Ligandenstrukturen in die Bindungstasche (*docking*) und zum anderen der fragmentbasierte, schrittweise Aufbau neuer Liganden, das sogenannte *de novo*-Design. Die Konstruktion des Liganden kann dabei auch durch Modifikation eines nativen Liganden oder einer anderen bekannten Leitstruktur erfolgen. Bei der Modifizierung von Molekülbereichen muss berücksichtigt werden, dass sowohl das Protein als auch der Ligand eine gewisse Flexibilität besitzen und somit eine Bewegung der Interaktionspartner zulassen. In Moleküldynamik-Simulationen (MD) erfolgt die numerische Berechnung der Zeitentwicklung eines molekularen Systems nach den Gesetzen der klassischen Mechanik. Diese Simulationen zeigen das dynamische Verhalten von Molekülen oder Komplexen über einen bestimmten Zeitraum.<sup>81</sup>

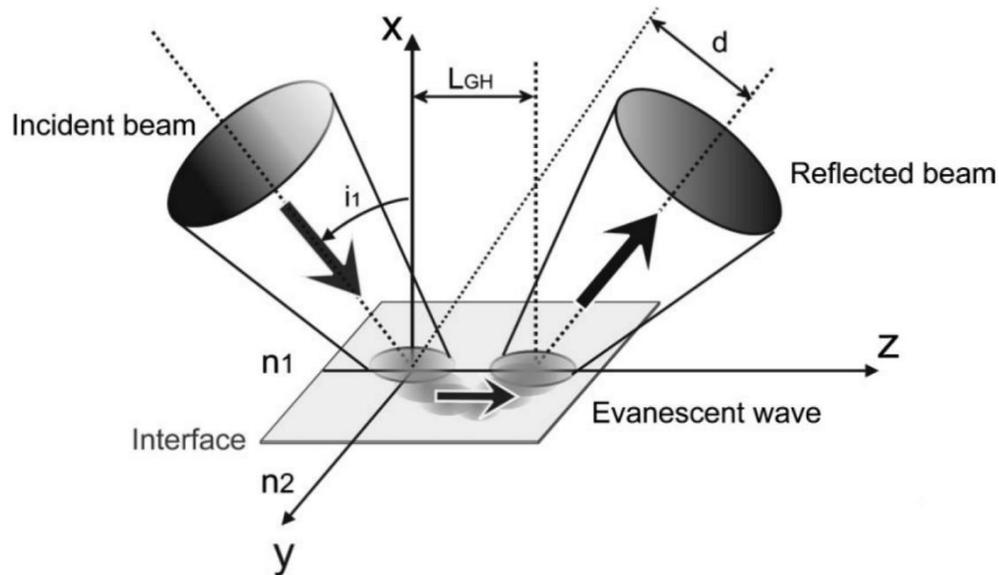
Die Qualität der Ergebnisse des *molecular modelings* ist von verschiedenen Faktoren abhängig, wie der zugrundeliegenden Röntgenstrukturdaten sowie die bei den Berechnungen vorgenommenen Vereinfachungen des Systems. Meist können jedoch trotz starker Vereinfachungen aussagekräftige Ergebnisse im jeweiligen Bezugssystem erzielt werden.

## 4.2 Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)

Die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (*surface plasmon resonance spectroscopy*, SPR-Spektroskopie) ist ein spektroskopisches Analyseverfahren welches die Detektion von Adsorptionsvorgänge von Molekülen an Metalloberflächen ermöglicht.<sup>82</sup> Biacore-Systeme nutzen das Phänomen der Oberflächenplasmonenresonanz, um die Wechselwirkung zwischen Molekülen in Echtzeit zu verfolgen. Dazu wird ein Interaktionspartner auf der Oberfläche eines mit Gold beschichteten Sensorchips immobilisiert und anschließend ein weiterer Interaktionspartner über die Oberfläche geleitet. Das Verfahren ermöglicht somit die Beobachtung von Bindungsereignisse in strömenden Systemen.

Der Sensorchip wird mit, in einem bestimmten Winkel polarisiertem, Licht bestrahlt. Durch die Reflexion des eingestrahlt Lichts entsteht eine elektromagnetische Welle. 1943 bewiesen Goos und Hänchen<sup>83</sup> in Experimenten zur Totalreflexion, dass der reflektierte Strahl nicht am Ort des Auftreffens, sondern erst etwas versetzt zurückläuft. Mit der Annahme, dass das Licht teilweise in das optisch dünnere Medium eindringt, lässt sich dieses Phänomen mit

Hilfe der geometrischen Optik verdeutlichen. Das elektromagnetische Feld der totalreflektierten Welle an einer Grenzfläche fällt nicht abrupt auf null ab. Das folgt aus den Stetigkeitsbedingungen für das elektromagnetische Feld bei Totalreflexion von einem optisch dichteren in ein optisch dünneres Medium. Für  $\theta < \theta_T$  entsteht eine entlang der Grenzfläche propagierende Welle, die exponentiell mit der Eindringtiefe gedämpft wird. Diese Welle im optisch dünneren Medium wird dann als evaneszentes Feld bezeichnet (Abb. 14).<sup>84</sup>

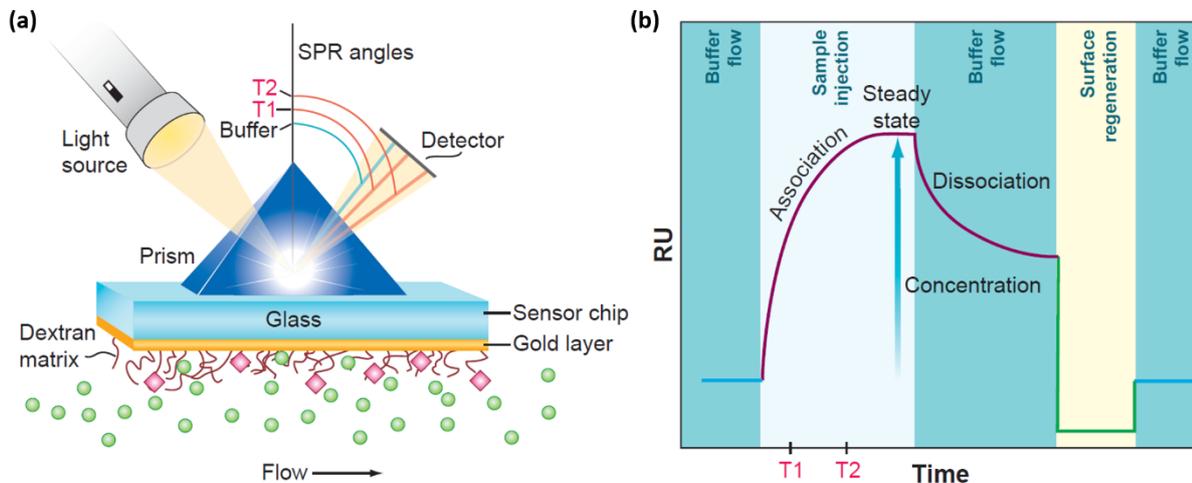


**Abb. 14:** Schematische Darstellung des Goos-Hänchen-Effekts als reine räumliche Verschiebung des reflektierten Lichtstrahls.<sup>84</sup>

Sind die Resonanzbedingungen erfüllt, ist das evaneszente Feld in der Lage mit Oberflächenplasmonen eines Edelmetallfilms zu interagieren. Dabei sind die Resonanzbedingungen abhängig vom Einfallswinkel ( $\theta$ ), von den Brechungsindizes ( $n_1$  und  $n_2$ ) und von der Wellenlänge. Während eines SPR-Experiments wird die Wellenlänge konstant gehalten, damit Veränderungen des Brechungsindex in der Nähe der Oberfläche des Metallfilms durch die Veränderung des Resonanzwinkels detektiert werden können.

Auf der Optik-abgewandten Seite der Metalloberfläche wird einer der Bindungspartner immobilisiert. Wird dann eine Analytlösung über den Chip geleitet kommt es, durch die Bindung des Analyten, zu einer Änderung des Brechungsindex der Lösung an der Oberfläche. Die daraus resultierende Änderung des Resonanzwinkels ermöglicht die Nachverfolgung von Bindungsereignissen zwischen Biomolekülen in Echtzeit (Abb. 15). Die Amplitude der evaneszenten Feldwelle nimmt dabei exponentiell mit dem Abstand von der

Oberfläche ab. Die effektive Eindringtiefe hinsichtlich der Empfindlichkeit gegenüber dem Brechungsindex beträgt in Biacore-Systemen ungefähr 150 nm.<sup>81, 85, 86</sup>



**Abb. 15:** Biomolekulare Interaktionsanalyse mittels Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) **(a)** SPR-Detektion. Monochromatisches Licht wird durch ein Prisma auf einen Sensorchip eingestrahlt und von der goldbeschichteten Grenzfläche zwischen den zwei Medien mit unterschiedlichen Brechungsindizes vollständig reflektiert. Der Intensitätsabfall im Resonanzwinkel erscheint als "Schatten" im reflektierten Lichtkeil, der von einem Detektor erfasst und in einem Sensorgramm aufgezeichnet wird. Die Position des "Schattens" ändert sich mit der Änderung des Brechungsindex in der oberflächennahen Lösungsmittelschicht, z. B. wenn ein Analyt P (grüne Kugeln) an einen immobilisierten Liganden T (rosa Rauten) bindet. Die Änderung des Brechungsindex ist dabei direkt proportional zur Beladung der Matrix auf der Chipoberfläche. Der blaue SPR-Winkel definiert die Position des Strahls mit reduzierter Intensität. **(b)** idealisiertes Sensorgramm. Die gezeigten Zeitpunkte T1 und T2 entsprechen den beiden roten SPR-Winkeln. Diese verschieben sich, wenn P mit der Zeit an T bindet. Wenn die Konzentration von gebundenem P zunimmt (Pfeil), nähert sich die RU-Reaktion der Sättigung (*steady state*). Der Komplex dissoziiert bei Wiedereinführung des Puffers. Das RU-Signal der Injektionslösung fällt unter die Basislinie, wenn der entsprechende Brechungsindex niedriger als der des Puffers ist. Um das Grundlinienniveau wiederzuerlangen, wird eine Regenerationslösung injiziert.<sup>85, 87</sup>

Das resultierende Sensorgramm (Abb. 15/b) ist eine Darstellung des Oberflächenplasmonenresonanzsignals und gibt die Änderung des Resonanzwinkels in *response units* (RU) gegen die Zeit an. Hierbei entspricht ein RU der Bindung von 1 pg Material an die Oberfläche mit einer Fläche von 1 mm<sup>2</sup>. Demnach ist die Einheit RU definiert als pg/mm<sup>2</sup>.<sup>81, 85</sup>

Das Sensorgramm lässt sich in Assoziation, Dissoziation und Regeneration unterteilen und gibt Informationen über die Kinetik und Thermodynamik des Bindungsereignisses. Für die kinetische Ermittlung der Dissoziationskonstanten  $K_D$  lässt sich der Verlauf der Messung an die Langmuir-Isotherme anpassen. Der Quotient aus den so ermittelten Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation ( $k_{on}$ ) und der Dissoziation ( $k_{off}$ ) ergibt die Dissoziationskonstante  $K_D$  (Gl. 7).<sup>82, 88, 89</sup>

für  $R + L \rightleftharpoons RL$  gilt:

$$\frac{[R] \cdot [L]}{[RL]} = \frac{k_{off}}{k_{on}} = K_D$$

**Gl. 7:** Kinetische Bestimmung der Dissoziationskonstante  $K_D$  mit  $[R]$  = Konzentration des immobilisierten Rezeptors,  $[L]$  = Konzentration des gelösten Liganden und  $[RL]$  = Konzentration des Protein-Ligand-Komplexes,  $k_{off}$  = Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation,  $k_{on}$  = Geschwindigkeitskonstante der Assoziation.

Durch die Auswertung von Sensorgrammen einer Konzentrationsreihe lässt sich zudem die thermodynamische Dissoziationskonstante  $K_D$  bestimmen. Die im *steady state* gemessenen  $RU_{max}$  verhalten sich nach dem *one site binding* Modell proportional zur Konzentration der Ligandlösung  $[L]$  (Gl. 8).

$$RU([L]) = \frac{RU_{max} \cdot [L]}{K_D + [L]}$$

**Gl. 8:** Thermodynamische Analyse der erhaltenen SPR-Antworten (RU), wobei  $RU_{max}$  dem extrapolierten RU-Wert im Gleichgewicht bei unendlich hoher Ligandkonzentration  $[L]$  und  $K_D$  der Dissoziationskonstante entspricht.

Der erhaltene Wert  $RU_{max}$  entspricht dem theoretischen RU-Wert im Gleichgewicht bei unendlich hoher Ligandkonzentration  $[L]$ . Für die thermodynamischen Dissoziationskonstante  $K_D$  ergibt sich  $RU_{max}/2$ .<sup>89</sup>



## 5 Aufgabenstellung

Die Influenza ist eine ansteckende, durch Viren ausgelöste Infektionskrankheit des respiratorischen Trakts, die mitunter tödlich verlaufen kann. Das aviäre Influenzavirus H5N1 gehört, seitdem es in seiner hochpathogenen Form in Erscheinung getreten ist, zu den besonders gefährlichen Influenzavirusstämmen. Eine bislang ausbleibende humane Pandemie mit dieser Virusvariante ist in der viralen Präferenz für bestimmte Zielstrukturen beim Primärkontakt mit der Wirtszelle begründet. Eine Adaption an menschliche Zellen durch Mutation oder Reassortierung der genetischen Informationen des Virus und eine daraus folgende Mensch-zu-Mensch Übertragung könnte jedoch zu einer humanen Pandemie mit hoher Letalität führen. Das virale Oberflächenprotein Hämagglutinin H5 ist durch das Binden von Kohlenhydratstrukturen auf der Zelloberfläche für den Primärkontakt zwischen Virus und Wirtszelle verantwortlich. Dabei bedient sich das Protein zur Affinitätssteigerung multivalenter Effekte. Multivalente Wechselwirkungen sind allgegenwärtig und ein erfolgreiches System, um starke und zugleich reversible Wechselwirkungen zu erzeugen. Aufgrund von unterschiedlichen multivalenten Effekten kann eine enorme Affinitätssteigerung von schwachen monovalenten Wechselwirkungen erreicht werden. Die Inhibition des homotrimeren Hämagglutinins mittels hochaffiner multivalenter Inhibitoren ist somit ein interessanter Ansatzpunkt für die Entwicklung potenzieller neuer Wirkstoffe.

Ziel dieser Arbeit war das strukturbasierte Design von multivalenten Liganden, sowie die Untersuchung von Syntheserouten zur Darstellung der Bausteine und Strukturen für einen möglichen Einsatz als *entry*-Inhibitoren des Hämagglutinins H5 des Vogelgrippevirus basierend auf Oligoethylenglycolen als biokompatible Linker. Dazu sollte das Konzept aus der vorangegangenen Masterarbeit aufgegriffen, weiterentwickelt und angepasst werden. Das Hämagglutinin H5 sollte *in silico* untersucht und entsprechend dem Konzept passende Liganden und Bausteine zunächst modelliert und dann synthetisiert werden. Die erfolgreich durchgeführten Synthesen, sowie die Reinigung und Charakterisierung der Fragmente sollte zudem für eine breite Anwendung des Konzeptes auf vergleichbare Systeme angepasst werden.



## 6 Ergebnisse und Diskussion

Teile dieser Arbeit wurden bereits im Rahmen der vorangegangenen Masterarbeit selbstständig erarbeitet. Einige Abschnitte und Durchführungen können daher ähnlich oder identisch sein. Alle aufgeführten Synthesen wurden für diese Arbeit jedoch unter angepassten und optimierten Bedingungen und mit meist deutlich besseren Ausbeuten neu durchgeführt. Die Masterarbeit wurde nicht veröffentlicht.

### 6.1 Molecular Modeling - Vorbereitung der *in silico* Studien

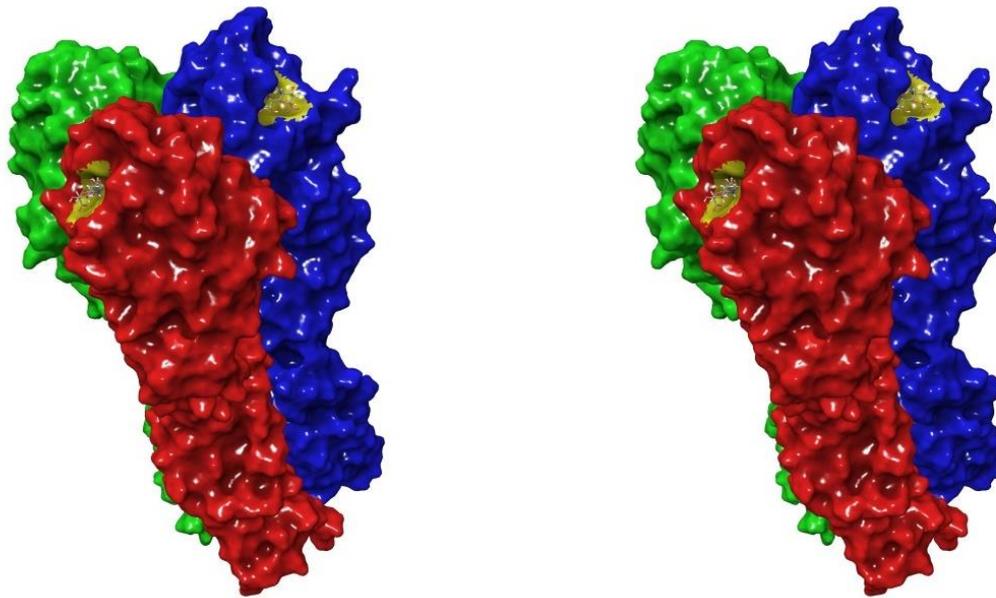
Alle im Nachfolgenden gezeigten *in silico* Berechnungen und aufgeführten theoretischen Energien sind nur in ihrem jeweiligen Bezugssystem vergleichbar. Die berechneten Energien sind nicht als absolute Werte zu betrachten. Dementsprechend wurden alle gezeigten theoretischen Energien für diese Arbeit neu berechnet, um eine Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten.

#### 6.1.1 Modellierung eines trimeren Hämagglutinins

Die Ergebnisse des *molecular modelings* wurden in Maestro 2017-1 in der Version 11.1.011 von Schrödinger mit Hilfe der Programme und Softwareapplikationen „Prime“, „Glide“, „MacroModel“, „LigPrep“ und „Desmond“ erstellt.

Als Grundlage des *molecular modelings* dienten die Kristallstrukturen 1JSO<sup>90</sup> und 2IBX<sup>91</sup>, die der frei zugänglichen PDB-Datenbank entnommen wurden. Die Kristallstruktur 1JSO zeigt eine monomere Struktur des Hämagglutinins kokristallisiert mit dem natürlichen Liganden *N*-Acetylneuraminsäure. Das Monomer ist aus einer HA1- und einer HA2-Domäne aufgebaut, die über eine Disulfidbrücke verknüpft sind. Die Bindungstasche mit der *N*-Acetylneuraminsäure befinden sich im globulären Teil der HA1-Domäne. Die Kristallstruktur 2IBX zeigt eine trimere Struktur des Hämagglutinins, wobei der Aufbau der drei Monomere, dem der Struktur des

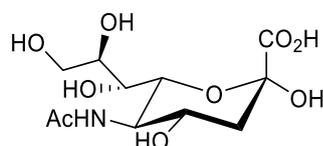
1J50 entspricht, jedoch ohne nativen Liganden in den Bindungstaschen. Die Strukturen wurden in Maestro mit dem „Protein Preparation Wizard“ (PPW) optimiert und anschließend mit „Protein Structure Alignment“ (PSA) aufeinander gefittet (vgl. Abschnitt 7.4.2). Es wurde ein homotrimeres Hämagglutinin mit nativen Liganden in allen drei Bindungstaschen erhalten (Abb. 16). Der Alignment Score des Fittings betrug bei allen drei Monomeren 0.009 und der RMSD-Wert (*root mean square deviation*) lag bei 0.466, 0.475 und 0.479 Å, wodurch sich das modellierte trimere Hämagglutinin für die weiteren *in silico* Studien qualifizierte.



**Abb. 16:** Darstellung des trimeren Hämagglutinins im *crossed eye stereo*-Modus mit *N*-Acetylneuraminsäure in allen drei Bindungstaschen. Jedes Monomer (rot, grün, blau) ist aus den Untereinheiten HA1 und HA2 aufgebaut, die über eine Disulfidbrücke verknüpft sind. Die Rezeptorbindungstaschen mit den *N*-Acetylneuraminsäuren befinden sich im globulären Teil jeder HA1-Domäne (gelb).

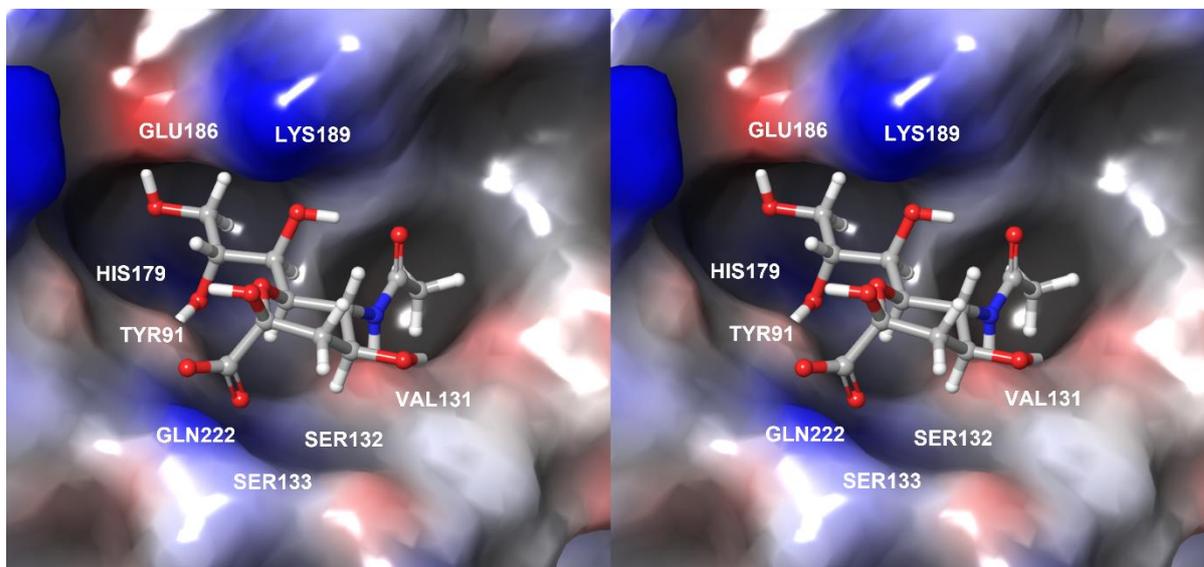
### 6.1.2 Untersuchung der Rezeptorbindungsdomänen des H5

Für die Entwicklung von potenziellen Liganden des Hämagglutinin H5 wurden bereits während der Masterarbeit die bestehenden Wechselwirkungen zwischen dem nativen Liganden (Abb. 17) und den Aminosäuren der Bindungstasche des Proteins untersucht.



**Abb. 17:** *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) als natürlicher Ligand des Hämagglutinin H5.

In Abb. 18 ist die *N*-Acetylneuraminsäure in der Rezeptorbindungstasche des Hämagglutinins H5 gezeigt. Die Aminosäuren des Proteins, welche die wichtigsten Wechselwirkungen zum Liganden ausbilden und somit zur spezifischen Bindung beitragen, sind beschriftet. Für den Komplex aus monomerem Hämagglutinin und *N*-Acetylneuraminsäure wurde in Maestro eine Bindungsenergie von -54.5 kcal/mol berechnet.



**Abb. 18:** Darstellung im *crossed eye stereo*-Modus der Neu5Ac in der der Rezeptorbindungstaschen des Hämagglutinins H5. Die Aminosäuren des Proteins, welche die wichtigsten Wechselwirkungen zum Liganden ausbilden und somit zur spezifischen Bindung beitragen, sind beschriftet. Die Proteinoberfläche ist entsprechend des elektrostatischen Potentials eingefärbt (blau = positives Potential, rot = negatives Potential, grau = neutrales Potential).

Die Methylgruppe der *N*-Acetylfunktion der Neuraminsäure liegt in einer hydrophoben Vertiefung der Bindungstasche, wobei das amidische NH eine Wasserstoffbrückenbindung zum Rückgrat von Val 131 (Abstand 2.8 Å) ausbildet. Das C-1 der Carboxylatgruppe der Neuraminsäure akzeptiert Wasserstoffbrücken der Hydroxylgruppe des Ser132 (Abstand 2.7 Å), der NH- und der Hydroxylgruppe des Ser133 (Abstand 2.6 Å) und der Aminogruppe des Gln222 (Abstand 2.6 Å). Weitere Wasserstoffbrücken gehen von den OH-Gruppen der Glycerolseitenkette aus und bestehen zwischen der OH-Gruppe am C-7 und dem Lys189, der OH-Gruppe am C-8 und dem Tyr91, sowie zwischen der terminalen OH-Gruppe am C-9 und dem Glu186 bzw. His179. Andere funktionelle Gruppen wie die Carbonylfunktion der *N*-Acetylgruppe oder auch die Hydroxylgruppe am C-2 zeigen aus der Bindungstasche heraus und gehen keine spezifischen Wechselwirkungen mit den Aminosäuren des Proteins

ein. Vor allem die Eigenschaft der Hydroxylgruppe am C-2 qualifizieren diese als möglichen Anker für die Verknüpfungen übergeordneter Strukturen.

Im Komplex aus trimeren Hämagglutinin und nativen Liganden in allen drei Bindungstaschen bilden die *N*-Acetylneuraminsäuren die gleichen spezifischen Wechselwirkungen wie im monomeren Komplex aus. Für den trimeren Komplex wurde in Maestro, im Vergleich zum monomeren Komplex, wie erwartet eine knapp dreimal so starke Bindungsenergie von -156.9 kcal/mol berechnet. Die Ermittlung der theoretischen Bindungsenergie erfolgt dabei in Maestro nach energetischer Minimierung mit dem Programm „MacroModel“ (vgl. Kapitel 7.4.5) mit der MM-GBSA (*molecular mechanics - generalized Born surface area*) Methode im Modul Prime (vgl. Kapitel 7.4.4). Dazu wurde jeweils die Energie des Ligand-Protein-Komplexes ( $E_{PL}$ ) berechnet und die Energien des Proteins ohne Liganden ( $E_P$ ) und die des freien Liganden ( $E_L$ ) von dieser subtrahiert (Gl. 9).

$$E_{Bind} = E_{PL} - E_P - E_L$$

**Gl. 9:** Berechnung der theoretischen Bindungsenergie bei der Bindung eines Liganden an ein Protein  $E_{Bind}$  mit  $E_{PL}$  = Energie des minimierten Protein-Ligand Komplexes,  $E_P$  = Energie des Proteins und  $E_L$  = Energie des Liganden.

## 6.2 Design von Liganden für das Hämagglutinin H5 und *in silico* Studien

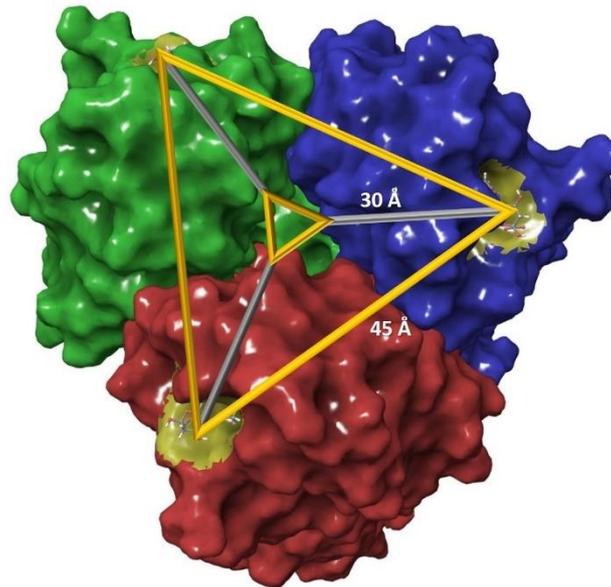
Um passende Liganden zur Inhibition des Hämagglutinin H5 zu finden, können verschiedene Faktoren in den Fokus der Entwicklung gerückt werden. Dabei spielt das Maß der Bindungsaffinität eine wichtige Rolle für die Interaktion des Protein-Ligand-Komplexes. Ebenso wichtig ist auch die von der Affinität zu unterscheidende Avidität des Komplexes, welche eine tragende Rolle bei multivalenten Interaktionen spielt (vgl. Abschnitt 3.5)

Die Bindungsaffinität beschreibt die Stärke monovalenter Wechselwirkungen zwischen einem Liganden und einem Rezeptor. Bei dieser Wechselwirkung bindet der Ligand über verschiedene Arten von Bindungen wie Wasserstoffbrücken, Ionenbindungen, Van-der-Waals-Wechselwirkungen und elektrostatische Kräfte an einen Rezeptor (vgl. Abschnitt 3.4.1).

Die Bindungsaffinität ist somit ein Maß für das dynamische Gleichgewicht des Verhältnisses zwischen  $k_{on}$  (Geschwindigkeit der Komplexassoziation) und  $k_{off}$  (Geschwindigkeit der Komplexdissoziation). Die Avidität wiederum beschreibt die Gesamtstärke aller nichtkovalenten Wechselwirkungen eines Komplexes aus einem multivalenten Liganden und einem multivalenten Rezeptor. Ursprünglich wurde der Begriff in der Immunologie zur Beschreibung der Bindung zwischen Antikörper und Antigen verwendet. Die Avidität zwischen einem Rezeptor und einem Liganden wird durch unterschiedliche Faktoren beeinflusst. Sowohl die Affinitäten der einzelnen monovalenten Wechselwirkungen des Komplexes, die Wertigkeit des Proteins, die Topologie des Liganden, als auch die entropischen und enthalpischen Energiebeiträge der einzelnen Bausteine tragen zur Gesamtstärke der Avidität bei (vgl. Abschnitt 3.4).<sup>92</sup>

Bei Betrachtung des trimeren Hämagglutinin H5 in der Draufsicht (Abb. 19) wird die Symmetrie des Proteins und die exponierte Lage der Bindungstaschen deutlich sichtbar. Aufgrund dieser Beschaffenheit und einer von Kitov und Bundle<sup>64</sup> ermittelten thermodynamischen Präferenz bietet sich die Entwicklung von radialen,  $C_3$ -symmetrischen multivalenten Liganden für das Hämagglutinin an. In der Abbildung ist sowohl schematisch der Abstand der einzelnen Bindungstaschen zueinander als auch der Abstand der Bindungstaschen zur Symmetrieachse des Hämagglutinins dargestellt. Aus dieser idealisierten Darstellung ergibt sich nach Waldmann *et al.*<sup>51</sup> ein Abstand der Bindungstaschen von ca. 45 Å

und nach Bhatia *et al.*<sup>53</sup> ein mit diesem Ergebnis übereinstimmender Abstand der Bindungstaschen von ca. 4 – 5 nm. Die minimale Spannweite der „Linkerarme“ ergibt sich demnach nach zu ca. 30 Å.<sup>51</sup>



**Abb. 19:** Draufsicht des modellierten trimeren Hämagglutinins H5 (monomere Einheiten rot, grün und blau gefärbt). Der Bereich der Bindungstaschen ist gelb eingefärbt. Der Abstand der einzelnen Bindungstaschen zueinander und zur Symmetrieachse des H5 sind farblich hervorgehoben.

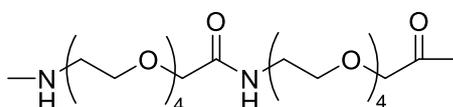
Um in den nachfolgenden Abschnitten auf die Entwicklung und *in silico* Studien der in dieser Arbeit entwickelten Liganden einzugehen, wird in den Kapiteln 6.2.1 und 6.2.2 zunächst kurz auf die Entwicklung und durchgeführten *in silico* Studien des Liganden **1** eingegangen. Zudem sind alle nachfolgend aufgeführten Energien nicht als absolute Werte zu betrachten und nur im selben Bezugssystem vergleichbar. Sie ermöglichen jedoch die Vorhersage einer Tendenz zum Vergleich zwischen den nativen und den modellierten Liganden.

### 6.2.1 Design eines trivalenten Liganden – Variation der Linkerlänge

In der vorangegangenen Masterarbeit wurde der trivalente Ligand **1** (Abb. 22) als potenzieller Inhibitor für das Hämagglutinin H5 entwickelt. Die multivalente Struktur besaß einen zentralen  $C_3$ -symmetrischen *core* an den über flexible Linker Neuraminsäurebausteinen als Bindungsepitope verknüpft waren. Da in anderen Arbeiten<sup>93</sup> bereits gezeigt werden konnte, dass ein gleichzeitiges Binden der drei Rezeptorbindungsdomänen möglich ist und zu einer

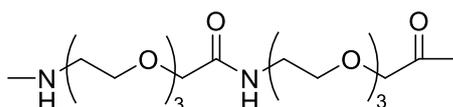
positiven Bindungsverstärkung führt, lag der Fokus auf der Entwicklung eines modifizierten Linkers, welcher zusätzlich zum spannungsfreien, gleichzeitigen Binden der drei Rezeptorbindungstaschen möglichst geringe Wechselwirkungen mit der Oberfläche des Proteins ausbildet, eine sterische Flexibilität vorweist und dabei trotzdem den Verlust an Konformationsentropie möglichst geringhält. Die Beschaffenheit des Linkers sollte zudem einen positiven Effekt auf die Löslichkeit des Liganden haben.

In Abb. 20 ist das, während der Masterarbeit entwickelte, Linkerfragment aus zwei gleichen amidisch verknüpften Tetraethylglycolderivaten dargestellt. Das Fragment besteht aus 30 Schweratomen mit einer Länge in gestreckter Anordnung von ca. 44 Å.



**Abb. 20:** Der Linker besteht aus zwei Tetraethylglycolderivaten, die je um eine Essigsäure verlängert und amidisch verknüpft wurden. Der Linker besteht aus 30 Schweratomen mit einer Länge in gestreckter Anordnung von ca. 44 Å.

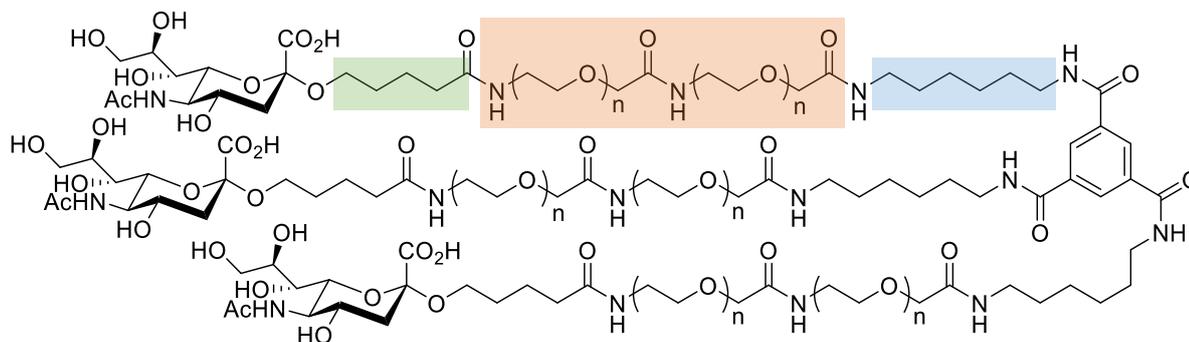
Zusätzlich zu dem Linkerfragment aus Tetraethylglycolderivaten wurde in dieser Arbeit ein vergleichbares Fragment basierend auf Triethylglycolderivaten entwickelt. Durch die Verkürzung um insgesamt zwei Ethylglycoleinheiten ist die Spannweite des entsprechenden Linkers deutlich kürzer. Die unterschiedliche Länge der zwei Fragmente bietet zudem die Möglichkeit von unterschiedlichen Kombinationen und somit verschiedene Längen des Linkers. Aufgrund von verschiedenen Problemen bei der Darstellung der Tetraethylglycol-Fragmente sollte anhand des kürzeren Triethylglycols überprüft werden, ob die Länge der Glycolderivate direkten Einfluss auf die Synthesen hat und sich entsprechend die Durchführungen und Ausbeuten optimiert lassen. In Abb. 21 ist das entwickelte Linkerfragment aus zwei gleichen amidisch verknüpften Triethylglycolderivaten dargestellt. Das Fragment besteht aus 24 Schweratomen mit einer Länge in gestreckter Anordnung von ca. 35 Å.



**Abb. 21:** Der Linker besteht aus zwei Triethylglycolderivaten, die je um eine Essigsäure verlängert und amidisch verknüpft wurden. Der Linker besteht aus 24 Schweratomen mit einer Länge in gestreckter Anordnung von ca. 35 Å.

In Abschnitt 6.5.1 sind die Synthesen der verschiedenen Linker dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass die Synthesen der kürzeren Linkerfragment meist bessere Ausbeuten gegenüber den längeren Fragmenten lieferten. Zudem wurden literaturbekannte Synthesen, unter teilweise optimierten Bedingungen mit deutlich besseren Ausbeuten durchgeführt.

Der während der Masterarbeit entwickelte trivalente Ligand **1** und der ergänzend dazu für diese Arbeit mit den Triethylenglycolfragmenten modifizierte Ligand **2** sind in Abb. 22 dargestellt. Neben dem Linkerfragment aus Tetraethylenglycolderivaten für **1** und Triethylenglycolderivaten für **2** (orange) besitzen die Liganden eine von Trimesoylchlorid abgeleitete  $C_3$ -symmetrische aromatische *core*-Struktur. Weitere Struktur motive der Liganden sind zwei unterschiedlich lange Alkylspacer (grün, blau) und die Neuraminsäurebausteine.



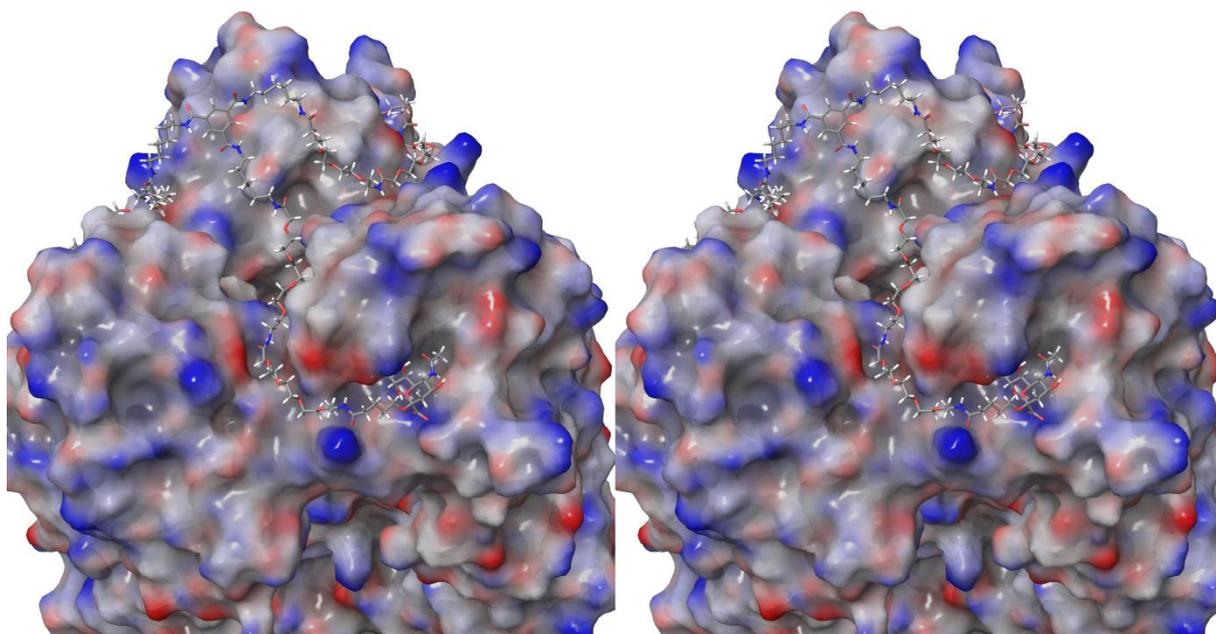
**Abb. 22:** Trivalenter Ligand **1** für  $n = 4$  und **2** für  $n = 3$ . Die *core*-Struktur ist von Trimesoylchlorid abgeleitet. Es sind pro Arm je ein Alkylspacer mit 5 (grün) und einer mit 6 Kohlenstoffatomen (blau), ein Linker bestehend aus zwei amidisch verknüpften Tetra- ( $n = 4$ ) oder Tri- ( $n = 3$ ) ethylenglycolderivaten (orange) und eine terminale Neuraminsäure enthalten.

Ein Arm des Liganden mit Tetraethylglycollinkerfragmenten und Alkylspacern besteht aus 45 Schweratomen und besitzt eine Gesamtlänge von ca. 56 Å (vom C-Atom des Aromaten bis zum ersten C-Atom des Zuckers). Ein Arm des entsprechenden Liganden mit Triethylglycollinkerfragmenten und Alkylspacern besteht aus 39 Schweratomen und besitzt eine Gesamtlänge von ca. 48 Å (vom C-Atom des Aromaten bis zum ersten C-Atom des Zuckers).

Verschiedene Darstellungsprobleme des sehr komplexen trimeren Liganden **1**, insbesondere die während Masterarbeit verfolgte stufenweise Synthese des Linkerfragments führten dazu, dass in dieser Arbeit eine bessere Synthesestrategie für das Tetraethylenglycolfragment und das neu hinzugekommene Triethylethylenglycolfragment entwickelt wurde. Zudem sollte der Schwerpunkt auf der Entwicklung und Darstellung weiterer Liganden, mit ähnlichen und vereinfachten Strukturmotiven liegen. Die Grundstruktur der Liganden wurde dazu hinsichtlich verschiedener Faktoren variiert und optimiert. Dabei wurden auch die bereits erfolgreichen Teilsynthesen im Hinblick auf eine bessere Durchführbarkeit und höhere Ausbeute überarbeitet. Es wurden unterschiedliche Ansätze gewählt (vgl. Kapitel 6.2.3).

### 6.2.2 *In silico* Bindungsmodus des Liganden **1**

Während der Masterarbeit wurden Bindungsstudien zum postulierte Bindungsmodus zwischen dem Liganden **1** und dem Hämagglutinin H5 durchgeführt. In Abb. 23 ist die erwartete Bindung nach energetischer Minimierung gezeigt. Für den Komplex aus dem trivalenten Liganden und dem trimeren H5 wurde im Vergleich zum Komplex aus drei natürlichen Liganden und dem trimeren H5 (vgl. Kapitel 6.1.2) eine gesteigerte Bindungsenergie von -239.8 kcal/mol berechnet (vgl. Tab. 1).



**Abb. 23:** Darstellung im *crossed eye stereo*-Modus der erwarteten Bindung zwischen dem Liganden **1** und dem Hämagglutinin H5 nach energetischer Minimierung. Die Oberflächen des trimeren Hämagglutinins und der Ligand sind atomtypspezifisch eingefärbt. Eine Bindungstasche mit Neuraminsäure und der aromatische Anker sind vordergründig zu erkennen. Die beiden anderen Bindungstaschen sind leicht verdeckt. Für den Komplex aus dem trivalenten Liganden und dem trimeren H5 wurde im Vergleich zum Komplex aus natürlichen Liganden und dem trimeren H5 eine gesteigerte Bindungsenergie von  $-239.8$  kcal/mol berechnet.

Die deutliche Steigerung der theoretischen Bindungsenergie gegenüber dem Komplex aus trimeren Hämagglutinin H5 und den natürlichen Liganden lässt vermuten, dass sowohl Linker als auch Alkylspacer unspezifische Beiträge zur Bindungsenergie leisten. Um den Einfluss des Linkers und der Alkylspacer auf die Bindungsenergie einschätzen zu können, wurde während der Masterarbeit exemplarisch für einen Arm des trimeren Liganden ein *ligand interaction plot* (*LigPlot*) während der Bindung an das Hämagglutinin angefertigt und ausgewertet. Dieser zeigte, dass zusätzlich zu den ausgeprägten Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren der Bindungstasche des Hämagglutinins und der Neuraminsäure auch Interaktionen zwischen einzelnen Kettengliedern, wie den Amid- und Etherbindungen mit Aminosäuren entlang der Proteinoberfläche bestanden, was unter anderem auf die etwas überdimensionierte Länge und damit verbundene Flexibilität der verlinkenden Strukturen zurückzuführen war.

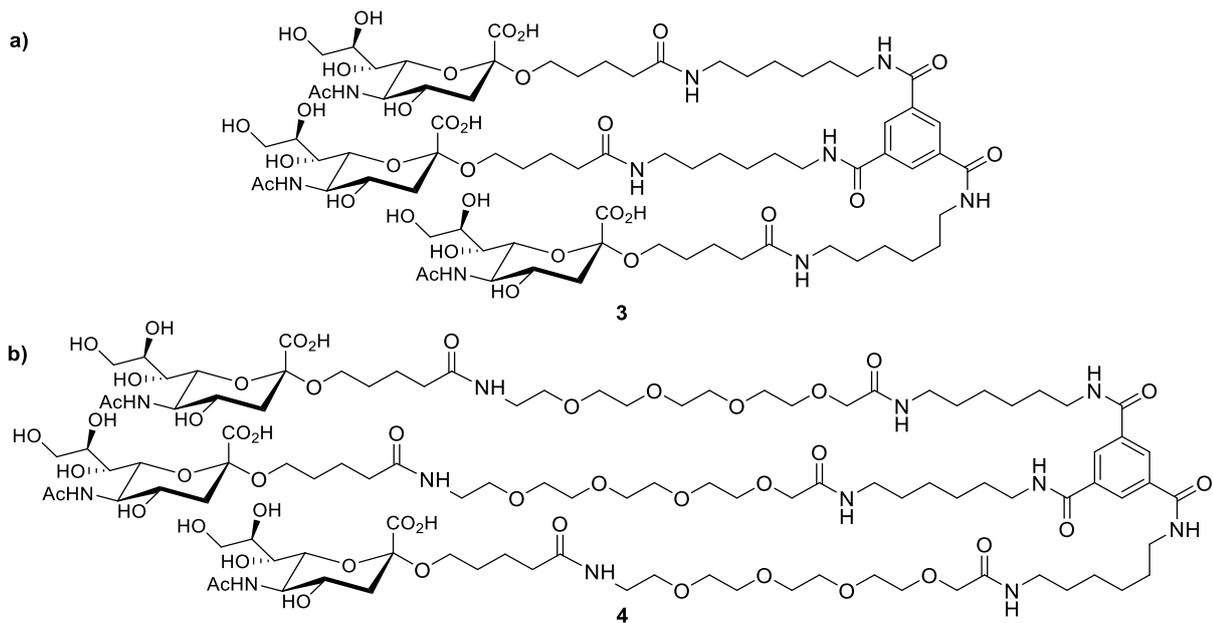
Aufgrund von Stabilitäts- und Darstellungsproblemen unterschiedlicher Zwischenverbindungen war die Totalsynthese des Liganden **1** während dieser Arbeit nicht möglich. Der zu erwartende entropische Energieverlust des überaus komplexen und flexiblen Systems wurde zudem als problematisch eingestuft. Die finale Synthese des Liganden **2** wurde

dementsprechend nicht in Betracht gezogen. Die gezeigten Triethylenglycolderivate sollten an anderer Stelle zur Darstellung unterschiedlich langer Fragmente genutzt werden.

In den nachfolgenden Abschnitten sollten weitere Aspekte der Affinitäts- und Aviditätsbeiträge von multivalenten Liganden untersucht werden. In vorangegangenen Studien lieferten unterschiedliche Ansätze vielversprechende multivalente Inhibitoren. Beispielsweise zeigten Glick und Knowles<sup>94</sup> 1991, das bivalente Sialoside von geeigneter Länge keine gesteigerte Bindungsaffinität gegenüber isolierten BHA (mittels Bromelain vom Virus abgespaltenes HA) aufweisen, jedoch sehr gute Bindungseigenschaften gegenüber intakten Viren zeigen. Diese bivalenten Liganden, bestehend aus einem Anker-molekül, verknüpft mit zwei Bindungsepitopen über flexible Polyethylenglycol- oder deutlich rigidere Peptid-Linkerfragmente, binden intermolekular an benachbarte Hämagglutinin-Trimere auf der viralen Oberfläche und zeigen dabei stark erhöhte Bindungsaffinitäten. Anderen Studien wie beispielsweise die von Mammen *et al.*<sup>95</sup> und Weber *et al.*<sup>75</sup> zeigen, dass mit einer Erhöhung der Konzentration von Bindungsepitopen in der Umgebung eines Rezeptors, sowie mit der sterische Stabilisierung, in Form einer Abschirmung der Rezeptoren, einen positiven Einfluss auf die Bindungsenergie erzielt kann (vgl. Kapitel 3.5). Auf Basis dieser Ansätze wurden weitere multivalente Liganden entwickelt, in *in silico* Studien untersucht und dargestellt.

