

# **Asymmetrically branched sequence-controlled glycooligomers as sugar mimetic ligands for specific receptor targeting**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Kira Neuhaus**  
aus Wuppertal

Düsseldorf, Oktober 2018



aus dem Institut für Organische und Makromolekulare Chemie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. Laura Hartmann

2. Priv.-Doz. Dr. Klaus Schaper

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.2018



Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Diese Dissertation wurde weder in der vorliegenden noch in ähnlicher Form bei einer anderen Institution eingereicht, noch wurden bisher anderweitige Promotionsversuche meinerseits unternommen.

Düsseldorf, den 31. Oktober 2018

---

Kira Neuhaus



## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt vor allem meiner Doktormutter, Prof. Dr. Laura Hartmann, für die Möglichkeit zur Anfertigung der vorliegenden Dissertationsschrift. Durch die Aufnahme in ihren Arbeitskreis bot sie mir die Möglichkeit, wissenschaftsbezogene Lösungsansätze zu entwickeln. Ich konnte mich sowohl persönlich wie auch fachlich in nationalen sowie internationalen Kooperationen weiterentwickeln. Ich möchte mich weiterhin dafür bedanken, dass Prof. Dr. Laura Hartmann mir die Chance und ihr Vertrauen für einen dreimonatigen Forschungsaufenthalt am Davidson College in North Carolina geschenkt hat. Durch ihre stete Gesprächs- und Diskussionsbereitschaft trug sie entscheidend zum Gelingen der vorliegenden Arbeit bei und motivierte mich während des gesamten Zeitraumes dieser Promotion.

Priv.-Doz. Dr. Klaus Schaper danke ich herzlich für die Übernahme des Korreferates.

Mein herzlicher Dank gilt ebenso Fr. Dr. Monir Tabatabai für die zahlreichen Hilfestellungen, Ihr immer offenes Ohr, die Korrektur dieser Arbeit sowie Ihre stets freundliche und hilfsbereite Art.

Dr. Nicole L. Synder danke ich für die Chance, dass ich am Davidson College, North Carolina, USA, einen Forschungsaufenthalt durchführen konnte und für die stete Förderung dieser Arbeit durch ihre hilfreichen Ratschläge und interessanten Ideen.

Herrn Dr. C. Rademacher vom Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung danke ich für die gute Zusammenarbeit und die interessante Kooperation.

Allen Mitgliedern des Arbeitskreises danke ich für die freundliche Atmosphäre, die zahlreichen Anregungen und Gespräche im Labor, Büro und in der Küche sowie die immerwährende Hilfsbereitschaft. Unsere Team-Buildingevents in Holland, auf Malta und in der Kletterhalle zeigten, dass wir nicht nur Kollegen, sondern auch Freunde sind. Hierbei gilt mein besonderer Dank dem „Büro 78“ - mit Tanja, Lukas sowie Fadi und Dana.

Mein abschließender Dank gilt meiner Familie für die stetige Unterstützung. Meinem Vater möchte ich besonders für die zahlreichen Korrekturen danken. Mein ganz besonderer Dank gilt Maximilian Neubauer, der immer an meiner Seite war.

*„Ich bin immer noch verwirrt, aber auf einem höheren Niveau“*

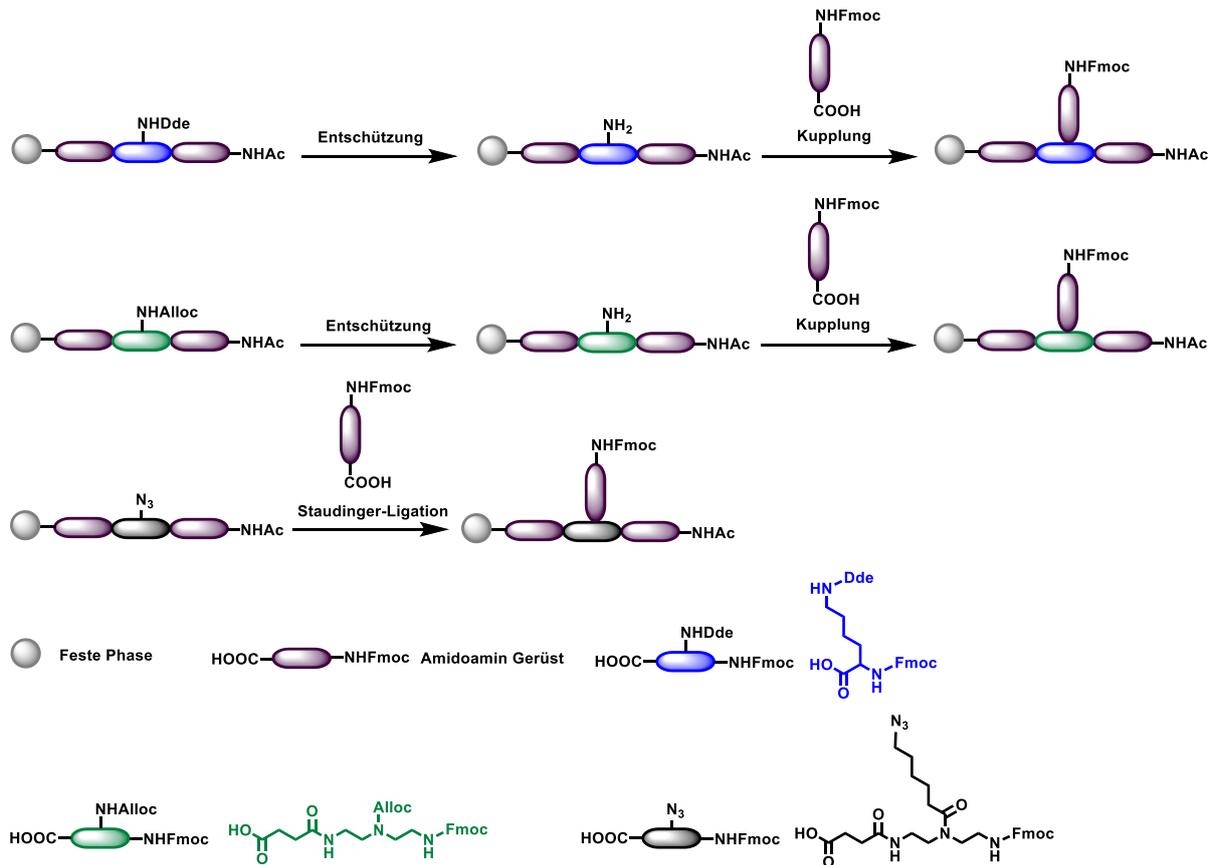
*-Enrico Fermi-*

## Kurzzusammenfassung

Die Wechselwirkung von Kohlenhydratliganden mit Lektin Rezeptoren vermittelt viele wichtige Bindungsereignisse in der Biologie wie z.B. die Adhäsion von Bakterien und Viren. Jedoch sind die zugrunde liegenden Mechanismen dieser Kohlenhydrat-Lektin Wechselwirkungen noch nicht vollständig aufgeklärt. Die Herstellung künstlicher Liganden zur Bindung an Lektine bietet das Potenzial neue Erkenntnisse zur Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung zu erhalten und bildet eine wichtige Grundlage zur Entwicklung neuer Wirkstoffe auf Kohlenhydrat-Basis. Eine Möglichkeit solche neuen Liganden zu erzeugen, ist die multivalente Anbindung von Monosacchariden an ein synthetisches Gerüst, die Synthese von sogenannten Glykomakromolekülen.