### 6.2.3 Design weiterer trivalenter Liganden – Variation der Fragmente

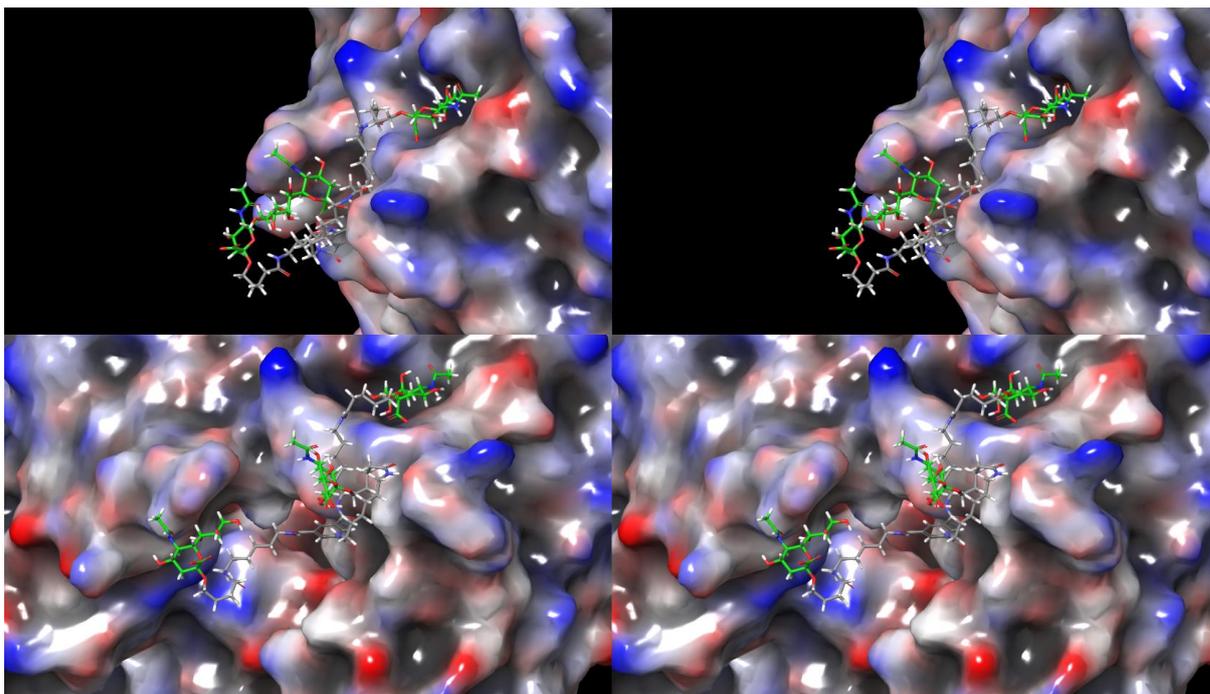
Zusätzlich zur Variation der Linker-Struktur unter 6.2.1 wurde ein trimerer Ligand mit verkürztem und einer ohne zusätzliches Linkerfragment entwickelt. Bei diesen Liganden sollte eine gesteigerte Bindungsaffinität aufgrund anderer multivalenter Effekte im Fokus stehen. Wie auch bei dem trivalenten Liganden **1** dienten für die nachfolgenden Liganden eine von Trimesoylchlorid abgeleitete aromatische Struktur als  $C_3$ -symmetrischer *core*-Baustein. Für den Liganden **3** wurde auf ein verbrückendes, glycolbasiertes Linkerfragment verzichtet. An den *core*-Baustein waren über die amidisch verknüpften unterschiedlichen Alkylspacer die Neuraminsäuren gekuppelt (Abb. 24/a). Der Ligand **4** wiederum besaß neben dem aromatischen *core*-Baustein auch ein verbrückendes, glycolbasiertes Linkerfragment, bestehend aus einer Tetraethylenglycolderivateinheit, zwei unterschiedlich lange Alkylspacer, sowie als Bindungsepitope die Neuraminsäurebausteine (Abb. 24/b).



**Abb. 24:** Multivalente Liganden des Hämagglutinins. **a)** Trivalenter Ligand **3**. Die *core*-Struktur ist von Trimesoylchlorid abgeleitet. Es sind pro Arm amidisch verknüpft je ein Alkylspacer mit 5 und einer mit 6 Kohlenstoffatomen und eine terminale Neuraminsäure enthalten. **b)** Trivalenter Ligand **4**. Die *core*-Struktur ist von Trimesoylchlorid abgeleitet. Es sind pro Arm amidisch verknüpft je ein Alkylspacer mit 5 und einer mit 6 Kohlenstoffatomen, ein Linker bestehend aus einem Tetraethylglycolderivate und eine terminale Neuraminsäure enthalten.

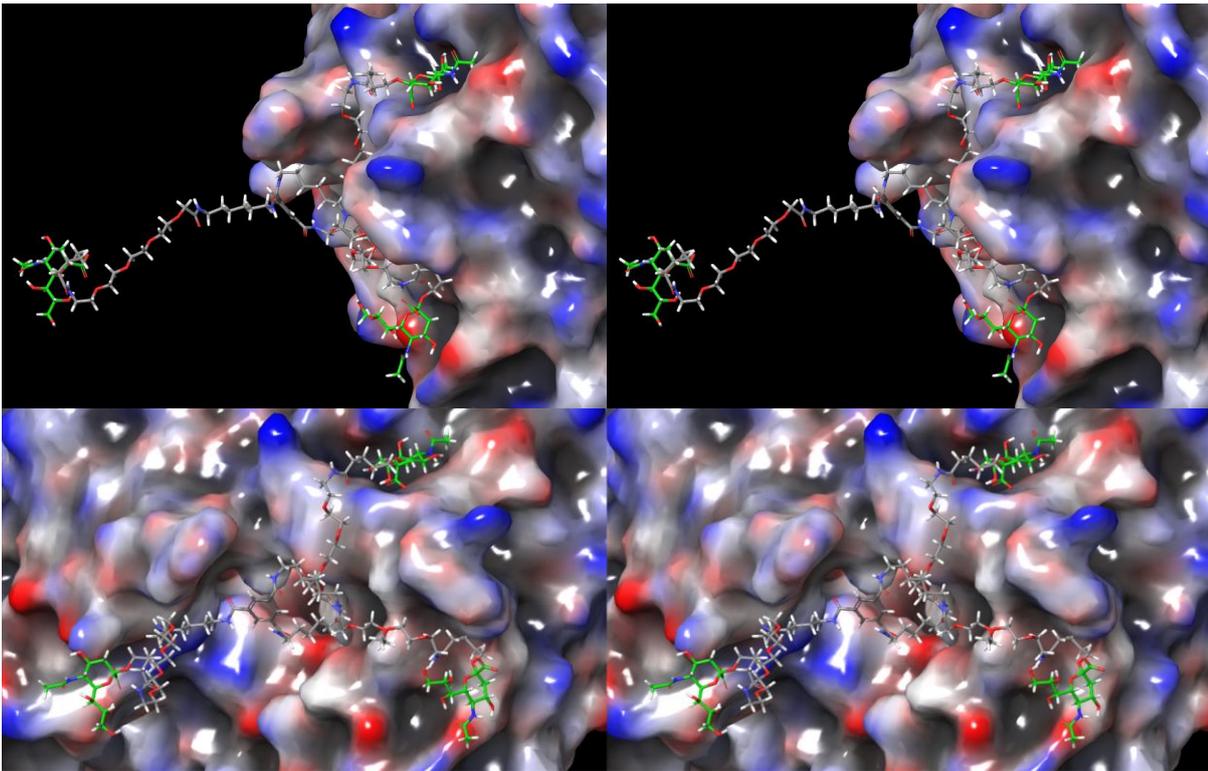
#### 6.2.4 *In silico* Bindungsmodi der Liganden **3** und **4**, sowie Überprüfung auf die Eignung als potenzielle Inhibitoren des Hämagglutinins H5

Der Bindungsmodus und die Eignung der multivalenten Liganden **3** und **4** als potenzielle Inhibitoren des Hämagglutinins H5 wurde in Maestro *in silico* überprüft. Im Vergleich zu dem Liganden **1** war bei diesen Liganden ein gleichzeitiges Binden der drei Bindungstaschen aufgrund der gewählten Verbrückung der Fragmente nicht möglich. Für die Liganden wurden theoretische Bindungsenergien eines wahrscheinlichen Bindungsmodus zum trimeren Hämagglutinin H5 im Vergleich zum Bindungsmodus des nativen Liganden berechnet. In den Abb. 25 und Abb. 26 ist jeweils der Bindungsmodus nach energetischer Minimierung als Ansicht von der Seite und als Draufsicht der Liganden **3** und **4** in einer der Bindungstaschen des Hämagglutinins gezeigt.



**Abb. 25:** Darstellung im *crossed eye stereo*-Modus der Bindung des Liganden **3** in der Rezeptorbindungstasche des H5 als Ansicht von der Seite (oben) und als Draufsicht (unten) nach energetischer Minimierung. Der Ausschnitt zeigt den gesamten Liganden mit Positionierung eines Bindungssepitops in der Bindungstasche des Proteins. Die Oberflächen des Proteins und der Liganden sind atomtypspezifisch eingefärbt. Die Neuraminsäurefragmente sind als Bindungssepitope farblich (grün) hervorgehoben. Für den Protein-Ligand-Komplex wurde im Vergleich zum monomeren Komplex eine um 23 % verbesserte Bindungsenergie von -71.2 kcal/mol berechnet (vgl. Tab. 1).

In Abb. 25 ist zu erkennen, dass nach energetischer Minimierung eine Neuraminsäure des Liganden **3** wie erwartet als Bindungssepitop in der Bindungstasche lokalisiert ist. Die beiden anderen Neuraminsäuren befinden sich aufgrund der Länge der Verknüpfungen in der Nähe der Bindungstasche, bilden aber keine erkennbaren unspezifischen Wechselwirkungen mit dem Protein aus. Für den Protein-Ligand-Komplex wurde im Vergleich zum monomeren Komplex eine um 23 % verbesserte Bindungsenergie von -71.2 kcal/mol berechnet (vgl. Tab. 1).



**Abb. 26:** Darstellung im *crossed eye stereo*-Modus der Bindung des Liganden **4** in der Rezeptorbindungstasche des H5 als Ansicht von der Seite (oben) und als Draufsicht (unten) nach energetischer Minimierung. Der Ausschnitt zeigt den gesamten Liganden mit Positionierung eines Bindungsepitops in der Bindungstasche des Proteins. Die Oberflächen des Proteins und der Liganden sind atomtypspezifisch eingefärbt. Die Neuraminsäurefragmente sind als Bindungsepitope farblich (grün) hervorgehoben. Für den Protein-Ligand-Komplex wurde im Vergleich zum monomeren Komplex eine um 31 % verbesserte Bindungsenergie von  $-78.9$  kcal/mol berechnet (vgl. Tab. 1).

In Abb. 26 ist zu erkennen, dass nach energetischer Minimierung eine Neuraminsäure des Liganden **4** wie erwartet als Bindungsepitop in der Bindungstasche lokalisiert ist. Anders als beim Liganden **3** sind die beiden anderen Neuraminsäuren aufgrund der Länge der Linkerfragmente deutlich weiter entfernt von der Bindungstasche. Ein Arm befindet sich aufgrund der ursprünglichen Modellierung auch nach der energetischen Minimierung distal zur Proteinoberfläche. Der dritte Arm liegt in etwas deutlicherer Nähe zur Proteinoberfläche, bildet aber noch keine erkennbaren unspezifischen Wechselwirkungen mit dem Protein aus. Für den Protein-Ligand-Komplex wurde im Vergleich zum monomeren Komplex eine um 31 % verbesserte Bindungsenergie von  $-78.9$  kcal/mol berechnet (vgl. Tab. 1).

In Tab. 1 sind die mittels Prime MM-GBSA berechneten Bindungsenergien der entwickelten Liganden im Vergleich zur Bindungsenergie des Komplexes aus monomeren Hämagglutinin und einer Neuraminsäure (HA-mono + Neu5Ac) und des Komplexes aus trimeren Hämagglutinin und drei Neuraminsäure (HA-tri + 3 Neu5Ac) aufgeführt. Zusätzlich ist die relative Energie der Liganden **3** und **4** im Bezug zum monomeren Komplex (Bezug<sub>mono</sub>), sowie die relative Energie des Liganden **1** im Bezug zum trimeren Komplex (Bezug<sub>tri</sub>) angegeben. Im Falle der Bindungsmodi von Ligand **3** und **4** findet die Bildung des Komplexes über die Wechselwirkung einer Rezeptorbindungsstelle des Hämagglutinins mit einer der terminalen Neuraminsäuren des Liganden statt. Beim Bindungsmodus des Liganden **1** können aufgrund seiner Beschaffenheit alle drei Rezeptorbindungsstellen gleichzeitig besetzt werden.

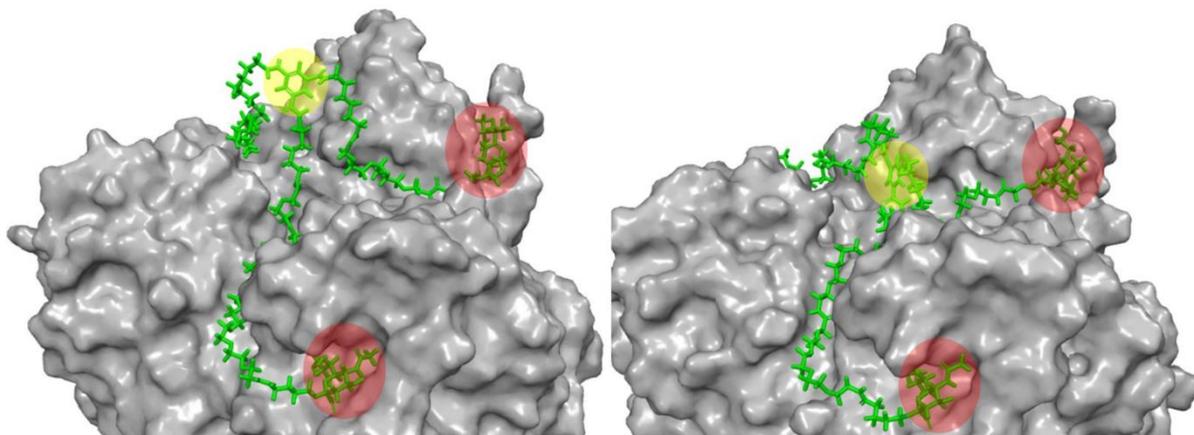
**Tab. 1:** Mittels Prime MM-GBSA berechnete Bindungsenergien der entwickelten Liganden im Vergleich zur Bindungsenergie des Komplexes aus monomeren Hämagglutinin und einer Neuraminsäure (HA-mono + Neu5Ac) und des Komplexes aus trimeren Hämagglutinin und drei Neuraminsäure (HA-tri + 3 Neu5Ac). Zusätzlich ist die relative Energie der Liganden **3** und **4** im Bezug zum monomeren Komplex (Bezug<sub>mono</sub>), sowie die relative Energie des Liganden **1** im Bezug zum trimeren Komplex (Bezug<sub>tri</sub>) angegeben.

Ligand	Bindungsenergie [kcal/mol]	relative Energie [kcal/mol]
<b>3</b>	-71.2	-16.7
<b>4</b>	-78.9	-24.4
HA-mono + Neu5Ac	-54.5	0 (Bezug <sub>mono</sub> )
<b>1</b>	-239.8	-82.9
HA-tri + 3 Neu5Ac	-156.9	0 (Bezug <sub>tri</sub> )

### 6.2.5 Moleküldynamik-Simulationen (MD)

Für *docking*-Experimente in Maestro mittels der Applikation „Glide“ war das System aus trimerem Hämagglutinin und dem jeweiligen trivalenten Liganden zu komplex. Um jedoch auch ohne *docking*-Experimente weitere Erkenntnisse über die Validität der postulierten Bindungsmodi der Liganden **1**, **3** und **4** zu erhalten, wurden mit den Protein-Ligand-Komplexen Moleküldynamik-Simulationen (MD-Simulationen) durchgeführt. Sowohl das Hämagglutinin mit einem Gewicht von mehr als 60 kDa, als auch die Liganden mit molaren Massen größer 2000 g/mol und entsprechenden Anzahl an Atomen sind für *in silico* Berechnungen und Simulationen eine besondere Herausforderung. 2012 berichteten Sieben *et al.*<sup>96</sup> in einer Studie zum Influenzavirus und dessen dynamische Interaktion mit der Wirtszelle über MD-Simulationen zwischen den Zelloberflächenrezeptoren LSTa und LSTc und dem trimeren Hämagglutinin, jedoch gibt es bisher kaum geeignete Algorithmen oder *scoring rules*, um beispielsweise den statistischen Einfluss der Aviditätsentropie zu berücksichtigen.<sup>30</sup> Dementsprechend waren für die Berechnungen vor allem elektrostatische, sterische und konformative Effekte von entscheidender Bedeutung.

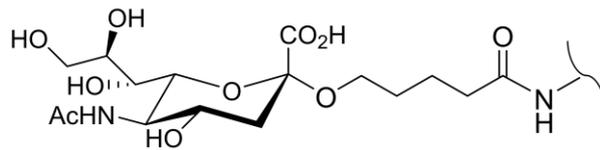
Für den Liganden **1** wurde in einer MD-Simulation gezeigt, dass ein gleichzeitiges Binden aller drei Bindungstaschen möglich ist, ohne dass die terminalen Neuraminsäuren aufgrund sterischer oder anderer energetisch ungünstiger Effekte aus den Bindungstaschen herauswandern. Lediglich der aromatische Anker wies aufgrund der hohen Flexibilität der langen Verlinkung eine erhöhte Fluktuation auf. In Abb. 27 ist links der Anfangszeitpunkt der Simulation und rechts der Endzeitpunkt der Simulation nach 4.8 ns dargestellt.



**Abb. 27:** Bindungsmodus des Liganden **1** zu Beginn (links) und am Ende (rechts) der Moleküldynamiksimulation nach 4.8 ns. Es sind zwei Bindungstaschen mit Neuraminsäuren (rot) und der aromatische Anker (gelb) zu sehen. Die dritte Bindungstasche liegt rückseitig und ist aufgrund des Bildausschnittes verdeckt. Es konnte gezeigt werden, dass ein gleichzeitiges Binden aller drei Bindungstaschen möglich ist, ohne dass die terminalen Neuraminsäuren aufgrund sterischer oder energetisch ungünstiger Effekte aus den Bindungstaschen herauswandern. Lediglich der aromatische Anker wies aufgrund der hohen Flexibilität der langen Verlinkungen eine erhöhte Fluktuation auf.

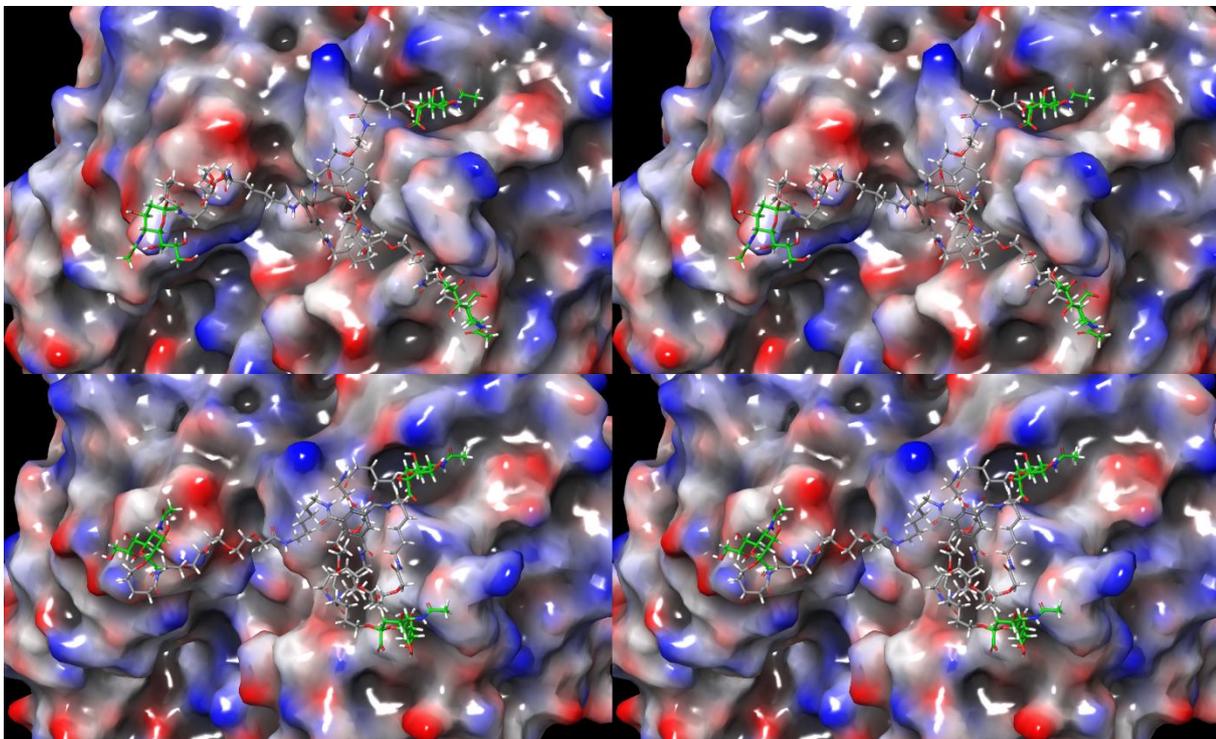
Aufgrund der bereits erläuterten Schwierigkeiten sollte die MD-Simulation des Liganden **1** ausschließlich zeigen, dass ein gleichzeitiges Binden der drei Bindungstaschen des Hämagglutinins unter Verwendung des entworfenen Linkerfragments möglich ist und dass keine energetisch ungünstigen Effekte den Bindungsmodus beeinträchtigen. Eine weitere Auswertung der MD-Simulation des modellierten Liganden **1** war mit den in Maestro implementierten Applikationen nicht möglich, da das Programm nur die Untersuchung von Liganden mit bis zu 200 Schweratomen ermöglicht. Der Ligand **1** wurde demnach *in silico* nicht weiter untersucht.

Für die Liganden **3** und **4** wurden ebenfalls MD-Simulationen über 4.8 ns durchgeführt. Es wurden zudem *LigPlots* angefertigt und mit der in Maestro implementierten Applikation „*Simulation Interactions Diagram*“ (*SID*) wurden die MD-Simulationen ausgewertet. Für Ligand **4** wurde aufgrund seiner Komplexität ein definierter Abschnitt eines Linkerarms im Bereich des Bindungsepitops mit insgesamt 28 Schweratomen (Abb. 28) für die Analyse mittels *SID* ausgewählt. Der Ligand **3** konnte aufgrund seiner Beschaffenheit (insgesamt 237 Atome, davon 117 Schweratome) für den Großteil der Untersuchungen im Ganzen genutzt werden.



**Abb. 28:** Abschnitt des Liganden **4** zur Auswertung der MD-Simulation mittels *SID*.

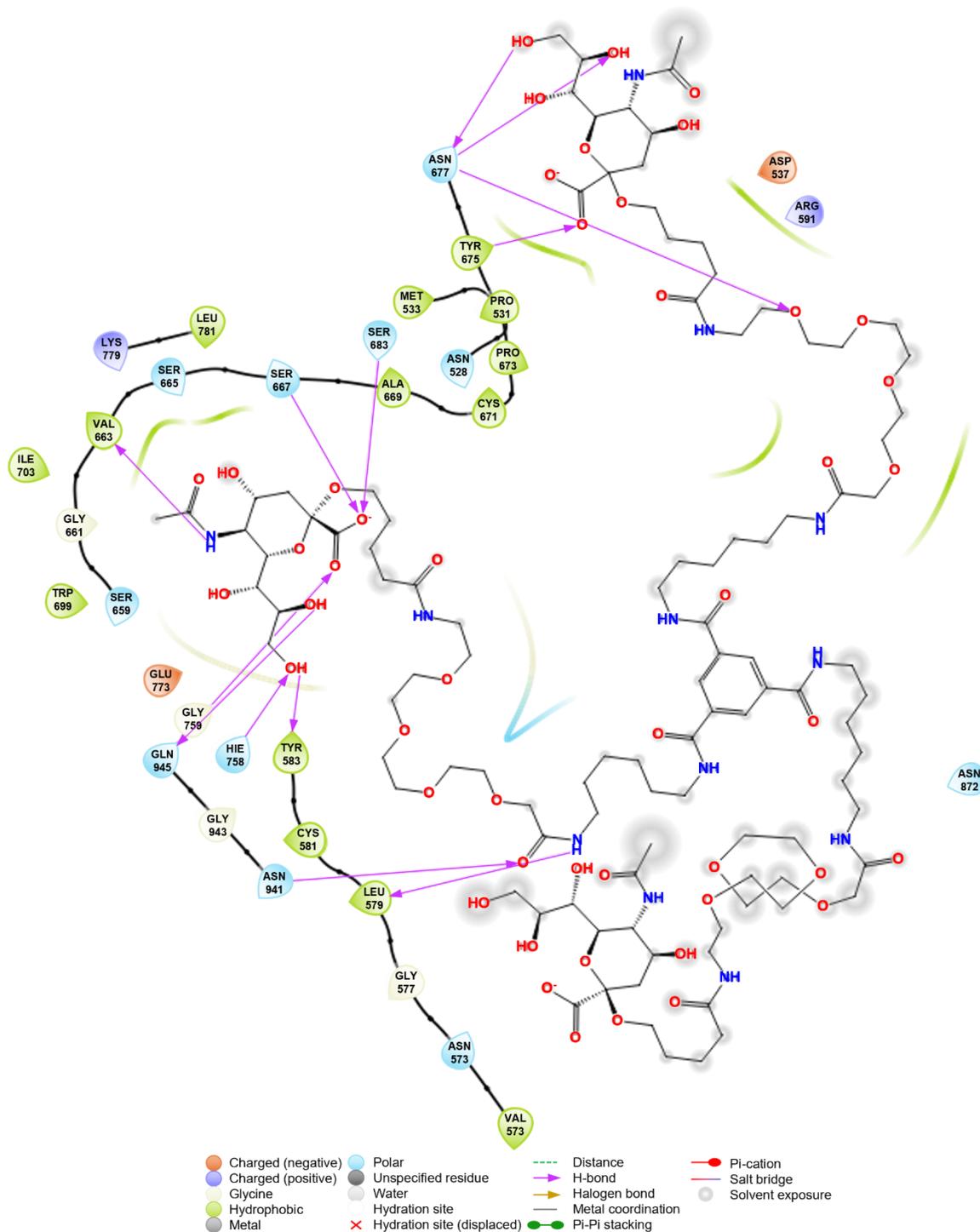
Für den Liganden **4** wurde mit der Applikation *SID* die Interaktionen im Bereich der Rezeptorbindungsstelle ausgewertet, da vor allem die Auswirkungen des Linkerfragments auf die Lage des Bindungsepitops und die resultierende Bindungsenergie von Interesse waren. In Abb. 29 ist der Ausgangszustand (oben) der MD-Simulation im Vergleich zum Endzeitpunkt (unten) nach 4.8 ns zu sehen.



**Abb. 29:** Darstellung im *crossed eye stereo*-Modus des Liganden **4** in der Bindungstasche des Hämagglutinins H5 zu Beginn (oben) und am Ende (unten) der Moleküldynamiksimulation nach 4.8 ns. Es ist zu erkennen, dass die Neuraminsäure zu Beginn der Simulation als auch am Ende in der Bindungstasche lokalisiert ist. Die Lage des aromatischen Rings sowie die Lage eines Linkerarms und dessen terminalen Neuraminsäure sind jedoch am Anfang und zum Ende der Simulation deutlich unterschiedlich. Die Neuraminsäure hat sich im Laufe der Simulation der Proteinoberfläche deutlich angenähert. Der dritte Arm sowie dessen terminale Neuraminsäure, welche zu Beginn der Simulation eine distale Lage zur Proteinoberfläche aufwies, zeigt auch am Ende eine fast unveränderte Lage.

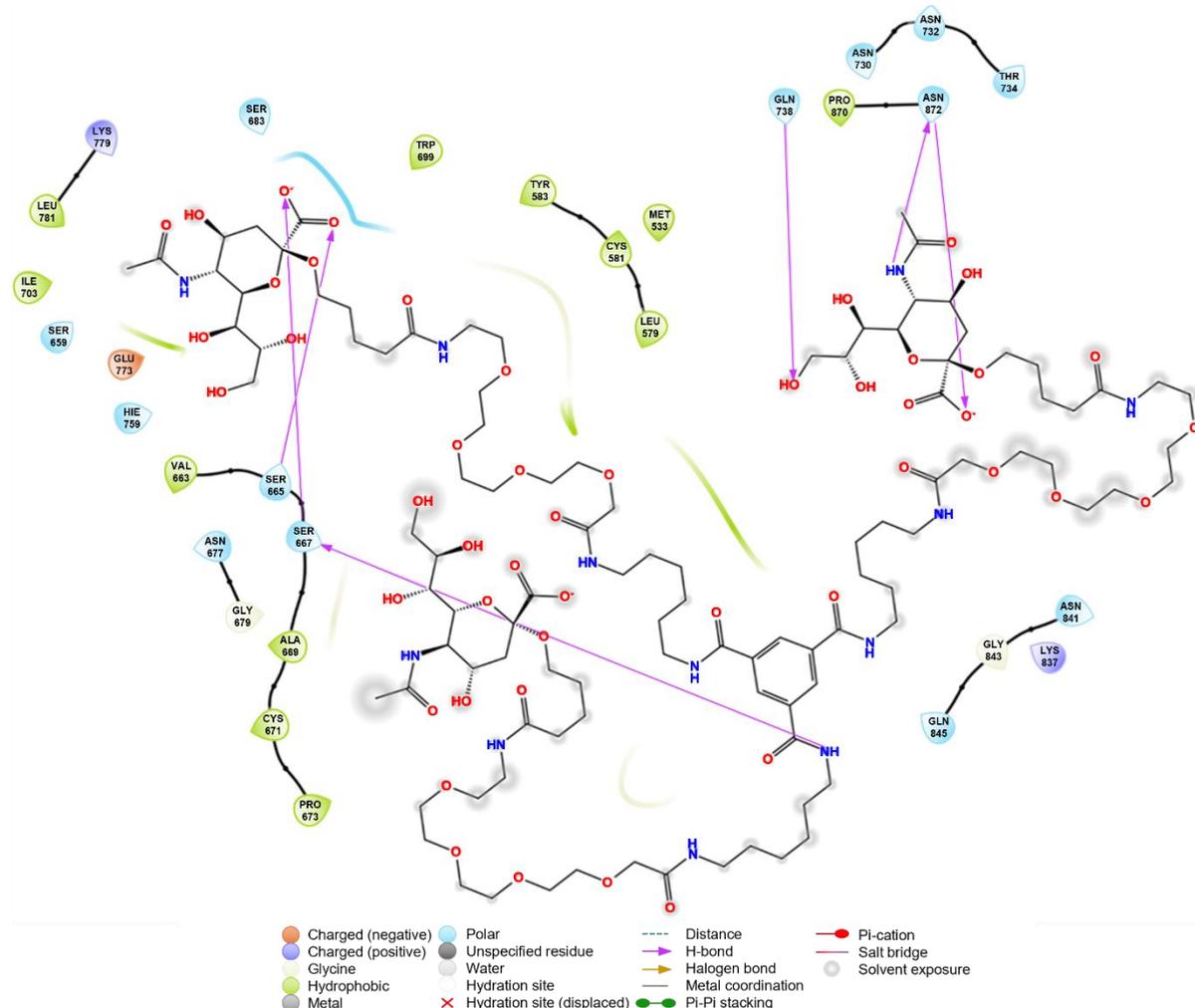
Beim Vergleich des Protein-Liganden-Komplexes zum Anfang und zum Ende der Simulation ist zu erkennen, dass die Bindungstasche am Ende der Simulation leicht deformiert vorlag und die attraktiven Wechselwirkungen des Zuckers unterschiedliche Ausprägungen angenommen hatten. Aufgrund der hohen Komplexität der vorliegenden MD-Simulation stellen die Ergebnisse jedoch bestenfalls eine Momentaufnahme dar. Simulationen von derartig großen Strukturen erlauben lediglich die Vorhersage einer Tendenz einer wahrscheinlichen Entwicklung. Da die Neuraminsäure das natürliche Bindungsepitop des Hämagglutinins H5 ist, welches der Kristallstruktur entsprechend in der Bindungstasche positioniert war, konnte davon ausgegangen werden, dass sich dessen Lage während der Simulation kaum verändert. Dieses bestätigt, dass trotz der Ausbildung neuer attraktiver Wechselwirkungen während der Simulation, welche in Abb. 31 zu erkennen sind, die Neuraminsäure in der Bindungstasche verweilt. Die mittels Prime MM-GBSA berechneten Bindungsenergien für den Komplex waren für den Start der Simulation  $\Delta G_{\text{Start}} = -78.9$  kcal/mol und für das Ende der Simulation  $\Delta G_{\text{Ende}} = -38.6$  kcal/mol. Die Schwankungen bzw. Abnahme der Bindungsenergie im Verlauf der MD-Simulation ist aufgrund der Bewegung des Liganden eine normale Entwicklung. Im Falle einer Komplexdissoziation könnte, aufgrund der Nähe weiterer Bindungsepitope, mit hoher Wahrscheinlichkeit eine erneute Bindung mit einer der anderen terminalen Neuraminsäuren stattfinden (vgl. Rückbindung - Kapitel 3.5.4).

In den nachfolgenden Abbildungen sind die simulierten Interaktionsplots des Liganden **4** während der Bindung an das Hämagglutinin H5 dargestellt. Passend zu den in Abb. 29 gezeigten Momentaufnahmen der MD-Simulation ist in Abb. 30 der *LigPlot* des Liganden **4** zu Beginn der Simulation gezeigt.



**Abb. 30:** *LigPlot* des Liganden **4** zu Beginn der Moleküldynamiksimulation.

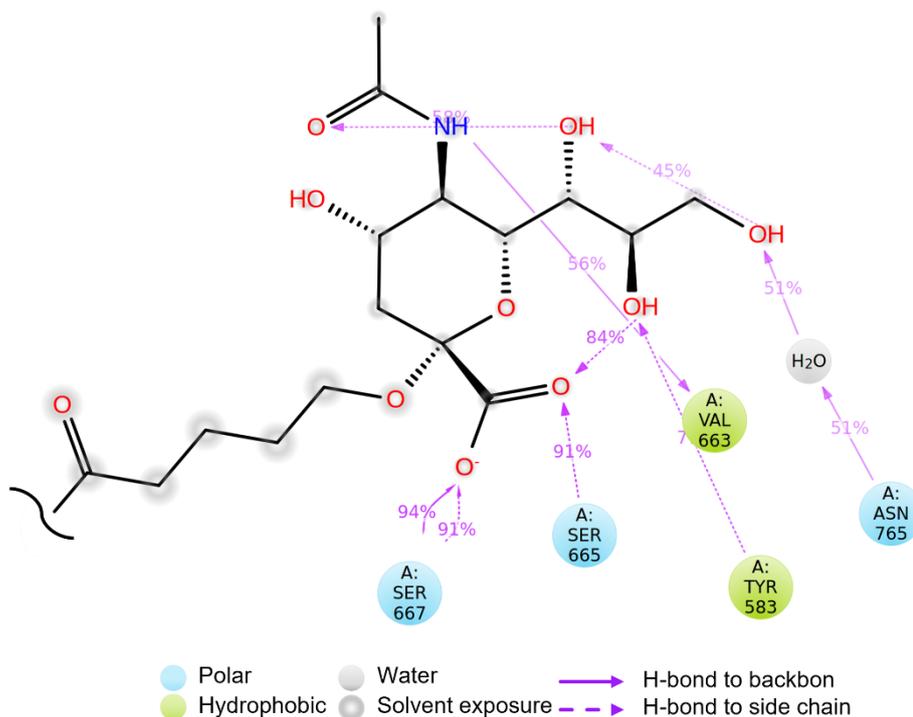
In Abb. 31 ist der *LigPlot* des Liganden **4** am Ende der Moleküldynamiksimulation nach 4.8 ns gezeigt.



**Abb. 31:** *LigPlot* des Liganden **4** am Ende der Moleküldynamiksimulation nach 4.8 ns.

In den Abbildungen ist zu erkennen, dass die Interaktionen der Neuraminsäure in der Bindungstasche des H5 zum Ende der Simulation abgenommen haben. Nur die Wasserstoffbrücken zwischen Ser667 und Ser665 und der Carboxylatgruppe der Neuraminsäure bestehen zum Ende der Simulation noch. Alle weiteren Wasserstoffbrückenbindungen, wie die zu den OH-Gruppen am C9 und am C8 der Glycerolseitenkette der Neuraminsäure sind am Ende der Simulation nicht mehr existent. Jedoch ist auch zu erkennen, dass sich neue attraktive Wechselwirkungen zwischen einer weiteren Neuraminsäure und Aminosäuren an unspezifischen Stellen der Proteinoberfläche ausgebildet haben.

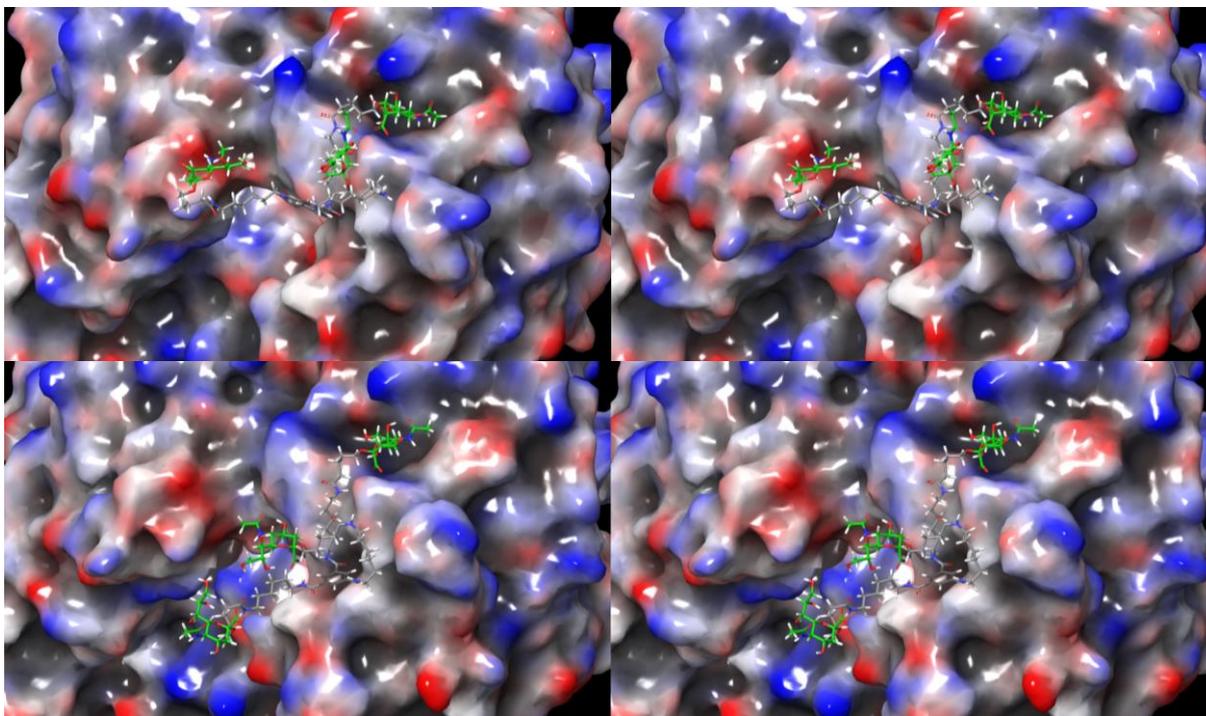
In Abb. 32 ist im *ligand contact plot* zusätzlich die Kontaktdauer der Protein-Ligand-Kontakte der in der Bindungstasche des Hämagglutinins H5 interagierenden Neuraminsäure des Liganden **4** als Ausschnitt mit entsprechenden prozentualen Kontaktdauern gezeigt. Die Interaktionsstärke der Kontakte zwischen Ligand und Protein wird im *ligand contact plot* durch die Häufigkeit des Auftretens in der Trajektorie quantifiziert. Selten und häufig auftretende Ereignisse lassen sich durch diese Auswertung differenzieren, wodurch besonders wichtige Interaktionen identifiziert werden können. Werte > 100 % sind möglich, da einige Reste mehrere Wechselwirkungen eines einzigen Typs mit demselben Ligandatom eingehen können.



**Abb. 32:** Darstellung der Ligand-Protein-Kontakte in der Bindungstasche für eine Neuraminsäure des Liganden **4**. Die prozentualen Werte sind die anteilige Kontaktdauer. Gezeigt sind Kontakte, die über mindestens 30 % der gesamten Laufzeit der Simulation von 4.8 ns existent waren.

In der Abbildung ist zu erkennen, dass ein Großteil der auftretenden Interaktionen einen prozentualen Anteil im mittleren Bereich aufweist. In Übereinstimmung mit dem *LigPlot* konnten anhand des *ligand contact plot* die Wechselwirkungen der Neuraminsäure zum Ser667 und zum Ser665 als besonders wichtig identifiziert werden.

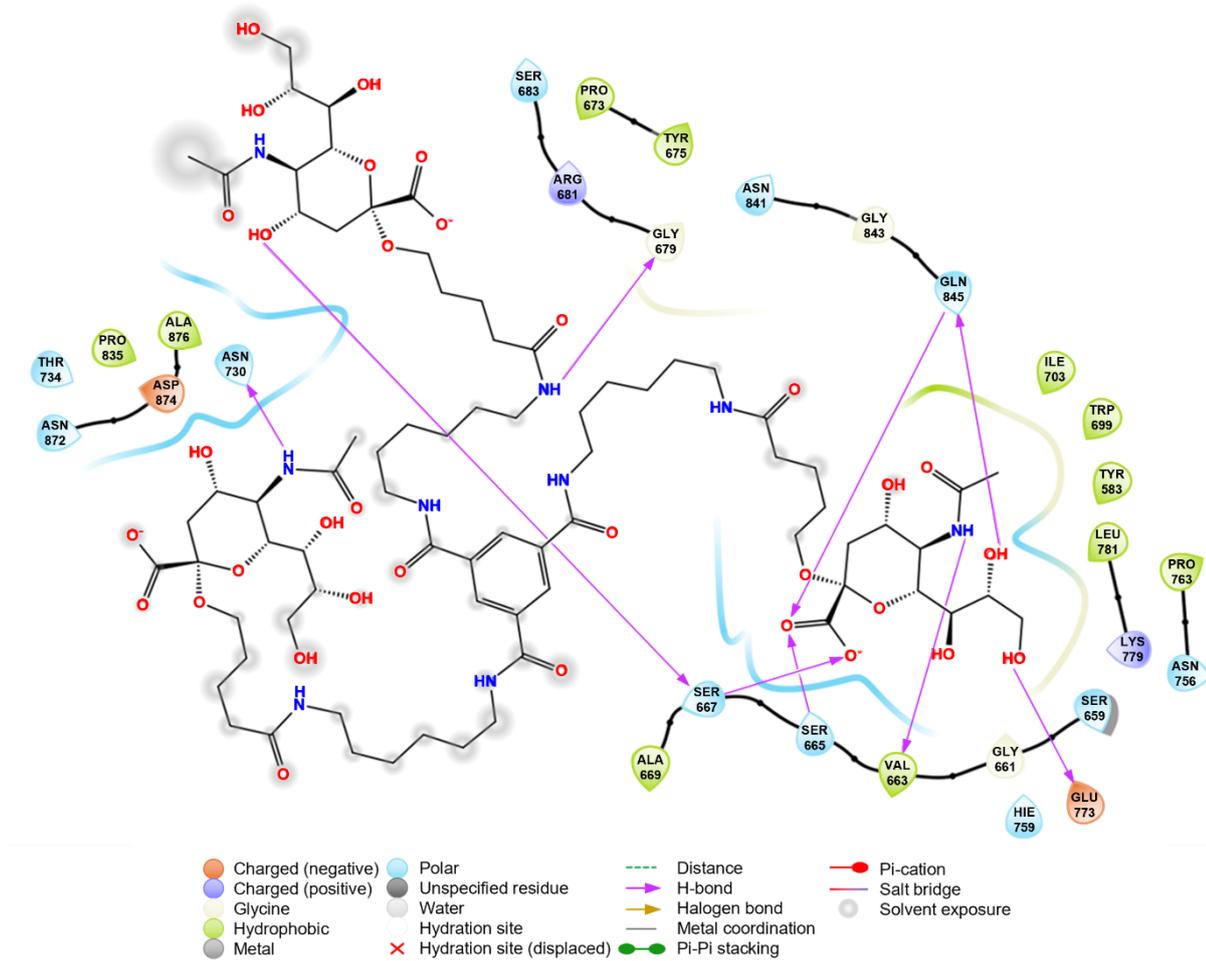
Für den Liganden **3** konnten mit der Applikation *SID* die Interaktionen des gesamten Liganden untersucht werden. In Abb. 33 ist jeweils der Ausgangszustand der Simulation im Vergleich zum Endzeitpunkt nach 4.8 ns zu sehen.



**Abb. 33:** Darstellung im *crossed eye stereo*-Modus des Liganden **3** in der Bindungstasche des Hämagglutinins H5 zu Beginn (oben) und am Ende (unten) der Moleküldynamiksimulation nach 4.8 ns. Es ist zu erkennen, dass eine Neuraminsäure zu Beginn der Simulation als auch am Ende in der Bindungstasche lokalisiert ist. Die Lage des aromatischen Rings sowie die Lage der anderen Linkerarme und dessen terminale Neuraminsäuren hat sich jedoch deutlich verändert.

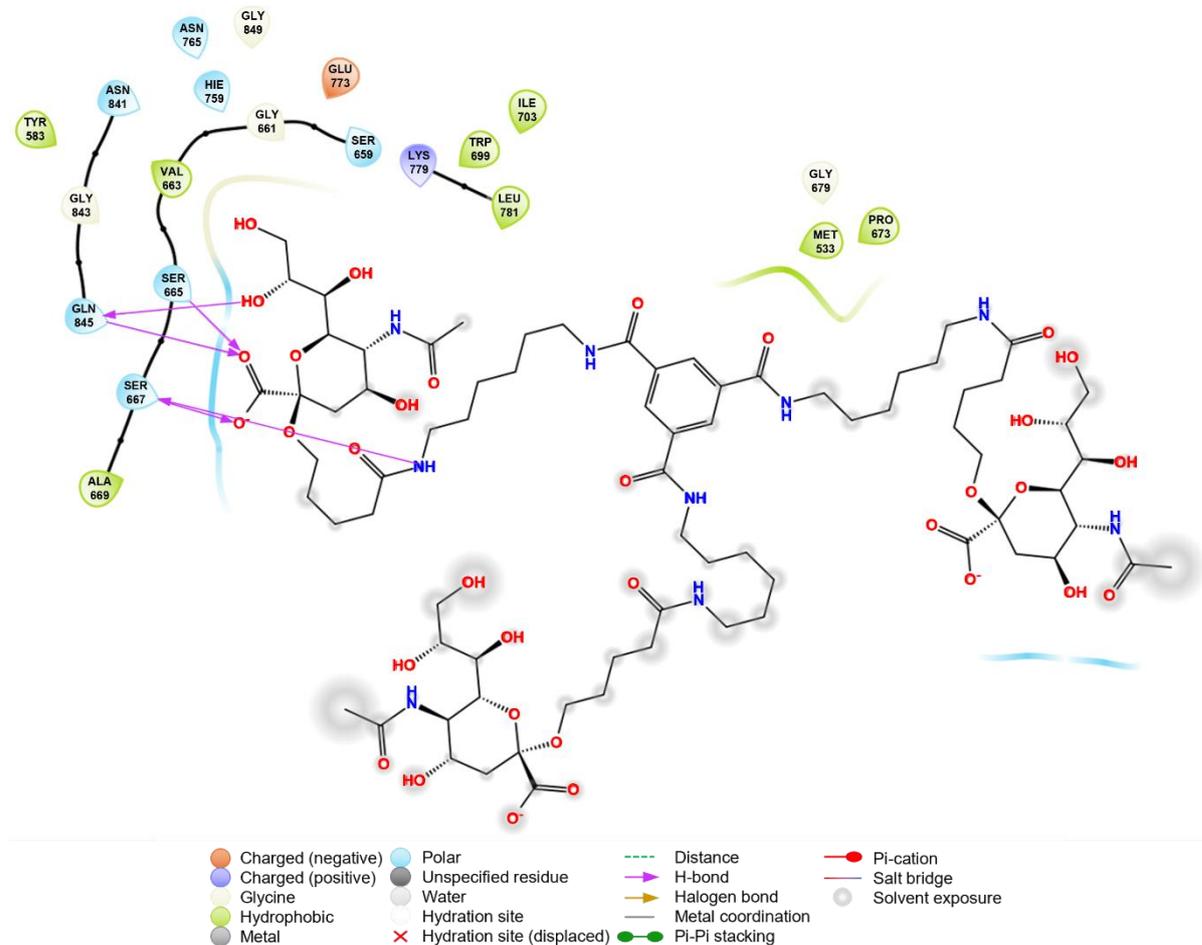
Auch beim Liganden **3** verweilt die Neuraminsäure während der Simulation in der Bindungstasche, wobei auch in diesem Fall die attraktiven Wechselwirkungen des Zuckers unterschiedliche Ausprägungen angenommen haben. Die mittels Prime MM-GBSA berechneten Bindungsenergien für den Protein-Ligand-Komplex waren für den Start der Simulation  $\Delta G_{\text{Start}} = -71.2$  kcal/mol und für das Ende der Simulation  $\Delta G_{\text{Ende}} = -55.8$  kcal/mol. In den nachfolgenden Abbildungen sind die simulierten Interaktionsplots des Liganden dargestellt.

Passend zu den in Abb. 33 gezeigten Momentaufnahmen der MD-Simulation, sind in den nachfolgenden Abbildungen die simulierten Interaktionsplots des Liganden **3** während der Bindung an das Hämagglutinin H5 dargestellt. In Abb. 34 ist der *LigPlot* des Liganden **3** zu Beginn der Simulation gezeigt.



**Abb. 34:** *LigPlot* des Liganden **3** zu Beginn der Moleküldynamiksimulation.

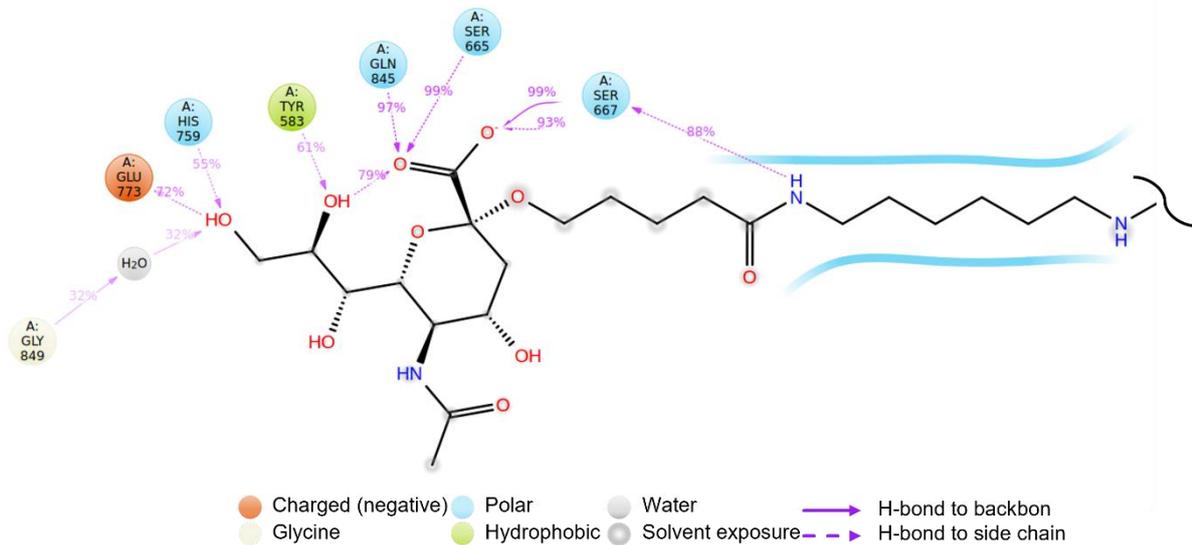
In Abb. 35 ist der *LigPlot* des Liganden **3** am Ende der Moleküldynamiksimulation nach 4.8 ns gezeigt.