Viele biologisch relevante Lektine wie Langerin, Hämagglutinin und der Asialoglykoproteinrezeptor (ASGPR) haben eine trivalente räumliche Anordnung der Bindungstaschen, entweder symmetrisch, wie im Fall von Langerin oder asymmetrisch, wie in den Fällen von Hämagglutinin und ASGPR. Es ist anzunehmen, dass die einfachste und effizienteste Gerüstarchitektur zur Bindung an alle drei Bindungstaschen ein verzweigtes Glykomakromolekül mit drei Armen ist.

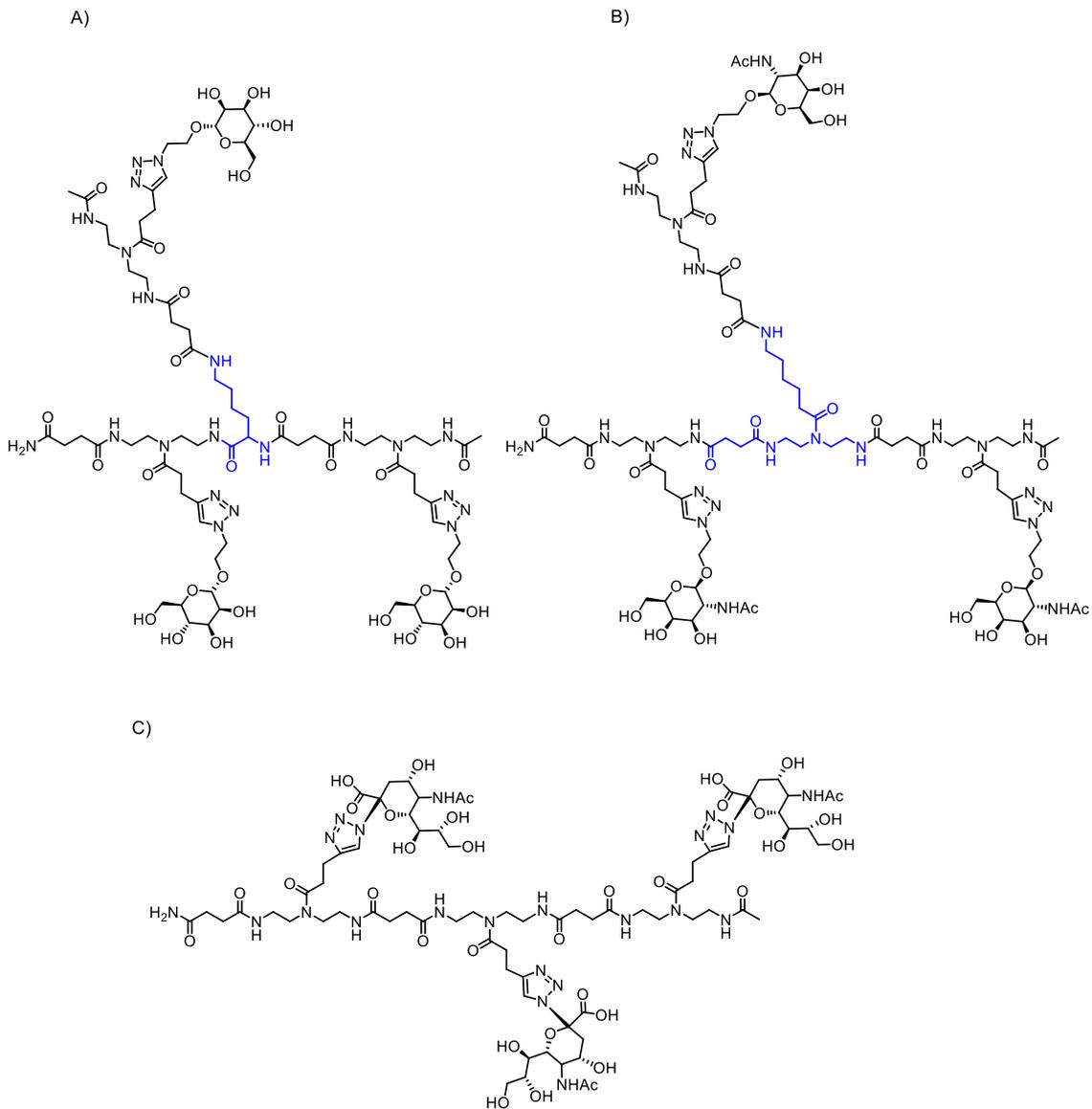
In dieser Arbeit wird daher eine neue Synthesestrategie vorgestellt, die basierend auf der von Hartmann *et al.* entwickelten Festphasenpolymersynthese (*solid phase polymer synthesis* (SPPoS)) Zugang zu symmetrisch wie auch asymmetrisch verzweigten Glykomakromolekülen bietet. Es konnten zwei verschiedene Synthesewege für die Anbringung einer Seitenkette an das Gerüst mittels funktioneller Bausteine etabliert werden: unter Verwendung von einem etablierten Baustein oder einer kommerziell erhältlichen Aminosäure mit Seitenketten Amingruppen und den orthogonalen Schutzgruppen Alloc oder Dde sowie unter Verwendung eines neu entwickelten Bausteins zur Einführung einer Seitenketten Azidgruppe und Kettenverlängerung mittels Staudinger-Ligation (Kurzzusammenfassung 1).