**Abb. 35:** *LigPlot* des Liganden **3** am Ende der Moleküldynamiksimulation nach 4.8 ns.

In den Abbildungen ist zu erkennen, dass die Interaktionen der Neuraminsäure in der Bindungstasche des H5 am Anfang und zum Ende der Simulation ähnlich sind. Die Wasserstoffbrücken zwischen Ser667, Ser665 und Gln845 und der Carboxylatgruppe der Neuraminsäure bleiben während der gesamten Simulation bestehen. Lediglich die Interaktion zu Val663 und Glu773 sind am Ende der Simulation nicht mehr vorhanden. Auch die unspezifischen Wechselwirkungen einer anderen Neuraminsäure mit der Proteinoberfläche sind zum Ende der Simulation nicht mehr existent.

In Abb. 36 ist im *ligand contact plot* zusätzlich die Kontaktdauer der Protein-Ligand-Kontakte der in der Bindungstasche des Hämagglutinins H5 interagierenden Neuraminsäure des Liganden **3** als Ausschnitt mit entsprechenden prozentualen Kontaktdauern gezeigt.

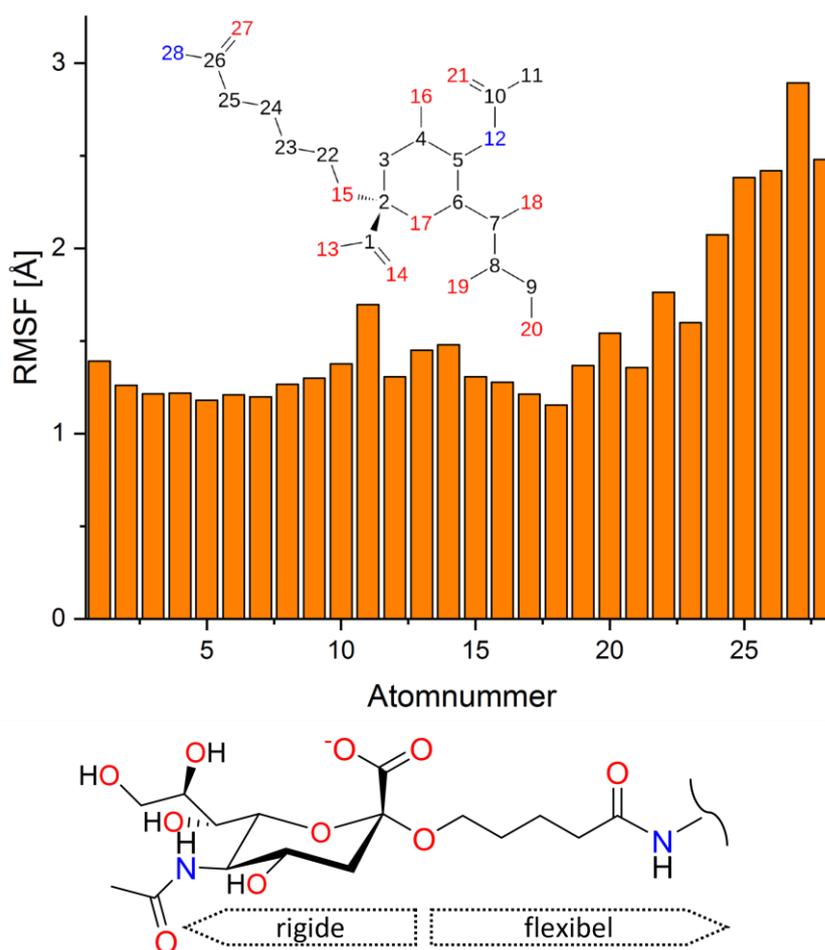


**Abb. 36:** Darstellung der Ligand-Protein-Kontakte in der Bindungstasche für eine Neuraminsäure des Liganden **3**. Die prozentualen Werte sind die anteilige Kontaktdauer. Gezeigt sind Kontakte, die über mindestens 30 % der gesamten Laufzeit der Simulation von 4.8 ns existent waren.

In der Abbildung ist zu erkennen, dass wie zu erwarten auch beim Ligand **3** ein Großteil der auftretenden Interaktionen einen prozentualen Anteil im mittleren Bereich aufweisen. In Übereinstimmung mit dem *LigPlot* und den Ergebnissen zu Ligand **4** konnten anhand des *ligand contact plot* auch für den Liganden **3** die Wechselwirkungen der Neuraminsäure zum Ser667 und zum Ser665 als besonders wichtig identifiziert werden. Zusätzlich hielt in diesem Fall auch Gln845 während mindestens 90 % der Simulationszeit den Kontakt zur Neuraminsäure.

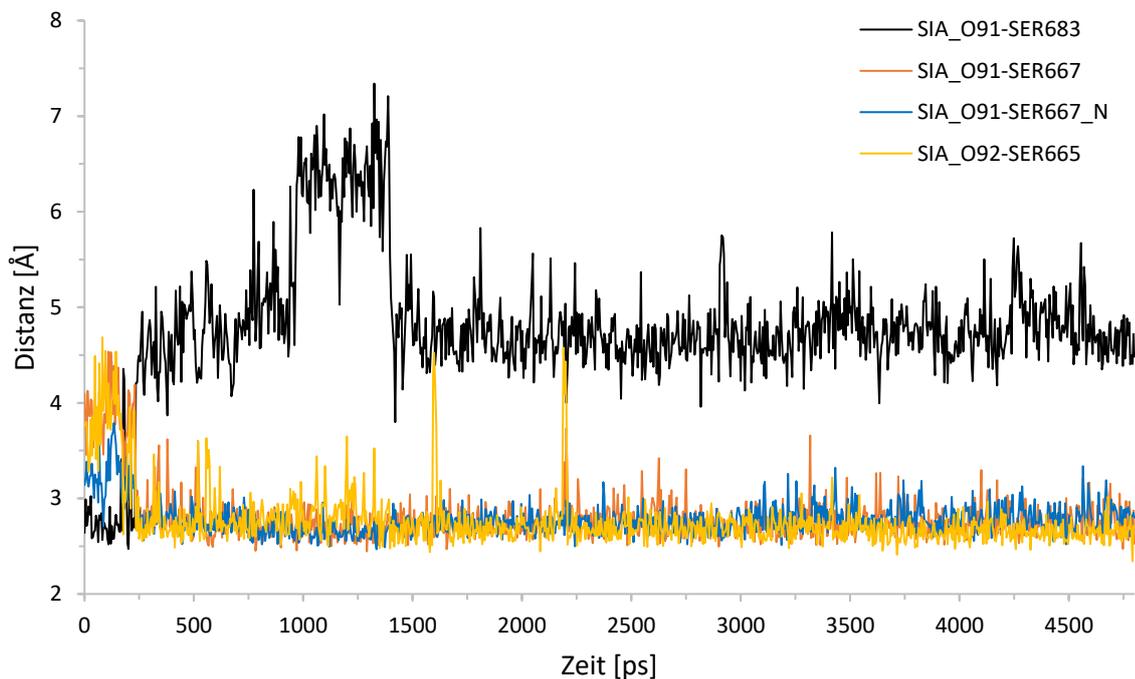
In den beiden nachfolgenden Abbildungen ist stellvertretend für die untersuchten Liganden jeweils das Ergebnis des Liganden **4** dargestellt. In Abb. 37 ist die Auftragung der quadratisch gemittelten Fluktuation der Schweratome (*root-mean-square fluctuation*, RMSF) über den gesamten Zeitraum der MD-Simulation, sowie die vom System generierte zugeordnete Nummerierung (C = schwarz, O = rot, N = blau) des Bindungssepitops des Liganden zu sehen. Aufgrund der hohen Komplexität konnte das System für Ligand **3** keine entsprechende Atomzuordnung generieren, wodurch kein Liganden-RMSF für Ligand **3** erstellt werden konnte.

Der Liganden-RMSF zeigt die Fluktuationen des Liganden, aufgeschlüsselt nach den einzelnen Schweratomen. Er gibt einen Einblick darin, wie einzelne Fragmente des Liganden mit dem Protein interagieren und welche entropische Rolle sie für das Bindungsereignis spielen. Wie erwartet weisen die Atome der Neuraminsäure des Liganden **4** keine besonders hohe Fluktuation auf. Eine geringfügig erhöhte Beweglichkeit zeigen lediglich zwei der OH-Gruppen der Glycerolseitenkette (19, 20), die Atome der *N*-Acetylgruppe insbesondere die Methyl-Gruppe (11) und die Atome der Carboxylatgruppe (13, 14). Entlang des Alkylspacers steigt die Fluktuation dann aufgrund fehlender Wechselwirkungen und der damit verbundenen ungehinderten Bewegungsfreiheit stetig an.



**Abb. 37:** Auftragung der quadratisch gemittelten Fluktuation der Schweratome (RMSF-Werte) über den gesamten Zeitraum der Moleküldynamiksimulation, sowie generierte Atomzuordnung (C = schwarz, O = rot, N = blau) des Bindungs epitops des Liganden **4**. Die Atome der Neuraminsäure des Liganden **4** weisen keine besonders hohe Fluktuation auf. Eine geringfügig erhöhte Beweglichkeit zeigen lediglich zwei der OH-Gruppen der Glycerolseitenkette (19, 20), die Atome der *N*-Acetylgruppe insbesondere die Methyl-Gruppe (11) und die Atome der Carboxylatgruppe (13, 14). Entlang des Alkylspacers steigt die Fluktuation dann aufgrund fehlender Wechselwirkungen und der damit verbundenen ungehinderten Bewegungsfreiheit stetig an.

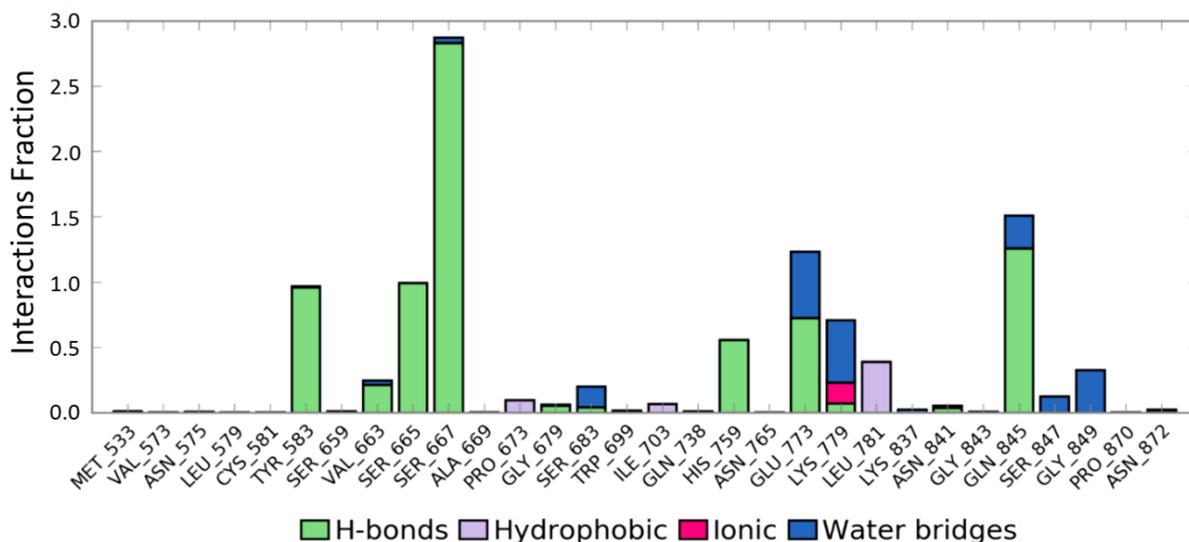
Für den Liganden **4** ist in Abb. 38 zusätzlich die Auftragung der jeweiligen Distanzen der beiden Sauerstoffatome der Carboxylatgruppe (O91 und O92) der Neuraminsäure des Liganden zur OH-Gruppe des Ser683 (schwarz), Ser667 (rot) und Ser665 (gelb) und zur Aminogruppe des Ser667 (blau) im zeitlichen Verlauf der MD-Simulation zu sehen. Bei Distanzen über 3.0 Å sind die attraktiven Wechselwirkungen einer ionischen Salzbrücke und bei Distanzen über 3.2 Å sind die attraktiven Wechselwirkungen einer Wasserstoffbrückenbindung (vgl. Kapitel 3.4.1) sehr gering. Dies ist hier im Fall der Distanz zum Ser683 nach ca. 150 ps der Fall. Die anderen Wechselwirkungen haben sich am Ende der Simulation zwischen 2.7 und 3.0 Å eingependelt.



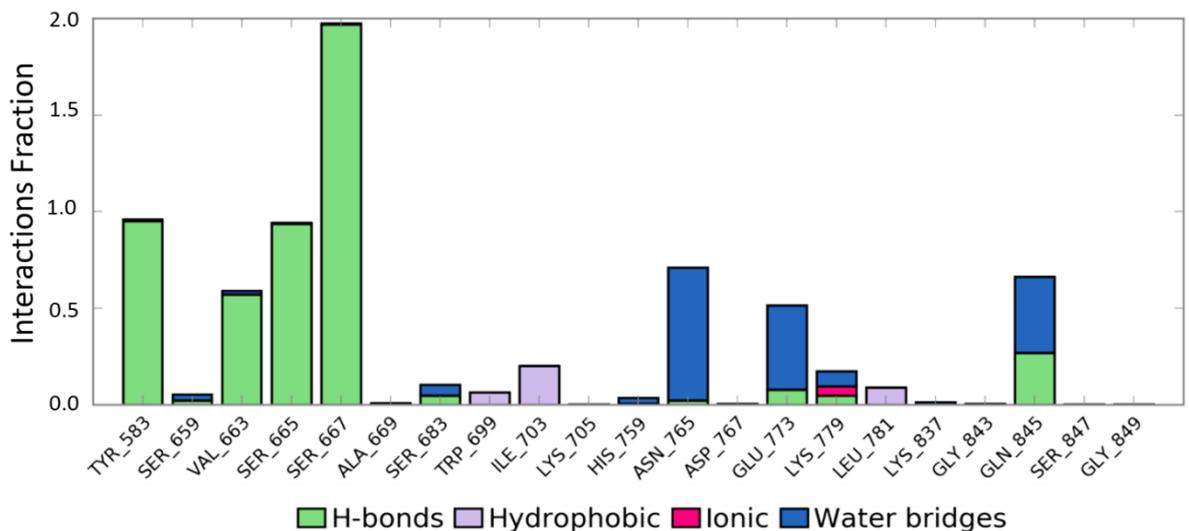
**Abb. 38:** Auftragung der jeweiligen Distanzen der beiden Sauerstoffatome der Carboxylatgruppe (O91 und O92) der Neuraminsäure des Liganden **4** zur OH-Gruppe des Ser683 (schwarz), Ser667 (rot) und Ser665 (gelb) und zur Aminogruppe des Ser667 (blau) im zeitlichen Verlauf der MD-Simulation. Bei Distanzen über 3.0 Å sind die attraktiven Wechselwirkungen einer ionischen Salzbrücke und bei Distanzen über 3.2 Å sind die attraktiven Wechselwirkungen einer Wasserstoffbrückenbindung nicht mehr existent. Dies ist hier im Fall der Distanz zum Ser683 nach ca. 150 ps der Fall. Die anderen Wechselwirkungen haben sich am Ende der Simulation zwischen 2.7 und 3.0 Å eingependelt.

Während der Simulationen wurden die gesamten Wechselwirkungen des Liganden **3** und alle Wechselwirkungen des Bindungsepitops des Liganden **4** zum Protein überwacht. Diese Wechselwirkungen wurden je nach Typ kategorisiert und zusammengefasst. In den beiden nachfolgenden Abbildungen sind diese Protein-Ligand-Wechselwirkungen gezeigt, wobei sie in vier Typen von Kontakten eingeteilt wurden: Wasserstoffbrücken, hydrophobe Kontakte,

ionische Kontakte und Wasserbrücken (vgl. Kapitel 3.4.1). Zur Interpretation wurden die gestapelten Balkendiagramme auf die Simulationszeit von 4.8 ns normiert, sodass beispielsweise ein Wert von 0.7 bedeutet, dass die spezifische Interaktion 70 % der Simulationszeit bestand. Werte größer 1.0 sind möglich, da einige Proteinreste mehrere Kontakte desselben Subtyps mit dem Liganden eingehen können.



**Abb. 39:** Darstellung der während der Simulation beobachteten Wechselwirkungen zwischen dem Liganden **3** und dem Protein: Wasserstoffbrücken (grün), hydrophobe Kontakte (violett), ionische Kontakte (pink) und Wasserbrücken (blau). Ein Wert von 0.7 bedeutet, dass die spezifische Interaktion 70 % der Simulationszeit bestand. Werte größer 1.0 sind möglich, da Proteinreste mehrere Kontakte desselben Subtyps eingehen können.



**Abb. 40:** Darstellung der während der Simulation beobachteten Wechselwirkungen zwischen dem Bindungssepitop des Liganden **4** und dem Protein: Wasserstoffbrücken (grün), hydrophobe Kontakte (violett), ionische Kontakte (pink) und Wasserbrücken (blau). Ein Wert von 0.7 bedeutet, dass die spezifische Interaktion 70 % der Simulationszeit bestand. Werte größer 1.0 sind möglich, da Proteinreste mehrere Kontakte desselben Subtyps eingehen können.

In den Abbildungen ist zu erkennen, dass für den Liganden **3** 30 wechselwirkende Aminosäuren zu finden sind und für das Bindungsepitop des Liganden **4** sind 21 Aminosäuren aufgeführt. Einige der gezeigten Kontakte sind nahe 0 und können daher vernachlässigt werden. In beiden Fällen sind die Wechselwirkungen zum Ser667 am dominantesten. Beim Liganden **3** führen die Wechselwirkungen des Ser667 mit mehreren Wasserstoffbrücken zu einem Wert von fast 3.0 und beim Liganden **4** zu einem Wert von knapp 2.0. Auch die Wechselwirkungen mit den Aminosäuren Tyr583, Ser665, Glu773 und Gln845 sind bei beiden Liganden im Bereich größer 0.5 und reichen teilweise bis 1.5. Diese Wechselwirkungen sind auch für die Bindung des natürlichen Liganden Neu5Ac essenziell (vgl. Kapitel 6.1.2 - Abb. 18). Beim Liganden **3** sind zusätzlich die Aminosäuren His759 und Lys779 im Bereich größer 0.5 und beim Liganden **4** sind zusätzlich die Aminosäuren Val663 und Asn765 im Bereich größer 0.5. Die Wechselwirkung zum His759 wird in beiden Fällen über die terminale OH-Gruppe am C-9 der Neuraminsäure vermittelt und ist beim Liganden **3** sogar deutlich größer ausgeprägt als beim Liganden **4**. Zusätzlich ist auch die Wechselwirkung zum Lys779 beim Liganden **3** deutlich ausgeprägter als beim Liganden **4**. Die Wechselwirkungen zwischen dem Lysin und der OH-Gruppe am C-7, sowie die Wechselwirkung zwischen dem Histidin und der OH-Gruppe am C-9 der Neuraminsäure, ebenso wie die Wechselwirkung zwischen einem Valin und der NH-Gruppe der Neuraminsäure, spielen auch im Komplex mit dem natürlichen Liganden eine wichtige Rolle für die Bindungsaffinität.

Anhand der Auswertungen der MD-Simulationen konnte gezeigt werden, dass wie erwartet vor allem die Bindungsepitope der Liganden Auswirkungen auf die Bindungsmodi haben und dass zumeist bestehende unspezifische Wechselwirkungen anderer Fragmente zum Ende der Simulationen abgebaut waren. Beim Ligand **4** war eine zusätzliche Interaktion einer Neuraminsäure mit einer unspezifischen Stelle des Proteins zu beobachten. Zudem hatte der Ligand einen größeren Verlust an Bindungsenergie zum Ende der Simulation zu verzeichnen als der Ligand **3**. Die ausgeprägtere Komplexität des Liganden **4** schien direkten Einfluss auf die Bindungstasche zu haben, was im Laufe der Simulation zu einer Deformation dieser führte. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass die Beschaffenheit der beiden Liganden nicht zu einer sofortigen Dissoziation des Komplexes führte. Das heißt, die attraktiven Wechselwirkungen der Bindungsepitope waren noch immer bevorzugt. Die räumliche Nähe

weiterer freier Bindungsepitope spricht im Falle einer Komplexdissoziation zudem für ein statistisches Rückbinden des Komplexes. Auch die sterische Abschirmung der Bindungstasche durch die voluminösen Liganden ist im Falle der Konkurrenz um die Bindungsstellen nicht zu vernachlässigen, da so die kompetitive Bindung der Oberflächenrezeptoren an das Hämagglutinin erschwert wird.

Ein weiterer interessanter Aspekt des Liganden **4** geht aus den Abb. 26 und Abb. 29 hervor. Da einer der Bindungsepitop-tragenden Arme des Liganden in keinerlei Interaktion mit dem Protein involviert ist und auch die Linkerfragmente keinen essenziellen Beitrag zur Bindung leisten, besteht die Möglichkeit von intermolekularen Wechselwirkungen mit benachbarten Hämagglutininen auf der Wirtszellenoberfläche, wie es bereits in Arbeiten von Glick und Knowles<sup>94</sup> 1991 gezeigt werden konnte. Dies sei aber als rein spekulativ zu betrachten und müsste in weiteren Studien überprüft werden.

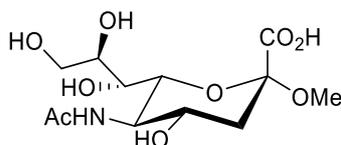
### 6.3 Biacore - SPR

Wie bereits in Kapitel 4.2 beschrieben ist die SPR-Spektroskopie eine sehr sensitive und schnelle Methode, um Bindungseigenschaften von Ligand-Rezeptor-Interaktionen zu untersuchen. Ein Bindungspartner wird dabei auf einem Sensorchip immobilisiert und der andere in gelöster Form über dessen Oberfläche geleitet. Es ist somit möglich Bindungsereignisse in einem fließenden System zu beobachten, was einem biologisch relevanten System ähnlicher ist als ein Statisches. Die Generierung des Messsignals beruht dabei auf dem Effekt der Oberflächenplasmonenresonanz. Jede Bindung zwischen einem Liganden und einem Rezeptor führt zu einer Anreicherung der mobilen Spezies auf der Oberfläche. Die dadurch erzeugte Änderung des Brechungsindex führt wiederum zu einem detektierbaren Signal.

Grundsätzlich gibt es für SPR-Studien zwei Möglichkeiten bezüglich der zu immobilisierenden Spezies. Es gibt sowohl literaturbekannte Systeme bei denen das Protein, in diesem Fall Hämagglutinin auf dem Sensorchip immobilisiert wird<sup>97</sup>, als auch Systeme bei denen der entsprechende Ligand immobilisiert wird<sup>98</sup>. Wenn der Ligand auf dem Sensorchip immobilisiert wird, führt das Hämagglutinin mit einem Gewicht von ~60 kDa als Analyt zu sehr hohen RU-Antworten. Das Signal-Rausch-Verhältnis (*signal-to-noise ratio*, S/N oder SNR) ist in diesem Fall sehr gut. Wird das Targetprotein auf dem Chip immobilisiert ist im Bereich von Liganden mit einem Molekulargewicht zwischen 300 und 1000 g/mol die SPR-Antwort deutlich geringer und damit das SNR schlechter. Jedoch wird die Immobilisierung des Proteins in Falle des Hämagglutinins aus verschiedenen Gründen präferiert. Zum einen ist die Rückgewinnung des bei den Messungen verbrauchten Proteins sehr schwierig. Zum anderen kann es, im Falle der Immobilisierung des Liganden während der Messungen zum störenden *rebinding* kommen. Außerdem müssten die Sialinsäureliganden zusätzlich speziell modifiziert werden, um auf der Matrix des Sensorchips immobilisiert werden zu können.

### 6.3.1 Etablierung eines SPR-Basisassays für Hämagglutinin H5 und Überprüfung des Systems mit Neu5Ac $\alpha$ 2Me

Da aus vorangegangenen Arbeiten<sup>93, 99</sup> eine Problematik bei der Immobilisierung und der Stabilität des Hämagglutinins H5 auf dem Sensorchip bekannt ist, wurde während dieser Arbeit ein entsprechendes optimiertes Assay entwickelt. Überprüft wurde das System mit dem  $\alpha$ -Methylglycosid der Sialinsäure (Neu5Ac $\alpha$ 2Me) (Abb. 41) als bekannten Binder des Hämagglutinins H5 (vgl. Kapitel 3.3.1 - Abb. 6).



**Abb. 41:** Bekannter Binder des Hämagglutinins, das  $\alpha$ -Methylglycosid der Sialinsäure (Neu5Ac $\alpha$ 2Me).

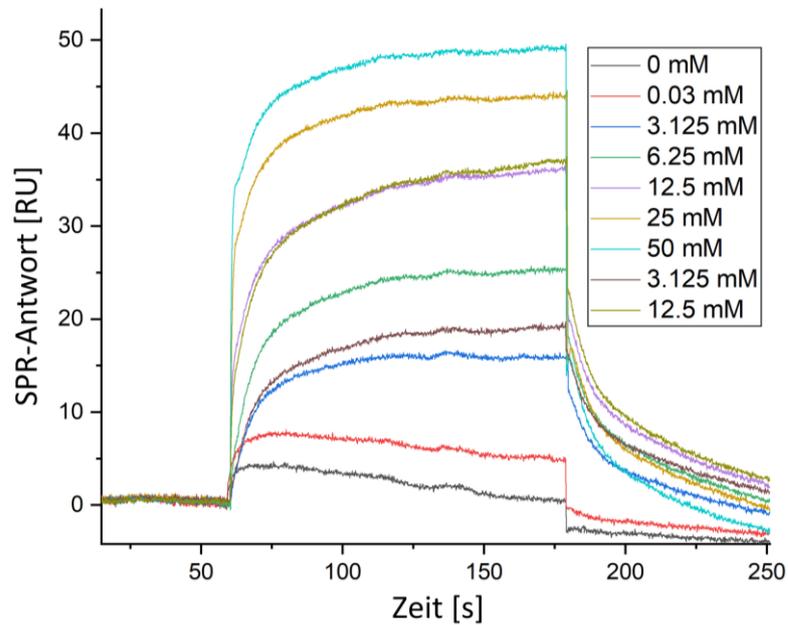
Die Schwierigkeiten bei der Immobilisierung/Stabilität des Proteins bestanden vor allem in einem unsteten Verlauf der Bindungskurven, ungenügenden RU-Antworten, sowie einer massiven Abnahme der Signalintensität im Verlauf der Analyse der Messreihen. Zurückzuführen sind diese Probleme mutmaßlich auf eine zu kurze Lebensdauer/Stabilität des Proteins auf dem Sensorchip. In der Literatur sind SPR-Messungen mit Influenza Hämagglutininen zwar bereits beschrieben<sup>100-102</sup>, doch es wurde nur selten das Hämagglutinin selbst auf dem Sensorchip immobilisiert.<sup>103</sup>

Die nachfolgende Methodenentwicklung sollte als Basisassay vor allem die Halbwertszeit des Proteins auf dem Sensorchip bedeutend verlängern und so komplexe SPR-Untersuchungen des Hämagglutinins H5 auch über längere Zeiträume zu ermöglichen. In vorangegangenen Arbeiten<sup>93, 99, 104</sup> wurde das Hämagglutinin nach unterschiedlichen Methoden auf dem Sensorchip immobilisiert, wobei jedoch in allen Fällen nur eine sehr kurze Halbwertszeit der Stabilität von teilweise nur 4-6 h<sup>93</sup> erreicht wurde. Als Immobilisierungspuffer wurden sowohl ein Maleatpuffer (pH 5.5)<sup>93</sup>, als auch ein 10 mM Acetatpuffer (pH 5.5) verwendet.<sup>99, 104</sup>

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das in einem Tris-Puffer gelagerte Hämagglutinin mittels Dialyse in den Immobilisierungspuffer überführt. Als Immobilisierungspuffer wurde ein PBS-Puffer (pH 7.2) verwendet. Per NanoDrop wurde eine mittlere Konzentration von 133  $\mu$ g/mL des Proteins bestimmt. Der CM5 Sensorchip der Firma Biacore wurde 20 h vor der Belegung in das Gerät eingesetzt und unter Verwendung der *standby*-Methode, der im Gerät

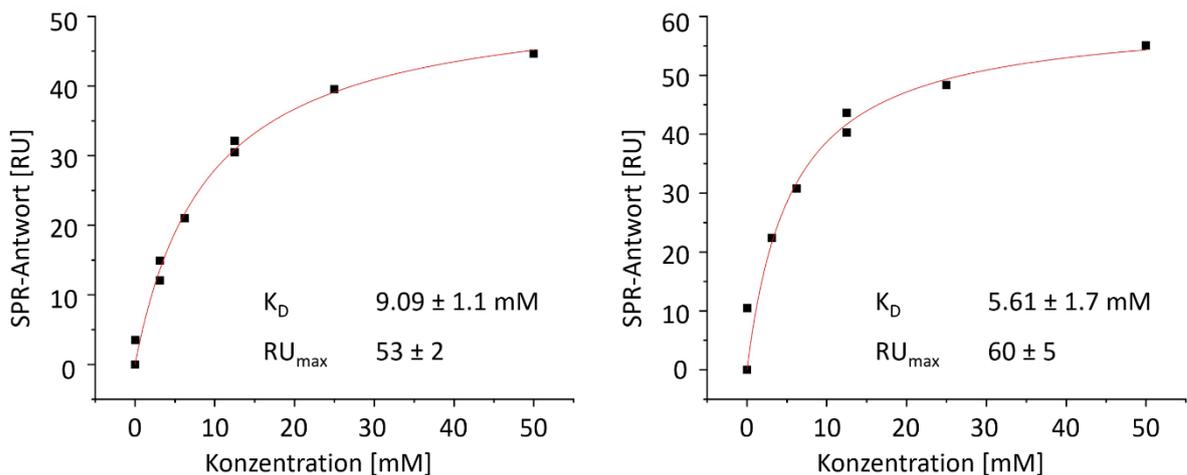
implementierten Software, mit Laufpuffer gespült. Für die SPR-Experimente wurde das Protein auf dem Chip unter Standardbedingungen gekuppelt. Zunächst wurde mit EDC/NHS (1 M/4 M) bei einer Flussrate von 5  $\mu\text{L}/\text{min}$  über 1200 s die Aktivierung der Dextranmatrix durchgeführt. Die Proteinimmobilisierung wurde mit 100  $\mu\text{L}$  verdünnter Protein-Lösung (77.4  $\mu\text{L}$  Protein-Lösung + 22.6  $\mu\text{L}$  Puffer; Konzentration = 103  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) über 760 s bei einer Flussrate von 5  $\mu\text{L}/\text{min}$  durchgeführt. Ein *capping* mit Ethanolamin nach ausreichender Proteinimmobilisierung wurde bei gleicher Flussrate während 720 s durchgeführt. Es gelang eine Immobilisierung von 12880 *response units* (RU) zu erreichen. Für die nachfolgenden Messungen wurde HBS-EP Puffer (0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005 % Surfactant P20) als Laufpuffer verwendet. Zur Äquilibrierung des Systems wurde vor den Messreihen ein *start-up cycle* vorangestellt und das System wurde mittels des *prime*-Befehls mit Pufferlösung gespült. Die Messungen erfolgten ohne Regeneration bei einer Flussrate von 20  $\mu\text{L}/\text{min}$  mit einer Kontaktzeit von 120 s und einer Dissoziationszeit 600 s. Für die Affinitätsbestimmung wurden Konzentrationsreihen aufgenommen, die anschließend thermodynamisch nach dem *one site binding* Modell (vgl. Kapitel 4.2) ausgewertet wurden.

Für thermodynamische Bindungsstudien wurden vier Verdünnungsreihen des Neu5Ac $\alpha$ 2Me zu unterschiedlichen Zeitpunkten vermessen. Verdünnungsreihe 1 und 2 wurden an einem Tag innerhalb von ein paar Stunden vermessen. Verdünnungsreihe 3 wurde nach 24 h gemessen und Verdünnungsreihe 4 wurde nach 96 h vermessen. Der Konzentrationsbereich von Messung 1 und 2 betrug 0 - 50 mM, der Bereich der dritten Messung lag zwischen 0 - 125 mM, wobei alle Messungen im Konzentrationsbereich über 62.5 mM keine gut verwertbaren Ergebnisse lieferten. Der Bereich der vierten Messung lag wieder zwischen 0 - 50 mM. In Abb. 42 sind stellvertretend für alle Messreihen die Sensorgramme der Verdünnungsreihe 1 gezeigt.

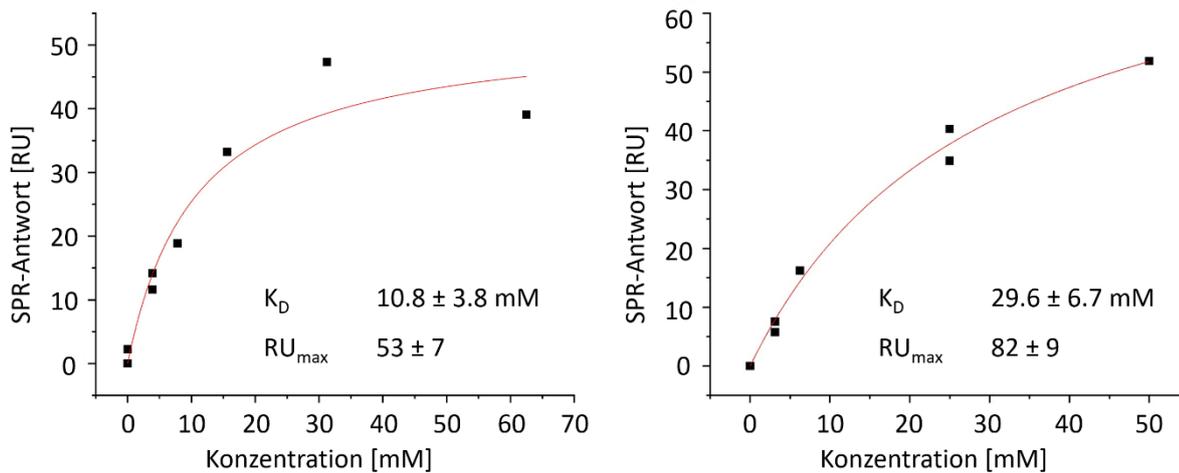


**Abb. 42:** SPR-Sensorgramme der Konzentrationsreihe 1 des Neu5Acα2Me, aufgenommen an der Biacore T100, Sensorchip CM5. Die Sensorgramme wiesen ein gutes Signal-zu-Rausch Verhältnis auf. Die Daten ließen sich anschließend gut an das *one site binding* Modell anpassen.

Wie in der Abbildung zu erkennen, sind die RU-Antworten konzentrationsabhängig. Nach einer Assoziationszeit von 120 s ist bei allen Konzentrationen der *steady state* erreicht. Die maximalen RU-Antworten wurden nach dem *one site binding* Modell analysiert. Dazu wurde die jeweilige RU-Antwort gegen die entsprechenden Konzentrationen aufgetragen.



**Abb. 43:** SPR-Antworten des Liganden Neu5Acα2Me als Funktion der Konzentration der Konzentrationsreihe 1, 4 h nach Immobilisierung des Proteins auf dem Sensorchip (links) und der Konzentrationsreihe 2, 9 h nach Immobilisierung des Proteins auf dem Sensorchip (rechts). Die Messdaten wurden mittels des in der Software Origin implementierten *one site binding* Modell gefittet.



**Abb. 44:** SPR-Antworten des Liganden Neu5Ac $\alpha$ 2Me als Funktion der Konzentration der Konzentrationsreihe 3, 24 h nach Immobilisierung des Proteins auf dem Sensorchip (links) und der Konzentrationsreihe 4, 96 h nach Immobilisierung des Proteins auf dem Sensorchip (rechts). Die Messdaten wurden mittels des in der Software Origin implementierten *one site binding* Modell gefittet.

Die aus den ersten drei Verdünnungsreihen gemittelte Dissoziationskonstante  $K_D = 8.5 \text{ mM}$  liegt in einem erwarteten niedrigen millimolaren Bereich, welcher charakteristisch für Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkung ist. Im Vergleich dazu ergaben Bindungsstudien des Neu5Ac $\alpha$ 2Me beispielsweise von Sauter *et al.*<sup>105</sup> für das vergleichbare Hämagglutinin H3 eine Dissoziationskonstanten von  $K_D = 2.8 \pm 0.3 \text{ mM}$ . Der erhaltene gemittelte  $R_{U_{\max}}$  für die Verbindung liegt zudem mit einem Wert von 55 im Bereich des mit Hilfe von *BiaCalculations* ermittelten theoretisch  $R_{U_{\max}}$  von 65.

Die Konzentrationsreihe 4 ergab einen  $K_D$ -Wert von 29.6 mM und einen  $R_{U_{\max}}$ -Wert von 82. Die Messungen wurden 96 h nach Immobilisierung des Proteins durchgeführt. Der im Verlauf der Messreihen schlechter werdende  $K_D$ -Wert legt die Vermutung nahe, dass das Protein auf dem Sensorchip teilweise denaturiert war. Eine wahrscheinliche Möglichkeit stellt die partielle Abspaltung einzelner Segmente des trimeren Hämagglutinins dar.

Aus den Sensorgrammen könnte durch Anpassung auch auf die Kinetik des Liganden geschlossen werden (vgl. Kapitel 4.2). Dazu wird das Sensorgramm der höchsten Konzentration einer Konzentrationsreihe an die Langmuir-Isotherme angepasst, woraus sich dann die Dissoziationskonstante  $K_D$  und zusätzlich auch die Geschwindigkeitskonstanten  $k_{on}$

und  $k_{\text{off}}$  ermitteln lassen. Auf die kinetische Auswertung der Daten wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch verzichtet, da die Verifizierung des Systems zur Anwendung als Basisassay bereits aufgrund der gewonnenen thermodynamischen Daten möglich war.

Die ermittelten Daten zeigen, dass sich die verwendeten Messparameter sehr gut für die Analyse des untersuchten Systems eignen. Unter den entwickelten Bedingungen ist das Protein deutlich länger auf dem Sensorchip stabil als in vergleichbaren Arbeiten, was die Reproduzierbarkeit und Belastbarkeit von aussagekräftigen Ergebnissen für komplexe Bindungsstudien deutlich verbessert und vereinfacht. Auch Messungen nach 24 h lieferten konsistente und mit den anfangs gemessenen Daten vergleichbare Ergebnisse. Das entwickelte Assay eignet sich somit zur Untersuchung von Bindungsereignissen des Hämaggglutinins H5 auch über einen längeren Zeitraum. Lediglich die Messungen nach 96 h zeigten eine langsame Veränderung der Ergebnisse, wobei diese Veränderung möglicherweise auch die Folge anderer Faktoren sein könnte.

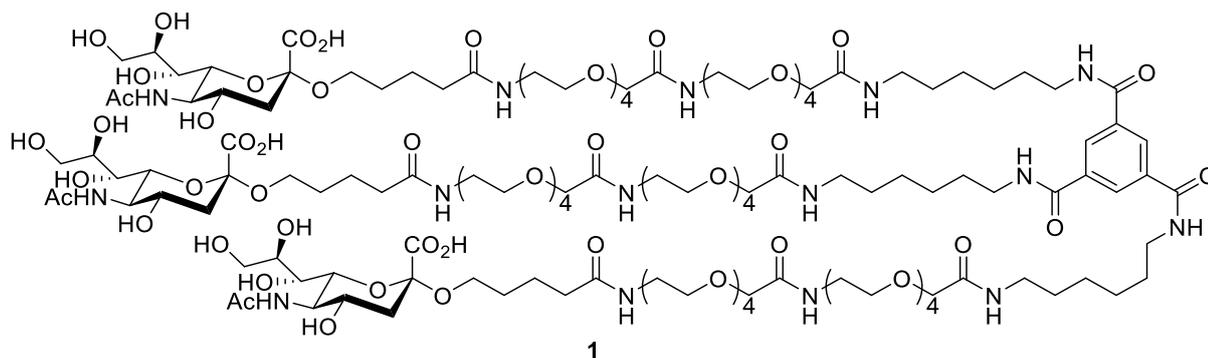
## 6.4 Retrosyntheseplan und Weiterentwicklung der Syntheserouten

Die entworfenen und mittels *molecular modeling* untersuchten Liganden sollten als Ausgangspunkt für die Entwicklung von Synthesestrategien zur Darstellung der entsprechenden Bausteine und der anschließenden Kupplung der Fragmente dienen. Zudem wurde die während der Masterarbeit entwickelte Synthesestrategie zur Darstellung der Fragmente des multivalenten Liganden **1** optimiert, erweitert und an die Darstellung der multivalenten Liganden **3** und **4** entsprechend angepasst.

### 6.4.1 Retrosynthesen der multivalenten Leitstrukturen

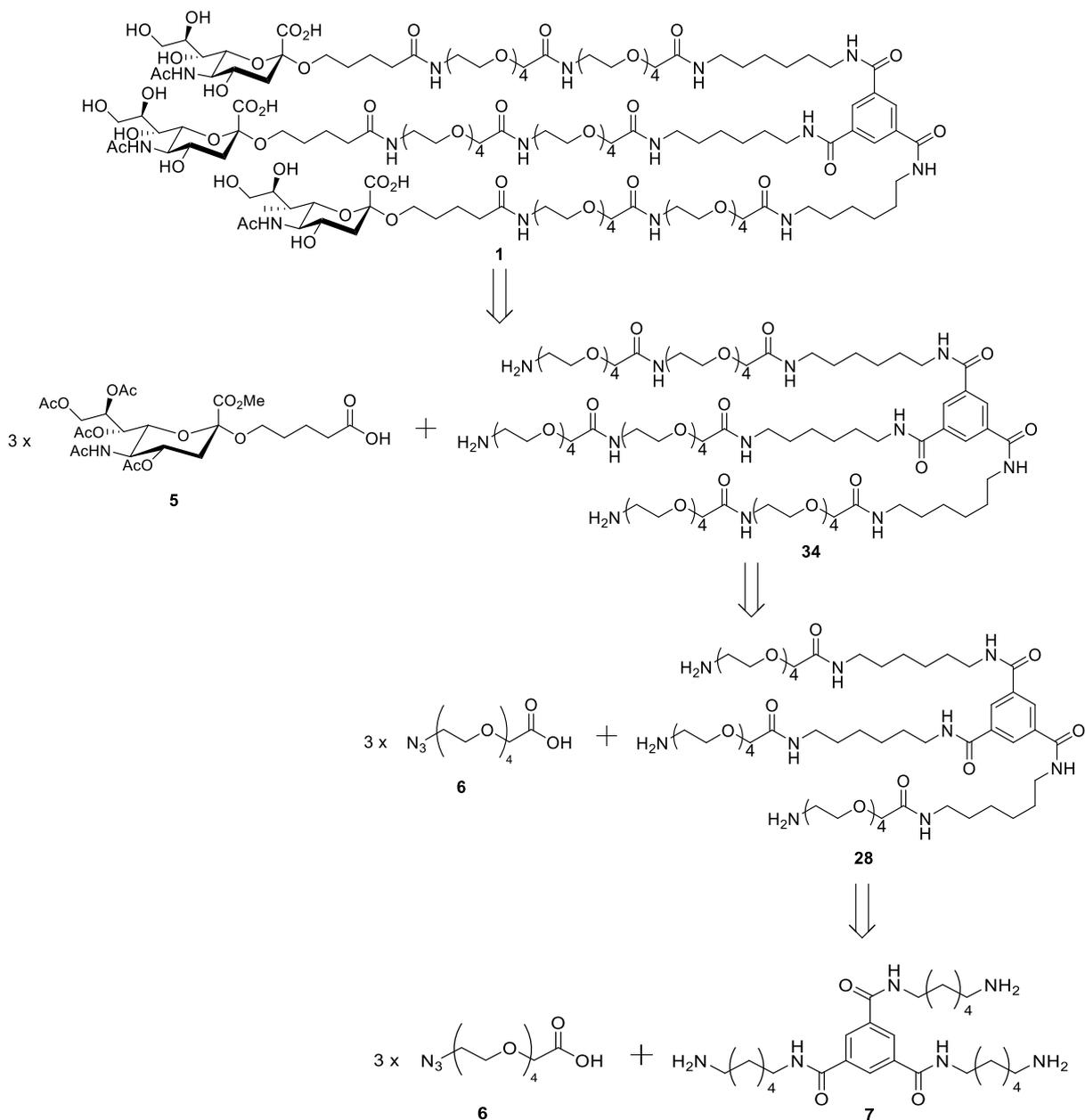
Bereits während der Masterarbeit wurde Ligand **1** (Abb. 45) einer retrosynthetischen Analyse unterzogen. Dieser besitzt eine  $C_3$ -symmetrische, von Trimesoylchlorid abgeleitete *core*-Struktur. Diese Struktur sollte den weiteren multivalenten Liganden ebenfalls als  $C_3$ -symmetrischer *core* dienen.

Wie Abb. 45 zu entnehmen ist an den aromatischen *core* in Position 1, 3 und 5 zunächst je ein Alkylspacer aus sechs Kohlenstoffatomen amidisch geknüpft. Darauf folgt jeweils ein amidisch gebundenes Linkerfragment, das aus zwei, um eine Essigsäureeinheit verlängerte, Tetraethylenglycolderivaten besteht. An diesen Linker ist ein weiterer amidisch verknüpfter Alkylspacer, aus vier Kohlenstoffatomen, mit glycosidisch verknüpfter Neuraminsäure gebunden.



**Abb. 45:** Der trimere Ligand **1** besitzt eine  $C_3$ -symmetrische von Trimesoylchlorid abgeleitete *core*-Struktur. An den aromatischen *core* ist in Position 1, 3 und 5 zunächst je ein Alkylspacer aus sechs Kohlenstoffatomen amidisch geknüpft. Darauf folgt jeweils ein amidisch gebundenes Linkerfragment, das aus zwei, um eine Essigsäureeinheit verlängerte, Tetraethylenglycolderivaten besteht. An diesen Linker ist ein weiterer amidisch verknüpfter Alkylspacer, aus vier Kohlenstoffatomen, mit glycosidisch verknüpfter Neuraminsäure gebunden.

Die retrosynthetische Analyse des Liganden **1** ergab eine konvergente Synthesestrategie, bestehend aus drei Grundbausteinen. Diese Bausteine sollten in mehreren Stufen amidisch miteinander verknüpft werden. Als Grundbausteine wurde ein Neuraminsäurebaustein **5**, ein Linkerbaustein **6** und einen aromatischen *core*-Baustein **7** erhalten (Abb. 46).

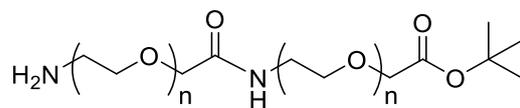


**Abb. 46:** Nach retrosynthetischer Analyse erhaltene Bausteine des Liganden **1**. Es wurde ein Neuraminsäurebaustein **5**, ein Linkerbaustein **6** und ein aromatischer *core*-Baustein **7** erhalten.

Nach *in situ* Entschützung der *core*-Struktur zum Triamin **7** wird dieses zunächst mit einem ersten Linkerbaustein **6** amidisch verknüpft. Anschließend wird ein weiterer Linkerbaustein **6** amidisch verknüpft, bevor der Neuraminsäurebaustein **5** amidisch gekuppelt wird. Nach Entfernung der Schutzgruppen wird der Ligand **1** erhalten.

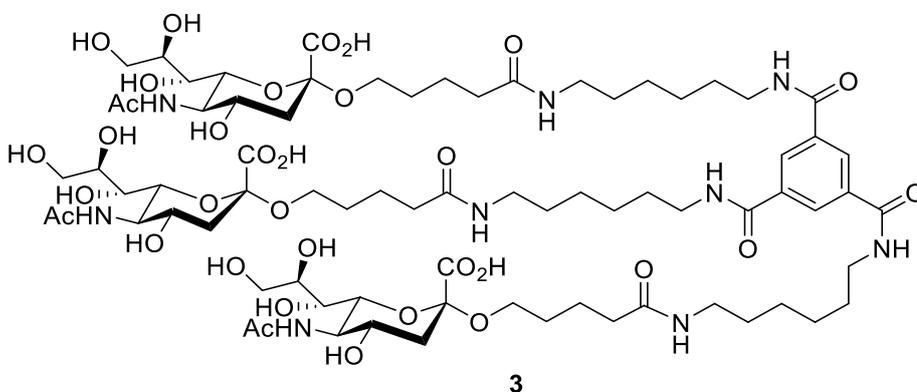
Abweichend von dieser Strategie, bei welcher zweimal ein Teil des Linkerfragments **6** gekuppelt wird, wurde in dieser Arbeit überprüft, ob die Synthese des Linkerfragments **8** (Abb.

47) von Vorteil für nachfolgenden Kupplungen ist. Zusätzlich wurde diese Strategie auch mit den eingeführten Triethylenglycolderivaten zum Baustein **9** durchgeführt.



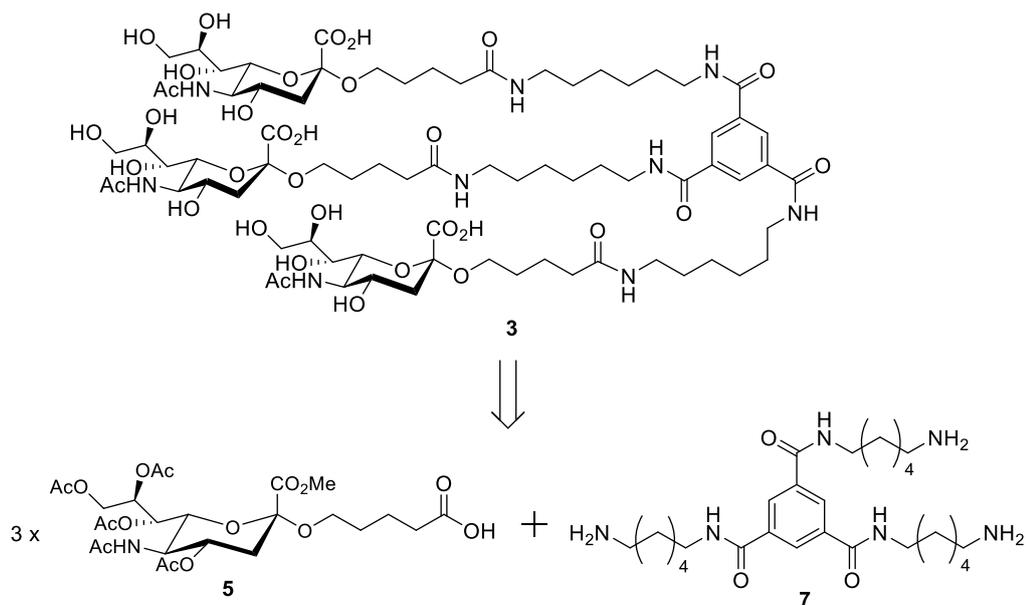
**Abb. 47:** Alternative Bausteine **8** (für  $n = 4$ ) und **9** (für  $n = 3$ ).