Kurzzusammenfassung 1: Schematische Präsentation der in dieser Arbeit entwickelten Synthesestrategien zur Einführung von Verzweigungen in der Festphasensynthese von Präzisionsglykomakromolekülen und Darstellung der Verzweigungsbausteine.

Durch den schrittweisen Aufbau der verschiedenen Arme des dreiarmigen Gerüsts konnten sowohl die Armlängen als auch die Zusammensetzung der Arme unabhängig voneinander variiert werden. Nachdem sukzessiven Aufbau des Gerüsts wurden dann verschiedene Kohlenhydrat Liganden mittels Cu-vermittelter Azid-Alkin-Konjugation angebracht. Dieses Syntheseprinzip bietet Zugang zu symmetrischen wie auch asymmetrischen verzweigten Glykomakromolekülen.

Unter Verwendung dieser Synthesestrategien wurden drei Klassen von Glykomakromolekülen mit unterschiedlichen Gerüsten und Kohlenhydratliganden für verschiedene Lektin Bindungsstudien hergestellt (Kurzzusammenfassung 2): A) 1- und 3-armig verzweigte Glykomakromoleküle, die mit Mannose funktionalisiert wurden; B) 3-armig verzweigte Glykomakromoleküle, die *N*-Acetylgalactosamin (GalNAc) tragen; C) lineare mit *N*-Acetylneuramin Säure (Neu5Ac) funktionalisierte Glykomakromoleküle als mono-, di- und trivalente Glykomimetika.



*Kurzzusammenfassung 2: Präsentation der drei Glykooligomerklassen, die in dieser Arbeit synthetisiert wurden. In blau hervorgehoben ist jeweils der zentrale Baustein, der zur Verzweigung der Kette eingesetzt wurde. A) Mannose funktionalisiertes asymmetrisch verzweigtes Glykooligomer für Bindungsstudien an Langerin und ConA, B) GalNAc funktionalisiertes asymmetrisch verzweigtes Glykooligomer für Bindungsstudien an ASGPR, C) Neu5Ac funktionalisiertes lineares Glykooligomer für Bindungsstudien an Hämagglutinin.*

Die verzweigten Mannose-funktionalisierten Glykomakromoleküle wurden in Bindungsstudien an Langerin und ConA getestet. Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse, dass die kleinste verzweigte Struktur die höchste Bindungsaffinität zu Langerin besitzt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Glykomakromolekül möglicherweise zwischen den Bindungstaschen des Rezeptors sitzt und dort von einem schnellen Austausch der Kohlenhydratliganden zu den drei Bindungsstellen profitiert. Die Verlängerung nur eines Armes der trivalenten Struktur führt zu einer Reduktion der Bindungsaffinität, die auf die zunehmende Größe des Moleküls und schlechtere Passgenauigkeit zurückzuführen sein könnte. Ein weiterer Faktor für die Reduktion der Bindungsaffinität könnte die Flexibilität und damit resultierende Konformation des Gerüsts sein, die eine multivalente Bindung mit zunehmender Kettenlänge entropisch weniger begünstigt. Neben der Steigerung der Affinität ist eine