Der Ligand **3** (Abb. 48) besitzt ebenfalls einen  $C_3$ -symmetrischen *core* an den in Position 1, 3 und 5 zunächst je ein Alkylspacer aus sechs Kohlenstoffatomen amidisch geknüpft. In diesem Fall folgt dann direkt jeweils ein weiterer amidisch verknüpfter Alkylspacer, aus vier Kohlenstoffatomen, mit glycosidisch verknüpfter Neuraminsäure.



**Abb. 48:** Der trimere Ligand **3** besitzt eine  $C_3$ -symmetrische von Trimesoylchlorid abgeleitete *core*-Struktur. An den aromatischen *core* ist in Position 1, 3 und 5 zunächst je ein Alkylspacer aus sechs Kohlenstoffatomen amidisch geknüpft. Darauf folgt jeweils ein weiterer amidisch verknüpfter Alkylspacer, aus vier Kohlenstoffatomen, mit glycosidisch verknüpfter Neuraminsäure.

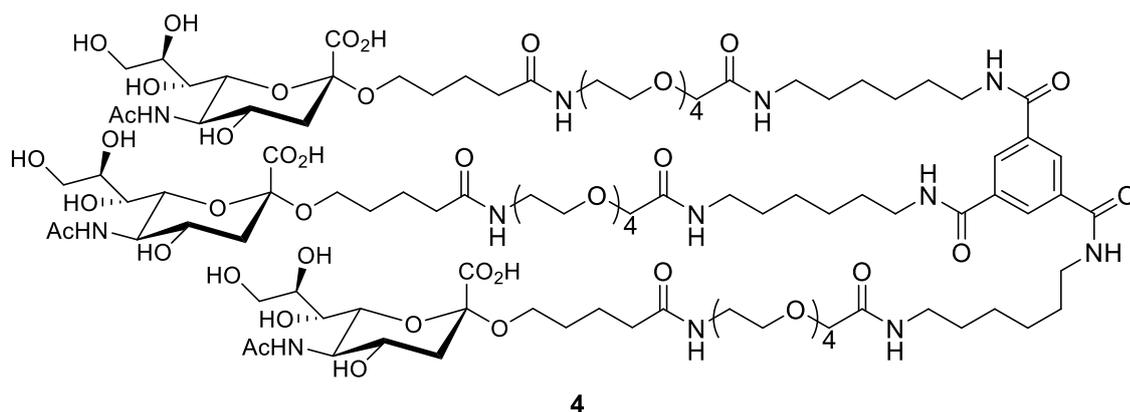
Die retrosynthetische Analyse des Liganden **3** sah eine konvergente Synthesestrategie, bestehend aus zwei Grundbausteinen, vor. Diese Bausteine sollten amidisch miteinander verknüpft werden. Die retrosynthetische Analyse ergab den Neuraminsäurebaustein **5** und den aromatischen *core*-Baustein **7** (Abb. 49).



**Abb. 49:** Retrosynthetische Analyse des Liganden **3**. Die Zerlegung ergab den Neuraminsäurebaustein **5** und den aromatischer *core*-Baustein **7**.

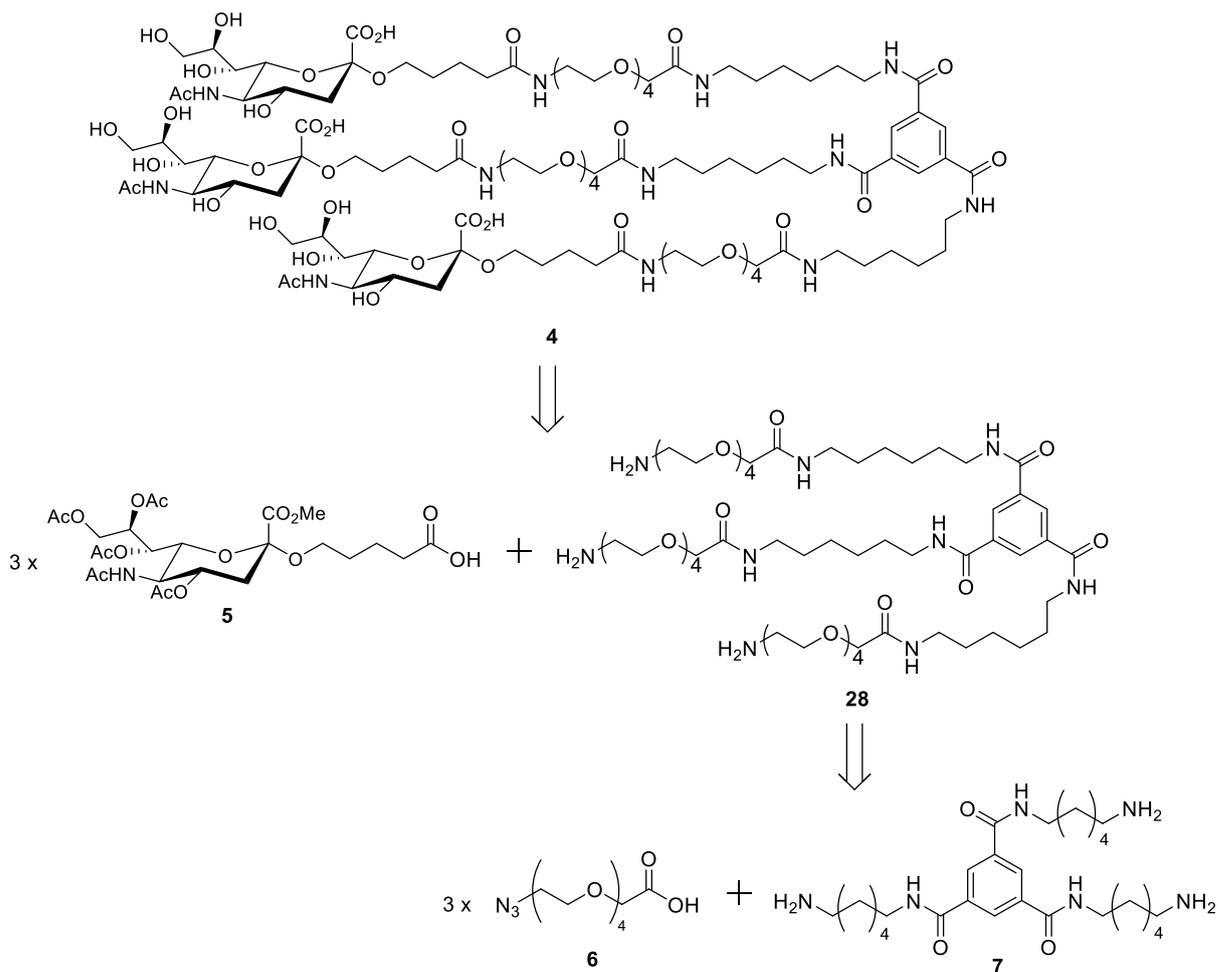
Nach *in situ* Entschützung der *core*-Struktur zum Triamin **7** wird dieses mit einem Neuraminsäurebaustein **5** amidisch gekuppelt. Nach Entfernung der Schutzgruppen wird der Ligand **3** erhalten.

Der Ligand **4** (Abb. 50) besitzt ebenfalls einen  $C_3$ -symmetrischen *core* an den in Position 1, 3 und 5 zunächst je ein Alkylspacer aus sechs Kohlenstoffatomen amidisch geknüpft. Darauf folgt jeweils ein amidisch gebundenes Linkerfragment, das aus einem, um eine Essigsäureeinheit verlängertem, Tetraethylenglycolderivat besteht. An diesen Linker ist ein weiterer amidisch verknüpfter Alkylspacer, aus vier Kohlenstoffatomen, mit glycosidisch verknüpfter Neuraminsäure gebunden.



**Abb. 50:** Der trimere Ligand **4** besitzt eine  $C_3$ -symmetrische von Trimesoylchlorid abgeleitete *core*-Struktur. An den aromatischen *core* ist in Position 1, 3 und 5 zunächst je ein Alkylspacer aus sechs Kohlenstoffatomen amidisch geknüpft. Darauf folgt jeweils ein amidisch gebundenes Linkerfragment, das aus einem, um eine Essigsäureeinheit verlängertem, Tetraethylenglycolderivat besteht. An diesen Linker ist ein weiterer amidisch verknüpfter Alkylspacer, aus vier Kohlenstoffatomen, mit glycosidisch verknüpfter Neuraminsäure gebunden.

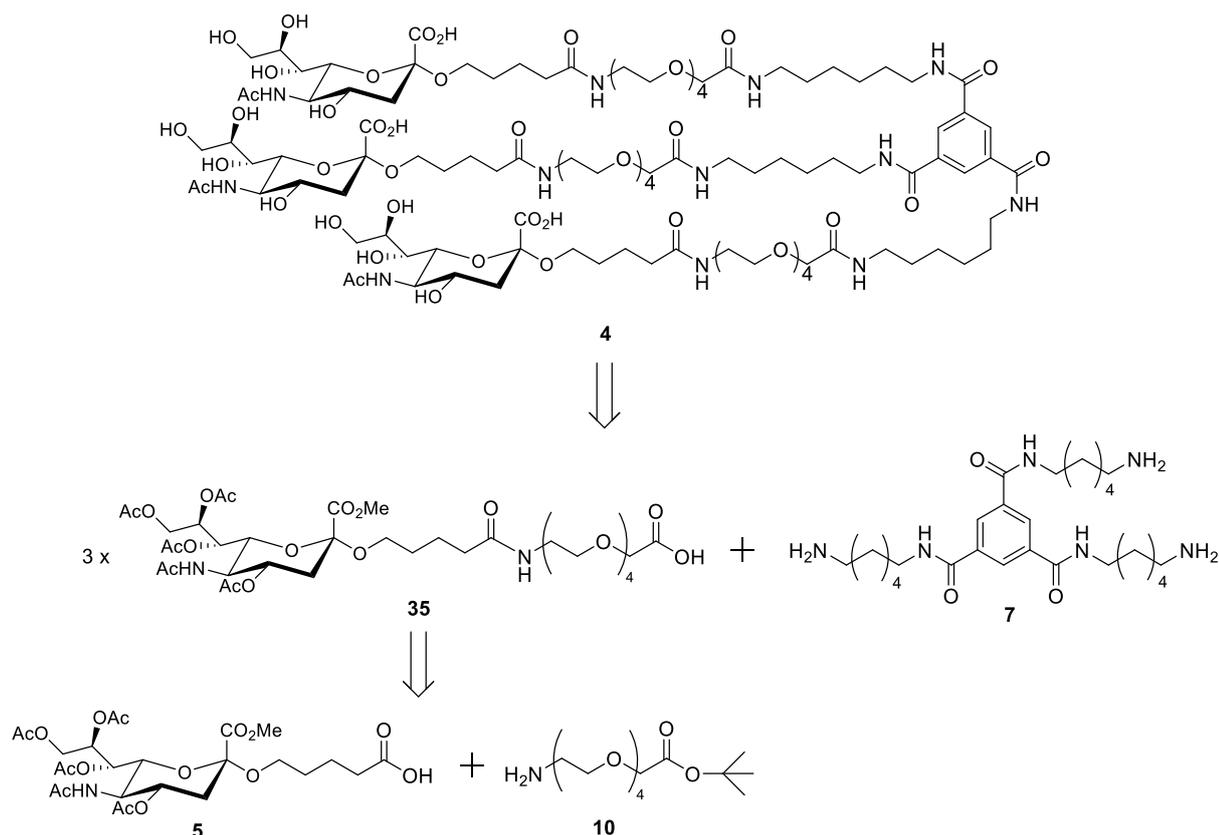
Die retrosynthetische Analyse des Liganden **4** ermöglicht im Gegensatz zum Ligand **3** zwei unterschiedliche konvergente Synthesestrategien, bestehend aus unterschiedlichen Bausteinen. Die erste Variante ergab einen Neuraminsäurebaustein **5**, einen Linkerbaustein **6** und einen aromatischen *core*-Baustein **7** (Abb. 51).



**Abb. 51:** Retrosynthetische Analyse des Liganden **4**. Die Zerlegung ergab einen Neuraminsäurebaustein **5**, einen Linkerbaustein **6** und einen aromatischer *core*-Baustein **7**.

Für die erste Variante wird nach *in situ* Entfernung der Boc-Schutzgruppen von der *core*-Struktur das erhaltene Triamin **7** mit dem Linkerbaustein **6** amidisch verknüpft. Anschließend wird der Neuraminsäurebaustein **5** amidisch gekuppelt. Nach Entfernung der Schutzgruppen wird der Ligand **4** erhalten.

Die zweite Variante der retrosynthetischen Analyse ergab einen aromatischen *core*-Baustein **7**, einen Neuraminsäurebaustein **5** und einen Linkerbaustein **10** (Abb. 52).



**Abb. 52:** Retrosynthetische Analyse des Liganden **4**. Die Zerlegung ergab einen Neuraminsäurebaustein **5**, einen Linkerbaustein **10** und einen aromatischer *core*-Baustein **7**.

Für diese Variante wird der Neuraminsäurebaustein **5** amidisch mit dem Linkerbaustein **10** verknüpft. Nach *in situ* Entfernung der Boc-Schutzgruppen von der *core*-Struktur **7** und selektiven Entschützung der *tert*-Butyl-Schutzgruppe von dem carboxyfunktionalisierten Neuraminsäureglycosid **35** werden die Bausteine amidisch verknüpft. Nach Entfernung der verbleibenden Schutzgruppen wird der Ligand **4** erhalten. Bei dieser Variante stellt die selektive Entschützung der *tert*-Butyl-Schutzgruppe in Anwesenheit des Methylesters eine besondere Herausforderung dar.

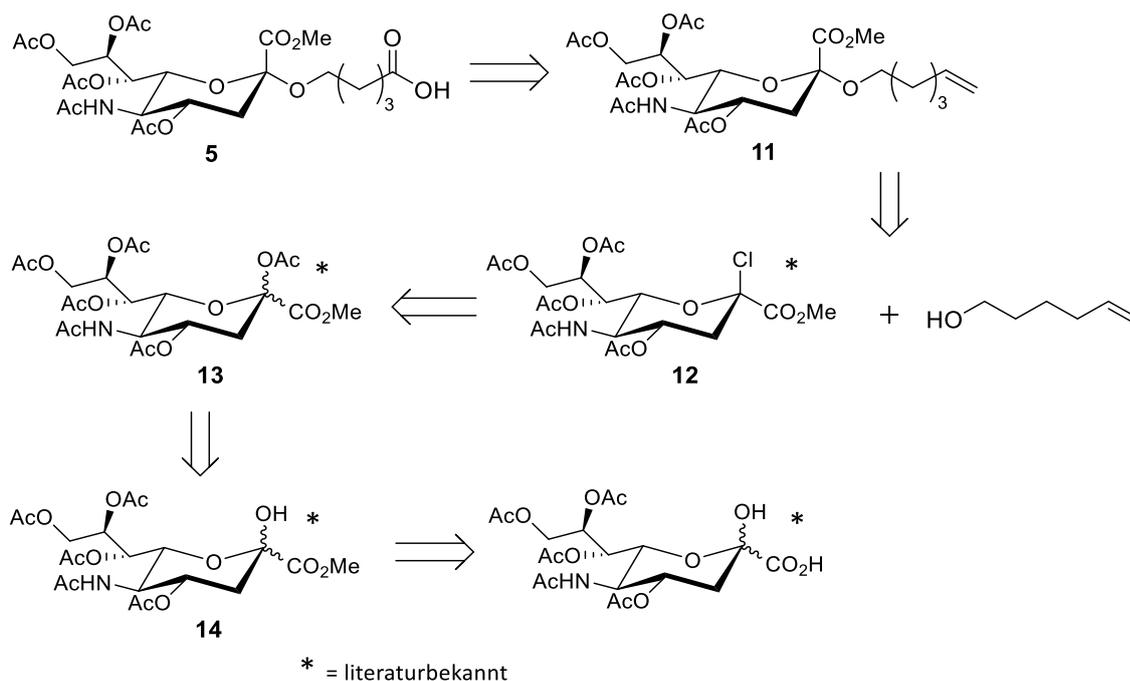
Für die multivalenten Leitstrukturen sollten jeweils die letzten zwei Syntheseschritte, die Entfernung der Acetylschutzgruppen, sowie die Entschützung des Methylesters optional bleiben. Es werden somit in den nachfolgenden Abschnitten vorrangig die geschützten Varianten der Liganden **1**, **3** und **4** synonym zu den freien Liganden behandelt. Die geschützten Varianten werden als Ligand **1a**, **3a** und **4a** geführt. Der verbleibende Schutz der funktionellen Gruppen führt zu einer besseren Haltbarkeit und Stabilität der vorliegenden Strukturen, da aufgrund der Komplexität der Liganden, bei einer frühzeitigen Entschützung der funktionellen

Gruppen, von problematischen Nebenreaktionen und Lagerungsproblemen auszugehen ist. Die freien funktionellen Gruppen würden zudem erst in möglichen *in vitro* Bindungsstudien benötigt werden und bieten unter anderem auch für mögliche Studien in Zelllinien aufgrund ihrer höheren Lipophilie verschiedene Vorteile. Den geschützten Liganden wäre beispielsweise die Diffusion durch lipophile Zellmembranen möglich. Oft werden dafür Ester, wie die verwendeten Acetyl- und Methylester eingesetzt. Je nach möglichem Einsatz der Inhibitoren als Medikament wäre auch die Wirksamkeit über verschiedene Verabreichungsformen (oral, inhalativ, etc.) zu überprüfen. Von Interesse wäre daher die Möglichkeit einer erst *in vivo* stattfindenden Umwandlung der geschützten Liganden in die aktiven Stoffwechselprodukte (Metabolite) (vgl. Kapitel 3.4.2 Prodrugs - Resorptionsester). Beispielsweise könnten, ähnlich wie auch verwandte Inhibitoren aus der Familie der Neuraminidase-Hemmer, die geschützten Liganden durch hepatische Esterasen, nach der Aufnahme über den Magen-Darm-Trakt ins Blut, metabolisiert werden.

#### 6.4.2 Retrosynthesen der Bausteine

Im nachfolgenden Abschnitt sind die retrosynthetischen Zerlegungen der erhaltenen Bausteine aus Kapitel 6.4.1 aufgeführt. Die retrosynthetische Zerlegung des Zuckerbausteins **5** und des *core*-Bausteins **7** wurden bereits während der Masterarbeit durchgeführt.

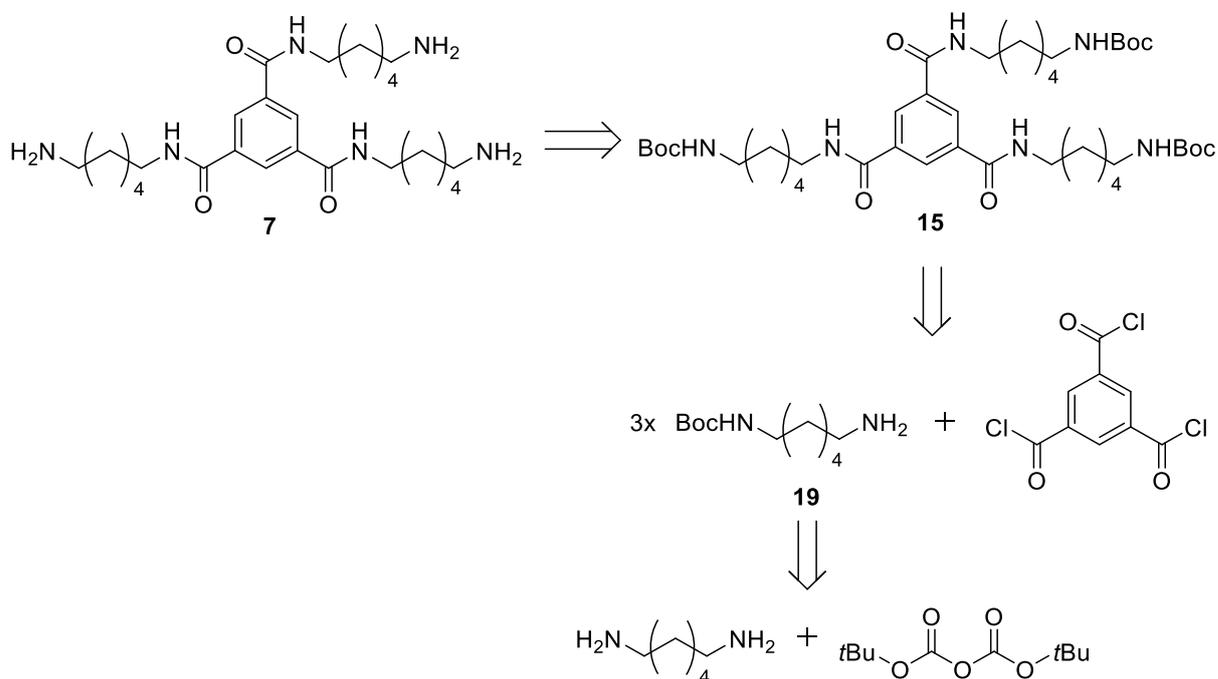
In Abb. 53 ist die retrosynthetische Analyse des Neuraminsäurebausteins **5** aufgeführt. Die Darstellung des  $\beta$ -Chlorids der Neuraminsäure als Glycosyldonors ist ein literaturbekanntes Verfahren in der Neuraminsäurechemie.<sup>106-108</sup>



**Abb. 53:** Retrosynthetische Analyse des Neuraminsäurebausteins **5**. Die retrosynthetische Analyse des  $\beta$ -Chlorids der Neuraminsäure **12** als Glycosyldonors ist literaturbekannt (\*).<sup>106-108</sup>

Die Darstellung des Neuraminsäurechlorids **12** verläuft literaturbekannt über die Synthese des Methylesters der Neuraminsäure **14**, die Acetylierung der Hydroxyfunktionen zum peracetyliertem Methyl ester **13** und die anschließende Einführung des Chlorids am anomeren Zentrum.<sup>106-108</sup> Die Glycosylierung des  $\beta$ -Chlorids zum  $\alpha$ -Glycosid **11** kann mit 5-Hexen-1-ol in einer Königs-Knorr-artigen Reaktion mit frisch dargestelltem Silbersalicylat<sup>109</sup> als Promoter durchgeführt werden.<sup>110</sup> Die anschließende Oxidation der terminalen Doppelbindung und die damit verbundene Verkürzung des Aglycons um ein Kohlenstoffatom kann mit *in situ* erzeugtem Rutheniumtetroxid nach Lee *et al*<sup>111</sup> und Carlsen *et al*.<sup>112</sup> durchgeführt werden.

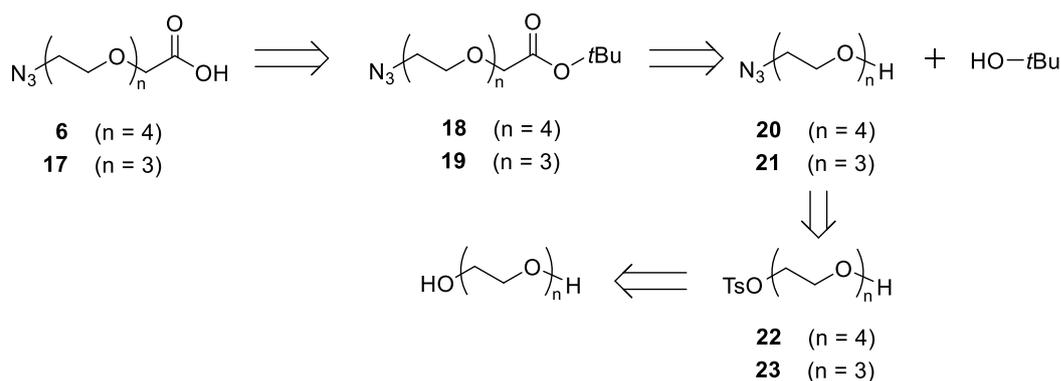
In Abb. 54 ist die retrosynthetische Analyse des aromatischen *core*-Bausteins **7** dargestellt. Die Darstellung der *core*-Struktur ist für Alkylketten mit zwei und vier Methylenenheiten literaturbekannt.<sup>113, 114</sup>



**Abb. 54:** Retrosynthetische Analyse des aromatischen *core*-Bausteins **7**.

Der aromatische *core*-Baustein **7** wird *in situ* durch saure Hydrolyse der Boc-Schutzgruppen aus **15** erhalten. Unter Schotten-Baumann Bedingungen wird durch die Umsetzung von Trimesoylchlorid mit dem einfach geschützten Diamin **19**, welches zuvor aus der Umsetzung von Hexamethyldiamin mit Di-*tert*-butyldicarbonat erhalten wird<sup>115</sup>, der geschützte Baustein **15** erhalten.<sup>113, 114</sup>

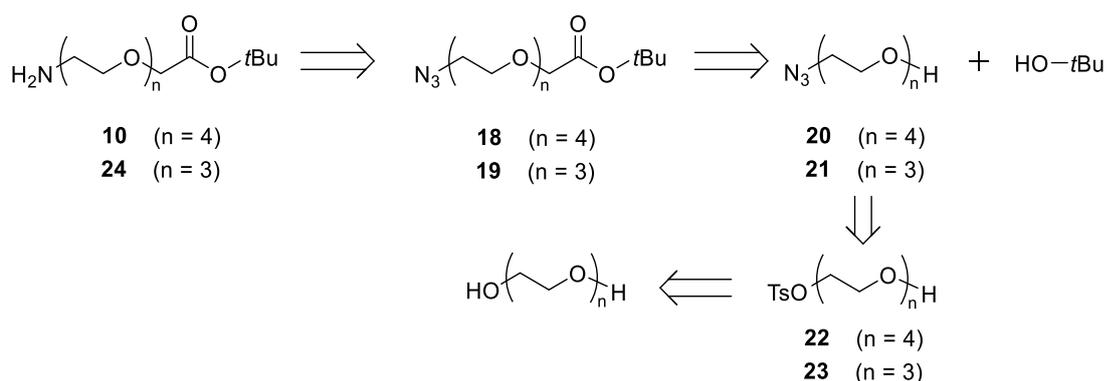
Die retrosynthetische Analyse des Linkerbausteins **6** wurde ausgehend von den in der Masterarbeit durchgeführten Synthesen und den damit verbundenen Schwierigkeiten für diese Arbeit angepasst und optimiert. Zudem wurde für weitere Variationsmöglichkeiten der Linkerbaustein **17** analog zum Linkerbaustein **6** entwickelt. In Abb. 55 ist die retrosynthetische Analyse der Linkerbausteine **6** und **17** dargestellt.



**Abb. 55:** Retrosynthetische Analyse der Linkerbausteine **6** und **17**.

Die tosylierten Bausteine **22** und **23** werden durch die Umsetzung von Tri- ( $n=3$ ) bzw. Tetraethylenglycol ( $n=4$ ) mit *para*-Toluolsulfonsäurechlorid erhalten.<sup>116, 117</sup> Die Azidgeschützten Vorstufen **20** und **21** werden durch die Umsetzung mit Natriumazid erhalten<sup>116, 118</sup> und durch Veresterung mit frisch dargestelltem Natrium-*tert*-butanolat in *tert*-Butanol werden diese zu **18** und **19** umgesetzt.<sup>119</sup> Die finalen Linkerbausteine **6** und **17** werden durch basische Hydrolyse erhalten. Alternativ lassen sich die finalen Linkerbausteine auch direkt über eine Williamson-Ethersynthese aus der Azidgeschützte Vorstufe **20** und **21** erhalten.<sup>118</sup> Diese Variante zeigte jedoch eine hohe Anfälligkeit für Probleme und lieferte durchweg keine zufriedenstellenden Ausbeuten.

In Abb. 56 ist die retrosynthetische Analyse des Linkerbausteins **10** und des verkürzten Bausteins **24** dargestellt.



**Abb. 56:** Retrosynthetische Analyse der Linkerbausteine **10** und **24**.

Die Darstellung verläuft zum großen Teil analog zu der von **6** und **17**, wobei die finalen Bausteine **10** und **24** in diesem Fall durch Hydrierung der terminalen Azidgruppe erhalten werden.<sup>116-118</sup>

## 6.5 Synthesen

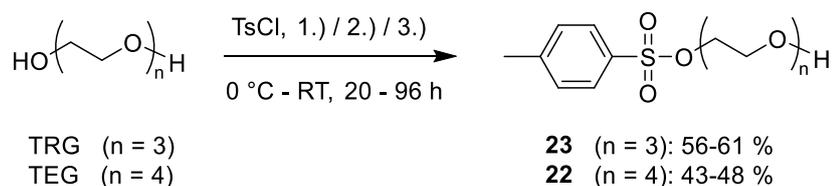
In den folgenden Abschnitten sind alle während der Doktorarbeit durchgeführten Synthesen aufgeführt. Zudem sind sowohl Ergänzungen und Optimierungen von literaturbekannten Synthesewegen gezeigt als auch die überarbeiteten Durchführungen von bereits während der Masterarbeit durchgeführten Synthesen gezeigt.

### 6.5.1 Synthese der Azid-geschützten Linkerbausteine **6** und **17**, sowie der Boc-geschützten Analoga **10** und **24**

Die Darstellung der Linkerbausteine erfolgte ausgehend von Tetra- oder Triethylenglycol. Für die Darstellung der unterschiedlichen Linkerlängen wurden vergleichbare Synthesestrategien gewählt. Zur Optimierung der Ausbeuten, sowie der Vermeidung von schwer abtrennbaren Nebenprodukten wurden unterschiedliche Synthesevarianten getestet. Im Nachfolgenden sind nur die jeweils zwei vielversprechendsten Darstellungen für die erste Synthesestufe aufgeführt. In unterschiedlichen Reaktionsansätzen wurde eine der terminalen Hydroxyl-Gruppen des Tetraethylenglycols (TEG) bei 0 °C mit *para*-Toluolsulfonsäurechlorid (TsCl) in das geschützte Tosylat überführt. Die Reaktion wurde zum einen nach Ma *et al.*<sup>120</sup> in Chloroform unter der Zugabe von festem Kaliumhydroxid als Hilfsbase durchgeführt und zum anderen nach Shirude *et al.*<sup>121</sup> in THF unter Zugabe von in Wasser gelöstem Natriumhydroxid als Hilfsbase. Das Triethylenglycol (TRG) wiederum wurde, zum einen nach Ma *et al.*<sup>120</sup> in Chloroform unter Zugabe von festem Kaliumhydroxid und zum anderen nach Strulson *et al.*<sup>116</sup> und Beckmann *et al.*<sup>117</sup> in abs. THF unter Zugabe von Pyridin als Hilfsbase, zum Tosylat umgesetzt.

Das Hauptproblem bei der Tosylierung der Ethylenglycole stellte vor allem die Symmetrie der Moleküle und eine damit verbundene Entstehung der doppelt-tosylierten Nebenprodukte (TEG-dTs = doppelt-tosyliertes Tetraethylenglycol) bzw. (TRG-dTs = doppelt-tosyliertes Triethylenglycol) dar. Das mono-tosylierte Tetraethylenglycol **22** (TEG-Ts) in dem Reaktionsansatz nach Ma *et al.* wurde in einer Ausbeute von 48 % und in dem Ansatz nach Shirude *et al.* in einer Ausbeute von 43 % erhalten. Das mono-tosylierte Triethylenglycol **23**

(Ts-TRG) wurde in dem Reaktionsansatz nach Ma *et al.* in einer Ausbeute von 61 % und in dem Ansatz nach Strulson *et al.* und Beckmann *et al.* in einer Ausbeute von 56 % erhalten (Abb. 57).



**Abb. 57:** Darstellung des mono-tosylierten Tri- **23** bzw. Tetraethylenglycols **22** bei 0 °C mit *para*-Toluolsulfonsäurechlorid. 1.) Nach Ma *et al.*<sup>120</sup> wurde sowohl Tri- als auch Tetraethylenglycol in Chloroform unter der Zugabe von festem Kaliumhydroxid als Hilfsbase bei 0 °C mit *para*-Toluolsulfonsäurechlorid in das geschützte Tosylat überführt. 2.) Nach Shirude *et al.*<sup>121</sup> wurde Tetraethylenglycol in THF unter Zugabe von in Wasser gelöstem Natriumhydroxid als Hilfsbase bei 0 °C mit *para*-Toluolsulfonsäurechlorid in das geschützte Tosylat überführt. 3.) Nach Strulson *et al.*<sup>116</sup> und Beckmann *et al.*<sup>117</sup> wurde Triethylenglycol in abs. THF unter Zugabe von Pyridin als Hilfsbase bei 0 °C mit *para*-Toluolsulfonsäurechlorid in das geschützte Tosylat überführt. Das Produkt **23** wurde in den Reaktionsansätzen in Ausbeuten von 56-61 % und das Produkt **22** wurde in den Reaktionsansätzen in Ausbeuten von 43-48 % erhalten.

Neben der Wahl des eingesetzten Lösungsmittels, sowie der verwendeten Hilfsbase war das Verhältnis zwischen *para*-Toluolsulfonsäurechlorid und dem Glycol, sowie die Reaktionszeit von entscheidender Bedeutung für die Ausbeute an Produkt und die Entstehung von Nebenprodukten. In einer zusätzlich durchgeführten Versuchsreihe wurde das Tetraethylenglycol anhand der Synthesevariante nach Strulson *et al.*<sup>116</sup> und Beckmann *et al.*<sup>117</sup> in abs. THF unter Zugabe von Pyridin als Hilfsbase bei 0 °C mit *para*-Toluolsulfonsäurechlorid in das mono-tosylierte Produkt überführt und dabei die Äquivalente der beiden Reaktanden und die Reaktionszeit variiert. Die erhaltenen Ausbeuten wurden verglichen (Tab. 2) und es konnte gezeigt werden, dass Äquivalente von 0.65 bis 1.0 für die Durchführung in abs. THF mit Pyridin oder Triethylamin als Hilfsbase reproduzierbare Ausbeuten des mono-tosylierten Produkts (TEG-Ts), fast unabhängig von der Reaktionszeit, lieferten. Äquivalente an TsCl größer 1.0 lieferten durchweg nur einen erhöhten Anteil an doppelt-tosyliertem Produkt (TEG-dTs). Bei 1.5 eingesetzten Äquivalenten an TsCl im Zusammenhang mit einer erhöhten Reaktionszeit konnte mittels MS und NMR sogar gezeigt werden, dass keine nachweisbare Menge an mono-tosyliertem Produkt erhalten wurde. Es wurde mittels NMR und MS bestätigt, dass ausschließlich das doppelt-tosylierte Produkt erhalten wurde.

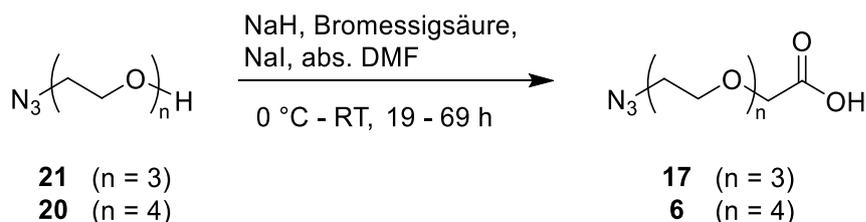
**Tab. 2:** Vergleich der erhaltenen Ausbeuten an TEG-Ts und TEG-dTs nach der Synthesvariante von Strulson *et al.*<sup>116</sup> und Beckmann *et al.*<sup>117</sup> in Abhängigkeit der eingesetzten Äquivalente an TsCl und Variation der Reaktionszeit (n.b. = nicht bestimmbarer Anteil des entsprechenden Produkts).

TsCl [eq] / Reaktionszeit [h]	Ausbeute TEG-Ts [%]	Ausbeute TEG-dTs [%]
0.65 / 24	26	n.b.
0.65 / 48	41	n.b.
0.65 / 72	31	n.b.
1.0 / 24	31	n.b.
1.0 / 48	30	n.b.
1.2 / 24	16	8
1.5 / 24	10	15
1.5 / 96	n.b.	50

In weiteren Optimierungsversuchen konnte gezeigt werden, dass 1.5 Äquivalente TsCl im Zusammenhang mit einer sehr kurzen Reaktionszeit bei der Umsetzung von beiden Ethylenglycolen mit KOH als Hilfsbase sehr gute Ausbeuten lieferte. Dies kann vor allem auf die kürzere Reaktionszeit und eine anschließende sofortige chromatographische Reinigung des Rohprodukts zurückgeführt werden. Mittels NMR konnte gezeigt werden, dass ein Überschuss an TsCl im Rohprodukt bei längerem Stehen, selbst unter ständiger Kühlung, zur schnellen Ausbildung von Nebenprodukten führt. Sowohl die Entstehung des doppelt-tosylierten Produkts als auch die Bildung von teilweise polymeren Nebenprodukten wurde dadurch begünstigt.

Abweichend von der Darstellungsvariante während der Masterarbeit wurde das tosylierte Tri-**23** bzw. Tetraethylenglycol **22** anschließend in abs. DMF bei 70 °C mit Natriumazid in einer klassischen S<sub>N</sub>2-Reaktion zum Azid-geschützten Tri-**21** bzw. Tetraethylenglycol **20** umgesetzt. Das Azid-geschützte Triethylenglycol **21** wurde in einer Ausbeute von 98 % und das Azid-geschützte Tetraethylenglycol **20** wurde in einer Ausbeute von 95 % erhalten.<sup>80</sup>

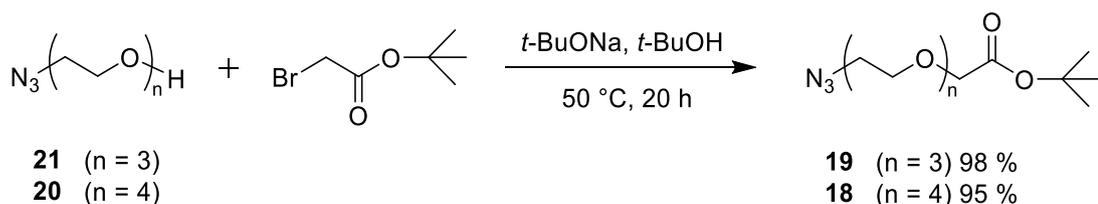




**Abb. 59:** Darstellung des Bausteins **17** bzw. **6** in einer Williamson-Ethersynthese durch Umsetzung der Azid-derivatisierten Vorstufen **21** bzw. **20** mit Natriumhydrid, Natriumiodid und Bromessigsäure in abs. DMF.

Die Williamson-Ethersynthese stellte sich als nicht sehr praktikable Variante zur Darstellung dieser Bausteine heraus. Die schlechten Ausbeuten, die Entstehung von schwer abtrennbaren Verunreinigungen, Nebenprodukten und eine damit verbundene erschwerten Aufreinigung, sowie die Abhängigkeit von hochreaktivem Natriumhydrid bei der Williamson-Ethersynthese erforderten die Entwicklung einer alternativen Synthesestrategie (vgl. Kapitel 6.4.2). Der ursprüngliche Syntheseweg zur Einführung der Essigsäure-Einheit wurde daher zur besseren Handhabung um einen Zwischenschritt erweitert. Anstatt der freien Bromessigsäure wurde in einer angepassten Synthese Bromessigsäure-*tert*-butylester verwendet.

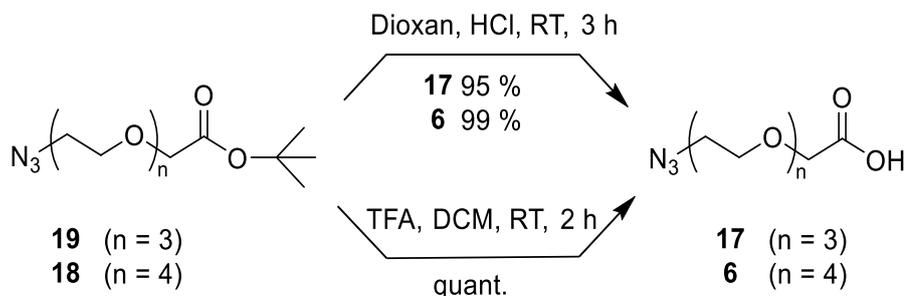
Abweichend von einer literaturbekannten Vorschrift<sup>119</sup> wurde Natrium-*tert*-butanolat aus Natrium und *tert*-Butanol frisch dargestellt. Anschließend wurde in *tert*-Butanol als Lösungsmittel der Bromessigsäure-*tert*-butylester bei 50 °C mit dem Azid-geschützten Glycolderivat zum geschützten Produkt **19** bzw. **18** umgesetzt. Das Produkt **19** wurde in einer Ausbeute von 98 % und das Produkt **18** wurde in einer Ausbeute von 95 % erhalten.



**Abb. 60:** Darstellung des beidseitig geschützten Tri- bzw. Tetraethylglycols durch Umsetzung des Azid-geschützten Edukts in *tert*-Butanol mit Bromessigsäure-*tert*-butylester bei 50 °C. Das geschützte Produkt des Triethylglycols **19** wurde in einer Ausbeute von 98 % und das geschützte Produkt des Tetraethylglycols **18** wurde in einer Ausbeute von 95 % erhalten.

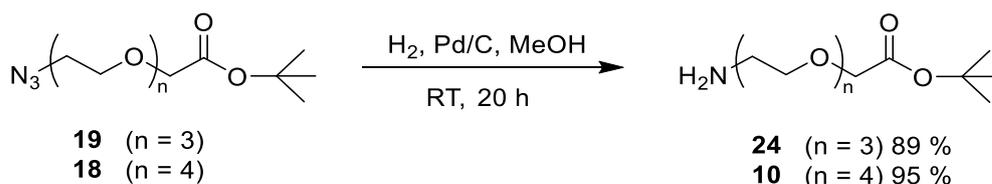
Zur selektiven Entfernung der *tert*-Butyl-Schutzgruppen wurden anschließend zwei klassische Varianten der Esterhydrolyse durchgeführt. Für die erste Variante wurde die Entschützung mit Trifluoressigsäure (TFA) in DCM bei Raumtemperatur durchgeführt. Dabei wurde nach 2 h Reaktionszeit jeweils das gewünschte Produkt, jedoch auch schlecht abtrennbare

Nebenprodukte, wie entsprechende TFA-Salze erhalten, wodurch die Ausbeute ohne weitere Aufarbeitung nicht bestimmt werden konnte. Eine deutlich bessere Reinheit ohne weitere Aufarbeitung lieferte die selektive Entschützung in Dioxan mit HCl bei Raumtemperatur. Dabei wurden nach 3 h Reaktionszeit das Produkt **17** in einer Ausbeute von 95 % und das Produkt **6** in einer Ausbeute von 99 % erhalten.



**Abb. 61:** Darstellung des selektiv entschützten Tri- **17** bzw. Tetraethylglycols **6** durch Umsetzung des Edukts zum einen in Dioxan bei RT mit HCl oder mit TFA in DCM bei RT.

Für eine mögliche Linker-Linker-Verknüpfung zur Darstellung von **9** bzw. **8** wurden zudem selektiv die Azid-geschützte Seite der Ethylenglycole durch eine klassische Hydrierung in die freien Amine überführt (Abb. 62). Dazu wurde jeweils die geschützte Verbindung des Tri- bzw. Tetraethylglycols für 20 h bei Raumdruck und Raumtemperatur unter  $H_2$ -Atmosphäre mit Pd/C als Katalysator in MeOH umgesetzt. Das Amin des Triethylglycols **24** wurde in einer Ausbeute von 89 % und das Amin des Tetraethylglycols **10** wurde in einer Ausbeute von 95 % erhalten.

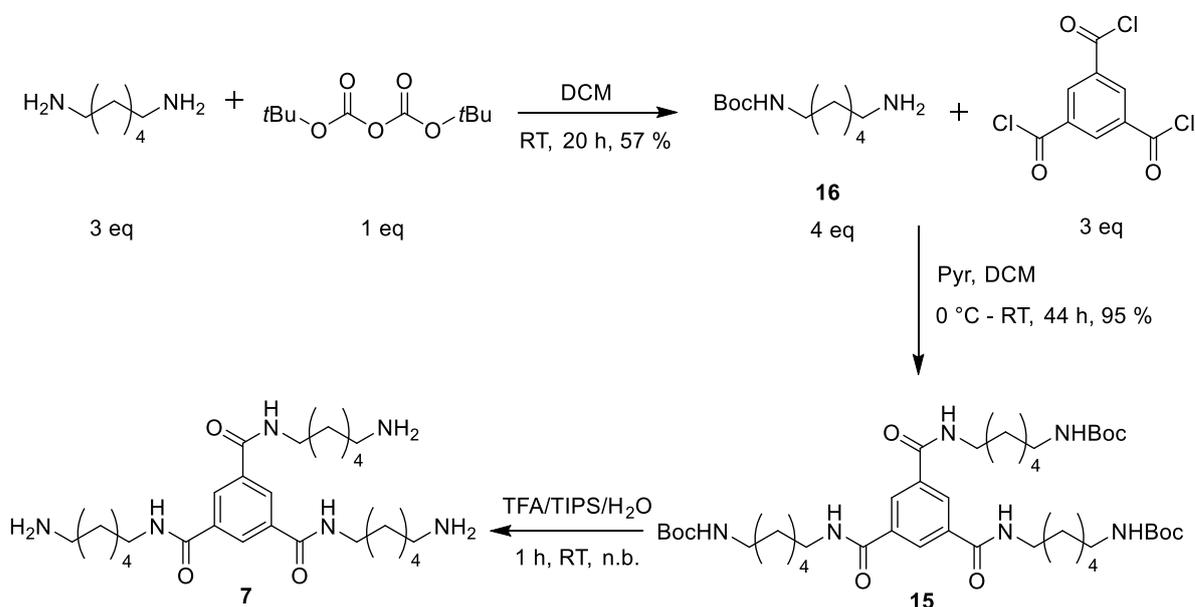


**Abb. 62:** Darstellung des Amins des Tri- **24** bzw. Tetraethylglycols **10** durch Umsetzung des Edukts unter  $H_2$ -Atmosphäre in MeOH mit Pd/C als Katalysator. Das Amin des Triethylglycols **17** wurde in einer Ausbeute von 89 % und das Amin des Tetraethylglycols **6** wurde in einer Ausbeute von 95 % erhalten.

6.5.2 Synthese des aromatischen *core*-Bausteins **7** und des Neuraminsäure-Bausteins **5**

Die nachfolgenden Synthesen des *core*- und des Neuraminsäure-Bausteins wurden, mit schlechteren Ausbeuten, bereits erfolgreich während der Masterarbeit durchgeführt.

Die Darstellung des aromatischen *core*-Bausteins **7** erfolgte in Anlehnung an literaturbekannten Vorschriften aus Trimesoylchlorid und Hexamethyldiamin.<sup>113-115</sup> Die Synthesen sind für Amine mit etwas kürzeren Kettenlängen in der Literatur beschrieben und konnten in vorrangegangenen Arbeiten bereits in ähnlich guten Ausbeuten durchgeführt werden.<sup>93, 123</sup>

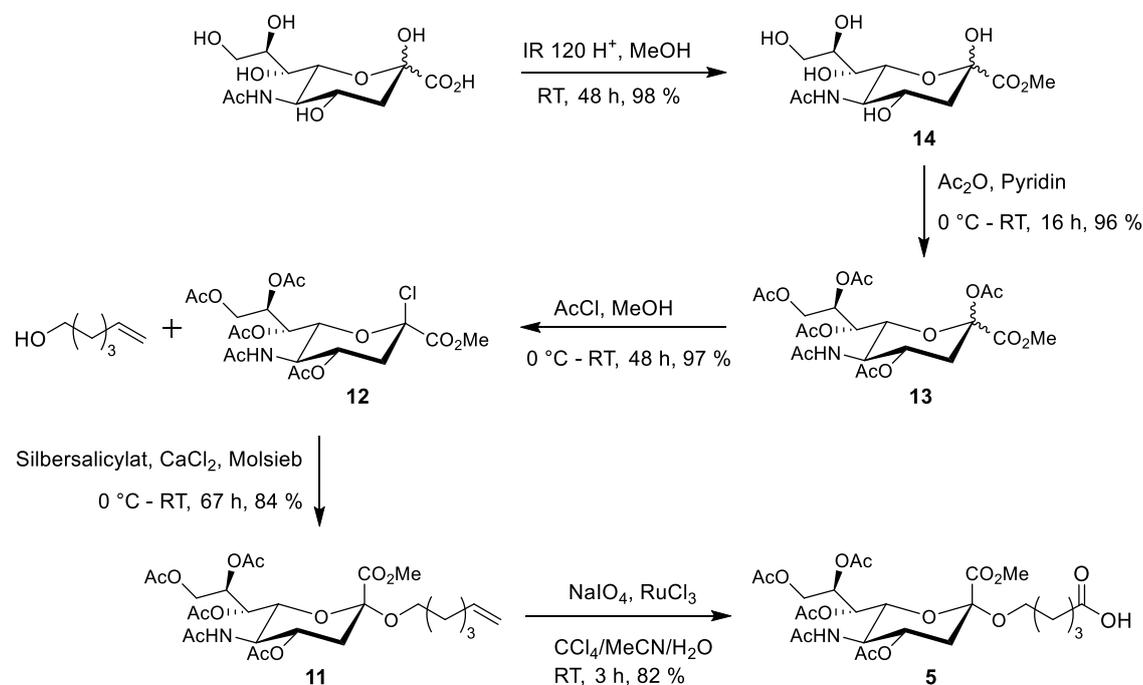


**Abb. 63:** Synthese des aromatischen *core*-Bausteins **7**. Die einfache Schützung des Diamins erfolgte kinetisch kontrolliert durch einen Überschuss des Diamins in Dichlormethan bei Raumtemperatur. Die anschließende Schotten-Baumann-Reaktion erfolgte in abs. Dichlormethan bei 0 °C und Pyridin als Hilfsbase. Der Boc-geschützte *core*-Baustein **15** wurde in einer Ausbeute von 95 % erhalten. Die Entschützung erfolgte mit TFA/TIPS/H<sub>2</sub>O (95:5:2) und lieferte nach vollständiger Trocknung das tris TFA-Salz des Triamins **7** welches für nachfolgende Reaktionen ohne weitere Aufarbeitung verwendet wurde.<sup>113-115</sup>

Zunächst erfolgte die einfache Schützung des Diamins. Diese verlief kinetisch kontrolliert durch einen Überschuss des Diamins in Dichlormethan bei Raumtemperatur und lieferte eine Ausbeute von 57%. Die anschließende Schotten-Baumann-Reaktion des geschützten Diamins **16** mit Trimesoylchlorid erfolgte in abs. Dichlormethan bei 0 °C und Pyridin als Hilfsbase. Der Boc-geschützte *core*-Baustein **15** wurde in einer Ausbeute von 95% erhalten. Die gewählte Boc-Schutzgruppe gewährleistete zum einen eine gute Lagerstabilität des

Produkts und zum anderen konnte sie schnell und quantitativ entfernt werden, da sowohl die notwendigen Reagenzien als auch die sich bildenden Spaltprodukte volatil sind und sich durch Evaporation quantitativ entfernen ließen. Die geschützte *core*-Struktur **15** konnte so bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Umsetzung gelagert werden. Die Entschützung der *core*-Struktur wurde jeweils direkt vor weiterer Verwendung durchgeführt. Diese erfolgte mit TFA/TIPS/ $\text{H}_2\text{O}$  (95:5:2) und lieferte nach vollständiger Trocknung das tris TFA-Salz des Triamins **7** welches für nachfolgende Reaktionen ohne weitere Aufarbeitung verwendet wurde.

Die Darstellung des Neuraminsäure-Bausteins **5** (Abb. 64) erfolgte in insgesamt sechs Stufen aus *N*-Acetylneuraminsäure. Für die Darstellung carboxyfunctionalisierter Neuraminsäureglycoside sind in der Literatur zahlreiche Vorschriften zu finden.<sup>123-126</sup>



**Abb. 64:** Darstellung des Neuraminsäure-Bausteins **5**. Ausgehend von *N*-Acetylneuraminsäure wurde nach literaturbekannter Vorschrift in drei Stufen der Glycosyldonor **12** erhalten.<sup>106-108</sup> Die Glycosylierung zu **11** erfolgte mit Silbersalicylat als Promotor und unter Verwendung des Glycosylakzeptor 5-Hexen-1-ol als Lösungsmittel und lieferte eine Ausbeute von 84%.<sup>110</sup> Die Oxidation der terminalen Doppelbindung wurde mit *in situ* erzeugtem Rutheniumtetroxid durchgeführt und lieferte den finalen Neuraminsäure-Baustein **5** in einer Ausbeute von 82%.<sup>111, 112</sup>

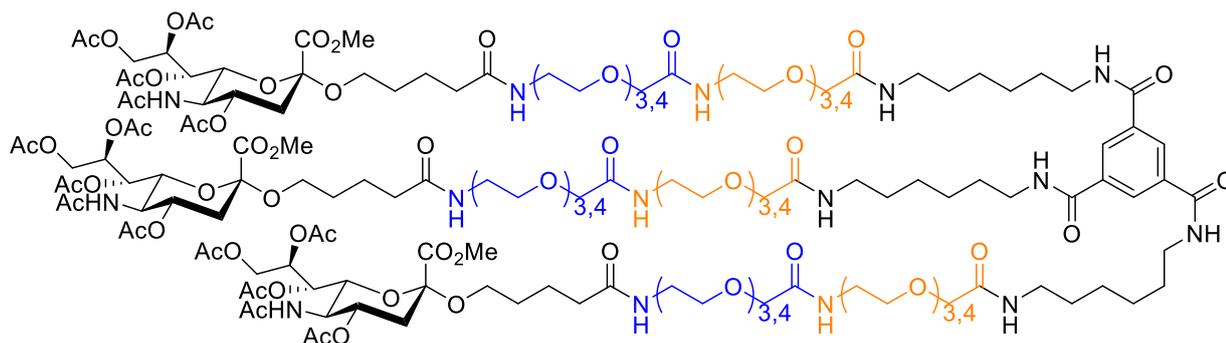
Die Darstellung des Neuraminsäurechlorids **12** als Glycosyldonor über die Schützung der Carboxylgruppe als Methyl ester **14** mit anschließender Acetylierung der Hydroxyl-Gruppen des Methyl esters zu **13** und Einführung des Chlorids am anomeren Zentrum zum  $\beta$ -Sialylchlorid **12** ist als Standardverfahren in der Neuraminsäurechemie bekannt und wurde

entsprechend, mit teilweise sehr guten Ausbeuten, durchgeführt.<sup>106-108</sup> Das  $\beta$ -Sialylchlorid als Glycosyldonor wurde anschließend in einer Königs-Knorr-artigen Reaktion mit frisch hergestelltem Silbersalicylat<sup>109</sup> als Promotor und unter der Verwendung des Glycosylakzeptors 5-Hexen-1-ol als Lösungsmittel in das  $\alpha$ -Glycosid überführt. Das eingesetzte Silbersalicylat und die Verwendung des Glycosylakzeptors als Lösungsmittel wirkten sich dabei positiv auf die Kinetik und  $\alpha$ -Selektivität der Reaktion aus. Das  $\alpha$ -Glycosylierungsprodukt **11** wurde in einer guten Ausbeute von 84 % erhalten.<sup>110</sup> Die anschließende Oxidation der terminalen Doppelbindung und damit Verbundene Verkürzung des Aglycons fand in einer Lemieux von Rudloff Oxidation mit *in situ* hergestelltem Rutheniumtetraoxid unter Freisetzung von Formaldehyd statt. Das Oxidationsprodukt **5** wurde in einer Ausbeute von 82 % erhalten.<sup>111, 112</sup>

### 6.5.3 Kupplungsreaktionen

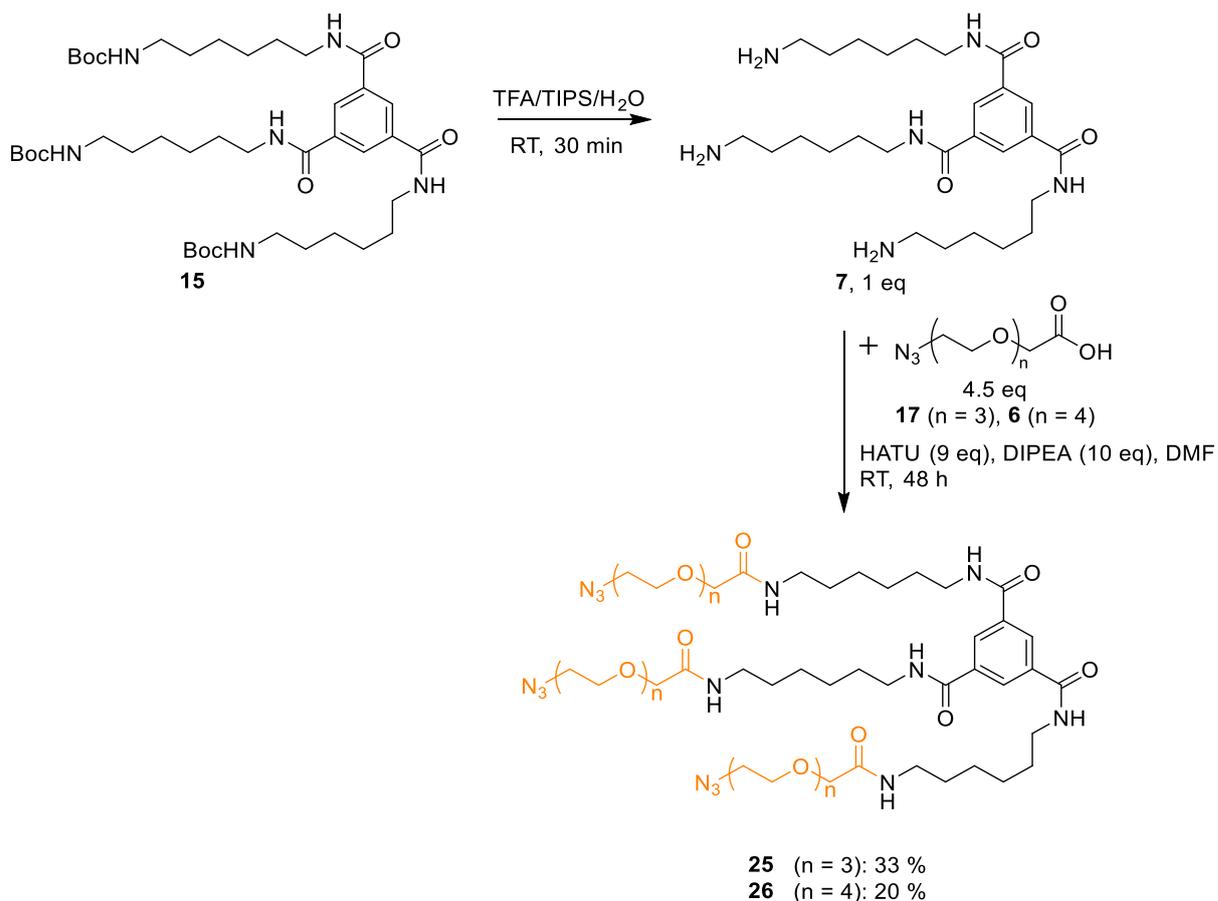
Es wurden unterschiedliche Kupplungsvariationen der einzelnen Fragmente durchgeführt. Dabei sollte vor allem eine gute Handhabung der durchzuführenden Synthesen, mit guten Ausbeuten und wenig Nebenprodukten, sowie eine möglichst einfache Aufreinigung im Fokus stehen. Außerdem wurden bei fast allen Synthesen, die ein Linkerfragment beinhalten, sowohl das Tetraethylenglycol-Derivat als auch das etwas kürzere Triethylenglycol-Derivat verwendet.

Zur Darstellung des geschützten Liganden **1a** (Abb. 65) wurden zwei verschiedene Herangehensweisen getestet. Für die erste Variante sollte der Linker-Teil des Moleküls stufenweise linear aufgebaut werden. Dazu sollte als erstes ein geschütztes Linkerfragment **17** bzw. **6** (orange) an die *core*-Struktur zum Baustein **25** bzw. **26** gekuppelt werden (Abb. 66). Nach Entschützung sollte dann zunächst ein zweites Linkerfragment (blau) und dann der Zuckerbaustein **5** gekuppelt werden.



**Abb. 65:** Der Linker-Teil des Liganden **1a** wird stufenweise linear aufgebaut. Zunächst wird ein Linkerfragment (orange) an die *core*-Struktur gekuppelt, bevor dann ein zweites Linkerfragment (blau) und anschließend der Zuckerbaustein gekuppelt wird.

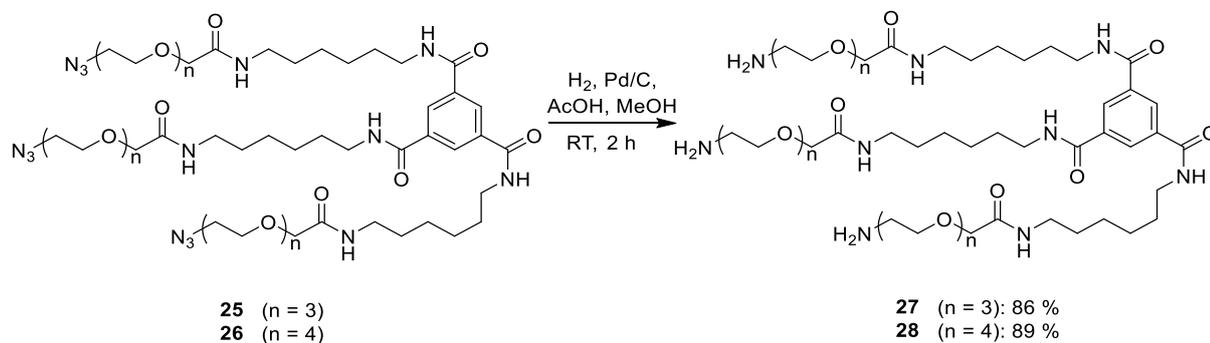
Zunächst wurde der geschützte *core*-Baustein **15** in TFA/TIPS/H<sub>2</sub>O (95:5:2) für 30 min bei RT zum Baustein **7** umgesetzt. Dieser wurde ohne weitere Aufarbeitung direkt für die nächste Synthese verwendet. Unter Kupplungsbedingungen mit HATU als Aktivator und der Hünig-Base DIPEA wurde dann der *core*-Bausteine **7** mit dem Linkerbaustein **17** bzw. **6** in abs. DMF bei RT umgesetzt. Nach 48 h wurde der Baustein **25** bzw. **26** in einer Ausbeute von 33 % bzw. 20 % erhalten (Abb. 66).



**Abb. 66:** Darstellung von **25** bzw. **26**. Zunächst wurde die geschützte *core*-Struktur **15** in TFA/TIPS/H<sub>2</sub>O (95:5:2) zum freien *core*-Baustein **7** umgesetzt, welcher ohne weitere Aufreinigung für die nächste Synthese eingesetzt wurde. Das Linkerfragment **17** bzw. **6** wurde zusammen mit dem Aktivator HATU und DIPEA in DMF gelöst und zu dem zuvor entschützten Triamin **7** gegeben. Dabei wurden 4.5 Äquivalente Linkerfragment pro trimerer *core*-Struktur und entsprechend pro Äquivalent Linker 2 Äquivalente Aktivator verwendet. DIPEA wurde im Überschuss eingesetzt. Die Kupplung erfolgte über einem Zeitraum von 48 h bei Raumtemperatur.

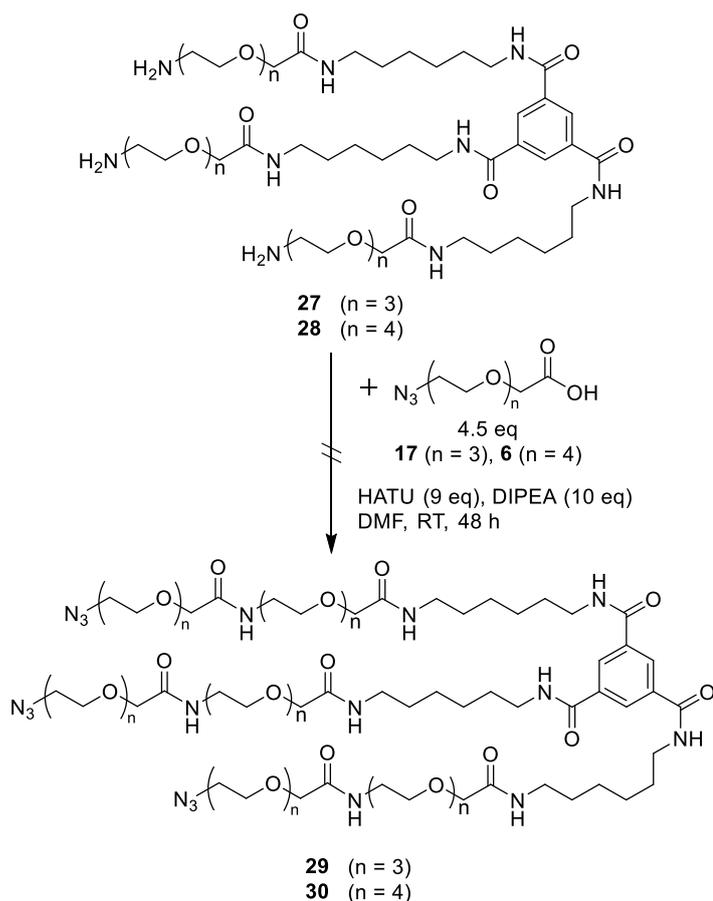
Die erhaltenen Ausbeuten beziehen sich auf die eingesetzte Menge an **7**. Aufgrund experimenteller Erkenntnisse<sup>93</sup> konnte **7** ohne weitere Aufreinigung eingesetzt werden. Nach Entfernung des Lösungsmittels wurde per Dünnschichtchromatographie (DC) überprüft, ob freie Aminogruppen vorhanden waren. Es wurden sehr aufwendige Versuche der Aufreinigung der Rohprodukte von **25** bzw. **26** unternommen, um vor allem die entstandenen DIPEA- und weitere undefinierte Nebenprodukte zu entfernen. Es wurde sowohl per Hand mittels NP- und RP-Säulenchromatographie mit verschiedenen Lösungsmittelgemischen, sowie GPC und HPLC gereinigt. Keine der verwendeten Methoden lieferte vollständig zufriedenstellende Ergebnisse, daher wurden geringe Spuren an DIPEA-Salzen für die nachfolgenden Synthesen geduldet.

Die anschließende Hydrierung der terminalen Azide fand unter H<sub>2</sub>-Atmosphäre in MeOH mit Pd/C als Katalysator und einem geringen Zusatz an Essigsäure statt. Nach 2 h bei RT wurde das Produktamin **27** bzw. **28** in einer Ausbeute von 86 % bzw. 89 % erhalten (Abb. 67).



**Abb. 67:** Darstellung von **27** bzw. **28**. Die Hydrierung der terminalen Azide fand unter H<sub>2</sub>-Atmosphäre in MeOH mit Pd/C als Katalysator und einem geringen Zusatz an Essigsäure statt. Nach 2 h bei RT wurde das Produktamin **27** bzw. **28** in einer Ausbeute von 86 % bzw. 89 % erhalten.

Im Anschluss sollte an den entstandenen Baustein **27** ein weiteres Linkerfragment **17** bzw. an den Baustein **28** ein weiteres Linkerfragment **6** gekuppelt werden, um die volle Länge der Linkerstruktur zu erhalten. Unter Kupplungsbedingungen mit HATU als Aktivator und der Hünig-Base DIPEA in abs. DMF bei RT sollte ein weiterer Linkerbaustein **17** bzw. **6** gekuppelt werden. Die Umsetzung wurde chromatographisch verfolgt. Nach der Aufreinigung und anschließender MS- sowie NMR-Auswertung wurde jedoch ersichtlich, dass auch nach diversen Syntheseversuchen eine weitere amidische Kupplung nicht die gewünschten Produkte **29** bzw. **30** lieferte (Abb. 68).

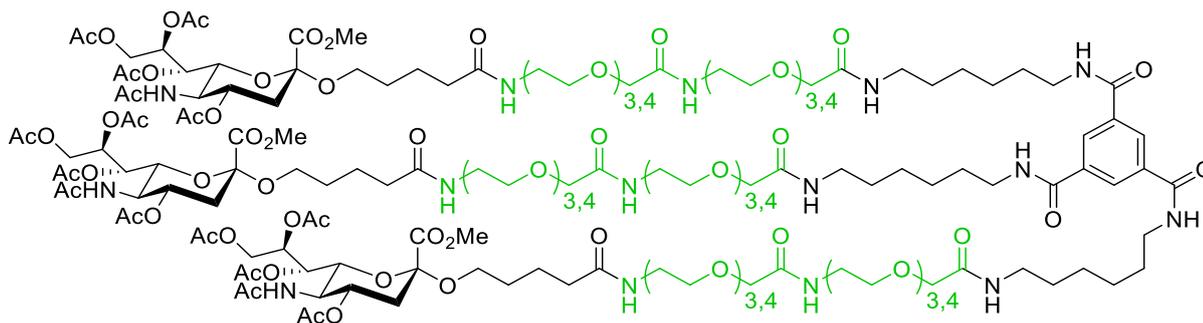


**Abb. 68:** Darstellung von **29** bzw. **30**. Nach diversen Syntheseversuchen konnte kein Produkt isoliert werden.

Es konnte mittels NMR und MS gezeigt werden, dass zum Teil Strukturen entstanden waren, die auf eine unvollständige Kupplung zurückzuführen waren. Jedoch war es nicht möglich im Nachhinein die fehlenden Fragmente zu koppeln. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die unzureichende Reinheit der Edukte wahrscheinlich zu dieser Problematik beitrug. Die Reduktion der Azid-Gruppen des Edukts war teilweise unvollständig und führte zu nicht klar definierbaren Strukturen. Da aber nur sehr geringe strukturelle oder gewichtsspezifische Unterschiede der sehr komplexen Moleküle vorlagen, ließen sich die unerwünschten Strukturen bei der Synthese zu **27** bzw. **28** nicht vollständig entfernen, was sich störend auf die nachfolgenden Synthesen auswirkte und sogar dazu führte, dass kein Produkt isoliert werden konnte. Bei dieser Darstellungsvariante ist der ursprüngliche konvergente Synthesansatz, durch die vorangestellte Synthese der Bausteine **7**, **17/6** und **5**, vorhanden. Jedoch zeigten sich bei der linearen Synthesestrategie zum Aufbau der Linker-Struktur erhebliche Schwierigkeiten. Die Entstehung von Nebenprodukten machte eine qualitative

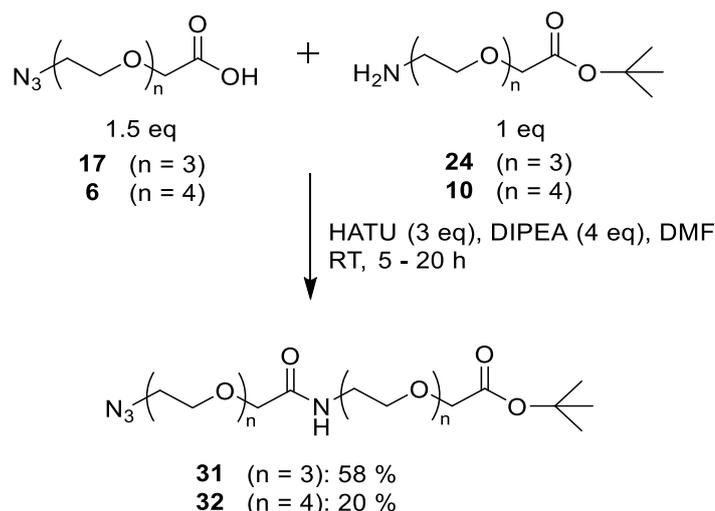
Aufreinigung unmöglich. Das Molekül wies zu diesem Zeitpunkt bereits eine zu hohe Komplexität auf.

Als Alternative zum linearen Aufbau des Linkers bestand die Möglichkeit vor der Kupplung an die *core*-Struktur zwei unterschiedlich geschützte Linkerfragmente **6** bzw. **17** und **10** bzw. **24** zur fertigen Linker-Struktur (grün) zu koppeln (Abb. 69) und erst anschließend weitere Bausteine zu verknüpfen.



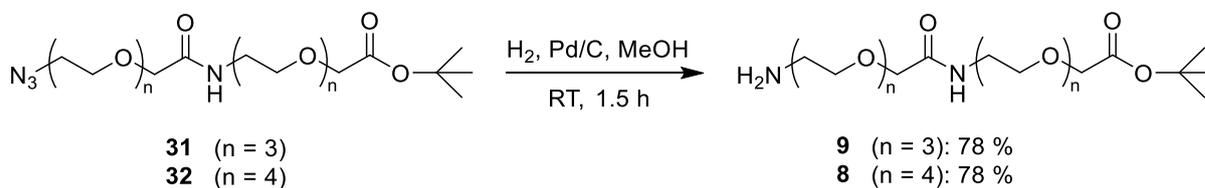
**Abb. 69:** Der Linker-Teil (grün) des Liganden **1a** wird vor der Kupplung mit den weiteren Bausteinen fertiggestellt.

Die Linkerfragmente **17** und **24** bzw. **6** und **10** wurden in einer klassischen Peptidkupplungsreaktion mit HATU als Aktivator und der Hünig-Base Diisopropylethylamin (DIPEA) in abs. DMF bei RT zum geschützten Linkerbaustein **31** bzw. **32** umgesetzt (Abb. 70). Aufgrund der Entstehung von Nebenprodukten und des geringen prozentualen Anteils an chromatographisch gut trennbarer funktioneller Gruppen war die Aufreinigung der Verbindungen problematisch. Es wurden teilweise nur sehr geringe Ausbeute erhalten. Nach mehreren Synthesen konnte festgestellt werden, dass zudem eine längere Reaktionszeit die Ausbildung von Nebenprodukten begünstigte. Für den Baustein **32** wurden zunächst deutlich längere Reaktionszeiten als für den Baustein **31** gewählt. Auch die Länge der Fragmente hatte scheinbar einen Einfluss auf die Ausbeuten. Die Synthesen für die kürzeren Fragmente lieferten in den meisten Versuchen etwas bessere Ausbeuten. Für den Baustein aus den Triethylglycolderivaten wurde eine maximale Ausbeute von 58 % und für den aus den Tetraethylglycolderivaten wurde eine maximale Ausbeute von 20 % erhalten.



**Abb. 70:** Darstellung von **31** bzw. **32** durch eine Kupplungsreaktion mit HATU und DIPEA bei RT in abs. DMF. Die geschützten Linkerbausteine **31** bzw. **32** wurden in einer Ausbeute von 58 % bzw. 20 % erhalten.

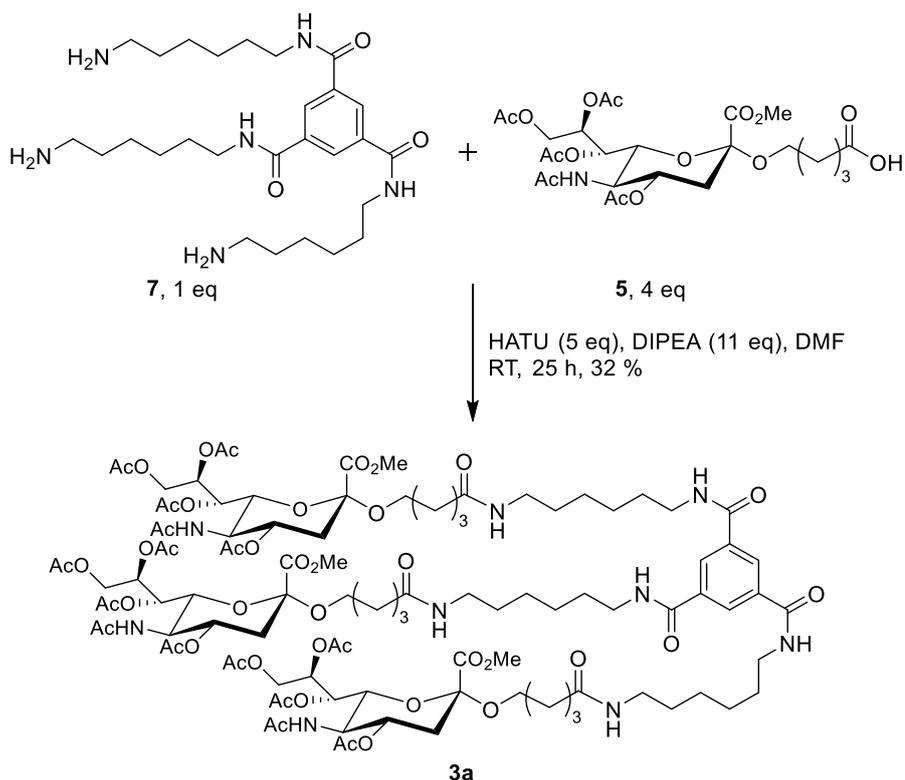
Die anschließende Hydrierung fand unter  $\text{H}_2$ -Atmosphäre in MeOH mit Pd/C als Katalysator statt. Die Produktamine **9** bzw. **8** wurden beide in Ausbeuten von bis zu 78 % erhalten. Die Ausbeuteverluste bei dieser quantitativ verlaufenden Reaktion sind in diesem Fall wie bereits beschrieben präparativer Natur und auf die schwierige, unzureichende chromatographische Reinigung der Edukte zurückzuführen.



**Abb. 71:** Darstellung der Produktamine **9** bzw. **8** durch Hydrierung der Azidgruppen unter  $\text{H}_2$ -Atmosphäre in MeOH mit Pd/C als Katalysator. Die nicht quantitative Ausbeute von 78 % ist auf die schwierige, unzureichende Reinigung der Edukte zurückzuführen.

Aufgrund der unzureichenden Ausbeuten, der Entstehung von Nebenprodukten und schwierigen Aufreinigungen jeder Synthesevariante von Ligand **1** bzw. **1a**, wurde von einer finalen Synthese des Liganden abgesehen. Bereits unter Punkt 6.2.3 wurden die alternativen Liganden **3** und **4**, sowie unter 6.4.1 ihre geschützten Varianten **3a** und **4a** eingeführt.

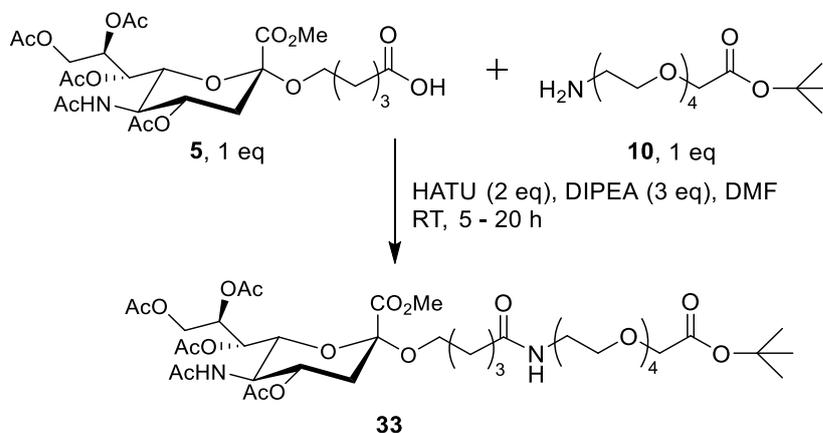
Für die Darstellung des Liganden **3a** wurde zunächst der *core*-Baustein **15** in TFA/TIPS/H<sub>2</sub>O (95:5:2) für 30 min bei RT zum Baustein **7** umgesetzt (Abb. 66). Dieser wurde ohne weitere Aufarbeitung direkt für die nächste Synthese verwendet. Der Ligand wurde anschließend in einer klassischen Peptidkupplungsreaktion mit HATU als Aktivator und der Hünig-Base DIPEA in abs. DMF bei RT aus 1 Äquivalent der freien *core*-Struktur **7** und 4 Äquivalenten des Zuckerbausteins **5** erhalten. Nach aufwendiger Reinigung (vgl. 7.6.29) wurde der Ligand in einer Ausbeute von 32 % erhalten (Abb. 72).



**Abb. 72:** Darstellung des Liganden **3a** durch eine Kupplungsreaktion des *in situ* dargestellten freien *core*-Bausteins **7** mit dem Zuckerbaustein **5** in Gegenwart von HATU und DIPEA bei RT in abs. DMF. Das Produkt wurde in einer Ausbeute von 32 % erhalten.

Anders als für den Liganden **3a** gab es zur Darstellung des multivalenten Liganden **4a** zwei mögliche Herangehensweisen. Zum einen bestand die Möglichkeit im ersten Schritt die *core*-Struktur **7** an das Linkerfragment **6** zum Baustein **26** zu koppeln (Abb. 66) und anschließend den Zuckerbaustein **5** zu verknüpfen (Abb. 74). Und zum anderen bestand die Möglichkeit im ersten Schritt den Zuckerbaustein **5** an das Linkerfragment **10** zum Baustein **33** zu koppeln (Abb. 73) und anschließend die *core*-Struktur **7** zu verknüpfen.

Für die Variante, bei der zunächst der Zuckerbaustein mit dem Linkerbaustein verknüpft wird, wurde in einer Kupplungsreaktion mit HATU als Aktivator und der Hünig-Base DIPEA aus dem Linkerfragment **10** und dem Zuckerbaustein **5** im Verhältnis 1:1 der Baustein **33** dargestellt. Dieser wurde in einer Ausbeute von 56 % erhalten.

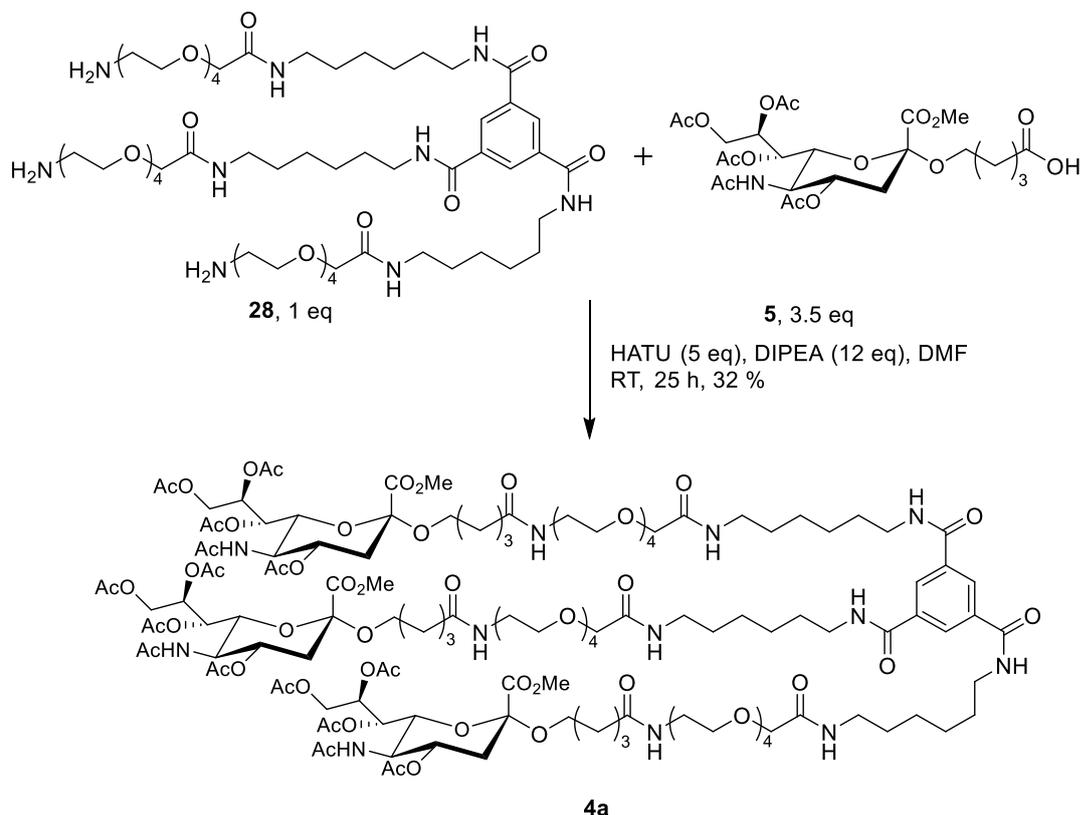


**Abb. 73:** Darstellung von **33** durch eine Kupplungsreaktion der Bausteine **10** und **5** mit HATU und DIPEA bei RT in abs. DMF. Der Baustein wurde in einer Ausbeute von 56 % erhalten.

Wie bereits unter Punkt 6.4.1 beschrieben, stellt die anschließende selektive Entschützung der *tert*-Butyl-Schutzgruppe in Anwesenheit des Methylesters, um die weitere Kupplung mit dem *core*-Baustein zu ermöglichen, eine besondere Herausforderung dar, weshalb diese Variante im Weiteren nicht genutzt wurde und auf einen anderen Syntheseweg zur Darstellung von **4a** zurückgegriffen wurde. Jedoch konnte durch die Darstellung von Verbindung **33** gezeigt werden, dass die Synthese eines carboxyfunctionalisierten Neuraminsäureglycosids für die Kupplung an spezielle Anker-molekül auf diesem Weg möglich ist.

Für die andere Variante zur Darstellung von **4a** wurde ausgehend von der *core*-Struktur im ersten Schritt, ähnlich wie bei der Darstellung von **3a**, zunächst der geschützte *core*-Baustein **15** in TFA/TIPS/H<sub>2</sub>O (95:5:2) für 30 min bei RT zum freien Baustein **7** umgesetzt (Abb. 66). Dieser wurde ohne weitere Aufarbeitung direkt für die nächste Synthese verwendet. Unter Kupplungsbedingungen mit 9 Äquivalenten HATU und 10 Äquivalenten DIPEA wurde dann 1 Äquivalent des *core*-Bausteins **7** mit 4 Äquivalenten des Linkerbausteines **6** in abs. DMF bei RT zum Baustein **26** umgesetzt (Abb. 66). Dieser wurde in einer Ausbeute von 20 % bezogen auf den eingesetzten freien *core*-Baustein erhalten. Die anschließende Hydrierung der terminalen Azide fand unter H<sub>2</sub>-Atmosphäre in MeOH mit Pd/C

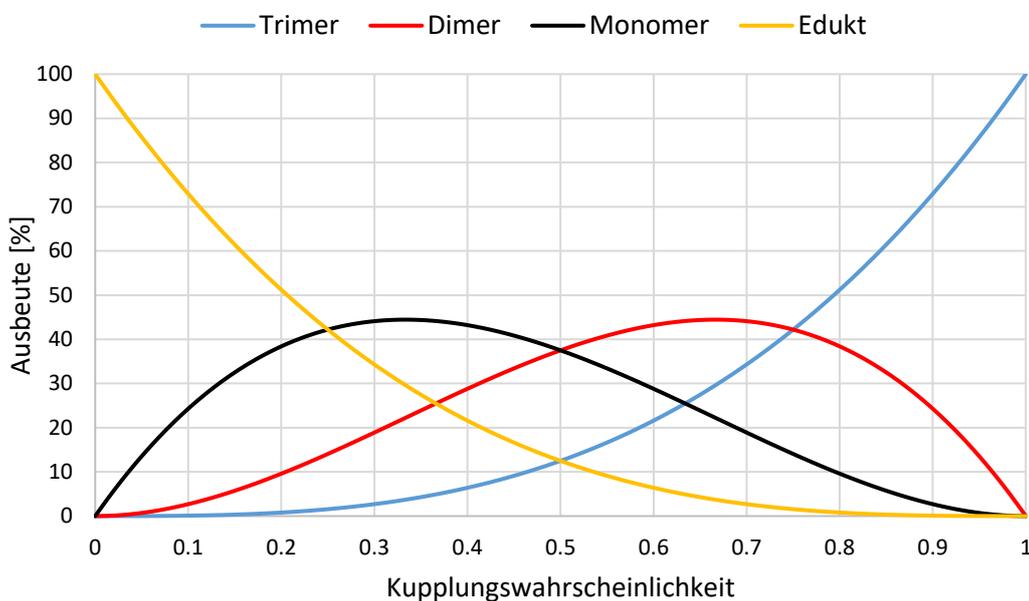
als Katalysator und einem geringen Zusatz an Essigsäure statt. Nach 2 h bei RT wurde das Produktamin **28** in einer Ausbeute von 89 % erhalten (Abb. 67). In einer weiteren Kupplungsreaktion wurde 1 Äquivalent **28** mit 3.5 Äquivalenten des Zuckerbausteins **5** zum multivalenten Liganden **4a** umgesetzt. Dieser wurde in einer Ausbeute von 32 % bezogen auf die eingesetzte Menge an **28** erhalten (Abb. 74).



**Abb. 74:** Darstellung des Liganden **4a** durch eine Kupplungsreaktion des *in situ* dargestellten freien *core*-Bausteins **28** mit dem Zuckerbaustein **5** in Gegenwart von HATU und DIPEA bei RT in abs. DMF. Der multivalente Ligand **4a** wurde in einer Ausbeute von 32 % erhalten.

Die vollständige Darstellung der Liganden **3a** und **4a**, sowie die Darstellung wichtiger Vorstufen von Ligand **1a** zeigt, dass Synthesen, die einen linearen Aufbau von Strukturmotiven verfolgen besondere Schwierigkeiten, vor allem mit wachsender Größe der Verbindungen mit sich bringen. Eine Hauptproblematik bei der Darstellung trimerer Kupplungsprodukte ist der Kupplungserfolg pro Arm bzw. Einheit. Eine Gesamtausbeute von 32 % deutet aufgrund der trimeren Symmetrie beispielsweise darauf hin, dass jede einzelne Kupplung zu ca. 70 % erfolgreich war. Unter der Annahme einer konstanten Wahrscheinlichkeit von 0.7 pro Einheit ergibt sich für die Bildung des trimeren Produkts lediglich eine Ausbeute von  $(0.7)^3 = 0.343$  ( $\approx 34\%$ ) (Abb. 75). Die monomeren Kupplungsprodukte werden für die angenommene

Wahrscheinlichkeit zu 19 % und die dimeren Kupplungsprodukte zu 44 % erhalten, 3 % des Eduktes verbleiben unverändert. Aus Abb. 75 wird zudem ersichtlich, dass erst ab einer Kupplungswahrscheinlichkeit von 0.75 mehrheitlich das trimere Produkte entsteht.



**Abb. 75:** Auftragung der Ausbeute des monomeren (schwarz), dimeren (rot) und trimeren (blau) Produktes, sowie verbleibendes Edukt (gelb) gegen die Kupplungswahrscheinlichkeit.

Eine daraus resultierende Problematik ist die schwierige Abtrennung der entstandenen komplexen Nebenprodukte aufgrund ihrer zu geringen Differenzierbarkeit gegenüber dem gewünschten Produkt. Die Auswertung der NMR-spektroskopischen und massenspektrometrischen Daten zeigte zudem, dass eine nachträgliche Kupplung von nicht vollständig umgesetzten Kupplungsprodukten mit anschließender Aufreinigung in keinem Versuch das gewünschte trimere Produkt lieferte. Zusätzlich zeigten alle Synthesevarianten mit Oligoethylenglycolen verschiedene Aufreinigungsprobleme, wobei vor allem der prozentuale Anteil chromatographisch trennbarer funktioneller Gruppen ausschlaggebend für eine erfolgreiche Aufreinigung und somit für nachfolgend erfolgreiche Synthesen war.

Anhand der erfolgreich durchgeführten Synthesen konnte jedoch auch gezeigt werden, dass die Darstellung hochkomplexer trimerer Verbindungen, aus  $C_3$ -symmetrischen Grundkörpern, flexiblen Oligoethylenglycollinkern und modifizierten Zuckerbausteinen, unter den gezeigten Bedingungen möglich ist.



## 7 Experimenteller Teil

### 7.1 Verwendete Geräte

Gerät	Gerätetyp	Hersteller
DC-Alufolie	ALUGRAM® Xtra SIL G/UV <sub>254</sub>	MACHEREY-NAGEL
ESI-TOF	6224 ESI-TOF	Agilent Technologies
Gefriertrocknungsanlage	Alpha 1-2, Alpha 1-4	Martin Christ
Heizrührgerät	RCT basic	IKA® Werke
NanoDrop	ND-1000	Thermo Scientific
NMR-Spektrometer 400 MHz	AMX 400	Bruker Biospin GmbH
NMR 500 MHz	DRX 500	Bruker Biospin GmbH
NMR 600 MHz	Avance III HD 600	Bruker Biospin GmbH
NMR 700 MHz	Avance I 700	Bruker Biospin GmbH
Polarimeter	P8000	Krüss Optronic
Reinstwasseranlage	Ultra Clear UV 18.2 MΩ	SGwater GmbH
RP-HPLC Säule	Nucleodur C <sub>18</sub> Pyramid, 300 Å	Macherey&Nagel
Rotationsverdampfer	PC 3003	vaccubrand
	MZ 2C	vaccubrand
Schmelzpunktmessgerät	IA 9100	Electrothermal
SPR	T100 Biacore®	GE Healthcare
SPR-Sensorchip	CM5	GE Healthcare
Ultraschallbad	Sonorex, RK106	BANDELIN electronic
UV Lampe	Universal UV Lampe TL-900	CAMAG®
Waage	Zweibereichswaage AE240	Mettler
	Analysenwaage ABS	Kern
Zentrifuge	5417 R	Eppendorf AG

## 7.2 Verwendete Software

Software	Hersteller
Biacore T100 Control (Vers. 1.1.1)	GE Healthcare
Biacore T100 Evaluation (Vers. 1.1.1 / 3.0.2)	GE Healthcare
ChemDraw Pro 15.1	CambridgeSoft
Maestro (Vers. 11.1.011)	Schrödinger
MestReNova 10.0	Mestrelab Research S.L.
OriginPro 2018 / 2019 (Vers. 9.5 / 9.6)	OriginLab
Topspin 3.2	Bruker BioSpin GmbH
Excel 2016	Microsoft

## 7.3 Verwendete Chemikalien

Hersteller	Chemikalien
ABCR	Silbernitrat, TIPS
Acros	Amberlite IR 120 H <sup>+</sup>
Azelis	Petrolether (techn.)
Biesterfeld	Toluol (techn.)
Chempur	Rutheniumchlorid
Chemsolute	Natriumhydroxid
Euriso-Top	Chloroform- <i>d</i> , Methanol- <i>d</i> <sub>4</sub>
Fluka	Methanol (abs.), Pyridin, Bromessigsäure- <i>tert</i> -butylester, DCM (abs.), DMSO (abs.), Ethanolamin Hydrochlorid, MeOH (abs.), Pd/C
Grüssing	Essigsäureanhydrid, Salzsäure 37%, Triethylamin, 2-Propanol, Ammoniak, Natriumsulfat, Natriumchlorid, Triethylenglycol
Honeywell	Calciumchlorid, Ammoniumchlorid

---

<b>Hersteller</b>	<b>Chemikalien</b>
Iris Biotech	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure, DIPEA, Dimethylformamid, HATU, Triflouressigsäure
Kraemer&Martin	Aceton (techn.), Chloroform (techn.), Dichlormethan (techn.), Diethylether (techn.), Ethylacetat (techn.), Ethanol (techn.), Methanol (techn.)
Lancaster	Bromessigsäure
Merck	Acetylchlorid, Kieselgel 60, Molekularsieb 4 Å, Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat, Hexamethyldiamin, 5-Hexen-1-ol, Tetrachlormethan, Natriumazid, Salicylsäure, Natriumhydrid, Natriumperodat, Tetraethylenglycol, Schwefelsäure 97 %, <i>tert</i> - Butanol
Riedel de Haen	Natriumhydrogencarbonat
Sigma-Aldrich	Tetrahydrofuran (abs.), Trimesoylchlorid, <i>p</i> -Toluolsulfonsäurechlorid
VWR	<i>n</i> -Hexan, Essigsäure, Acetonitril

---

## 7.4 Molecular modeling

Der folgende Abschnitt erläutert alle durchgeführten Arbeitsschritte beim *molecular modeling* mittels Maestro 2017-1 in der Version 11.1.011 von Schrödinger und den entsprechenden Programmen und Softwareapplikationen „Prime“, „Glide“, „MacroModel“, „LigPrep“ und „Desmond“. Alle nicht aufgeführten Parameter entsprachen den Standardeinstellungen der Konfigurationsdialoge. Als Grundlage der virtuellen Studien dienten die Kristallstrukturen des monomeren Hämagglutinins des H5N1-Virus (PDB-ID: 1JSO<sup>90</sup>) mit seinem natürlichen Liganden und die Kristallstruktur des trimeren Hämagglutinins H5 (PDB-ID: 2IBX<sup>91</sup>) ohne natürliche Liganden aus der *Brookhaven-Proteindatenbank* (PDB).

### 7.4.1 Vorbereitung der Kristallstrukturen - Protein Preparation Wizard (PPW)

Mit dem Tool „Protein Preparation Wizard“ (PPW) wurden die Proteinstrukturen 1JSO und 2IBX bearbeitet und optimiert. Dazu wurden die Strukturen aus der PDB-Datenbank zunächst importiert und preprozessiert. Die Preprozessierungsschritte waren für beide Strukturen:

#### Preprocess the Workspace structure

- ✓ Assign bond orders
- ✓ Add hydrogens
- ✓ Create zero-order bonds to metals
- ✓ Create disulfide bonds
- ✓ Fill in missing side chains using Prime
- ✓ Delete waters beyond 5 Å from het groups
- ✓ Use CCD database
- ✓ Remove original hydrogens

Bei der trimeren Proteinstruktur musste das Programm keine Seitenketten ergänzen. Nach der Preprozessierung wurden zusätzliche Verfeinerungsschritte durchgeführt. Die Einstellungen bei der Optimierung der H-Bindungen waren:

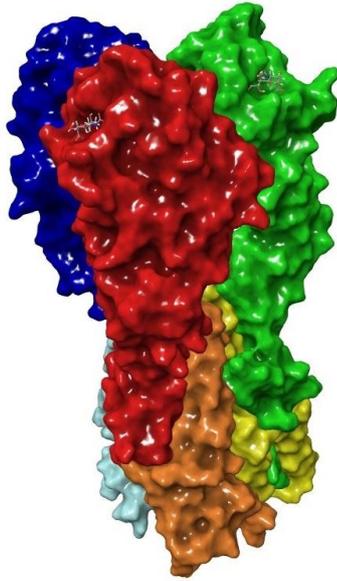
#### H-bond assignment

- ✓ Sample water orientations
- ✓ Use PROPKA; pH: 7

Nach diesen Optimierungsschritten wurden alle Wassermoleküle mit weniger als einer H-Bindungen zu „nicht-Wassermolekülen“ aus der Proteinstruktur entfernt. Es verblieben 11 Wassermoleküle, wobei 2 in der Rezeptorbindungstasche lokalisiert waren. Um Spannungen in der Struktur energetisch abzubauen, wurden für die anschließende Minimierung zusätzlich alle „Schweratome“ zu einem RMSD von 0.30 Å konvergiert. Als Standardkraftfeld wurde dabei OPLS3 gewählt. Das Ergebnis waren eine optimierte monomere Proteinstruktur mit einem nativen Liganden in der Rezeptorbindungstasche und eine trimere Proteinstruktur des Hämagglutinins ohne native Liganden.

#### 7.4.2 Modelling einer trimeren Hämagglutininstruktur mittels Protein Structure Alignment (PSA)

Die trimere Proteinstruktur des Hämagglutinins H5 liegt in der PDB nicht mit den natürlichen Liganden als Cokristall vor. Es wurde daher, um in der trimeren Struktur des Hämagglutinins ebenfalls die Position der Liganden darstellen zu können, drei monomere Strukturen des H5 auf eine trimere Struktur des H5 gefittet. Dazu wurde das Tool „Protein Structure Alignment“ verwendet. Die Untereinheiten HA1 und HA2 der trimeren Proteinstruktur wurde dazu mit den Buchstaben A-F bezeichnet, wobei immer zwei zusammengehörige Untereinheiten benachbarte Buchstaben erhielten. Die Segmente der monomeren Strukturen erhielten die Buchstabenzuordnung von U-Z, wobei auch hier immer zwei zusammengehörige Untereinheiten benachbarte Buchstaben erhielten. Zunächst wurden dann die Segmente A und B aus der trimeren Struktur ausgewählt und durch die Segmente Y und Z eines Monomers ersetzt. Dafür wurde nach erfolgreichem „align“-Befehl das trimere Hämagglutinin dupliziert und die Domänen A und B gelöscht. Der Alignment Score betrug dabei 0.009 und der RMSD-Wert 0.479 Å. Anschließend wurden in gleicher Weise die Trimersegmente C und D durch die Monomersegmente W und X, mit einem Alignment Score von 0.009 und einem RMSD-Wert von 0.475 Å und die Trimersegmente E und F durch die Monomersegmente U und V, mit einem Alignment Score von 0.009 und einem RMSD-Wert von 0.466 Å, ersetzt. Die neu positionierten Monomere wurden anschließend in einem neuen Eintrag zusammengeführt. Als Ergebnis wurde ein trimeres Hämagglutinin mit nativen Liganden in den drei Rezeptorbindungstaschen (Abb. 76) erhalten.



**Abb. 76:** Aufbau des trimeren Hämagglutinins mit nativen Liganden in allen drei Bindungstaschen. Die Untereinheiten HA1 und HA2 sind unterschiedlich eingefärbt (U = blau, V = hellblau, W = rot, X = orange, Y = grün, Z = gelb).

#### 7.4.3 Ligand modeling – Minimization

Der trimere Ligand wurde mit vorpositionierten Neuraminsäuren in den Bindungstaschen modelliert. Dazu wurde zunächst eine Proteinoberfläche für ein trimeres Protein aus der „*project table*“ generiert. Aus einem weiteren Eintrag wurden das Protein und die Wassermoleküle entfernt und die drei natürlichen Liganden beibehalten. Aus einem weiteren trimeren Protein mit natürlichen Liganden wurden sowohl das Protein als auch die Liganden entfernt und nur die Wassermoleküle beibehalten. Alle drei Einträge wurden in der „*workspace*“ vereinigt und der Ligand wurde anschließend ausgehend von einer Neuraminsäure per Hand gezeichnet. Die Einträge wurden zu einem einzigen Eintrag „*merged*“ und anschließend zur Optimierung der Bindungen, Atomabstände (etc.) minimiert.