Herausforderung bei der Entwicklung neuer Glykomimetika eine mögliche Selektivität, also die Bindung an ein ausgewähltes Lektin mit deutlich erhöhter Affinität gegenüber anderen Lektinen, die denselben Kohlenhydratliganden erkennen. Ein Vergleich der Bindung der Glykomakromoleküle an Langerin und ConA zeigte, dass in Abhängigkeit der Gerüststruktur Liganden mit höherer Affinität und somit Selektivität an Langerin binden können.

Zusammenfassend präsentiert diese Arbeit die Synthese asymmetrisch verzweigter Glykomakromoleküle und zeigt in ersten Bindungsstudien das Potenzial dieser Strukturen, durch gezielte Variation der Architektur des makromolekularen Gerüsts hochaffine und selektive Glykomimetika zu erzeugen. Solche biomimetischen Liganden könnten potenziell in verschiedenen biotechnologischen und biomedizinischen Anwendungen eingesetzt werden, etwa zur gezielten Wirkstofflieferung in der Krebstherapie. Als *Proof of concept*, wurde ein monovalentes GalNAc funktionalisiertes Glykooligomer synthetisiert und an ein Phorphyrin-Derivat konjugiert. Dieses Konjugat könnte als Photosensibilisator in der Photodynamischen Therapie (photodynamic therapy (PDT)) eingesetzt werden.

## Abstract

Carbohydrate-lectin interactions mediate many biological processes such as cell-cell contacts or the binding of pathogens. However, the mechanism of such carbohydrate-lectin interactions are often not fully understood. To get a deeper understanding, model systems can be used, so-called glycomimetics, consisting of an artificial scaffold with covalently linked carbohydrate motifs.

Hartmann *et al.* introduced the solid phase polymer synthesis (SPPoS) of glycomacromolecules based on the stepwise assembly of tailor-made building blocks using Fmoc-group adjusted coupling protocols and different conjugation methods for introducing carbohydrate ligands. The approach has been used to design and synthesize structurally-defined scaffolds with complete control of the carbohydrate position along the scaffold, the carbohydrate ligand type, the scaffold sequence and the general scaffold architecture.

The goal of this work was to extend this strategy towards the synthesis of asymmetrically branched glycomacromolecules. Lectins such as Langerin, hemagglutinin or the asialoglycoprotein receptor (ASGPR) have binding pockets arranged in a trivalent, triangular fashion. The triangular presentation can be symmetric in case of Langerin or asymmetric in case of hemagglutinin and ASGPR. To bridge the three binding pockets simultaneously and directly, the synthesis of three-armed branched glycomimetic ligands was proposed.

Two different synthetic strategies for the introduction of a side chain and thereby branching into a glycomacromolecular scaffold based on different functional building blocks were established. First strategy uses building blocks with an amine functionalized side chain, which is protected with orthogonal protecting groups, Dde or Alloc. Second strategy is using a newly developed building block with an azide functionality. The side chain elongation takes place by amide coupling in case of the amine functionality or Staudinger-ligation in case of the azide functionality (see Figure 1).