Zur Minimierung wurde das Modul „Prime“ genutzt. Folgende Einstellungen wurden für den Prozess verwendet:

- Use structures from: Workspace (included entry)
- Solvation model: VSGB
- Force field: OPLS3

#### Atoms for minimization

- Ligand
  - ✓ Pick: Residues
  - ✓ Markers

### 7.4.4 Ligand modeling – MM-GBSA

Mit der MM-GBSA (molecular mechanics – generalized Born surface accessibility) Methode von Prime wurde die Energie des Komplexes berechnet. Der positionierte Ligand wurde dazu als neuer Eintrag extrahiert. Anschließend wurde die Berechnung nach Gl. 9 durchgeführt. Folgende Einstellungen wurden für die Energiekalkulation verwendet:

#### Structures

- Take complexes from separated ligand and protein structures:
  - ✓ Selected entries in Project Table
- Take receptor from:
  - ✓ Workspace entry

#### Options

- Solvation model: VSGB
- Force field: OPLS3
  - ✓ Use input ligand partial charges

#### Protein flexibility

- Distance from ligand (Å): 0.0 also add

Sampling method: Minimize

#### 7.4.5 Ligand modeling – Macro Model

Zur Vorbereitung auf die nachfolgenden Moleküldynamik-Simulationen wurde nach Minimierung und Energiekalkulation mittels Prime der Protein-Ligand Komplex im „*project table*“ gesplittet und erneut per Hand zusammengeführt. Anschließend erfolgte eine weitere Minimierung mittels „Macro Model“. Folgende Einstellungen wurden für die Minimierung verwendet:

- Use structures from: Workspace (included entries)

##### Potential

- Force field: OPLS3
- Solvent: water
- Charges from: Force field
- Cutoff: Extended

Eine anschließende Energiekalkulation wurde erneut mittels MM-GBSA durchgeführt.

#### 7.4.6 Moleküldynamik-Simulationen (MD)

Die Moleküldynamik-Simulationen wurden mit der Softwareapplikation „Desmond“ innerhalb von Maestro durchgeführt. Der Protein-Ligand-Komplex wurde dazu in den Desmond „System Builder“ geladen und es wurde ein geeignetes Molekülsystem generiert. Als Solvationsmodell wurde dazu das SPC-Modell ausgewählt und es wurde eine orthorhombische Box, mit den Maßen  $a = b = 10 \text{ \AA}$  und  $c = 17 \text{ \AA}$  definiert. Um ein minimales Volumen der Simulationsbox zu erhalten, wurde eine Volumenminimierung durchgeführt, bei der die Box an die Lage des Protein-Ligand-Komplexes angepasst wurde. Überschüssige Ladungen wurden durch die Ergänzung von Natrium- oder Chlorid-Ionen durch das Programm ausgeglichen und die Gesamtionstärke wurde mit Natriumchlorid auf 0.15 M eingestellt. Als Kraftfeld wurde OPLS3 gewählt. Das so generierte Modellsystem wurde für die anschließende Simulation in „Molecular Dynamics“ verwendet. Es wurde eine Simulationszeit von 4.8 ns gewählt. Dabei wurde der Energieverlauf alle 1.2 ps und die einzelnen Trajektorie-Schritte alle

4.8 ps gespeichert. Als *ensemble class* wurde der Modus NPT mit einer Temperatur von 300 K und einem Druck von 1.01325 bar eingestellt. Zudem wurde vor der Simulation das Modellsystem relaxiert.

Zur Auswertung der Daten der molekulardynamischen Simulationen wurden Desmond „Simulation Event Analysis“ und Desmond „Simulation Interactions Diagram“ verwendet. Da die modellierten Liganden **1** und **4** aus mehr als 200 Atomen bestanden, war eine Analyse mittels „Simulation Interactions Diagram“ nur von definierten Regionen möglich. Eine Analyse von komplexen Liganden mit mehr als 200 Atome ist mit dem Programm generell nicht möglich.

## 7.5 Biacore - SPR

Die im nachfolgenden Abschnitt beschriebenen SPR-Experimente wurden an einer Biacore T100 der Firma GE Healthcare durchgeführt. Die Steuerung der Geräte erfolgte durch die Biacore T100 Control Software und die Auswertung der Daten wurde mittels der Biacore T100 Evaluation Software und OriginPro 2018 / 2019 durchgeführt.

### 7.5.1 Immobilisierung des Hämagglutinins H5

Das kommerziell erworbene Hämagglutinin H5 besaß laut Hersteller einen Gehalt von 145 µg/mL. Vor Beginn der Messungen musste das in einem Tris-Puffer gelagerte Protein per Dialyse in den PBS-Immobilisierungspuffer bei einem pH-Wert von 7.4 überführt werden. Dazu wurden Amicon® Ultracel Zentrifugen-Filtereinheiten (*molecular weight cut off* = 3 kDa) der Firma Merck eingesetzt. Per NanoDrop wurde für das Protein eine mittlere Konzentration von 133 µg/mL bestimmt. Die Immobilisierung erfolgte auf einem CM5 Sensorchips der Firma GE Healthcare, welcher 20 h vor der eigentlichen Messung in das Gerät eingesetzt und mittels der implementierten *standby*-Methode mit Laufpuffer gespült wurde. Als Laufpuffer wurde HBS-EP Puffer (0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% Surfactant P20) verwendet. Die Immobilisierung des Proteins erfolgte mittels des implementierten *immobilization wizard* unter Standardbedingungen. Dazu wurde zunächst mit EDC/NHS (1 M/4 M) bei einer Flussrate von 5 µL/min über 1200 s die Aktivierung der Dextranmatrix durchgeführt. Die Proteinimmobilisierung wurde dann mit 100 µL Protein-Lösung (Konzentration = 103 µg/mL) über 760 s bei einer Flussrate von 5 µL/min durchgeführt. Ein *capping* mit Ethanolamin nach ausreichender Proteinimmobilisierung wurde bei gleicher Flussrate während 720 s durchgeführt. Es gelang eine Immobilisierung von 12880 *response units* (RU) zu erreichen.

### 7.5.2 Durchführung der Messungen und Auswertung

Die nachfolgenden Messungen wurden mit Hilfe der Biacore T100 Control Software durchgeführt. HBS-EP Puffer (0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% Surfactant P20) wurde als Laufpuffer verwendet. Zur Äquilibrierung des Systems wurden den Messreihen ein bis zwei *start-up cycle* mit HBS-EP Puffer vorangestellt. Zudem wurde vor jedem *run* eine *prime*-Sequenz durchgeführt. Die Messungen wurden bei einer Analysetemperatur von 25 °C und einer Temperatur des Probenraums von 30 °C durchgeführt. Die Messungen wurden ohne Regeneration bei einer Flussrate von 20 µL/min durchgeführt. Die Kontaktzeit betrug 120 s und die Dissoziationszeit 600 s. Für die Affinitätsbestimmung wurden vier verschiedene Konzentrationsreihen aufgenommen, die anschließend thermodynamisch nach dem *one site binding* Modell ausgewertet wurden. Die Konzentrationsreihen bestanden aus fünf bis sieben Proben, sowie einer Blindprobe mit einer Ligandkonzentration von 0 mM. Die Vermessung erfolgte von der kleinsten zur jeweils größten Konzentration, wobei die Blindprobe immer als zweites vermessen wurde. Anschließend wurden zwei unterschiedliche Konzentrationen (eine niedrige und eine hohe) zusätzlich ein zweites Mal vermessen. Die erhaltenen Daten wurden zunächst in die Biacore T100 Evaluation Software importiert. Die normierten Sensorgramme wurden anschließend in Origin 9.5 bzw. 9.6 und Excel 2016 bearbeitet und ausgewertet.

## 7.6 Synthesen und Charakterisierungen

Einige der in diesem Abschnitt dargestellten Verbindungen und durchgeführten Synthesen sind literaturbekannt oder wurden bereits während der Masterarbeit erstmalig erfolgreich durchgeführt. Alle Synthesen wurden jedoch unter angepassten und optimierten Bedingungen während dieser Arbeit durchgeführt. Es wurden zudem unter den angepassten Synthesebedingungen meist bessere Ausbeuten erhalten und deutlich detailliertere Charakterisierungen als literaturbekannt durchgeführt. Die Synthesen wurden, wenn nötig unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt.

### 7.6.1 Darstellung von 11-(Tosyloxy)-3,6,9-trioxaundecan-1-ol (**22**)<sup>120, 121</sup>

Die Verbindung **22** wurde, zur Verifizierung der besten Synthesebedingungen, in Anlehnung an verschiedenen, angepassten Literaturvorschriften dargestellt.

#### Variante 1:

Angelehnt an eine literaturbekannte Vorschrift<sup>120</sup> wurden 19.4 g (100 mmol, 1 eq) Tetraethylenglycol und 28.5 g (150 mmol, 1.5 eq) *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (*p*-TsCl) in 250 mL CHCl<sub>3</sub> gelöst. Bei 0 °C wurden 8.40 g (150 mmol, 1.5 eq) KOH in fünf Portionen zugegeben und für 2 h bei RT bis zur vollständigen Umsetzung des Tetraethylenglycols gerührt. Anschließend wurde die Reaktionssuspension zweimal mit je 100 mL Wasser und einmal mit 30 mL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und nach Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (EtOAc/*n*-Hexan, 5:1) an Kieselgel gereinigt.

Es wurden 16.7 g (48.1 mmol) 11-(Tosyloxy)-3,6,9-trioxaundecan-1-ol (**22**) erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 48 %.

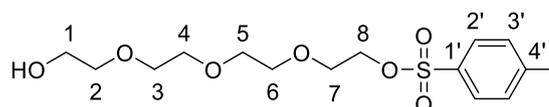
#### Variante 2:

Angelehnt an eine literaturbekannte Vorschrift<sup>121</sup> wurden 4.21 g (105 mmol, 1 eq) NaOH gelöst in 25 mL Wasser zu 20.4 g (105 mmol, 1 eq) Tetraethylenglycol gelöst in 150 mL THF

gegeben. Bei 0 °C wurden 19.9 g (105 mmol, 1 eq) *p*-TsCl gelöst in 150 mL THF über 60 min zu dem Reaktionsgemisch getropft. Es wurde weitere 1.5 h bei 0 °C und 20 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit 500 mL Eiswasser versetzt und viermal mit je 80 mL DCM extrahiert. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und nach Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (EtOAc/*n*-Hexan, 1:1 → EtOAc/*n*-Hexan 15:1 → EtOAc/MeOH 10:1 → EtOAc/MeOH 5:1) an Kieselgel gereinigt.

Es wurden 15.9 g (45.6 mmol) 11-(Tosyloxy)-3,6,9-trioxaundecan-1-ol (**22**) erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 43 %.

#### Charakterisierung:



farbloses Öl

R<sub>f</sub>-Wert (EtOAc/MeOH, 5:1): 0.34

M = 348.41 g/mol  
C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>O<sub>7</sub>S

**HR-MS (ESI):**  $m/z$  = ber.: 349.13 [M+H]<sup>+</sup>, 371.11 [M+Na]<sup>+</sup>  
gef.: 349.13 [M+H]<sup>+</sup>, 371.11 [M+Na]<sup>+</sup>

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 7.79 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 7.9 Hz, H-2'), 7.33 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 8.0 Hz, H-3'), 4.15 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 4.7 Hz, H-8), 3.71-3.57 (m, 14H, H-1, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6, H-7), 2.43 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>).

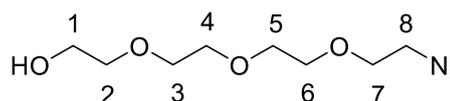
**<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 144.9 (C-4'), 133.1 (C-1'), 129.9 (C-3'), 128.1 (C-2'), 72.6 (C-2), 70.8, 70.8, 70.6, 70.4 (C-3, C-4, C-5, C-6), 69.4 (C-8), 68.8 (C-7), 61.8 (C-1), 21.7 (-CH<sub>3</sub>).

Die spektroskopischen Daten aus den <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR Spektren stimmen mit denen der Literatur überein.<sup>80</sup> Sie ermöglichen zusätzlich eine detailliertere Signalzuordnung als in der Literatur angegeben.

7.6.2 Darstellung von 11-Azido-3,6,9-trioxaundecan-1-ol (**20**)<sup>80, 120</sup>

Angelehnt an eine literaturbekannte Vorschrift<sup>120</sup> wurden 15.9 g (45.5 mmol, 1 eq) **22** in 130 mL abs. DMF gelöst und mit 11.8 g (182 mmol, 4 eq) Natriumazid versetzt. Es wurde für 28 h bei 70 °C gerührt und anschließend das DMF unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in 80 mL H<sub>2</sub>O aufgenommen und viermal mit je 80 mL DCM extrahiert. Der DCM-Extrakt wurde mit 150 mL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde erneut zweimal mit je 100 mL DCM extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet.

Nach Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurden 9.42 g (43.0 mmol) 11-Azido-3,6,9-trioxaundecan-1-ol (**20**) erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 95 %.

**Charakterisierung:**

farbloses Öl

R<sub>f</sub>-Wert (EtOAc/*n*-Hexan, 3:1): 0.15

M = 219.24 g/mol  
C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

**HR-MS (ESI):** *m/z* = ber.: 242.11 [M+Na]<sup>+</sup>

gef.: 242.11 [M+Na]<sup>+</sup>

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ [ppm] = 3.72 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 4.7 Hz, **H-1**), 3.69-3.66 (m, 10H, **H-3**, **H-4**, **H-5**, **H-6**, **H-7**), 3.61 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 4.8 Hz, **H-2**), 3.39 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 5.0 Hz, **H-8**).

**<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ [ppm] = 72.6 (**C-2**), 70.8, 70.8, 70.7, 70.5, 70.2 (**C-3**, **C-4**, **C-5**, **C-6**, **C-7**), 61.9 (**C-1**), 50.8 (**C-8**).

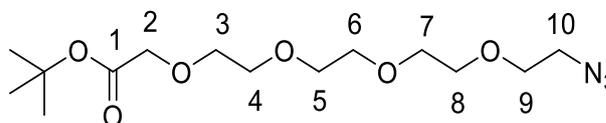
Die spektroskopischen Daten aus den <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR Spektren stimmen mit denen der Literatur überein.<sup>80</sup> Sie ermöglichen zusätzlich eine detailliertere Signalzuordnung als in der Literatur angegeben.

7.6.3 Darstellung von *tert*-Butyl 14-Azido-3,6,9,12-tetraoxatetradecanoat (**18**)<sup>119</sup>

Angelehnt an eine literaturbekannte Vorschrift<sup>119</sup> wurde für die nachfolgende Synthese frisch dargestelltes Natrium-*tert*-butanolat verwendet. Dazu wurden 46 mL *tert*-Butanol mit 0.87 g Natrium versetzt und auf 100 °C erhitzt. Nach 2 h wurde auf 50 °C gekühlt und für weitere 20 h gerührt. Für die nachfolgende Reaktion wurde das Gemisch weiter auf 30 °C gekühlt und es wurden 3.30 g (15.1 mmol, 1 eq) **20** gelöst in 33 mL *tert*-Butanol zugegeben. Es wurde 1 h bei 30 °C gerührt und anschließend wurden langsam 5.53 mL (7.40 g, 37.9 mmol, 2.5 eq) Bromessigsäure-*tert*-butylester gelöst in 17 mL *tert*-Butanol zu dem Reaktionsgemisch getropft. Es wurde auf 50 °C erhitzt und für weitere 20 h gerührt.

Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 60 mL DCM aufgenommen. Die organische Lösung wurde mit 60 mL Wasser gewaschen und die wässrige Phase anschließend erneut dreimal mit je 30 mL DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden dreimal mit je 30 mL gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und nach Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (EtOAc/Hex, 3:1) an Kieselgel gereinigt.

Es wurden 4.81 g (14.4 mmol) *tert*-Butyl 14-Azido-3,6,9,12-tetraoxatetradecanoat (**18**) erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 95 %.

**Charakterisierung:**

farbloses Öl

R<sub>f</sub>-Wert (EtOAc/*n*-Hexan, 3:1): 0.41

M = 333.39 g/mol  
C<sub>14</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>

**HR-MS (ESI):** *m/z* = ber.: 356.18 [M+Na]<sup>+</sup>  
gef.: 355.99 [M+Na]<sup>+</sup>

**$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 4.00 (s, 2H, H-2), 3.71-3.65 (m, 14H, H-3, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9), 3.37 (t, 2H,  $^3J = 5.0$  Hz, H-10), 1.46 (s, 9H,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ).**

**$^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 169.7 (C-1), 81.6 ( $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 70.8, 70.8, 70.7, 70.7, 70.7, 70.7, 70.1 (C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9), 69.1 (C-2), 50.8 (C-10), 28.2 ( $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ).**

Die spektroskopischen Daten aus den  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektren stimmen mit denen der Literatur überein.<sup>119</sup> Sie ermöglichen zusätzlich eine detailliertere Signalzuordnung als in der Literatur angegeben.

7.6.4 Darstellung von 14-Azido-3,6,9,12-tetraoxatetradecansäure (**6**)<sup>118, 119</sup>Variante 1: Darstellung durch Williamson-Ethersynthese aus **20**

Angelehnt an eine literaturbekannte Vorschrift<sup>118</sup> wurde zunächst Natriumhydrid (60 %-ige Suspension in Paraffinöl) mit abs. *n*-Hexan gewaschen und die erhaltenen 1.76 g (73.3 mmol) in zwei Portionen aufgeteilt und in insgesamt 30 mL abs. DMF suspendiert. Die Natriumhydrid-Suspension wurde auf 0 °C gekühlt und zu der ersten wurden 1.35 g (6.16 mmol) **20** gelöst in 15 mL abs. DMF über 75 min zugetropft. Zeitgleich wurden zu der zweiten Suspension innerhalb von 90 min 1.15 g (8.25 mmol) Bromessigsäure gelöst in 35 mL abs. DMF getropft. Anschließend wurde eine Spatelspitze Natriumiodid zu der ersten Suspension gegeben und innerhalb von 60 min die zweite Suspension zugetropft. Nach 20 h bei RT wurde die Reaktion durch Zugabe von Eiswürfeln beendet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 150 mL H<sub>2</sub>O aufgenommen. Es wurde zweimal mit jeweils 60 mL DCM extrahiert und mit 1 M HCl ein pH-Wert von 3 eingestellt. Anschließend wurde viermal mit jeweils 50 mL DCM extrahiert. Der organische Extrakt wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Rohprodukt nach Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck mehrfach säulenchromatographisch (Toluol/EtOH, 9:2; DCM/MeOH/AcOH, 9:1:0.1; DCM/MeOH, 9:1) gereinigt.

Es wurden 711 mg (2.57 mmol) 14-azido-3,6,9,12-tetraoxatetradecansäure (**6**) erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 45 %. Mittels NMR und Massenspektrometrie konnte gezeigt werden, dass auch nach mehrfacher Aufreinigung keiner der Syntheseansätze zur Darstellung von Verbindung **6** mittels Williamson-Ethersynthese eine ausreichende Reinheit des Produktes lieferte. Die Ausbeute ist demnach niedriger als 45 %.

Variante 2: Darstellung durch Esterhydrolyse aus **18** mit TFA in DCM<sup>119</sup>

Es wurden 500 mg (1.50 mmol) **18** in 5 mL DCM gelöst und mit 1 mL TFA versetzt. Die Reaktionslösung wurde 2 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der verbleibende Rückstand dreimal mit Toluol coevaporiert.

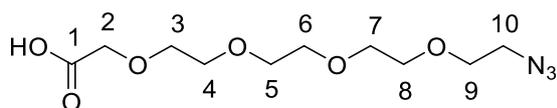
Es wurden 431 mg (1.55 mmol) 14-azido-3,6,9,12-tetraoxatetradecansäure (**6**) erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von >100 %, welche auf die Ausbildung von schwer abtrennbaren TFA-Addukten zurückzuführen ist.

Variante 3: Darstellung durch Esterhydrolyse aus **18** mit HCl in Dioxan<sup>119</sup>

Es wurden 2.00 g (6.00 mmol) **18** in 2.9 mL Dioxan gelöst und mit 2.9 mL 37 %-iger HCl versetzt. Die Reaktionslösung wurde 3 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der verbleibende Rückstand dreimal mit Toluol coevaporiert.

Es wurden 1.64 g (5.91 mmol) 14-azido-3,6,9,12-tetraoxatetradecansäure (**6**) erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 99 %.

#### Charakterisierung:



gelbes Öl

R<sub>f</sub>-Wert (Toluol/EtOH, 9:2): 0.23

M = 277.28 g/mol  
C<sub>10</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>

HR-MS (ESI):  $m/z$  = ber.: 300.12 [M+Na]<sup>+</sup>

gef.: 300.12 [M+Na]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 4.15 (s, 2H, H-2), 3.77-3.66 (m, 14H, H-3, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9), 3.39 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 5.1 Hz, H-10).

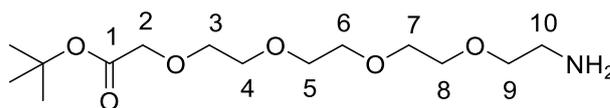
<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 175.6 (C-1), 71.2, 70.7, 70.4, 70.3, 70.1, 70.0, 69.9 (C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9), 69.2 (C-2), 50.8 (C-10).

7.6.5 Darstellung von *tert*-Butyl 14-Amino-3,6,9,12-tetraoxatetradecanoat (**10**)

Es wurden 111 mg (333  $\mu$ mol) **18** in 3 mL MeOH gelöst und mit einer Spatelspitze Pd/C versetzt. Der Reaktionskolben wurde mit Wasserstoff geflutet und die Reaktion für 20 h bis zur vollständigen Umsetzung des Eduktes bei RT gerührt.

Zur Entfernung des Katalysators wurde das Reaktionsgemisch über Celite® filtriert und mehrfach mit MeOH gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt.

Es wurden 96.7 mg (315  $\mu$ mol) *tert*-Butyl 14-Amino-3,6,9,12-tetraoxatetradecanoat (**10**) erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 95 %.

**Charakterisierung:**

farbloses Öl

R<sub>f</sub>-Wert (EtOAc/*n*-Hexan, 3:1): 0.00

M = 307.39 g/mol  
C<sub>14</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>6</sub>

**HR-MS (ESI):**  $m/z$  = ber.: 308.21 [M+H]<sup>+</sup>

gef.: 308.21 [M+H]<sup>+</sup>

**<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 4.00 (s, 2H, H-2), 3.68-3.61 (m, 12H, H-3, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8), 3.54 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 5.1 Hz, H-9), 2.88 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 5.1 Hz, H-10), 1.45 (s, 9H, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

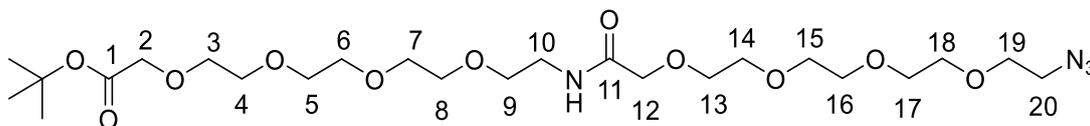
**<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 169.8 (C-1), 81.8 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 72.6, 70.9, 70.8, 70.6, 70.5, 70.5, 70.2 (C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9), 69.1 (C-2), 41.6 (C-10), 28.2 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

### 7.6.6 Darstellung von *tert*-Butyl 29-Azido-16-oxo-3,6,9,12,18,21,24,27-octaoxa-15-azanonacosanoat (**32**)

Es wurden 27.3 mg (97.4  $\mu\text{mol}$ , 1.5 eq) **6** und 75.0 mg (197  $\mu\text{mol}$ , 3 eq) HATU zusammen in einem Kolben eingewogen und 1 h im HV getrocknet. Bei RT wurden 3 mL DMF und 45.2  $\mu\text{L}$  (34.3 mg, 265  $\mu\text{mol}$ , 4 eq) DIPEA zugegeben. Dann wurden 21.5 mg (69.9  $\mu\text{mol}$ , 1 eq) **10** gelöst in 3 mL DMF zugegeben und für 20 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 2 mL MeOH aufgenommen. Es wurde dreimal mit Toluol coevaporiert. Das Rohprodukt wurde mehrfach säulenchromatographisch (DCM/MeOH, 7:1; DCM/MeOH, 9:1) an Kieselgel gereinigt.

Es wurden 8.00 mg (14.1  $\mu\text{mol}$ ) *tert*-Butyl 29-Azido-16-oxo-3,6,9,12,18,21,24,27-octaoxa-15-azanonacosanoat (**32**) erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 20 % bezogen auf **10**.

#### Charakterisierung:



farbloses Öl

$R_f$ -Wert (DCM/MeOH, 9:1): 0.60

$M = 566.65 \text{ g/mol}$   
 $\text{C}_{24}\text{H}_{46}\text{N}_4\text{O}_{11}$

**HR-MS (ESI):**  $m/z =$  ber.: 567.33  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 589.31  $[\text{M}+\text{Na}]^+$   
 gef.: 567.32  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 589.31  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  [ppm] = 7.16 (bs, 1H, NH), 4.16 (s, 2H, H-2), 4.01 (s, 2H, H-12), 3.73-3.61 (m, 26H, H-3, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17, H-18, H-19), 3.58-3.55 (m, 2H, H-9), 3.50-3.46 (m, 2H, H-10), 3.38 (t, 2H,  $^3J = 4.9 \text{ Hz}$ , H-20), 1.47 (s, 9H,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ).

**<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 170.9 (C-1), 169.9 (C-11), 81.8 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 71.0, 70.8, 70.8, 70.7, 70.7, 70.7, 70.7, 70.7, 70.7, 70.6, 70.4, 70.4, 70.1, 70.1 (C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-13, C-14, C-15, C-16, C-17, C-18, C-19), 69.9 (C-9), 69.1 (C-2), 50.8 (C-20), 38.8 (C-10), 28.2 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).**

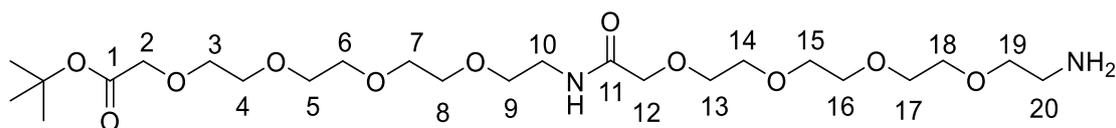
7.6.7 Darstellung von *tert*-Butyl 29-Amino-16-oxo-3,6,9,12,18,21,24,27-octaoxa-15-azanonacosanoat (**8**)

Es wurden 28.9 mg (51.0  $\mu\text{mol}$ ) **32** in 3 mL MeOH gelöst und mit einer Spatelspitze Pd/C versetzt. Der Reaktionskolben wurde mit Wasserstoff geflutet und die Reaktion für 1.5 h bis zur vollständigen Umsetzung des Eduktes bei RT gerührt.

Zur Entfernung des Katalysators wurde das Reaktionsgemisch über Celite® filtriert und mehrfach mit MeOH nachgewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt.

Es wurden 21.6 mg (40.0  $\mu\text{mol}$ ) *tert*-Butyl 29-Amino-16-oxo-3,6,9,12,18,21,24,27-octaoxa-15-azanonacosanoat (**8**) erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 78 %.

**Charakterisierung:**



farbloses Öl

R<sub>f</sub>-Wert (DCM/MeOH, 9:1): 0.0

M = 540.65 g/mol  
C<sub>24</sub>H<sub>48</sub>N<sub>2</sub>O<sub>11</sub>

**HR-MS (ESI):**  $m/z$  = ber.: 541.33 [M+H]<sup>+</sup>, 563.31 [M+Na]<sup>+</sup>  
gef.: 541.37 [M+H]<sup>+</sup>, 563.31 [M+Na]<sup>+</sup>

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 7.16 (bs, 1H, NH), 4.15 (s, 2H, H-2), 3.99 (s, 2H, H-12), 3.70-3.46 (m, 30H, H-3, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17, H-18, H-19), 2.65 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 5.9 Hz, H-20), 1.45 (s, 9H, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 171.4 (C-1), 170.2 (C-11), 81.6 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 71.3, 70.8, 70.8, 70.7, 70.7, 70.7, 70.7, 70.7, 70.6, 70.4, 70.4, 70.1, 70.1 (C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-13, C-14, C-15, C-16, C-17, C-18, C-19), 69.9 (C-9), 69.1 (C-2), 40.1 (C-20), 38.7 (C-10), 28.2 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

7.6.8 Darstellung von 8-(Tosyloxy)-3,6-dioxaoctan-1-ol (**23**)<sup>116, 117, 120</sup>Variante 1:

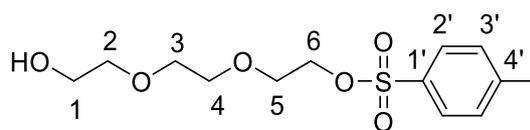
Nach einer literaturbekannten Vorschrift<sup>120</sup> wurden 15.0 g (99.9 mmol, 1 eq) Triethylenglycol und 28.5 g (149 mmol, 1.5 eq) *p*-Toluolsulfonsäurechlorid in 250 mL CHCl<sub>3</sub> gelöst.<sup>120</sup> Bei 0 °C wurden 8.40 g (150 mmol, 1.5 eq) KOH in fünf Portionen zugegeben und für 2 h bei RT bis zur vollständigen Umsetzung des Triethylenglycols gerührt. Anschließend wurde die Reaktionssuspension zweimal mit je 100 mL Wasser und einmal mit 30 mL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Rohprodukt wurde nach Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck säulenchromatographisch (EtOAc/*n*-Hexan, 5:1) an Kieselgel gereinigt.

Es wurden 17.0 g (55.9 mmol) 8-(Tosyloxy)-3,6-dioxanonan-1-ol (**23**) erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 56 %.

Variante 2:

Angelehnt an eine literaturbekannte Vorschrift<sup>116, 117</sup> wurden 16.8 g (112 mmol, 1 eq) Triethylenglycol in 30 mL abs. THF gelöst und mit 6.0 mL abs. Pyridin versetzt. Innerhalb von 20 Minuten wurden bei 0 °C 20.6 g (108 mmol, 1 eq) *p*-Toluolsulfonsäurechlorid gelöst in 20 mL abs. THF zu der Lösung getropft. Der Reaktionsfortschritt wurde per DC verfolgt und die Reaktion nach 21 Stunden beendet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Pyridin wurde durch dreimalige Coevaporation mit Toluol entfernt. Der Rückstand wurde in 80 mL Dichlormethan aufgenommen und mit je 60 mL 1M HCl, 60 mL 1M NaOH, 70 mL gesättigter NaCl-Lösung und 60 mL H<sub>2</sub>O gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (DCM/MeOH, 9:1) an Kieselgel gereinigt.

Es wurden 20.8 g (68.3 mmol) 8-(Tosyloxy)-3,6-dioxanonan-1-ol (**23**) erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 61 %.

**Charakterisierung:**

farbloses Öl

R<sub>f</sub>-Wert (EtOAc/*n*-Hexan, 5:1): 0.17

M = 304.36 g/mol

C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>S

**HR-MS (ESI):** *m/z* = ber.: 305.10 [M+H]<sup>+</sup>, 327.08 [M+Na]<sup>+</sup>

gef.: 305.10 [M+H]<sup>+</sup>, 327.08 [M+Na]<sup>+</sup>

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ [ppm] = 7.79 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 8.5 Hz, H-2'), 7.34 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 8.5 Hz, H-3'), 4.16 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 4.7 Hz, H-6), 3.72-3.69 (m, 4H, H-1, H-5), 3.60 (s, 4H, H-3, H-4), 3.57 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 4.8 Hz, H-2), 2.44 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>).

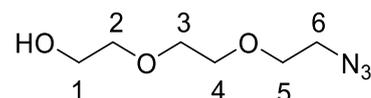
**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ [ppm] = 144.9 (C-4'), 133.0 (C-1'), 129.9 (C-3'), 128.1 (C-2'), 72.5 (C-2), 70.9 (C-3), 70.4 (C-4), 69.2 (C-6), 68.8 (C-5), 61.8 (C-1), 21.7 (-CH<sub>3</sub>).

Die spektroskopischen Daten aus den <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR Spektren stimmen mit denen der Literatur überein.<sup>116, 117</sup> Sie ermöglichen zusätzlich eine detailliertere Signalzuordnung als in der Literatur angegeben.

7.6.9 Darstellung von 8-Azido-3,6-dioxaoctan-1-ol (**21**)<sup>120</sup>

Angelehnt an eine literaturbekannte Vorschrift<sup>120</sup> wurden 13.4 g (44.0 mmol, 1 eq) **23** in 34 mL abs. DMF gelöst und mit 5.56 g (85.5 mmol, 2 eq) Natriumazid versetzt. Es wurde für 24 h bei 65 °C gerührt und anschließend das DMF unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in 20 mL H<sub>2</sub>O aufgenommen und viermal mit je 20 mL DCM extrahiert. Der DCM-Extrakt wurde mit je 20 mL Wasser und je 20 mL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet.

Nach Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurden 7.55 g (43.1 mmol) 8-Azido-3,6-dioxanonan-1-ol (**21**) erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 98 %.

**Charakterisierung:**

M = 175.19 g/mol  
C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>

farbloses Öl

R<sub>f</sub>-Wert (EtOAc/*n*-Hexan, 3:1): 0.33

**HR-MS (ESI):**  $m/z$  = ber.: 198.08 [M+Na]<sup>+</sup>  
gef.: 198.08 [M+Na]<sup>+</sup>

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 3.74 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 4.3 Hz, **H-1**), 3.69-3.66 (m, 6H, **H-3**, **H-4**, **H-5**), 3.61 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 4.8 Hz, **H-2**), 3.39 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 5.0 Hz, **H-6**).

**<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 72.6 (**C-2**), 70.8, 70.5, 70.1 (**C-3**, **C-4**, **C-5**), 61.9 (**C-1**), 50.8 (**C-6**).

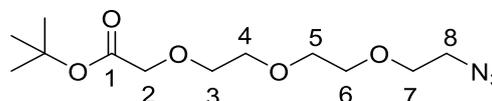
Die spektroskopischen Daten aus den <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR Spektren stimmen mit denen der Literatur überein.<sup>120</sup> Sie ermöglichen zusätzlich eine detailliertere Signalzuordnung als in der Literatur angegeben.

7.6.10 Darstellung von *tert*-Butyl 11-Azido-3,6,9-trioxaundecanoat (**19**)<sup>119</sup>

Angelehnt an eine literaturbekannte Vorschrift<sup>119</sup> wurde für die nachfolgende Synthese frisch dargestelltes Natrium-*tert*-butanolat verwendet. Dazu wurden 46 mL *tert*-Butanol mit 0.87 g Natrium versetzt und auf 100 °C erhitzt. Nach 2 h wurde auf 50 °C gekühlt und für weitere 20 h gerührt. Für die nachfolgende Reaktion wurde das Gemisch weiter auf 30 °C gekühlt und es wurden 6.33 g (36.1 mmol, 1 eq) **21** gelöst in 63 mL *tert*-Butanol zugegeben. Es wurde 1 h bei 30 °C gerührt und anschließend wurden langsam 13.2 mL (17.4 g, 89.1 mmol, 2.5 eq) Bromessigsäure-*tert*-butylester gelöst in 32 mL *tert*-Butanol zu dem Reaktionsgemisch getropft. Es wurde auf 50 °C erhitzt und für weitere 20 h gerührt.

Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 60 mL DCM aufgenommen. Die organische Lösung wurde mit 60 mL Wasser gewaschen und die wässrige Phase wurde anschließend erneut dreimal mit je 30 mL DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden dreimal mit je 30 mL gesättigten Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und nach Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (EtOAc/*n*-Hexan, 3:1) an Kieselgel gereinigt.

Es wurden 10.3 g (35.4 mmol) *tert*-Butyl 11-Azido-3,6,9-trioxaundecanoat (**19**) erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 98 %.

**Charakterisierung:**

farbloses Öl

R<sub>f</sub>-Wert (EtOAc/*n*-Hexan, 3:1): 0.73

M = 289.33 g/mol  
C<sub>12</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>

**HR-MS (ESI):** *m/z* = ber.: 312.14 [M+Na]<sup>+</sup>  
gef.: 312.00 [M+Na]<sup>+</sup>

**$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 4.02 (s, 2H, **H-2**), 3.72-3.66 (m, 10H, **H-3**, **H-4**, **H-5**, **H-6**, **H-7**), 3.38 (t, 2H,  $^3J = 5.0$  Hz, **H-8**), 1.47 (s, 9H,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ).**

**$^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 169.8 (**C-1**), 81.6 ( $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 70.8, 70.8, 70.8, 70.8, 70.1 (**C-3**, **C-4**, **C-5**, **C-6**, **C-7**), 69.2 (**C-2**), 50.8 (**C-8**), 28.2 ( $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ).**

Die spektroskopischen Daten aus den  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektren stimmen mit denen der Literatur überein.<sup>119</sup> Sie ermöglichen zusätzlich eine detailliertere Signalzuordnung als in der Literatur angegeben.

7.6.11 Darstellung von 11-Azido-3,6,9-trioxaundecansäure (**17**)

Variante 1: Darstellung durch Williamson-Ethersynthese aus **21**<sup>118</sup>

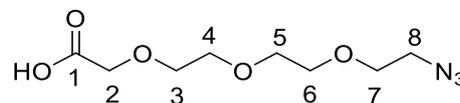
Angelehnt an eine literaturbekannte Vorschrift<sup>118</sup> wurde zunächst Natriumhydrid (60 %-ige Suspension in Paraffinöl) mit abs. *n*-Hexan gewaschen und die erhaltenen 1.45 g (60.5 mmol) in zwei Portionen aufgeteilt und in insgesamt 30 mL abs. DMF suspendiert. Die Natriumhydrid-Suspension wurde auf 0 °C gekühlt und zu der ersten wurden 3.37 g (19.3 mmol) **21** gelöst in 15 mL abs. DMF über 20 min zugetropft. Zeitgleich wurden zu der zweiten Suspension innerhalb von 90 min 3.47 g (25.0 mmol) Bromessigsäure gelöst in 35 mL abs. DMF getropft. Anschließend wurde eine Spatelspitze Natriumiodid zu der ersten Suspension gegeben und innerhalb von 60 min die zweite Suspension zugetropft. Nach 20 h bei RT wurde die Reaktion durch Zugabe von Eiswürfeln beendet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 150 mL H<sub>2</sub>O aufgenommen. Es wurde zweimal mit jeweils 60 mL DCM extrahiert und mit 1 M HCl ein pH-Wert von 3 eingestellt. Anschließend wurde viermal mit jeweils 50 mL DCM extrahiert. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Rohprodukt nach Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck mehrfach säulenchromatographisch (Toluol/EtOH, 9:2; DCM/MeOH/AcOH, 9:1:0.1; DCM/MeOH, 9:1) gereinigt.

Es wurden 3.01 g (12.9 mmol) 11-Azido-3,6,9-trioxaundecansäure (**17**) erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 67 %. Mittels NMR und Massenspektrometrie konnte gezeigt werden, dass auch nach mehrfacher Aufreinigung keiner der Syntheseansätze zur Darstellung von Verbindung **17** mittels Williamson-Ethersynthese eine ausreichende Reinheit des Produktes lieferte. Die Ausbeute ist demnach niedriger als 67 %.

Variante 2: Darstellung durch Esterhydrolyse aus **19** mit HCl in Dioxan

Es wurden 3.97 g (13.7 mmol) **19** in 2.9 mL Dioxan gelöst und mit 2.9 mL 37 %-iger HCl versetzt.<sup>119</sup> Die Reaktionslösung wurde 3 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der verbleibende Rückstand dreimal mit Toluol coevaporiert.

Es wurden 3.03 g (13.0 mmol) 11-Azido-3,6,9-trioxaundecansäure (**17**) erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 95 %.

**Charakterisierung:**

farbloses Öl

R<sub>f</sub>-Wert (EtOAc/*n*-Hexan, 5:1): 0.29

M = 233.22 g/mol  
C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>

**HR-MS (ESI):**  $m/z$  = ber.: 256.08 [M+Na]<sup>+</sup>  
gef.: 256.09 [M+Na]<sup>+</sup>

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 4.16 (s, 2H, H-2), 3.77-3.66 (m, 2H, H-3), 3.72-3.70 (m, 4H, H-5, H-6), 3.68-3.66 (m, 4H, H-4, H-7), 3.39 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 4.8 Hz, H-8).

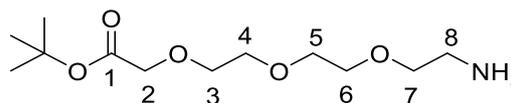
**<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 172.5 (C-1), 71.6 (C-3), 70.8, 70.5, 70.3, (C-4, C-5, C-6), 70.2 (C-7), 68.9 (C-2), 50.8 (C-8).

7.6.12 Darstellung von *tert*-Butyl 11-Amino-3,6,9-trioxaundecanoat (**24**)

Es wurden 204 mg (705  $\mu$ mol) **19** in 6 mL MeOH gelöst und mit einer Spatelspitze Pd/C versetzt. Der Reaktionskolben wurde mit Wasserstoff geflutet und die Reaktion für 20 h bis zur vollständigen Umsetzung des Eduktes bei RT gerührt.

Zur Entfernung des Katalysators wurde das Reaktionsgemisch über Celite® filtriert und mehrfach mit MeOH gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt.

Es wurden 165 mg (626  $\mu$ mol) *tert*-Butyl 11-Amino-3,6,9-trioxaundecanoat (**24**) erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 89 %.

**Charakterisierung:**

farbloses Öl

R<sub>f</sub>-Wert (EtOAc/*n*-Hexan, 3:1): 0.00

M = 263.33 g/mol

C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>5</sub>

**HR-MS (ESI):**  $m/z$  = ber.: 264.17 [M+H]<sup>+</sup>

gef.: 264.18 [M+H]<sup>+</sup>

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 4.02 (s, 2H, H-2), 3.70-3.65 (m, 8H, H-3, H-4, H-5, H-6), 3.58 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 5.1 Hz, H-7), 2.91 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 5.1 Hz, H-8), 1.47 (s, 9H, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 170.0 (C-1), 81.9 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 72.5, 70.7, 70.6, 70.5, 70.3 (C-3, C-4, C-5, C-6, C-7), 69.1 (C-2), 41.7 (C-8), 28.2 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

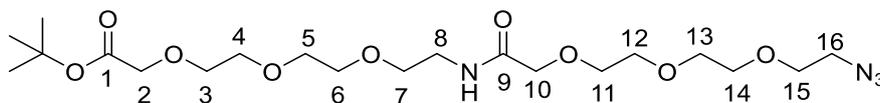
### 7.6.13 Darstellung von *tert*-Butyl 23-Azido-13-oxo-3,6,9,15,18,21-hexaoxa-12-azatricosanoat (**31**)

Es wurden 27.0 mg (114  $\mu$ mol, 1.5 eq) **17** und 87.0 mg (228  $\mu$ mol, 3 eq) HATU zusammen in einem Kolben eingewogen und 1 h im HV getrocknet. Bei RT wurden 3 mL DMF und 51.3  $\mu$ L (39.0 mg, 302  $\mu$ mol, 4 eq) DIPEA zugegeben. Dann wurden 20 mg (76.0  $\mu$ mol, 1 eq) **24** gelöst in 3 mL DMF zugegeben und für 5.5 h bei RT gerührt.

Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 2 mL MeOH aufgenommen. Es wurde dreimal mit Toluol coevaporiert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (EtOAc/MeOH, 7:3) an Kieselgel gereinigt.

Es wurden 21.0 mg (43.9  $\mu$ mol) *tert*-Butyl 23-Azido-13-oxo-3,6,9,15,18,21-hexaoxa-12-azatricosanoat (**31**) erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 58 % bezogen auf **24**.

#### Charakterisierung:



farbloses Öl

R<sub>f</sub>-Wert (EtOAc/MeOH, 7:3): 0.20

M = 478.54 g/mol  
C<sub>20</sub>H<sub>38</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>

**HR-MS (ESI):** *m/z* = ber.: 479.26 [M+H]<sup>+</sup>, 501.24 [M+Na]<sup>+</sup>  
gef.: 479.27 [M+H]<sup>+</sup>, 501.25 [M+Na]<sup>+</sup>

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 7.15 (bs, 1H, NH), 4.16 (s, 2H, H-2), 4.00 (s, 2H, H-10), 3.72-3.61 (m, 18H, H-3, H-4, H-5, H-6, H-11, H-12, H-13, H-14, H-15), 3.57-3.55 (m, 2H, H-7), 3.50-3.47 (m, 2H, H-8), 3.38 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 5.0 Hz, H-16), 1.46 (s, 9H, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 170.0, 169.7 (C-1, C-9), 81.7 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 71.0, 70.8, 70.7, 70.6, 70.5, 70.5, 70.4, 70.2, 70.1 (C-3, C-4, C-5, C-6, C-11, C-12, C-13, C-14, C-15), 69.9 (C-7), 69.1 (C-2), 50.8 (C-16), 38.7 (C-8), 28.2 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

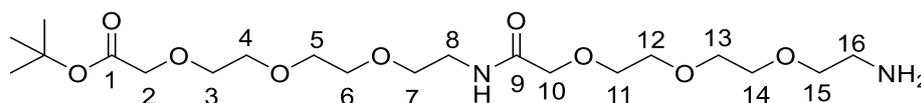
7.6.14 Darstellung von *tert*-Butyl 23-Amino-13-oxo-3,6,9,15,18,21-hexaoxa-12-azatricosanoat (**9**)

Es wurden 15.8 mg (51.0  $\mu$ mol) **31** in 3 mL MeOH gelöst und mit einer Spatelspitze Pd/C versetzt. Der Reaktionskolben wurde mit Wasserstoff geflutet und die Reaktion für 1.5 h bis zur vollständigen Umsetzung des Eduktes bei RT gerührt.

Zur Entfernung des Katalysators wurde das Reaktionsgemisch über Celite® filtriert und mehrfach mit MeOH gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt.

Es wurden 12.3 mg (40.0  $\mu$ mol) *tert*-Butyl 23-Amino-13-oxo-3,6,9,15,18,21-hexaoxa-12-azatricosanoat (**9**) erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 78 %.

**Charakterisierung:**



farbloses Öl

R<sub>f</sub>-Wert (DCM/MeOH, 9:1): 0.00

M = 452.54 g/mol  
C<sub>20</sub>H<sub>40</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>

**HR-MS (ESI):** *m/z* = ber.: 453.28 [M+H]<sup>+</sup>, 475.26 [M+Na]<sup>+</sup>  
gef.: 453.30 [M+H]<sup>+</sup>, 475.26 [M+Na]<sup>+</sup>

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 7.16 (bs, 1H, NH), 4.15 (s, 2H, H-2), 4.00 (s, 2H, H-10), 3.72-3.47 (m, 22H, H-3, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-11, H-12, H-13, H-14, H-15), 2.98-2.90 (m, 2H, H-16), 1.46 (s, 9H, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 170.0, 169.7 (C-1, C-9), 81.8 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 71.0, 70.8, 70.7, 70.6, 70.5, 70.5, 70.3, 70.2, 70.2 (C-3, C-4, C-5, C-6, C-11, C-12, C-13, C-14, C-15), 69.9 (C-7), 69.1 (C-2), 38.9 (C-16), 38.8 (C-8), 28.1 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

7.6.15 Darstellung von Methyl-(5-acetamido-3,5-dideoxy- $\alpha$ -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid)onat (**14**)<sup>106-108</sup>

Nach einer literaturbekannten Vorschrift<sup>106-108</sup> wurden 4.00 g (12.9 mmol) *N*-Acetylneuraminsäure und 4.00 g Ionentauscher Amberlite IR 120 H<sup>+</sup> in 83 mL abs. MeOH suspendiert und bei RT für 48 h gerührt. Der Reaktionsansatz wurde filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

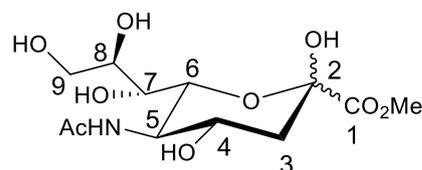
Es wurden 4.11 g (12.7 mmol) Methyl-(5-acetamido-3,5-dideoxy- $\alpha$ -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid)onat (**14**) erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 98 %.

**Charakterisierung:**

farbloser Feststoff

R<sub>f</sub>-Wert (EtOAc/2-Propanol/H<sub>2</sub>O, 2:2:1): 0.27

Drehwert [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>23</sup>: -34.8° (c = 1.0 CHCl<sub>3</sub>)



M = 323.30 g/mol  
C<sub>12</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>9</sub>

**HR-MS (ESI):** *m/z* = ber.: 346.11 [M+Na]<sup>+</sup>

gef.: 346.11 [M+Na]<sup>+</sup>

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, MeOD):**  $\delta$  [ppm] = 4.07-4.03 (m, 1H, H-4), 3.99 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>6,5</sub> = 10.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>7,6</sub> = 1.2 Hz, H-6), 3.83-3.80 (m, 2H, H-5, H-9a), 3.77 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.70 (ddd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>8,7</sub> = 9.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>9b,8</sub> = 5.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>9a,8</sub> = 2.7 Hz, H-8), 3.62 (dd, 1H, <sup>2</sup>J<sub>9a,9b</sub> = 11.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>9b,8</sub> = 5.6 Hz, H-9b), 3.48 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>8,7</sub> = 9.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>7,6</sub> = 1.1 Hz, H-7), 2.21 (dd, 1H, <sup>2</sup>J<sub>3ax,3eq</sub> = 12.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>4,3eq</sub> = 4.8 Hz, H-3eq), 2.01 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO-NH), 1.89 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>4,3ax</sub> = 11.5 Hz, H-3ax).

**<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, MeOD):**  $\delta$  [ppm] = 175.1 (CH<sub>3</sub>-CO-NH), 171.8 (C-1), 96.7 (C-2), 72.1 (C-6), 71.7 (C-8), 70.2 (C-7), 67.9 (C-4), 64.9 (C-9), 54.4 (C-5), 53.1 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 40.7 (C-3), 22.6 (CH<sub>3</sub>-CO-NH).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Literatur überein.<sup>106-108</sup>

7.6.16 Darstellung von Methyl-(5-acetamido-2,4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- $\beta$ -D-*glycero*-D-*galacto*-2-nonulopyranosid)onat (**13**)<sup>106-108</sup>

Bei 0 °C wurden 20.0 mL (21.6 g, 212 mmol) Essigsäureanhydrid zu 1.90 g (5.87 mmol) **14** gelöst in 30 mL Pyridin getropft. Die Reaktionslösung wurde für 16 h bei RT gerührt und anschließend das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand dreimal mit Toluol codestilliert.

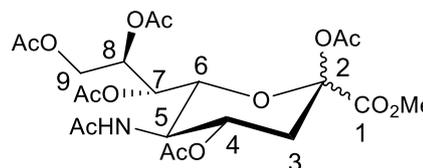
Es wurden 2.63 g (5.15 mmol) Methyl-(5-acetamido-2,4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- $\beta$ -D-*glycero*-D-*galacto*-2-nonulopyranosid)onat (**13**) erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 96 %.

**Charakterisierung:**

farbloser Schaum

R<sub>f</sub>-Wert (Tol/Aceton, 3:2): 0.25

Drehwert [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>23</sup>: -30.5° (c = 1.0 CHCl<sub>3</sub>)



M = 533.48 g/mol  
C<sub>22</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>14</sub>

**HR-MS (ESI):** *m/z* = ber.: 556.16 [M+Na]<sup>+</sup>

gef.: 556.17 [M+Na]<sup>+</sup>

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 5.37-5.35 (m, 1H, H-7), 5.28-5.23 (m, 1H, H-4), 5.09-5.05 (m, 1H, H-8), 4.49 (dd, 1H, <sup>2</sup>J<sub>9a,9b</sub> = 12.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>9a,8</sub> = 2.5 Hz, H-9a), 4.13-4.09 (m, 3H, H-6, H-5, H-9b), 3.79 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.55 (dd, 1H, <sup>2</sup>J<sub>3ax,3eq</sub> = 13.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>4,3eq</sub> = 4.8 Hz, H-3eq), 2.11-2.06 (m, 1H, H-3ax), 2.14 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO-O), 2.09 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO-O), 2.06 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO-O), 2.03 (s, 6H, 2x CH<sub>3</sub>-CO-O), 1.89 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO-NH).

**<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 171.1 (CH<sub>3</sub>-CO-O), 170.7 (CH<sub>3</sub>-CO-O), 170.4 (CH<sub>3</sub>-CO-NH), 170.3 (CH<sub>3</sub>-CO-O), 168.3 (CH<sub>3</sub>-CO-O), 166.4 (C-1), 96.5 (C-2), 73.6 (C-6), 71.5 (C-8), 68.4 (C-4), 68.0 (C-7), 62.3 (C-9), 53.3 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 49.5 (C-5), 36.0 (C-3), 23.3 (CH<sub>3</sub>-CO-NH), 21.0 (CH<sub>3</sub>-CO-O), 21.0 (CH<sub>3</sub>-CO-O), 20.9 (CH<sub>3</sub>-CO-O), 20.9 (CH<sub>3</sub>-CO-O), 20.9 (CH<sub>3</sub>-CO-O).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Literatur überein.<sup>106-108</sup>

7.6.17 Darstellung von Methyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- $\beta$ -D-*glycero*-D-*galacto*-2-nonulopyranosylchlorid)onat (**12**)<sup>106-108</sup>

Es wurden 5.46 g (10.2 mmol) **13** in 69.5 mL (76.5 g, 973 mmol) Acetylchlorid gelöst, auf 0 °C gekühlt und mit 1.16 mL (916 mg, 28.6 mmol) MeOH versetzt. Es wurde zunächst 30 min bei 0 °C und dann 48 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand viermal mit Toluol codestilliert.

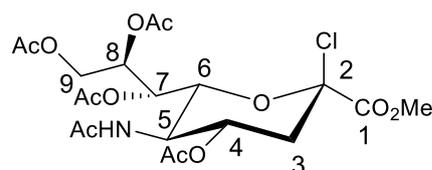
Es wurden 5.07 g (9.94 mmol) Methyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- $\beta$ -D-*glycero*-D-*galacto*-2-nonulopyranosylchlorid)onat (**12**) erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 97 %.

**Charakterisierung:**

farbloser Schaum

R<sub>f</sub>-Wert (EtOAc/PE, 2:1): 0.14

Drehwert [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>23</sup>: -44.8° (c = 1.0 CHCl<sub>3</sub>)



M = 509.89 g/mol  
C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>ClNO<sub>12</sub>

**HR-MS (ESI):** *m/z* = ber.: 510.14 [M+H]<sup>+</sup>, 532.12 [M+Na]<sup>+</sup>  
gef.: 510.14 [M+H]<sup>+</sup>, 532.12 [M+Na]<sup>+</sup>

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 5.46 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>8,7</sub> = 7.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>7,6</sub> = 2.3 Hz, **H-7**), 5.41 (ddd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>4,3ax</sub> = 11.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>5,4</sub> = 10.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>4,3eq</sub> = 4.4 Hz, **H-4**), 5.17 (ddd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>8,7</sub> = 7.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>9b,8</sub> = 5.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>9a,8</sub> = 2.6 Hz, **H-8**), 4.42 (dd, 1H, <sup>2</sup>J<sub>9a,9b</sub> = 12.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>9a,8</sub> = 2.6 Hz, **H-9a**), 4.35 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>6,5</sub> = 10.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>7,6</sub> = 2.4 Hz, **H-6**), 4.20 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>6,5</sub> = 10.4 Hz, **H-5**), 4.06 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>9b,8</sub> = 5.7 Hz, **H-9b**), 3.87 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.78 (dd, 1H, <sup>2</sup>J<sub>3ax,3eq</sub> = 13.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>4,3eq</sub> = 4.9 Hz H-3eq), 2.28 (dd, 1H, <sup>2</sup>J<sub>3ax,3eq</sub> = 13.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>4,3ax</sub> = 11.2 Hz, **H-3ax**), 2.12 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO-O), 2.07 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO-O), 2.05 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO-O), 2.05 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO-O), 1.91 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO-NH).

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] =** 171.1 (CH<sub>3</sub>-CO-O), 170.8 (CH<sub>3</sub>-CO-O), 170.5 (CH<sub>3</sub>-CO-NH), 170.1 (CH<sub>3</sub>-CO-O), 169.8 (CH<sub>3</sub>-CO-O), 165.8 (C-1), 96.7 (C-2), 74.0 (C-6), 70.1 (C-8), 68.9 (C-4), 67.0 (C-7), 62.2 (C-9), 53.9 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 49.0 (C-5), 40.8 (C-3), 23.3 (CH<sub>3</sub>-CO-NH), 21.1 (CH<sub>3</sub>-CO-O), 20.9 (CH<sub>3</sub>-CO-O), 20.9 (CH<sub>3</sub>-CO-O), 20.9 (CH<sub>3</sub>-CO-O).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Literatur überein.<sup>106-108</sup>

7.6.18 Darstellung von Methyl-*[n*-hex-5-enyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-*D*-glycero- $\alpha$ -*D*-galacto-2-nonulopyranosid)]onat (**11**)<sup>51, 109, 110</sup>

Es wurden 1.2 g Molekularsieb 4 Å, 1.2 g wasserfreies Calciumchlorid und 1.20 g (2.35 mmol) **12** in 10.0 mL 5-Hexen-1-ol (8.30 g, 82.9 mmol) suspendiert. Bei -10 °C und unter Lichtausschluss wurden 2.0 g frisch dargestelltes Silbersalicylat<sup>109</sup> zugefügt. Die Reaktionssuspension wurde anschließend unter Lichtausschluss für 67 h bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 15 mL Dichlormethan verdünnt und über Celite® filtriert. Der Filtrationsrückstand wurde mehrfach mit Dichlormethan gewaschen. Der entstandene Niederschlag wurde durch Waschen der organischen Phase mit Wasser entfernt. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und nach Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (EtOAc/PE, 2:1) gereinigt.

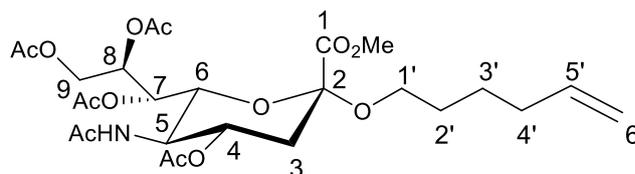
Es wurden 1.13 g (1.97 mmol) Methyl-*[n*-hex-5-enyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-*D*-glycero- $\alpha$ -*D*-galacto-2-nonulopyranosid)]onat (**11**) erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 84 %.

**Charakterisierung:**

farbloser Schaum

R<sub>f</sub>-Wert (EtOAc/PE, 2:1): 0.23

Drehwert [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>23</sup>: -10.1° (c = 1.0 CHCl<sub>3</sub>)



M = 573.59 g/mol  
C<sub>26</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>13</sub>

**HR-MS (ESI):** *m/z* = ber.: 574.25 [M+H]<sup>+</sup>, 596.23 [M+Na]<sup>+</sup>

gef.: 574.25 [M+H]<sup>+</sup>, 596.23 [M+Na]<sup>+</sup>

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm]** = 5.80 (ddt, 1H, <sup>3</sup>J<sub>5',6'E</sub> = 17.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>5',6'Z</sub> = 10.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>4',5'</sub> = 6.4 Hz, **H-5'**), 5.40-5.37 (m, 1H, **H-8**), 5.32 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>7,8</sub> = 8.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>6,7</sub> = 1.8 Hz, **H-7**), 5.18 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 9.1 Hz, NHAc), 5.00 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>5',6'E</sub> = 17.0 Hz, <sup>2</sup>J<sub>6'Z,6'E</sub> = 1.8 Hz, **H-6'E**), 4.93 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>5',6'Z</sub> = 10.1 Hz, **H-6'Z**), 4.84 (ddt, 1H, <sup>3</sup>J<sub>3ax,4</sub> = 12.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3eq,4</sub> = 4.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>4,5</sub> = 10.0 Hz, **H-4**), 4.31 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>8,9a</sub> = 2.6 Hz, <sup>2</sup>J<sub>9a,9b</sub> = 12.6 Hz, **H-9a**), 4.11-4.03 (m, 3H, **H-5**, **H-6**, **H-9b**), 3.79 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.76-3.73 (m, 1H, **H-1'a**), 3.22 (dt, 1H, <sup>2</sup>J<sub>1'a,1'b</sub> = 9.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>1'b,2'</sub> = 6.4 Hz, **H-1'b**), 2.57 (dd, 1H, <sup>2</sup>J<sub>3ax,3eq</sub> = 12.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3eq,4</sub> = 4.6 Hz, **H-3eq**), 2.14 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO-O), 2.13 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO-O), 2.08-2.02 (m, 8H, 2x CH<sub>3</sub>-CO-O, **H-4'**), 1.97-1.91 (m, 1H, **H-3ax**), 1.88 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO-NH), 1.60-1.52 (m, 2H, **H-2'**), 1.49-1.40 (m, 2H, **H-3'**).

**<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm]** = 171.2 (CH<sub>3</sub>-CO-O), 170.8 (CH<sub>3</sub>-CO-O), 170.3 (CH<sub>3</sub>-CO-NH), 170.2 (CH<sub>3</sub>-CO-O), 170.1 (CH<sub>3</sub>-CO-O), 168.6 (**C-1**), 138.8 (**C-5'**), 114.5 (**C-6'**), 98.7 (**C-2**) 72.4 (**C-6**), 69.2 (**C-4**), 68.7 (**C-8**), 67.4 (**C-7**), 64.3 (**C-1'**), 62.3 (**C-9**), 52.6 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 49.5 (**C-5**), 38.1 (**C-3**), 29.4 (**C-4'**), 28.7 (**C-2'**), 23.2 (CH<sub>3</sub>-CO-NH), 21.1 (CH<sub>3</sub>-CO-O), 20.9 (CH<sub>3</sub>-CO-O), 20.8 (CH<sub>3</sub>-CO-O), 20.8 (CH<sub>3</sub>-CO-O).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen aus vorangegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe<sup>93</sup> überein.

7.6.19 Darstellung von Methyl-[*n*-pent-5-ylsäure-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy-*D*-glycero- $\alpha$ -*D*-galacto-2-nonulopyranosid)]onat (**5**)<sup>51, 111, 112</sup>

Bei 0 °C wurden 808 mg (1.41 mmol, 1 eq) **11**, 1.50 g (7.01 mmol, 5 eq) NaIO<sub>4</sub> und 29 mg (0.14 mmol, 0.1 eq) RuCl<sub>3</sub>·xH<sub>2</sub>O in 10 mL einer Mischung aus CCl<sub>4</sub>/MeCN/H<sub>2</sub>O (2:2:3) suspendiert und für 3 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in einem Gemisch aus Aceton/Toluol (2:1) aufgenommen. Nach Filtration der unlöslichen Bestandteile über Celite® wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (Aceton/Toluol, 2:1) gereinigt.

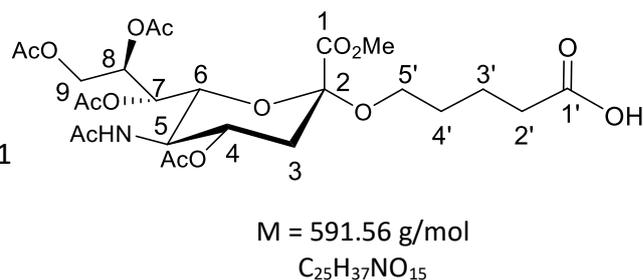
Es wurden 685 mg (1.16 mmol) Methyl-[*n*-pent-5-ylsäure-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy-*D*-glycero- $\alpha$ -*D*-galacto-2-nonulopyranosid)]onat (**5**) erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 82 %.

**Charakterisierung:**

gelblicher Schaum

R<sub>f</sub>-Wert (Toluol/Aceton/AcOH, 1:1:0.1): 0.51

Drehwert [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>23</sup>: -10.8° (c = 1.0 CHCl<sub>3</sub>)



**HR-MS (ESI):** *m/z* = ber.: 614.21 [M+Na]<sup>+</sup>

gef.: 614.20 [M+Na]<sup>+</sup>

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 5.42-5.39 (m, 1H, H-8), 5.30 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>6,7</sub> = 1.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>7,8</sub> = 8.7 Hz, H-7), 5.18 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 9.1 Hz, NHAc), 4.84 (ddd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>4,5</sub> = 9.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3ax,4</sub> = 12.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3eq,4</sub> = 4.6 Hz, H-4), 4.31 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>8,9a</sub> = 2.5 Hz, <sup>2</sup>J<sub>9a,9b</sub> = 12.5 Hz, H-9a), 4.11-4.02 (m, 3H, H-5, H-6, H-9b), 3.79-3.75 (m, 4H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, H-5'a), 3.24 (dt, 1H, <sup>3</sup>J<sub>4,5'b</sub> = 6.2 Hz, <sup>2</sup>J<sub>5'a,5'b</sub> = 9.7 Hz, H-5'b), 2.56 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>3eq,4</sub> = 4.6 Hz, <sup>2</sup>J<sub>3ax,3eq</sub> = 12.9 Hz, H-3eq), 2.40-2.37 (m, 2H, H-2'), 2.14, 2.14 (2x s, 2x 3H, 2x CH<sub>3</sub>-CO-O), 2.04 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO-O), 2.02 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO-O), 1.97-1.92 (m, 1H, H-3ax), 1.83 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO-NH), 1.75-1.68 (m, 2H, H-3'), 1.66-1.58 (m, 2H, H-4').

**<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 100.1 (C-2), 72.3 (C-6), 69.1 (C-4), 68.7 (C-8), 67.4 (C-7), 64.3 (C-5'), 62.5 (C-9), 52.7 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 49.6 (C-5), 37.9 (C-3), 33.4 (C-2'), 28.8 (C-4'), 23.1 (CH<sub>3</sub>-CO-NH), 20.8 (CH<sub>3</sub>-CO-O), 20.8 (CH<sub>3</sub>-CO-O), 20.7 (CH<sub>3</sub>-CO-O), 20.7 (CH<sub>3</sub>-CO-O).**

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen aus vorangegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe<sup>93</sup> überein.

7.6.20 Darstellung von Methyl-(methyl-5-acetamido-3,5-dideoxy- $\alpha$ -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid)onat <sup>106, 126, 127</sup>

Angelehnt an eine literaturbekannte Vorschrift<sup>127</sup> wurden 4.90 g (9.61 mmol) **12** in 294 mL absoluten MeOH gelöst und mit einer Spatelspitze Molsieb 3 Å versetzt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit einer frisch dargestellten Natriummethanolat-Lösung auf einen pH-Wert von 9 eingestellt. Nach 4 h konnte das Reaktionsende per DC detektiert werden. Die Reaktionslösung wurde mit Amberlite IR 120 H<sup>+</sup> neutralisiert und filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt zweimal säulenchromatographisch (EtOAc/MeOH, 4:1; EtOAc/EtOH, 4:1) gereinigt.

Es wurden 1.69 g (5.01 mmol) Methyl-(methyl-5-acetamido-3,5-dideoxy- $\alpha$ -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid)onat erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 52 %.

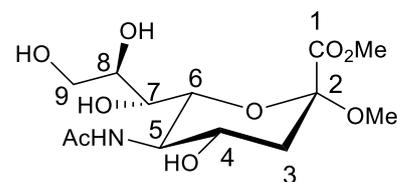
**Charakterisierung:**

farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 158 °C

R<sub>f</sub>-Wert (EtOAc/EtOH, 4:1): 0.14

Drehwert [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>23</sup>: -7.0° (c = 1.0 MeOH)



M = 337.33 g/mol  
C<sub>13</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>9</sub>

**HR-MS (ESI):**  $m/z$  = ber.: 338.14 [M+H]<sup>+</sup>, 360.12 [M+Na]<sup>+</sup>  
gef.: 338.15 [M+H]<sup>+</sup>, 360.16 [M+Na]<sup>+</sup>

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, MeOD):**  $\delta$  [ppm] = 3.87-3.84 (m, 4H, H-9a, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.82-3.80 (m, 1H, H-8), 3.78-3.73 (m, 1H, H-5), 3.67-3.62 (m, 2H, H-9b, H-4), 3.57 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>7,6</sub> = 1.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>6,5</sub> = 10.4 Hz, H-6), 3.51 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>8,7</sub> = 8.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>7,6</sub> = 1.6 Hz, H-7), 3.34 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2.65 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>3eq,4</sub> = 4.7 Hz, <sup>2</sup>J<sub>3ax,3eq</sub> = 12.8 Hz, H-3eq), 2.00 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO-NH), 1.71 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>4,3ax</sub> = 11.8 Hz, <sup>2</sup>J<sub>3ax,3eq</sub> = 12.8 Hz, H-3ax).

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = 175.2 (CH<sub>3</sub>-CO-NH), 170.8 (C-1), 100.2 (C-2), 74.8 (C-6), 72.5 (C-8), 70.1 (C-7), 68.5 (C-4), 64.7 (C-9), 53.8 (C-5), 53.3 (CH<sub>3</sub>-CO-O), 51.9 (OCH<sub>3</sub>), 41.4 (C-3), 22.6 (CH<sub>3</sub>-CO-NH).**

### 7.6.21 Darstellung von Methyl-5-acetamido-3,5-dideoxy- $\alpha$ -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosidonsäure<sup>106, 126, 127</sup>

Es wurden 715 mg (2.12 mmol) des unter 7.6.20 dargestellten  $\alpha$ -Glycosids in 20 mL dest. Wasser aufgenommen. Mit einer 0.1 M NaOH-Lösung wurde ein pH-Wert von 11-12 eingestellt. Der pH-Wert wurde während der Reaktion regelmäßig überprüft und gegebenenfalls nachkorrigiert. Nach 2 h konnte das Reaktionsende per DC detektiert werden. Die Reaktionslösung wurde mit Amberlite IR 120 H<sup>+</sup> neutralisiert, anschließend filtriert und gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wurde per Gelpermeationschromatographie an Biogel P2 gereinigt.

Es wurden 622 mg (1.92 mmol) Methyl-5-acetamido-3,5-dideoxy- $\alpha$ -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosidonsäure erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 91 %.

#### Charakterisierung:

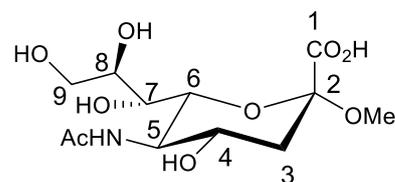
farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 117 °C

R<sub>f</sub>-Wert (*iso*-Prop/H<sub>2</sub>O/AcOH, 20:5:1): 0.42

HR-MS (ESI):  $m/z$  = ber.: 346.11 [M+Na]<sup>+</sup>

gef.: 346.10 [M+Na]<sup>+</sup>



M = 323.30 g/mol

C<sub>12</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>9</sub>

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] = 3.89-3.85 (m, 2H, H-9a, H-8), 3.82-3.78 (m, 1H, H-5), 3.70 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>7,6</sub> = 1.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>6,5</sub> = 10.4 Hz, H-6), 3.67-3.62 (m, 2H, H-9b, H-4), 3.58 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>7,6</sub> = 1.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>8,7</sub> = 9.2 Hz, H-7), 3.33 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2.71 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>3eq,4</sub> = 4.7 Hz, <sup>2</sup>J<sub>3ax,3eq</sub> = 12.4 Hz, H-3eq), 2.03 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO-NH), 1.64-1.60 (m, 1H, H-3ax).

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O):**  $\delta$  [ppm] = 175.2 (CH<sub>3</sub>-CO-NH), 173.5 (C-1), 100.8 (C-2), 72.7 (C-6), 71.7 (C-8), 68.3 (C-7), 68.3 (C-4), 62.7 (C-9), 52.0 (C-5), 51.6 (CH<sub>3</sub>-CO-O), 40.2 (C-3), 22.1 (CH<sub>3</sub>-CO-NH).

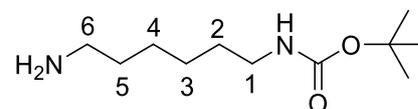
### 7.6.22 Darstellung von *N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-1,6-diaminohexan (**16**)<sup>115</sup>

Angelehnt an eine literaturbekannte Vorschrift<sup>115</sup> wurden 3.30 mL (3.37 g, 15.4 mmol) Di-*tert*-butyldicarbonat in 25 mL Dichlormethan gelöst und bei RT langsam zu 5.45 g (46.9 mmol) Hexamethyldiamin gelöst in 42 mL Dichlormethan getropft.

Es wurde 20 h bei RT gerührt und anschließend über Celite® filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der ölige Rückstand in 67 mL EtOAc aufgenommen und mit 10 mL H<sub>2</sub>O und 13 mL NaCl-Lösung gewaschen. Die Lösung wurde über Natriumsulfat getrocknet und nach Entfernung des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (DCM/EtOH/NH<sub>3</sub>, 15:15:1) gereinigt.

Es wurden 1.89 g (8.74 mmol) *N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-1,6-diaminohexan (**16**) erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 57 %.

#### Charakterisierung:



M = 216.32 g/mol  
C<sub>11</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

gelblicher halbfester Feststoff

R<sub>f</sub>-Wert (DCM/EtOH/NH<sub>3</sub>, 15:15:1): 0.35

**HR-MS (ESI):** *m/z* = ber.: 217.33 [M+H]<sup>+</sup>

gef.: 217.19 [M+H]<sup>+</sup>

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ [ppm] = 4.53 (s, 1H, NH), 3.10-3.09 (m, 2H, H-1), 2.68 (t, 2H, <sup>3</sup>J<sub>5,6</sub> = 7.0 Hz, H-6), 1.48-1.43 (m, 13H, 3x CH<sub>3</sub>, H-2, H-5), 1.32-1.31 (m, 4H, H-3, H-4).

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ [ppm] = 156.1 (CO), 79.1 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 42.2 (C-6), 40.6 (C-1), 33.7 (C-5), 30.2 (C-2), 28.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 26.7, 26.3 (C-3, C-4).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Literatur überein.<sup>115</sup>

7.6.23  $N^1, N^3, N^5$ -Tris(6-*tert*-butyloxycarbonylaminohex-1-yl)-1,3,5-benzentricarbonsäureamid (**15**)<sup>113, 114</sup>

In Anlehnung an eine literaturbekannte Vorschrift<sup>113</sup> wurden 1.06 g (4.91 mmol) **16** und 6.8 mL abs. Pyridin in 17 mL abs. Dichlormethan gelöst. Bei 0 - 5 °C wurden 321 mg (1.21 mmol) Trimesoylchlorid gelöst in 17 mL abs. Dichlormethan zu der Lösung gegeben. Die Reaktionslösung wurde für 44 h bei RT gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Gemisch zweimal mit je 25 mL H<sub>2</sub>O gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und dreimal mit Toluol codestilliert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/AcOH, 29:1:0.5 → CHCl<sub>3</sub>/MeOH/AcOH 19:1:0.5) gereinigt.

Es wurden 926 mg (1.15 mmol)  $N^1, N^3, N^5$ -Tris(6-*tert*-butyloxycarbonylaminohex-1-yl)-1,3,5-benzentricarbonsäureamid (**15**) erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 95 %.

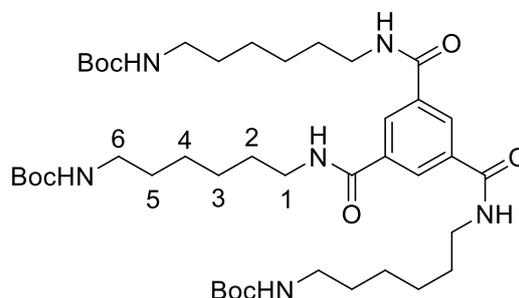
**Charakterisierung:**

farbloser Feststoff

R<sub>f</sub>-Wert (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/AcOH, 9:1:0.5): 0.45

**HR-MS (ESI):**  $m/z$  = ber.: 805.54 [M+H]<sup>+</sup>, 827.53 [M+Na]<sup>+</sup>  
gef.: 805.54 [M+H]<sup>+</sup>, 827.53 [M+Na]<sup>+</sup>

M = 805.06 g/mol  
C<sub>42</sub>H<sub>72</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub>



**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 8.43 (s, 3H, H<sub>arom</sub>), 6.99 (bs, 3H, CONH), 4.73 (bs, 3H, NHBoc), 3.46-3.42 (m, 6H, H-1), 3.12 (t, 6H, <sup>3</sup>J<sub>5,6</sub> = 6.8 Hz, H-6), 1.62-1.57 (m, 6H, H-2), 1.50-1.45 (m, 6H, H-5), 1.40 (s, 27H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.38-1.35 (m, 12H, H-3, H-4).

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 166.1 (NH-CO), 156.5 (NH-CO-O), 135.5 (C<sub>arom</sub>), 128.4 (C<sub>arom</sub>H), 40.1 (C-6), 39.8 (C-1), 30.1 (C-5), 29.3 (C-2), 28.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 26.1, 25.9 (C-3, C-4).

7.6.24 Darstellung von  $N^1, N^3, N^5$ -Tris(1-azido-14-oxo-3,6,9,12-tetraoxa-15-azahenicosan-21-yl)-1,3,5-benzentricarbonsäureamid (**26**)

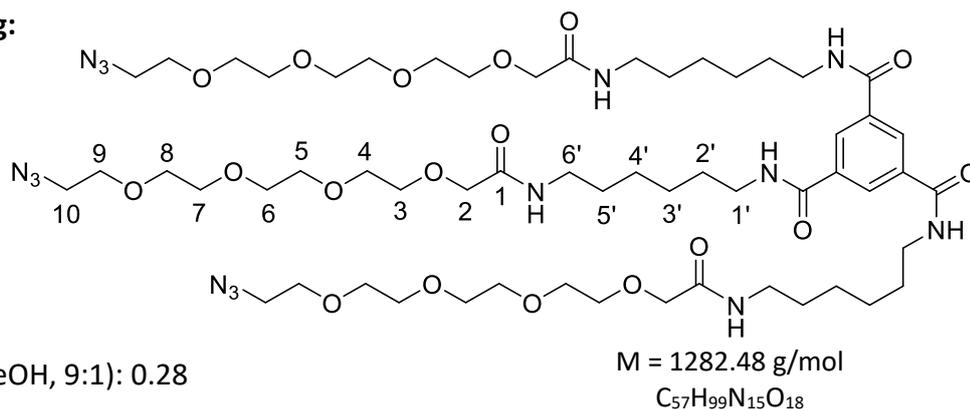
Es wurden 440 mg (547  $\mu$ mol) **15** in 15 mL TFA/TIPS/H<sub>2</sub>O (95:5:2) für 30 min bei RT zu 271 mg (537  $\mu$ mol) **7** umgesetzt. Nach Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck und anschließender dreimaliger Coevaporation mit Toluol, um TFA-Rückstände zu entfernen, wurde der erhaltene Rückstand ohne weitere Aufarbeitung für die nachfolgende Synthese eingesetzt.

Zunächst wurden 628 mg (2.26 mmol, 4.5 eq) **6** und 1.85 g (4.87 mmol, 9 eq) HATU eingewogen und für 1.5 h im HV getrocknet. Anschließend wurde der Rückstand in 6 mL DMF aufgenommen und bei RT wurden 913  $\mu$ L (694 mg, 5.37 mmol, 10 eq) DIPEA und 271 mg (537  $\mu$ mol, 1 eq) **7** gelöst in 6 mL DMF zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 48 h bei RT gerührt.

Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 5 mL MeOH aufgenommen. Es wurde dreimal mit Toluol coevaporiert. Der erhaltene Rückstand wurde in 30 mL DCM aufgenommen und zweimal mit je 15 mL 0.5 M HCl gewaschen. Anschließend wurde noch mit 20 mL NaHCO<sub>3</sub>, mit 20 mL gesättigter NaCl-Lösung und mit 15 mL H<sub>2</sub>O gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und nach Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt dreimal säulenchromatographisch (DCM/MeOH/AcOH, 9:1:0.1; DCM/MeOH, 9:2; DCM/MeOH, 9:1) an Kieselgel gereinigt.

Es wurden 139 mg (108  $\mu$ mol)  $N^1, N^3, N^5$ -Tris(1-azido-14-oxo-3,6,9,12-tetraoxa-15-azahenicosan-21-yl)-1,3,5-benzentricarbonsäureamid (**26**) erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 20 % bezogen auf **7**.

## Charakterisierung:



**HR-MS (ESI):**  $m/z$  = ber.: 1282.73 [M+H]<sup>+</sup>, 641.87 [M+2H]<sup>2+</sup>, 652.86 [M+H+Na]<sup>2+</sup>  
gef.: 1282.73 [M+H]<sup>+</sup>, 641.87 [M+2H]<sup>2+</sup>, 652.85 [M+H+Na]<sup>2+</sup>

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 8.37 (s, 3H, H<sub>arom</sub>), 7.17-7.16 (m, 3H, NH-C<sub>arom</sub>O), 7.11-7.07 (m, 3H, NH-CO), 3.95 (s, 6H, H-2), 3.66-3.64 (m, 42H, H-3, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9), 3.45-3.42 (m, 6H, H-1') 3.37 (t, 6H, <sup>3</sup>J = 5.0 Hz, H-10), 3.31-3.28 (m, 6H, H-6'), 1.61-1.59 (m, 6H, H-2'), 1.55-1.53 (m, 6H, H-5'), 1.43-1.34 (m, 12H, H-3', H-4').

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 170.3 (C-1), 166.1 (NH-CO), 135.3 (C<sub>arom</sub>), 128.5 (C<sub>arom</sub>H), 71.1, 70.8, 70.7, 70.7, 70.6, 70.5, 70.3 (C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9), 70.1 (C-2), 50.8 (C-10), 39.7 (C-1'), 38.3 (C-6'), 29.5, 29.3 (C-2', C-5'), 26.0, 25.9 (C-3', C-4').

---

7.6.25 Darstellung von *N*<sup>1</sup>,*N*<sup>3</sup>,*N*<sup>5</sup>-Tris(1-azido-11-oxo-3,6,9-trioxa-12-azaooctadecan-18-yl)-1,3,5-benzentricarbonsäureamid (**25**)

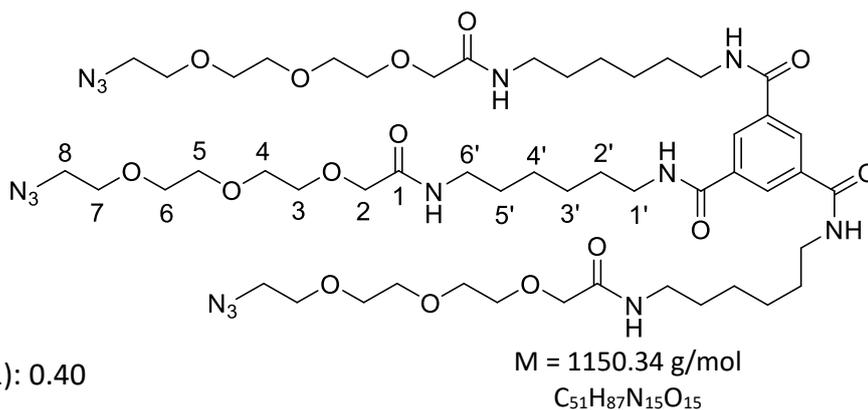
Es wurden 436 mg (542  $\mu$ mol) **15** in 14 mL TFA/TIPS/H<sub>2</sub>O (95:5:2) für 30 min bei RT zu 268 mg (530  $\mu$ mol) **7** umgesetzt. Nach Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck und anschließender dreimaliger Coevaporation mit Toluol, um TFA-Rückstände zu entfernen, wurde der erhaltene Rückstand ohne weitere Aufarbeitung für die nachfolgende Synthese eingesetzt.

Zunächst wurden 568 mg (2.43 mmol, 4.5 eq) **17** und 1.75 g (4.60 mmol, 9 eq) HATU eingewogen und für 1.5 h im HV getrocknet. Anschließend wurde der Rückstand in 5 mL DMF aufgenommen und bei RT wurden 901  $\mu$ L (685 mg, 5.30 mmol, 10 eq) DIPEA und 268 mg (530  $\mu$ mol, 1 eq) **7** gelöst in 5 mL DMF zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 48 h bei RT gerührt.

Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 5 mL MeOH aufgenommen. Es wurde dreimal mit Toluol coevaporiert. Der erhaltene Rückstand wurde in 30 mL DCM aufgenommen und zweimal mit je 15 mL 0.5 M HCl gewaschen. Anschließend wurde noch mit 20 mL NaHCO<sub>3</sub>, mit 20 mL gesättigter NaCl-Lösung und mit 15 mL H<sub>2</sub>O gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und nach Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt zweimal säulenchromatographisch (DCM/MeOH/AcOH, 9:1:0.1; DCM/MeOH, 9:1) an Kieselgel gereinigt.

Es wurden 201 mg (174  $\mu$ mol) *N*<sup>1</sup>,*N*<sup>3</sup>,*N*<sup>5</sup>-Tris(1-azido-11-oxo-3,6,9-trioxa-12-azaooctadecan-18-yl)-1,3,5-benzentricarbonsäureamid (**25**) erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 33 % bezogen auf **7**.

## Charakterisierung:



farbloses Öl

R<sub>f</sub>-Wert (DCM/MeOH, 9:1): 0.40

**HR-MS (ESI):**  $m/z$  = ber.: 1150.65 [M+H]<sup>+</sup>, 575.83 [M+2H]<sup>2+</sup>, 594.81 [M+H+K]<sup>2+</sup>  
 gef.: 1150.65 [M+H]<sup>+</sup>, 575.83 [M+2H]<sup>2+</sup>, 594.80 [M+H+K]<sup>2+</sup>

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 8.34 (s, 3H, H<sub>arom</sub>), 4.05 (s, 6H, H-2), 3.72-3.62 (m, 30H, H-3, H-4, H-5, H-6, H-7), 3.47-3.42 (m, 6H, H-1'), 3.37 (t, 6H, <sup>3</sup>J = 5.2 Hz, H-8), 3.33-3.28 (m, 6H, H-6'), 1.65-1.63 (m, 6H, H-2'), 1.58-1.54 (m, 6H, H-5'), 1.38-1.36 (m, 12H, H-3', H-4').

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 171.2 (C-1), 166.1 (NH-CO), 137.6 (C<sub>arom</sub>), 128.6 (C<sub>arom</sub>H), 71.1, 70.8, 70.7, 70.5, 70.3 (C-3, C-4, C-5, C-6, C-7), 69.9 (C-2), 47.8 (C-8), 42.4 (C-1'), 39.6 (C-6'), 29.4, 29.3 (C-2', C-5'), 26.1, 25.9 (C-3', C-4').

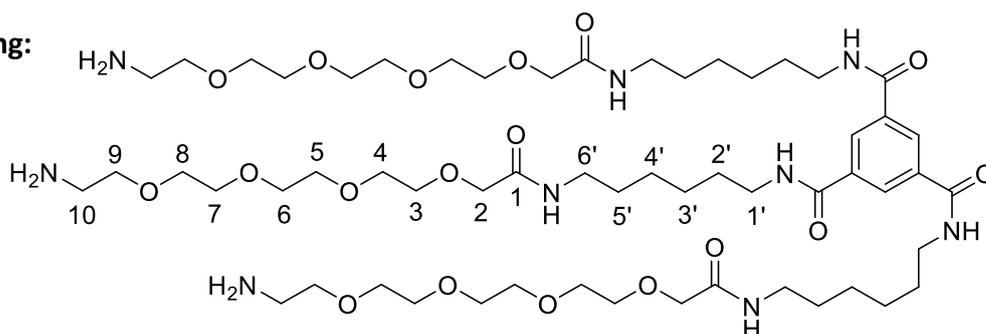
7.6.26 Darstellung von  $N^1, N^3, N^5$ -Tris(1-amino-14-oxo-3,6,9,12-tetraoxa-15-azahenicosan-21-yl)-1,3,5-benzentricarbonsäureamid (**28**)

Es wurden 50.4 mg (39.3  $\mu\text{mol}$ ) **26** in 5 mL MeOH gelöst. Es wurden 0.05 mL AcOH und eine Spatelspitze Pd/C hinzugegeben. Der Reaktionskolben wurde mit Wasserstoff geflutet und die Reaktion für 2 h bis zur vollständigen Umsetzung des Eduktes bei RT gerührt.

Der Katalysator wurde mittels Filtration über Celite<sup>®</sup> entfernt. Das Lösungsmittel wurde anschließend unter vermindertem Druck entfernt.

Es wurden 42.0 mg (34.9  $\mu\text{mol}$ )  $N^1, N^3, N^5$ -Tris(1-amino-14-oxo-3,6,9,12-tetraoxa-15-azahenicosan-21-yl)-1,3,5-benzentricarbonsäureamid (**28**) erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 89 %.

**Charakterisierung:**



farbloses Öl

R<sub>f</sub>-Wert (DCM/MeOH, 9:1): 0.00

M = 1204.49 g/mol  
C<sub>57</sub>H<sub>105</sub>N<sub>9</sub>O<sub>18</sub>

**HR-MS (ESI):**  $m/z$  = ber.: 602.88 [M+2H]<sup>2+</sup>, 402.26 [M+3H]<sup>3+</sup>  
gef.: 602.88 [M+2H]<sup>2+</sup>, 402.26 [M+3H]<sup>3+</sup>

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, MeOD):**  $\delta$  [ppm] = 8.37 (s, 3H, H<sub>arom</sub>), 4.00 (s, 6H, H-2), 3.73-3.62 (m, 42H, H-3, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9), 3.40 (t, 6H, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, H-1'), 3.27-3.23 (m, 6H, H-6'), 3.11 (t, 6H, <sup>3</sup>J = 5.0 Hz, H-10), 1.67-1.63 (m, 6H, H-2'), 1.57-1.54 (m, 6H, H-5'), 1.43-1.40 (m, 12H, H-3', H-4').

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = 172.5 (C-1), 168.6 (NH-CO), 136.8 (C<sub>arom</sub>), 129.7 (C<sub>arom</sub>H), 71.7, 71.4, 71.3, 71.2, 71.2, 71.0, 70.8 (C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9), 67.9 (C-2), 41.0 (C-1'), 40.5 (C-10), 39.8 (C-6'), 30.3, 30.3 (C-2', C-5'), 27.6, 27.5 (C-3', C-4').**

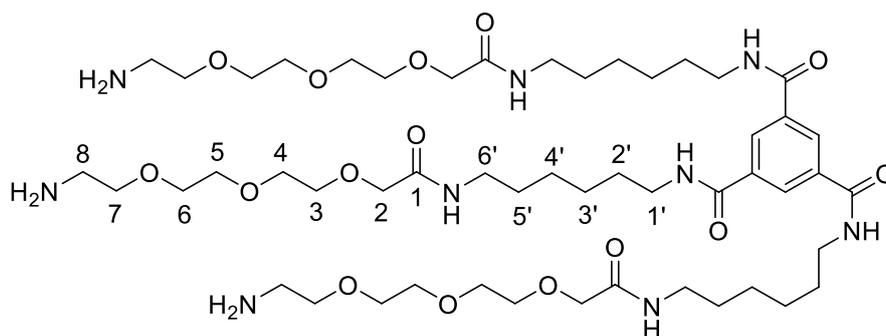
7.6.27 Darstellung von  $N^1, N^3, N^5$ -Tris(1-amino-11-oxo-3,6,9-trioxa-12-azaoctadecan-18-yl)-1,3,5-benzentricarbonsäureamid (**27**)

Es wurden 139 mg (121  $\mu$ mol) **25** in 10 mL MeOH gelöst. Es wurden 0.1 mL AcOH und eine Spatelspitze Pd/C hinzugegeben. Der Reaktionskolben wurde mit Wasserstoff geflutet und die Reaktion für 2 h bis zur vollständigen Umsetzung des Eduktes bei RT gerührt.

Der Katalysator wurde mittels Filtration über Celite® entfernt. Das Lösungsmittel wurde anschließend unter vermindertem Druck entfernt.

Es wurden 112 mg (104  $\mu$ mol)  $N^1, N^3, N^5$ -Tris(1-amino-11-oxo-3,6,9-trioxa-12-azaoctadecan-18-yl)-1,3,5-benzentricarbonsäureamid (**27**) erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 86 %.

**Charakterisierung:**



farbloses Öl

$R_f$ -Wert (DCM/MeOH, 9:1): 0.00

M = 1072.35 g/mol  
C<sub>51</sub>H<sub>93</sub>N<sub>9</sub>O<sub>15</sub>

**HR-MS (ESI):**  $m/z$  = ber.: 545.36 [M+H+NH<sub>4</sub>]<sup>2+</sup>, 358.23 [M+3H]<sup>3+</sup>  
gef.: 545.35 [M+2H]<sup>2+</sup>, 358.28 [M+3H]<sup>3+</sup>

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, MeOD):**  $\delta$  [ppm] = 8.37 (s, 3H, H<sub>arom</sub>), 4.00 (s, 6H, H-2), 3.69-3.68 (m, 30H, H-3, H-4, H-5, H-6, H-7), 3.41 (t, 6H, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, H-1'), 3.27-3.24 (m, 6H, H-6'), 3.12 (t, 6H, <sup>3</sup>J = 5.0 Hz, H-8), 1.67-1.64 (m, 6H, H-2'), 1.58-1.53 (m, 6H, H-5'), 1.43-1.41 (m, 12H, H-3', H-4').

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, MeOD):**  $\delta$  [ppm] = 171.1 (C-1), 166.0 (NH-CO), 137.4 (C<sub>arom</sub>), 128.5 (C<sub>arom</sub>H), 71.4, 71.2, 71.1, 70.8, 70.7 (C-3, C-4, C-5, C-6, C-7), 68.1 (C-2), 42.3 (C-1'), 39.3 (C-8), 39.4 (C-6'), 29.0, 28.8 (C-2', C-5'), 26.2, 26.1 (C-3', C-4').

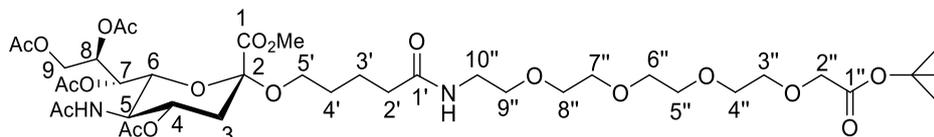
7.6.28 Darstellung von *tert*-Butyl 14-Amino-3,6,9,12-tetraoxatetradecan-[methyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy-*D*-glycero- $\alpha$ -*D*-galacto-2-nonulopyranosyl)onat-*n*-5-oxypentanoyl]onat (**33**)

Es wurden 161 mg (272  $\mu$ mol, 1 eq) **5** und 210 mg (552  $\mu$ mol, 2 eq) HATU eingewogen und für 1 h im HV getrocknet. Anschließend wurde der Rückstand in 3 mL DMF aufgenommen und bei RT wurden 133  $\mu$ L (101 mg, 783  $\mu$ mol, 3 eq) DIPEA und 80.1 mg (261  $\mu$ mol, 1 eq) **10** gelöst in 3 mL DMF zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 20 h bei RT gerührt.

Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in 3 mL MeOH aufgenommen und dreimal mit Toluol coevaporiert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (DCM/MeOH, 9:1) an Kieselgel gereinigt.

Es wurden 146 mg (166  $\mu$ mol) *tert*-Butyl 14-Amino-3,6,9,12-tetraoxatetradecan-[methyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy-*D*-glycero- $\alpha$ -*D*-galacto-2-nonulopyranosyl)onat-*n*-5-oxypentanoyl]onat (**33**) erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 56 % bezogen auf **10**.

**Charakterisierung:**



M = 880.93 g/mol  
C<sub>39</sub>H<sub>64</sub>N<sub>2</sub>O<sub>20</sub>

farbloses Öl

R<sub>f</sub>-Wert (DCM/MeOH, 9:1): 0.53

**HR-MS (ESI):** *m/z* = ber.: 881.41 [M+H]<sup>+</sup>, 903.39 [M+Na]<sup>+</sup>  
gef.: 881.40 [M+H]<sup>+</sup>, 903.38 [M+Na]<sup>+</sup>

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 5.39-5.36 (m, 1H, **H-8**), 5.30 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>6,7</sub> = 1.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>7,8</sub> = 8.3 Hz, **H-7**), 5.24 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 9.1 Hz, NHAc), 4.83 (ddd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>4,5</sub> = 9.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3ax,4</sub> = 12.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3eq,4</sub> = 4.5 Hz, **H-4**), 4.31 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>8,9a</sub> = 2.5 Hz, <sup>2</sup>J<sub>9a,9b</sub> = 12.3 Hz, **H-9a**), 4.10-4.03 (m, 3H, **H-5**, **H-6**, **H-9b**), 4.00 (s, 2H, **H-2''**), 3.79 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.77-3.74 (m, 1H, **H-5'a**), 3.73-3.60 (m, 12H, **H-**

3'', H-4'', H-5'', H-6'', H-7'', H-8''), 3.55 (t, 2H,  $^3J = 5.1$  Hz, H-9''), 3.46-3.44 (m, 2H, H-10''), 3.22 (dt, 1H,  $^3J_{4,5'b} = 6.5$  Hz,  $^2J_{5'a,5'b} = 9.4$  Hz, H-5'b), 2.56 (dd, 1H,  $^3J_{3eq,4} = 4.8$  Hz,  $^2J_{3ax,3eq} = 12.9$  Hz, H-3eq), 2.29-2.25 (m, 2H, H-2'), 2.13 (s, 6H, 2x CH<sub>3</sub>-CO-O), 2.03 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO-O), 2.01 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO-O), 1.96-1.89 (m, 1H, H-3ax), 1.87 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO-NH), 1.72-1.67 (m, 2H, H-3'), 1.62-1.55 (m, 2H, H-4'), 1.46 (s, 9H, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 169.6 (C-1''), 81.6 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 98.7 (C-2), 72.3 (C-6), 71.2, 70.7, 70.5, 70.5, 70.5, 70.2, 69.8 (C-3'', C-4'', C-5'', C-6'', C-7'', C-8'', C-9''), 69.1 (C-4), 68.9 (C-2''), 68.5 (C-8), 67.3 (C-7), 64.4 (C-5'), 62.5 (C-9), 52.6 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 49.5 (C-5), 49.5 (C-10''), 38.0 (C-3), 35.6 (C-2'), 28.8 (C-4'), 28.1 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 23.2 (CH<sub>3</sub>-CO-NH), 21.0 (CH<sub>3</sub>-CO-O), 20.8 (CH<sub>3</sub>-CO-O), 20.8 (CH<sub>3</sub>-CO-O), 20.8 (CH<sub>3</sub>-CO-O).**

---

### 7.6.29 Darstellung des Trisialosids des $N^1, N^3, N^5$ -Trihexylbenzen-1,3,5-tricarbonsäureamids (**3a**)

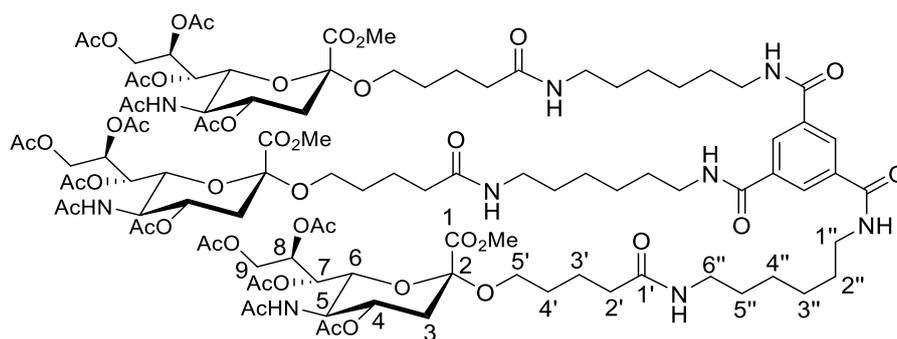
Es wurden 170 mg (211  $\mu\text{mol}$ ) **15** in 6 mL TFA/TIPS/ $\text{H}_2\text{O}$  (95:5:2) für 30 min bei RT zu 116 mg (230  $\mu\text{mol}$ ) **7** umgesetzt. Nach Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck und anschließender dreimaliger Coevaporation mit Toluol, um TFA-Rückstände zu entfernen, wurde der erhaltene Rückstand ohne weitere Aufarbeitung für die nachfolgende Synthese eingesetzt.

Zunächst wurden 467 mg (789  $\mu\text{mol}$ , 4 eq) **5** und 377 mg (992  $\mu\text{mol}$ , 5 eq) HATU eingewogen und für 1 h im HV getrocknet. Anschließend wurde der Rückstand in 1.5 mL DMF aufgenommen und bei RT wurden 370  $\mu\text{L}$  (282 mg, 2.18 mmol, 11 eq) DIPEA und 116 mg (230  $\mu\text{mol}$ , 1 eq) **7** gelöst in 0.7 mL DMF zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 25 h bei RT gerührt.

Das Rohprodukt wurde, um ein Abfallen des pH-Wertes zu verhindern, direkt im Reaktionslösungsmittel einer säulenchromatographischen Reinigung unterzogen. Zunächst wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (DCM/MeOH/Triethylamin, 9:1:0.2) an Kieselgel gereinigt. Dann erfolgte zweimal eine Reinigung mittels *RP*-HPLC per Hand an einer  $\text{C}_{18}$  Säule (Säulenmaterial: Nucleodur Pyramid, 250x21 mm, 5  $\mu\text{m}$ , 300 Å). Zur Elution diente ein Laufmittelgemisch aus  $\text{H}_2\text{O}$  und 20 % MeCN. Dann erfolgte eine Reinigung mittels *RP*-HPLC an einer  $\text{C}_{18}$  Säule von Macherey&Nagel (Nucleodur Pyramid, 250x21 mm, 5  $\mu\text{m}$ , 300 Å). Zur Elution dienten die Laufmittelgemische **A** ( $\text{H}_2\text{O}/\text{FA}$  100:0.1) und **B** (MeCN/FA 100:0.1). Anschließend erfolgte eine weitere normalphasige säulenchromatographische Reinigung (DCM/MeOH, 9:1) an Kieselgel.

Es wurden 53.8 mg (24.2  $\mu\text{mol}$ ) des Trisialosids des  $N^1, N^3, N^5$ -Trihexylbenzen-1,3,5-tricarbonsäureamids (**3a**) erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 32 % bezogen auf **7**.

## Charakterisierung:



farbloses Öl

R<sub>f</sub>-Wert (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/AcOH, 9:1:0.5): 0.45

M = 2225.36 g/mol

C<sub>102</sub>H<sub>153</sub>N<sub>9</sub>O<sub>45</sub>

**HR-MS (ESI):**  $m/z$  = ber.: 1113.01 [M+2H]<sup>2+</sup>, 1123.99 [M+H+Na]<sup>2+</sup>, 742.34 [M+3H]<sup>3+</sup>  
 gef.: 1113.01 [M+2H]<sup>2+</sup>, 1123.99 [M+H+Na]<sup>2+</sup>, 742.34 [M+3H]<sup>3+</sup>

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, MeOD):**  $\delta$  [ppm] = 8.38 (s, 3H, H<sub>arom</sub>), 5.40-5.36 (m, 3H, H-8), 5.32 (dd, 3H, <sup>3</sup>J<sub>6,7</sub> = 2.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>7,8</sub> = 8.8 Hz, H-7), 4.78 (ddd, 3H, <sup>3</sup>J<sub>4,5</sub> = 10.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3ax,4</sub> = 12.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3eq,4</sub> = 4.5 Hz, H-4), 4.30 (dd, 3H, <sup>3</sup>J<sub>8,9a</sub> = 2.4 Hz, <sup>2</sup>J<sub>9a,9b</sub> = 12.3 Hz, H-9a), 4.16 (dd, 3H, <sup>3</sup>J<sub>5,6</sub> = 2.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>6,7</sub> = 10.7 Hz, H-6), 4.05 (dd, 3H, <sup>3</sup>J<sub>8,9b</sub> = 5.6 Hz, <sup>2</sup>J<sub>9a,9b</sub> = 12.4 Hz, H-9b), 3.94 (dd, 3H, <sup>3</sup>J<sub>4,5</sub> = 10.4 Hz, H-5), 3.80 (s, 9H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.78-3.73 (m, 3H, H-5'a), 3.40 (t, 6H, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, H-1''), 3.25 (dt, 3H, <sup>3</sup>J<sub>4,5'b</sub> = 6.2 Hz, <sup>2</sup>J<sub>5'a,5'b</sub> = 9.4 Hz, H-5'b), 3.18 (t, 6H, <sup>3</sup>J<sub>5,6</sub> = 6.9 Hz, H-6''), 2.61 (dd, 3H, <sup>3</sup>J<sub>3eq,4</sub> = 4.7 Hz, <sup>2</sup>J<sub>3ax,3eq</sub> = 12.7 Hz, H-3eq), 2.19 (t, 6H, <sup>3</sup>J<sub>2',3'</sub> = 7.3 Hz, H-2'), 2.13 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-CO-O), 2.10 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-CO-O), 1.99 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-CO-O), 1.83 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-CO-NH), 1.79 (t, 3H, <sup>2</sup>J<sub>3ax,3eq</sub> = 12.5 Hz, H-3ax), 1.68-1.60 (m, 12H, H-3', H-2''), 1.56-1.50 (m, 6H, H-4', H-5''), 1.42-1.40 (m, 12H, H-3'', H-4'').

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, MeOD):**  $\delta$  [ppm] = 175.9 (C-1'), 173.5 (CH<sub>3</sub>-CO-NH), 172.4 (CH<sub>3</sub>-CO-O), 171.8 (CH<sub>3</sub>-CO-O), 171.7 (CH<sub>3</sub>-CO-O), 171.5 (CH<sub>3</sub>-CO-O), 169.7 (C-1), 168.6 (NH-CO), 136.8 (C<sub>arom</sub>), 129.7 (C<sub>arom</sub>H), 100.0 (C-2), 73.1 (C-6), 70.7 (C-4), 69.5 (C-8), 68.7 (C-7), 65.5 (C-5'), 63.5 (C-9), 53.2 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 50.1 (C-5), 41.0 (C-1''), 40.2 (C-6''), 39.1 (C-3), 36.6 (C-2'), 30.1 (C-4'), 30.4, 23.6 (C-2'', C-5''), 27.6, 27.6 (C-3'', C-4''), 22.7 (CH<sub>3</sub>-CO-NH), 21.3 (CH<sub>3</sub>-CO-O), 20.9 (CH<sub>3</sub>-CO-O), 20.7 (CH<sub>3</sub>-CO-O), 20.7 (CH<sub>3</sub>-CO-O).

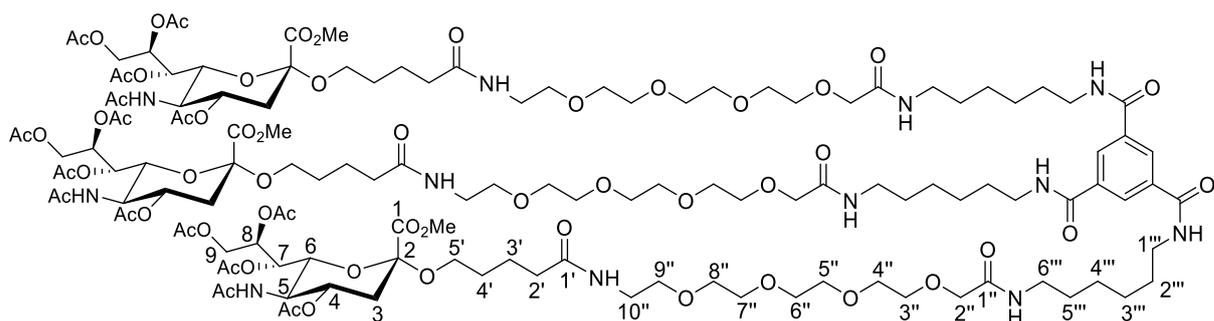
---

7.6.30 Darstellung des Trisialosids des  $N^1, N^3, N^5$ -Trihexylbenzen-1,3,5-tricarbonsäureamids (**4a**)

Es wurden 197 mg (332  $\mu\text{mol}$ , 3.5 eq) **5** und 192 mg (505  $\mu\text{mol}$ , 5 eq) HATU eingewogen und für 1 h im HV getrocknet. Anschließend wurde der Rückstand in 0.8 mL DMF aufgenommen und bei RT wurden 170  $\mu\text{L}$  (129 mg, 996  $\mu\text{mol}$ , 12 eq) DIPEA und 113 mg (93.8  $\mu\text{mol}$ , 1 eq) **28** gelöst in 0.8 mL DMF zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde bei RT gerührt. Nach 10 min wurden weitere 90  $\mu\text{L}$ , nach 1.5 h weitere 50  $\mu\text{L}$  und nach 20 h weitere 90  $\mu\text{L}$  DIPEA zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für insgesamt 22 h bei RT gerührt.

Das Reaktionsgemisch wurde in 3 mL Xylol aufgenommen und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde erneut in 2 mL MeOH aufgenommen und mit Xylol coevaporiert. Das Rohprodukt wurde zunächst mittels RP-HPLC per Hand an einer  $\text{C}_{18}$  Säule (Säulenmaterial: Nucleodur Pyramid, 250x21 mm, 5  $\mu\text{m}$ , 300 Å) gereinigt. Zur Elution diente ein Laufmittelgemisch aus  $\text{H}_2\text{O}$  und 20 % MeCN. Anschließend erfolgte zweimal eine normalphasige säulenchromatographische Reinigung (DCM/MeOH, 9:1  $\rightarrow$  DCM/MeOH, 3:1) an Kieselgel.

Es wurden 87.1 mg (29.8  $\mu\text{mol}$ ) des Trisialosids des  $N^1, N^3, N^5$ -Trihexylbenzen-1,3,5-tricarbonsäureamids (**4a**) erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 32 % bezogen auf **28**.

**Charakterisierung:**

farbloses Öl

R<sub>f</sub>-Wert (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/AcOH, 9:1:0.5): 0.45

M = 2925.15 g/mol

C<sub>132</sub>H<sub>210</sub>N<sub>12</sub>O<sub>60</sub>HR-MS (ESI): *m/z* = ber.: 1462.69 [M+2H]<sup>2+</sup>, 975.47 [M+3H]<sup>3+</sup>gef.: 1462.55 [M+2H]<sup>2+</sup>, 975.37 [M+3H]<sup>3+</sup>

**<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, MeOD):** δ [ppm] = 8.39 (s, 3H, H<sub>arom</sub>), 5.38 (ddd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>8,7</sub> = 8.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>9b,8</sub> = 5.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>9a,8</sub> = 2.5 Hz, H-8), 5.32 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>6,7</sub> = 2.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>7,8</sub> = 8.8 Hz, H-7), 4.78 (ddd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>4,5</sub> = 10.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3ax,4</sub> = 12.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3eq,4</sub> = 4.6 Hz, H-4), 4.31 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>8,9a</sub> = 2.6 Hz, <sup>2</sup>J<sub>9a,9b</sub> = 12.4 Hz, H-9a), 4.16 (dd, 3H, <sup>3</sup>J<sub>5,6</sub> = 2.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>6,7</sub> = 10.7 Hz, H-6), 4.05 (dd, 3H, <sup>3</sup>J<sub>8,9b</sub> = 5.5 Hz, <sup>2</sup>J<sub>9a,9b</sub> = 12.4 Hz, H-9b), 3.95 (dd, 3H, <sup>3</sup>J<sub>4,5</sub> = 10.4 Hz, H-5), 3.98 (s, 6H, H-2''), 3.81 (s, 9H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.76 (dt, 3H, <sup>3</sup>J<sub>4,5'a</sub> = 6.1 Hz, <sup>2</sup>J<sub>5'a,5'b</sub> = 9.4 Hz, H-5'a), 3.68-3.60 (m, 42H, H-3'', H-4'', H-5'', H-6'', H-7'', H-8'', H-9''), 3.42-3.40 (m, 6H, H-1'''), 3.36-3.28 (m, 6H, H-10''), 3.27-3.25 (m, 9H, H-5'b, H-6'''), 2.61 (dd, 3H, <sup>3</sup>J<sub>3eq,4</sub> = 4.5 Hz, <sup>2</sup>J<sub>3ax,3eq</sub> = 12.6 Hz, H-3eq), 2.22 (t, 6H, <sup>3</sup>J<sub>2',3'</sub> = 7.7 Hz, H-2'), 2.13 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-CO-O), 2.10 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-CO-O), 2.00 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-CO-O), 1.83 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-CO-NH), 1.79 (t, 3H, <sup>2</sup>J<sub>3ax,3eq</sub> = 12.3 Hz, H-3ax), 1.68-1.60 (m, 12H, H-3', H-2'''), 1.56-1.50 (m, 6H, H-4', H-5'''), 1.42-1.40 (m, 12H, H-3''', H-4''').

**<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, MeOD):** δ [ppm] = 176.1 (C-1'), 173.5 (CH<sub>3</sub>-CO-NH), 172.6 (C-1''), 172.4 (CH<sub>3</sub>-CO-O), 171.7 (CH<sub>3</sub>-CO-O), 171.7 (CH<sub>3</sub>-CO-O), 171.5 (CH<sub>3</sub>-CO-O), 169.7 (C-1), 168.6 (NH-CO), 136.8 (C<sub>arom</sub>), 129.7 (C<sub>arom</sub>H), 100.0 (C-2), 73.1 (C-6), 71.9, 71.5, 71.4, 71.4, 71.3, 71.2, 71.2 (C-3'', C-4'', C-5'', C-6'', C-7'', C-8'', C-9''), 70.8 (C-2''), 70.7 (C-4), 69.5 (C-8), 68.7 (C-7), 65.5 (C-5'), 63.5 (C-9), 53.2 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 50.1 (C-5), 41.0 (C-1'''), 40.3 (C-10''), 39.8 (C-6'''), 39.1 (C-3), 36.5 (C-2'), 30.4 (C-4'), 30.3, 23.5 (C-2''', C-5'''), 27.6, 27.5 (C-3''', C-4'''), 22.6 (CH<sub>3</sub>-CO-NH), 21.2 (CH<sub>3</sub>-CO-O), 20.8 (CH<sub>3</sub>-CO-O), 20.7 (CH<sub>3</sub>-CO-O), 20.6 (CH<sub>3</sub>-CO-O).



## 8 Toxikologische Daten

**Tab. 3:** Gefahren- und Sicherheitshinweise gemäß dem „Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals“ (GHS).

Substanz	Piktogramm	Gefahrenhinweise	Sicherheitshinweise
Aceton	 	H225-H319-H336, EUH066	P210, P233, P305+P351+P338
Acetonitril (≥ 99.9%)	 	H225, H332, H302, H312, H319	P210, P240, P302+P352, P305+P351+P338, P403+P233
Acetylchlorid	  	H225, H314, EUH014	P210, P280, P305+P351+P338, P310
N-Acetylneuraminsäure		H319	P305+P351+P338
Ameisensäure		H226, H314	P280, P305+P351+P338, P310
Ammoniak (aq., 25%)	 	H314, H335, H400	P280, P273, P301+P330+P331, P305+P351+P338, P309, P310
Ammoniumchlorid		H302, H319	P305+P351+P338
Bromessigsäure	  	H301+H31+H33, H314, H317, H400	P273, P280, P301+P330+P331, P302+P352, P304+P340, P305+P351+P338, P309+P310
Bromessigsäure- <i>tert</i> -butylester	 	H226, H315, H319, H335	P210, P280, P305+P351+P338
<i>tert</i> -Butanol	 	H225, H319, H332, H335, H336	P210, P233, P240, P241, P304+P340+P312, P305+P351+P338

TOXIKOLOGISCHE DATEN

Calciumchlorid			H315, H319, H335	P261, P305+P351+P338
Chloroform	 		H302, H331, H315, H319, H351, H361d, H336, H372	P261, P281, P305+P351+P338, P311
Chloroform- <i>d</i>	 		H302, H331, H315, H319, H351, H361d, H336, H372	P261, P281, P305+P351+P338, P311
Dichlormethan	 		H315, H319, H336, H351	P201, P302+P352, P305+P351+P338, P308+P313
Diethylether	 		H224, H302, H336	P210, P261
<i>N,N</i> -Diisopropyl-ethylamin	  		H225, H302, H318, H331, H335	P210, P280, P301+P312+P330, P304+P340+P311, P305+P351+P338+P310
<i>N,N</i> -Dimethylformamid	  		H226, H312+H33, H319, H360d	P280, P302+P352, P305+P351+P338, P308+P313
1,4-Dioxan	  		H225, H319, H335, H350, EUH019, EUH066	P202, P210, P233, P240, P305+P351+P338, P308+P313, P403+P233
Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat	 		H226, H330, H315, H319, H317	P210, P280, P309+P310, P304+P340-P305+P351+P338, P302+P352
Essigsäure	 		H226, H290, H314	P210, P280, P301+P331, P305+P351+P338, P308+P310
Essigsäureanhydrid	  		H226, H302, H314, H332	P280, P305+P351+P338, P310

TOXIKOLOGISCHE DATEN

Ethanol	 	H225, H319	P210, P240, P305+P351+P338, P403+P233
Ethylacetat		H225, H319, H336	P210, P240, P305+P351+P338
HATU		H317, H334	P261, P272, P280, P284, P302+P352, P304+P340+P312
<i>n</i> -Hexan	   	H225, H304, H361f, H373, H315, H336, H411	P210-P240-P273- P301+P310-P331- P302+P352-P403+P235
5-Hexen-1-ol	 	H226, H314	P210, P280, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P305+P351+P338+ P310
Hexamethyldiamin	 	H302, H312, H314, H335	P261, P280, P305+P351+P338, P310
Kaliumhydroxid	 	H290, H302, H314	P280, P301+P330+P331, P305+P351+P338, P308+P310
Methanol	  	H225, H301, H311, H331, H370	P210, P260, P280, P301+P310, P307+P311
Methanol- <i>d</i> <sub>4</sub>	  	H225, H301, H311, H331, H370	P210, P260, P280, P301+P310, P307+P311
Natrium			
Natriumazid	  	H300+H310+ H330, H373, H410, EUH032	P262, P273, P280, P301+P310+P330, P302+P352+P310, P304+P340+P310
Natriumchlorid	Kein gefährliches Produkt im Sinne der EG-Verordnung Nr. 1272/2008		
Natriumhydrid	 	H228, H260, H314	P210, P223, P231+P232, P280, P370+P378, P422

TOXIKOLOGISCHE DATEN

Natriumnitrat	 	H272, H302	P220, P305+P351+P338
Natriumsulfat	Kein gefährliches Produkt im Sinne der EG-Verordnung Nr. 1272/2008		
Natriumhydrogen-carbonat	Kein gefährliches Produkt im Sinne der EG-Verordnung Nr. 1272/2008		
Natriumhydroxid		H290, H314	P280, P301+P330+P331, P305+P351+P338, P308+P310
Natriumperiodat	 	H272, H301, H315, H319, H335	P220, P261, P301+P310, P305+P351+P338
Pd/C		H315, H319	P280, P302+P352, P305+P351+P338
Petrolether	 	H350, H340, H304, H225	P201, P210, P301+P310, P308+P313, P331
2-Propanol	 	H225, H319, H336	P210, P261, P305+P351+P338
Pyridin	 	H225, H332, H302, H312	P210, P233, P302+P352
Ruthenium(III)-chlorid Hydrat	  	H302, H314, H411	P260, P273, P280, P301+P312, P303+P361+P353, P305+P351+P338
Salzsäure (37%)	 	H290, H314, H335	P260, P280, P303+P361+P353, P304+P340+P310, P305+P351+P338
Silbersalicylat	Kein gefährliches Produkt im Sinne der EG-Verordnung Nr. 1272/2008		
Schwefelsäure (98%)		H290, H314	P280, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P305+P351+P338+ P310
Tetrachlormethan	 	H301+H311+ H331, H351, H372, H412, H420	P201, P273, P280, P301+P310+P330, P302+P352+P312, P502

TOXIKOLOGISCHE DATEN

Tetraethylenglycol	Kein gefährliches Produkt im Sinne der EG-Verordnung Nr. 1272/2008			
Tetrahydrofuran				H225, H351, H319, H335 P210, P233, P243, P305+P351+P338
<i>p</i> -Toluolsulfonsäurechlorid				H290, H315, H317, H318 P280, P302+P352, P305+P351+P338+P310
Toluol				H225, H304, H315, H336, H361, H373 P210, P261, P281, P301+P310-P331
Triethylamin				H225-H302-H312-H314-H332 P210, P280, P305+P351+P338, P310
Triethylenglycol	Kein gefährliches Produkt im Sinne der EG-Verordnung Nr. 1272/2008			
Trifluoressigsäure				H290, H331, H314, H412 P260, P273, P280, P303+P361+P353, P305+P351+P338, P312
Trisopropylsilan				H226 P210, P233, P241, P242, P243
Trimesoylchlorid				H302, H314 P280, P305+P351+P338, P310
Wasserstoff				H220, H280 P210, P377, P381, P403
Xylol				H226, H304, H312+H332, H315, H319, H335, H373 P210, P260, P280, P301+P310, P305+P351+P338, P370+P378



## 9 Literaturverzeichnis

1. W. Haas, G. Krause and R. Kurth, Aviäre Influenza in Deutschland: Gefährdung für den Menschen hat sich nicht grundlegend geändert, *Deutsches Ärzteblatt International*, **2006**, 103, 456f.
2. WHO, Cumulative number of confirmed human cases for avian influenza A(H5N1) reported to WHO, 2003-2021.
3. A. H. Reid, J. K. Taubenberger and T. G. Fanning, Evidence of an absence: the genetic origins of the 1918 pandemic influenza virus, *Nature reviews. Microbiology*, **2004**, 2, 909-914.
4. J. K. Taubenberger and D. M. Morens, 1918 Influenza: the mother of all pandemics, *Emerging infectious diseases*, **2006**, 12, 15-22.
5. F. S. Dawood, S. Jain, L. Finelli, M. W. Shaw, S. Lindstrom, R. J. Garten, L. V. Gubareva, X. Xu, C. B. Bridges and T. M. Uyeki, Emergence of a Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus in Humans, *New England Journal of Medicine*, **2009**, 360, 2605-2615.
6. J. Stevens, A. L. Corper, C. F. Basler, J. K. Taubenberger, P. Palese and I. A. Wilson, Structure of the Uncleaved Human H1 Hemagglutinin from the Extinct 1918 Influenza Virus, *Science*, **2004**, 303, 1866.
7. D. M. Morens, J. K. Taubenberger and A. S. Fauci, Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness, *The Journal of infectious diseases*, **2008**, 198, 962-970.
8. K. Shinya, M. Ebina, S. Yamada, M. Ono, N. Kasai and Y. Kawaoka, Influenza virus receptors in the human airway, *Nature*, **2006**, 440, 435-436.
9. C. J. L. Murray, A. D. Lopez, B. Chin, D. Feehan and K. H. Hill, Estimation of potential global pandemic influenza mortality on the basis of vital registry data from the 1918–20 pandemic: a quantitative analysis, *The Lancet*, **2006**, 368, 2211-2218.
10. S. Su, X. Fu, G. Li, F. Kerlin and M. Veit, Novel Influenza D virus: Epidemiology, pathology, evolution and biological characteristics, *Virulence*, **2017**, 8, 1580-1591.
11. A. W. Hampson and J. S. Mackenzie, The influenza viruses, *Medical Journal of Australia*, **2006**, 185, S39-S43.
12. K. Michaelis, S. Scholz, S. Buda, E. Garbe, T. Harder, T. Ledig, M. Terhardt, O. Wichmann, S. Wicker, F. Zepp and T. Mertens, Beschluss und Wissenschaftliche Begründung der Ständigen Impfkommision (STIKO) für die Aktualisierung der Influenza-Impfempfehlung für Personen im Alter von  $\geq 60$  Jahren, *Epidemiologisches Bulletin*, **2020**, 3-25.
13. A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO memorandum, *Bulletin of the World Health Organization*, **1980**, 58, 585-591.
14. I. V. Chizhnikov, F. M. Geraghty, D. C. Ogden, A. Hayhurst, M. Antoniou and A. J. Hay, Selective proton permeability and pH regulation of the influenza virus M2 channel expressed in mouse erythroleukaemia cells, *The Journal of physiology*, **1996**, 494, 329-336.
15. G. Lofano, A. Kumar, O. Finco, G. Del Giudice and S. Bertholet, B Cells and Functional Antibody Responses to Combat Influenza, *Frontiers in Immunology*, **2015**, 6.
16. A. Gaymard, N. Le Briand, E. Frobert, B. Lina and V. Escuret, Functional balance between neuraminidase and haemagglutinin in influenza viruses, *Clinical Microbiology and Infection*, **2016**, 22, 975-983.
17. Y. Shi, Y. Wu, W. Zhang, J. Qi and G. F. Gao, Enabling the 'host jump': structural determinants of receptor-binding specificity in influenza A viruses, *Nature Reviews Microbiology*, **2014**, 12, 822-831.
18. I. Zündorf and T. Dingeremann, Die drohende Influenza-Pandemie, *Deutsche Apotheker-Zeitung DAZ; unabhängige pharmazeutische Zeitschrift für Wissenschaft und Praxis*, **2006**, 8.
19. H. Tao, J. Steel and A. C. Lowen, Intrahost Dynamics of Influenza Virus Reassortment, *Journal of Virology*, **2014**, 88, 7485.

20. A. Chandrasekaran, A. Srinivasan, R. Raman, K. Viswanathan, S. Raguram, T. M. Tumpey, V. Sasisekharan and R. Sasisekharan, Glycan topology determines human adaptation of avian H5N1 virus hemagglutinin, *Nature Biotechnology*, **2008**, 26, 107-113.
21. I. Zündorf and T. Dingermann, [H5N1 with a special sense for sugar chains], *Pharmazie in unserer Zeit*, **2008**, 37, 190-191.
22. Y. Hiromoto, T. Saito, S. E. Lindstrom, Y. Li, R. Nerome, S. Sugita, M. Shinjoh and K. Nerome, Phylogenetic analysis of the three polymerase genes (PB1, PB2 and PA) of influenza B virus, *Journal of General Virology*, **2000**, 81, 929-937.
23. M. von Itzstein, The war against influenza: discovery and development of sialidase inhibitors, *Nature Reviews Drug Discovery*, **2007**, 6, 967-974.
24. D. J. Alexander, A review of avian influenza in different bird species, *Veterinary Microbiology*, **2000**, 74, 3-13.
25. D. L. Suarez, D. A. Senne, J. Banks, I. H. Brown, S. C. Essen, C.-W. Lee, R. J. Manvell, C. Mathieu-Benson, V. Moreno, J. C. Pedersen, B. Panigrahy, H. Rojas, E. Spackman and D. J. Alexander, Recombination resulting in virulence shift in avian influenza outbreak, Chile, *Emerging infectious diseases*, **2004**, 10, 693-699.
26. J. Pasick, K. Handel, J. Robinson, J. Copps, D. Ridd, K. Hills, H. Kehler, C. Cottam-Birt, J. Neufeld, Y. Berhane and S. Czub, Intersegmental recombination between the haemagglutinin and matrix genes was responsible for the emergence of a highly pathogenic H7N3 avian influenza virus in British Columbia, *Journal of General Virology*, **2005**, 86, 727-731.
27. J.-K. Kim, N. J. Negovetich, H. L. Forrest and R. G. Webster, Ducks: The "Trojan Horses" of H5N1 influenza, *Influenza and Other Respiratory Viruses*, **2009**, 3, 121-128.
28. B. Lupiani and S. M. Reddy, The history of avian influenza, *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, **2009**, 32, 311-323.
29. G. Klebe, *Wirkstoffdesign: Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen*, 2 edn., **2009**.
30. C. Fasting, C. A. Schalley, M. Weber, O. Seitz, S. Hecht, B. Kocsch, J. Dervedde, C. Graf, E.-W. Knapp and R. Haag, Multivalenz als chemisches Organisations- und Wirkprinzip, *Angewandte Chemie*, **2012**, 124, 10622-10650.
31. Y. Guan, L. L. M. Poon, C. Y. Cheung, T. M. Ellis, W. Lim, A. S. Lipatov, K. H. Chan, K. M. Sturm-Ramirez, C. L. Cheung, Y. H. C. Leung, K. Y. Yuen, R. G. Webster and J. S. M. Peiris, H5N1 influenza: A protean pandemic threat, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2004**, 101, 8156.
32. R. Harvey, A. C. R. Martin, M. Zambon and W. S. Barclay, Restrictions to the Adaptation of Influenza A Virus H5 Hemagglutinin to the Human Host, *Journal of Virology*, **2004**, 78, 502.
33. A. Gambaryan, A. Tuzikov, G. Pazynina, N. Bovin, A. Balish and A. Klimov, Evolution of the receptor binding phenotype of influenza A (H5) viruses, *Virology*, **2006**, 344, 432-438.
34. G. K. Hirst, The Agglutination of Red Cells by Allantoic Fluid of Chick Embryos Infected with Influenza Virus, *Science*, **1941**, 94, 22.
35. W. Doerfler, *Viren – Krankheitserreger und Trojanisches Pferd*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, **1996**.
36. M. Luo, Influenza virus entry, *Advances in experimental medicine and biology*, **2012**, 726, 201-221.
37. J. P. Amorij, A. Huckriede, J. Wilschut, H. W. Frijlink and W. L. J. Hinrichs, Development of stable influenza vaccine powder formulations: challenges and possibilities, *Pharmaceutical research*, **2008**, 25, 1256-1273.
38. I. A. Wilson, J. J. Skehel and D. C. Wiley, Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution, *Nature*, **1981**, 289, 366-373.
39. M. Mammen, S.-K. Choi and G. M. Whitesides, Polyvalent Interactions in Biological Systems: Implications for Design and Use of Multivalent Ligands and Inhibitors, *Angewandte Chemie International Edition*, **1998**, 37, 2754-2794.

40. B. S. Kamps, C. Hoffmann and W. Preiser, *Influenza Report*, Flying Publisher, Paris, Cagliari, Wuppertal, Sevilla, **2006**.
41. D. Baker and D. A. Agard, Influenza hemagglutinin: kinetic control of protein function, *Structure*, **1994**, 2, 907-910.
42. D. A. Steinhauer, Role of Hemagglutinin Cleavage for the Pathogenicity of Influenza Virus, *Virology*, **1999**, 258, 1-20.
43. A. Berg, D. Baltimore, H. Lodish, J. Darnell, P. Matsudaira and S. L. Zipursky, *Molekulare Zellbiologie*, Walter de Gruyter & Co, Berlin, **1996**.
44. J. M. Wood, Developing vaccines against pandemic influenza, *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, **2001**, 356, 1953-1960.
45. C. Wang, K. Takeuchi, L. H. Pinto and R. A. Lamb, Ion channel activity of influenza A virus M2 protein: characterization of the amantadine block, *Journal of Virology*, **1993**, 67, 5585-5594.
46. K. Fukao, Y. Ando, T. Noshi, M. Kitano, T. Noda, M. Kawai, R. Yoshida, A. Sato, T. Shishido and A. Naito, Baloxavir marboxil, a novel cap-dependent endonuclease inhibitor potently suppresses influenza virus replication and represents therapeutic effects in both immunocompetent and immunocompromised mouse models, *PLoS one*, **2019**, 14, e0217307-e0217307.
47. M. D. de Jong, T. T. Thanh, T. H. Khanh, V. M. Hien, G. J. D. Smith, N. V. Chau, B. V. Cam, P. T. Qui, D. Q. Ha, Y. Guan, J. S. M. Peiris, T. T. Hien and J. Farrar, Oseltamivir Resistance during Treatment of Influenza A (H5N1) Infection, *New England Journal of Medicine*, **2005**, 353, 2667-2672.
48. Q. M. Le, M. Kiso, K. Someya, Y. T. Sakai, T. H. Nguyen, K. H. L. Nguyen, N. D. Pham, H. H. Ngyen, S. Yamada, Y. Muramoto, T. Horimoto, A. Takada, H. Goto, T. Suzuki, Y. Suzuki and Y. Kawaoka, Isolation of drug-resistant H5N1 virus, *Nature*, **2005**, 437, 1108-1108.
49. E. G. Weinhold and J. R. Knowles, Design and evaluation of a tightly binding fluorescent ligand for influenza A hemagglutinin, *Journal of the American Chemical Society*, **1992**, 114, 9270-9275.
50. A. Marra, L. Moni, D. Pazzi, A. Corallini, D. Bridi and A. Dondoni, Synthesis of sialocusters appended to calix[4]arene platforms via multiple azide-alkyne cycloaddition. New inhibitors of hemagglutination and cytopathic effect mediated by BK and influenza A viruses, *Organic & Biomolecular Chemistry*, **2008**, 6, 1396-1409.
51. M. Waldmann, R. Jirmann, K. Hoelscher, M. Wienke, F. C. Niemeyer, D. Rehders and B. Meyer, A Nanomolar Multivalent Ligand as Entry Inhibitor of the Hemagglutinin of Avian Influenza, *Journal of the American Chemical Society*, **2014**, 136, 783-788.
52. W. Lu, W. Du, V. J. Somovilla, G. Yu, D. Haksar, E. de Vries, G.-J. Boons, R. P. de Vries, C. A. M. de Haan and R. J. Pieters, Enhanced Inhibition of Influenza A Virus Adhesion by Di- and Trivalent Hemagglutinin Inhibitors, *Journal of Medicinal Chemistry*, **2019**, 62, 6398-6404.
53. S. Bhatia, L. C. Camacho and R. Haag, Pathogen Inhibition by Multivalent Ligand Architectures, *Journal of the American Chemical Society*, **2016**, 138, 8654-8666.
54. P. Christen and R. Jaussi, *Biochemie: Eine Einführung mit 40 Lerneinheiten*, Spektrum Akademischer Verlag, Berlin Heidelberg, **2005**.
55. S. Miyamoto and P. A. Kollman, Absolute and relative binding free energy calculations of the interaction of biotin and its analogs with streptavidin using molecular dynamics/free energy perturbation approaches, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, **1993**, 16, 226-245.
56. C. Yung-Chi and W. H. Prusoff, Relationship between the inhibition constant (KI) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction, *Biochemical Pharmacology*, **1973**, 22, 3099-3108.
57. H. C. Cheng, The power issue: determination of KB or Ki from IC50: A closer look at the Cheng-Prusoff equation, the Schild plot and related power equations, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, **2001**, 46, 61-71.
58. A. Albert, Chemical Aspects of Selective Toxicity, *Nature*, **1958**, 182, 421-423.

59. J. B. Zawilska, J. Wojcieszak and A. B. Olejniczak, Prodrugs: a challenge for the drug development, *Pharmacol Rep*, **2013**, 65, 1-14.
60. G. He, J. Massarella and P. Ward, Clinical pharmacokinetics of the prodrug oseltamivir and its active metabolite Ro 64-0802, *Clin Pharmacokinet*, **1999**, 37, 471-484.
61. V. M. Krishnamurthy, L. A. Estroff and G. M. Whitesides, in *Fragment-based Approaches in Drug Discovery*, eds. R. Mannhold, H. Kubinyi and G. Folkers, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim, **2006**, vol. 34, pp. 11-53.
62. S. K. Lam and T. B. Ng, Lectins: production and practical applications, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2011**, 89, 45-55.
63. K. Autumn, P. H. Niewiarowski and J. B. Puthoff, Gecko Adhesion as a Model System for Integrative Biology, Interdisciplinary Science, and Bioinspired Engineering, *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **2014**, 45, 445-470.
64. P. I. Kitov and D. R. Bundle, On the Nature of the Multivalency Effect: A Thermodynamic Model, *Journal of the American Chemical Society*, **2003**, 125, 16271-16284.
65. R. Haag, Multivalency as a chemical organization and action principle, *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, **2015**, 11, 848-849.
66. G. Ercolani and L. Schiaffino, Allosteric, Chelate, and Interannular Cooperativity: A Mise au Point, *Angewandte Chemie International Edition*, **2011**, 50, 1762-1768.
67. P. M. Levine, T. P. Carberry, J. M. Holub and K. Kirshenbaum, Crafting precise multivalent architectures, *MedChemComm*, **2013**, 4, 493-509.
68. M. J. W. Ludden, D. N. Reinhoudt and J. Huskens, Molecular printboards: versatile platforms for the creation and positioning of supramolecular assemblies and materials, *Chemical Society Reviews*, **2006**, 35, 1122-1134.
69. L. L. Kiessling, J. E. Gestwicki and L. E. Strong, Synthetic Multivalent Ligands as Probes of Signal Transduction, *Angewandte Chemie International Edition*, **2006**, 45, 2348-2368.
70. W. P. Jencks, On the attribution and additivity of binding energies, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **1981**, 78, 4046-4050.
71. A. L. Banerjee, D. Eiler, B. C. Roy, X. Jia, M. K. Haldar, S. Mallik and D. K. Srivastava, Spacer-Based Selectivity in the Binding of "Two-Prong" Ligands to Recombinant Human Carbonic Anhydrase I, *Biochemistry*, **2005**, 44, 3211-3224.
72. R. J. Pieters, Maximising multivalency effects in protein-carbohydrate interactions, *Organic & Biomolecular Chemistry*, **2009**, 7, 2013-2025.
73. L. L. Kiessling, J. E. Gestwicki and L. E. Strong, Synthetic multivalent ligands in the exploration of cell-surface interactions, *Current Opinion in Chemical Biology*, **2000**, 4, 696-703.
74. J. E. Gestwicki, C. W. Cairo, L. E. Strong, K. A. Oetjen and L. L. Kiessling, Influencing Receptor-Ligand Binding Mechanisms with Multivalent Ligand Architecture, *Journal of the American Chemical Society*, **2002**, 124, 14922-14933.
75. M. Weber, A. Bujotzek and R. Haag, Quantifying the rebinding effect in multivalent chemical ligand-receptor systems, *The Journal of Chemical Physics*, **2012**, 137, 054111.
76. B. C. Lagerholm and N. L. Thompson, Theory for Ligand Rebinding at Cell Membrane Surfaces, *Biophysical Journal*, **1998**, 74, 1215-1228.
77. D. J. Diestler and E. W. Knapp, Statistical Mechanics of the Stability of Multivalent Ligand-Receptor Complexes, *The Journal of Physical Chemistry C*, **2010**, 114, 5287-5304.
78. J. Rao, J. Lahiri, R. M. Weis and G. M. Whitesides, Design, Synthesis, and Characterization of a High-Affinity Trivalent System Derived from Vancomycin and L-Lys-d-Ala-d-Ala, *Journal of the American Chemical Society*, **2000**, 122, 2698-2710.
79. A. Leach, *Molecular Modelling: Principles and Applications*, 2 edn., **2001**.
80. K. Brunner, J. Harder, T. Halbach, J. Willibald, F. Spada, F. Gnerlich, K. Sparrer, A. Beil, L. Möckl, C. Bräuchle, K.-K. Conzelmann and T. Carell, Cell-Penetrating and Neurotargeting Dendritic siRNA Nanostructures, *Angewandte Chemie International Edition*, **2015**, 54, 1946-1949.

81. M. Clark, R. D. Cramer III and N. Van Opdenbosch, Validation of the general purpose tripos 5.2 force field, *Journal of Computational Chemistry*, **1989**, 10, 982-1012.
82. L. F. U. Jönsson, B. Ivarsson, B. Johnsson, R. Karlsson, K. Lundh, S. Löfas, B. Persson, H. Roos, I. Rönnerberg, S. Sjölander, E. Stenberg, R. Stahlberg, C. Urbaniczky, H. Östlin and M. Malmqvist, Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology, *Biotechniques*, **1991**, 11, 620-627.
83. F. Goos and H. Hänchen, Ein neuer und fundamentaler Versuch zur Totalreflexion, *Annalen der Physik*, **1947**, 436, 333-346.
84. F. Pillon, H. Gilles, S. Girard, M. Laroche, R. Kaiser and A. Gazibegovic, Goos-Hänchen and Imbert-Fedorov shifts for leaky guided modes, *Journal of the Optical Society of America B*, **2005**, 22, 1290-1299.
85. B. Zimmermann, C. Hahnefeld and F. W. Herberg, Applications of biomolecular interaction analysis in drug development, *TARGETS*, **2002**, 1, 66-73.
86. G. Healthcare, *Biacore™ Assay Handbook*, AA edn., **2012**.
87. W. D. Wilson, Analyzing Biomolecular Interactions, *Science*, **2002**, 295, 2103.
88. R. Karlsson and R. Stahlberg, Surface Plasmon Resonance Detection and Multispot Sensing for Direct Monitoring of Interactions Involving Low-Molecular-Weight Analytes and for Determination of Low Affinities, *Analytical Biochemistry*, **1995**, 228, 274-280.
89. E. C. Hulme and M. A. Trevethick, Ligand binding assays at equilibrium: validation and interpretation, *British journal of pharmacology*, **2010**, 161, 1219-1237.
90. Y. Ha, D. J. Stevens, J. J. Skehel and D. C. Wiley, X-ray structures of H5 avian and H9 swine influenza virus hemagglutinins bound to avian and human receptor analogs, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2001**, 98, 11181-11186.
91. S. Yamada, Y. Suzuki, T. Suzuki, M. Q. Le, C. A. Nidom, Y. Sakai-Tagawa, Y. Muramoto, M. Ito, M. Kiso, T. Horimoto, K. Shinya, T. Sawada, M. Kiso, T. Usui, T. Murata, Y. Lin, A. Hay, L. F. Haire, D. J. Stevens, R. J. Russell, S. J. Gamblin, J. J. Skehel and Y. Kawaoka, Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors, *Nature*, **2006**, 444, 378-382.
92. P. J. Klasse, How to assess the binding strength of antibodies elicited by vaccination against HIV and other viruses, *Expert review of vaccines*, **2016**, 15, 295-311.
93. M. Waldmann, Design, Synthese und Analyse multivalenter Inhibitoren der Adhäsion des Hämagglutinin H5 des Vogelgrippe Virus, PhD thesis, University of Hamburg, **2013**.
94. G. D. Glick and J. R. Knowles, Molecular recognition of bivalent sialosides by influenza virus, *Journal of the American Chemical Society*, **1991**, 113, 4701-4703.
95. M. Mammen, S.-K. Choi and G. M. Whitesides, Polyvalente Wechselwirkungen in biologischen Systemen: Auswirkungen auf das Design und die Verwendung multivalenter Liganden und Inhibitoren, *Angewandte Chemie*, **1998**, 110, 2908-2953.
96. C. Sieben, C. Kappel, R. Zhu, A. Wozniak, C. Rankl, P. Hinterdorfer, H. Grubmüller and A. Herrmann, Influenza virus binds its host cell using multiple dynamic interactions, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2012**, 109, 13626.
97. T. S. Misono and P. K. R. Kumar, Selection of RNA aptamers against human influenza virus hemagglutinin using surface plasmon resonance, *Analytical Biochemistry*, **2005**, 342, 312-317.
98. D. K. Takemoto, J. J. Skehel and D. C. Wiley, A Surface Plasmon Resonance Assay for the Binding of Influenza Virus Hemagglutinin to Its Sialic Acid Receptor, *Virology*, **1996**, 217, 452-458.
99. M. Hollinger, Design, Synthese und Analyse von Liganden als Inhibitoren des Hämagglutinins des aviären Influenza Virus H5N1, PhD thesis, University of Hamburg, **2009**.
100. C.-F. Mandenius, R. Wang, A. Aldén, G. Bergström, S. Thébault, C. Lutsch and S. Ohlson, Monitoring of influenza virus hemagglutinin in process samples using weak affinity ligands and surface plasmon resonance, *Analytica Chimica Acta*, **2008**, 623, 66-75.
101. Y.-F. Chang, S.-F. Wang, J. C. Huang, L.-C. Su, L. Yao, Y.-C. Li, S.-C. Wu, Y.-M. A. Chen, J.-P. Hsieh and C. Chou, Detection of swine-origin influenza A (H1N1) viruses using a localized surface

- plasmon coupled fluorescence fiber-optic biosensor, *Biosensors and Bioelectronics*, **2010**, 26, 1068-1073.
102. E. Suenaga, H. Mizuno and K. K. R. Penmetcha, Monitoring influenza hemagglutinin and glycan interactions using surface plasmon resonance, *Biosensors and Bioelectronics*, **2012**, 32, 195-201.
103. C. Estmer Nilsson, S. Abbas, M. Bennemo, A. Larsson, M. D. Hämäläinen and Å. Frostell-Karlsson, A novel assay for influenza virus quantification using surface plasmon resonance, *Vaccine*, **2010**, 28, 759-766.
104. K. M. D. Winkel, Design, Synthese und Analyse von Inhibitoren des Hämagglutinins der aviären Influenza H5N1, PhD thesis, University of Hamburg, **2017**.
105. N. K. Sauter, M. D. Bednarski, B. A. Wurzburg, J. E. Hanson, G. M. Whitesides, J. J. Skehel and D. C. Wiley, Hemagglutinins from two influenza virus variants bind to sialic acid derivatives with millimolar dissociation constants: a 500-MHz proton nuclear magnetic resonance study, *Biochemistry*, **1989**, 28, 8388-8396.
106. R. Kuhn, P. Lutz and D. L. Macdonald, Synthese anomerer Sialinsäure-methylketoside, *Chemische Berichte*, **1966**, 99, 611-617.
107. A. Marra and P. Sinay, Acetylation of N-acetylneuraminic acid and its methyl ester, *Carbohydrate Research*, **1989**, 190, 317-322.
108. K. Furuhashi, K. Anazawa, M. Itoh, Y. Shitori and H. Ogura, Studies on sialic acids. V: Synthesis of  $\alpha$ - and  $\beta$ -D-Neu5Acp-(2 $\rightarrow$ 6)-lactose, *Chemical and pharmaceutical bulletin*, **1986**, 34, 2725-2731.
109. G. Wulff, G. Röhle and W. Krüger, Untersuchungen zur Glykosidsynthese, IV. Neuartige Silbersalze in der Glykosidsynthese, *Chemische Berichte*, **1972**, 105, 1097-1110.
110. D. J. M. van der Vleugel, W. A. R. van Heeswijk and J. F. G. Vliegthart, A facile preparation of alkyl  $\alpha$ -glycosides of the methyl ester of N-acetyl-d-neuraminic acid, *Carbohydrate Research*, **1982**, 102, 121-130.
111. D. Lee and M. Engh, The Oxidation of 2-Propanol by Ruthenium Tetroxide, *Canadian Journal of Chemistry*, **2011**, 50, 2000-2009.
112. P. H. J. Carlsen, T. Katsuki, V. S. Martin and K. B. Sharpless, A greatly improved procedure for ruthenium tetroxide catalyzed oxidations of organic compounds, *The Journal of Organic Chemistry*, **1981**, 46, 3936-3938.
113. N. Trouche, S. Wieckowski, W. Sun, O. Chaloin, J. Hoebeke, S. Fournel and G. Guichard, Small Multivalent Architectures Mimicking Homotrimers of the TNF Superfamily Member CD40L: Delineating the Relationship between Structure and Effector Function, *Journal of the American Chemical Society*, **2007**, 129, 13480-13492.
114. K. Matsuura, K. Murasato and N. Kimizuka, Artificial Peptide-Nanospheres Self-Assembled from Three-Way Junctions of  $\beta$ -Sheet-Forming Peptides, *Journal of the American Chemical Society*, **2005**, 127, 10148-10149.
115. R. Leung-Toung, T. F. Tam, Y. Zhao, C. D. Simpson, W. Li, D. Desilets and K. Karimian, Synthesis of 3-Substituted Bicyclic Imidazo[1,2-d][1,2,4]thiadiazoles and Tricyclic Benzo[4,5]imidazo[1,2-d][1,2,4]thiadiazoles, *The Journal of Organic Chemistry*, **2005**, 70, 6230-6241.
116. M. K. Strulson, D. M. Johnson and J. A. Maurer, Increased Stability of Glycol-Terminated Self-Assembled Monolayers for Long-Term Patterned Cell Culture, *Langmuir*, **2012**, 28, 4318-4324.
117. H. S. G. Beckmann, A. Niederwieser, M. Wiessler and V. Wittmann, Preparation of Carbohydrate Arrays by Using Diels–Alder Reactions with Inverse Electron Demand, *Chemistry – A European Journal*, **2012**, 18, 6548-6554.
118. M. Assali, J.-J. Cid, M. Pernía-Leal, M. Muñoz-Bravo, I. Fernández, R. E. Wellinger and N. Khair, Glyconanosomes: Disk-Shaped Nanomaterials for the Water Solubilization and Delivery of Hydrophobic Molecules, *ACS Nano*, **2013**, 7, 2145-2153.

- 
119. K. Heller, P. Ochtrop, M. F. Albers, F. B. Zauner, A. Itzen and C. Hedberg, Covalent Protein Labeling by Enzymatic Phosphocholination, *Angewandte Chemie International Edition*, **2015**, 54, 10327-10330.
  120. L. Ma, C. Tu, P. Le, S. Chitoor, S. J. Lim, M. U. Zahid, K. W. Teng, P. Ge, P. R. Selvin and A. M. Smith, Multidentate Polymer Coatings for Compact and Homogeneous Quantum Dots with Efficient Bioconjugation, *Journal of the American Chemical Society*, **2016**, 138, 3382-3394.
  121. P. S. Shirude, V. A. Kumar and K. N. Ganesh, BisPNA Targeting to DNA: Effect of Neutral Loop on DNA Duplex Strand Invasion by aepPNA-N7G/aepPNA-C Substituted Peptide Nucleic Acids, *European Journal of Organic Chemistry*, **2005**, 2005, 5207-5215.
  122. C. Visintin, A. E. Aliev, D. Riddall, D. Baker, M. Okuyama, P. M. Hoi, R. Hiley and D. L. Selwood, Membrane Receptor Probes: Solid-Phase Synthesis of Biotin-Asp-PEG-arvanil Derivatives, *Organic Letters*, **2005**, 7, 1699-1702.
  123. A.-L. Giertz, Design and synthesis of components of a trivalent ligand to inhibit the hemagglutinin of avian influenza virus H5N1, Master thesis, University of Hamburg, **2014**.
  124. V. R. N. Munasinghe, J. E. T. Corrie, G. Kelly and S. R. Martin, Fluorescent Ligands for the Hemagglutinin of Influenza A: Synthesis and Ligand Binding Assays, *Bioconjugate Chemistry*, **2007**, 18, 231-237.
  125. P. L. Toogood, P. K. Galliker, G. D. Glick and J. R. Knowles, Monovalent sialosides that bind tightly to influenza A virus, *Journal of Medicinal Chemistry*, **1991**, 34, 3138-3140.
  126. G. Zemplén, A. Gerecs and I. Hadácsy, Über die Verseifung acetylierter Kohlenhydrate, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)*, **1936**, 69, 1827-1829.
  127. A. Lubineau and J. L. Gallic, Stereoselective Syntheses of ALKYL- and ALKYL-2-THIO- $\alpha$ -Sialosides, *Journal of Carbohydrate Chemistry*, **1991**, 10, 263-268.



## 10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Freund Malte! Ich danke ihm für die vielen wunderbaren gemeinsamen Jahre, für die Kraft, die er mir gibt und dass er jede meiner Launen mit einer absoluten Selbstverständlichkeit erträgt. Die Beendigung dieser Arbeit wäre ohne seinen Rückhalt und auch die gelegentlichen kleinen Schubser nicht möglich gewesen.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei meiner Familie, sowie Gila und Bernd für die jahrelange Unterstützung.

Dem AK-Meyer danke ich für eine unvergessliche Zeit, das gemeinsame Lachen, das tolle Arbeitsklima, aber auch für die gegenseitige Hilfestellung und die fachlichen Diskussionen. Insbesondere danke ich Karsten, Melissa und Claas. Karsten danke ich für seine Freundschaft, die viele Hilfe und dafür, dass er scheinbar immer gute Laune hat. Melissa und Claas danke ich für die grandiosen gemeinsamen Jahre im AK, ihre Freundschaft, die vielen gemeinsamen Unternehmungen und ihre Unterstützung auch in schweren Zeiten... *#Nie ohne mein Team!*

Darüber hinaus danke ich den Abteilungen für Massenspektrometrie und für NMR-Spektroskopie, sowie dem IT-Service für den hervorragenden Support.



## 11 Eidesstattliche Erklärung

„Hiermit erkläre 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.“

Barsbüttel, 19.10.2021

---

Ort, Datum

---

Unterschrift