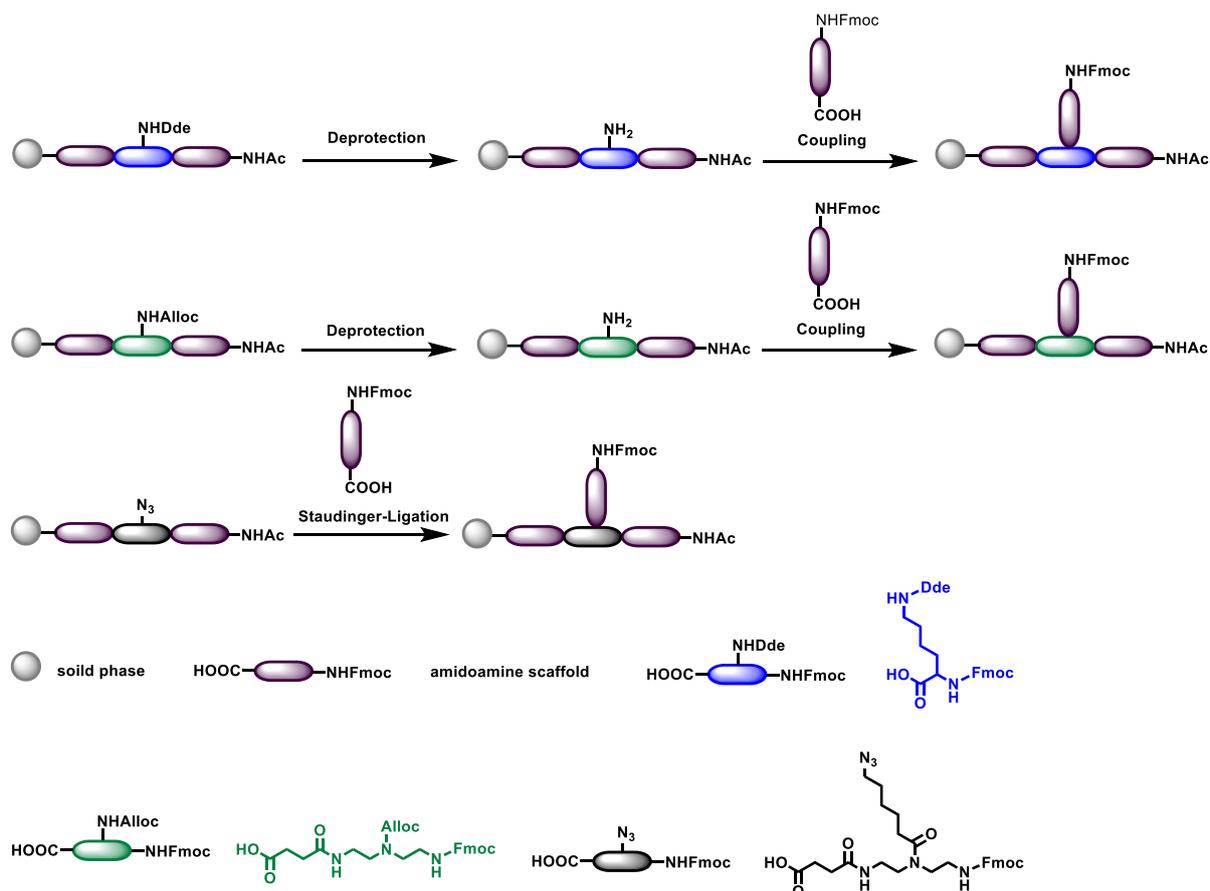


Figure 1: Schematic presentation of the developed synthetic strategies to synthesize a branched glycooligomer by introducing the side chain and depicting the branched building blocks.

All strategies still allow the stepwise coupling and deprotection of building blocks and thus the successive assembly of the different arms of the scaffold and synthesis of symmetrically and asymmetrically branched structures. After successful synthesis of the scaffold, carbohydrate ligands were conjugated by copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition.

Overall, three series of glycooligomers with different scaffolds and carbohydrate ligands were prepared (see Figure 2): A) 1-armed and 3-armed branched glycooligomers bearing mannose, B) 3-armed glycooligomers bearing *N*-acetylgalactosamine (GalNAc), C) 1-armed linear sialic acid functionalized glycooligomers, varying in valency from mono- to trivalent structures.

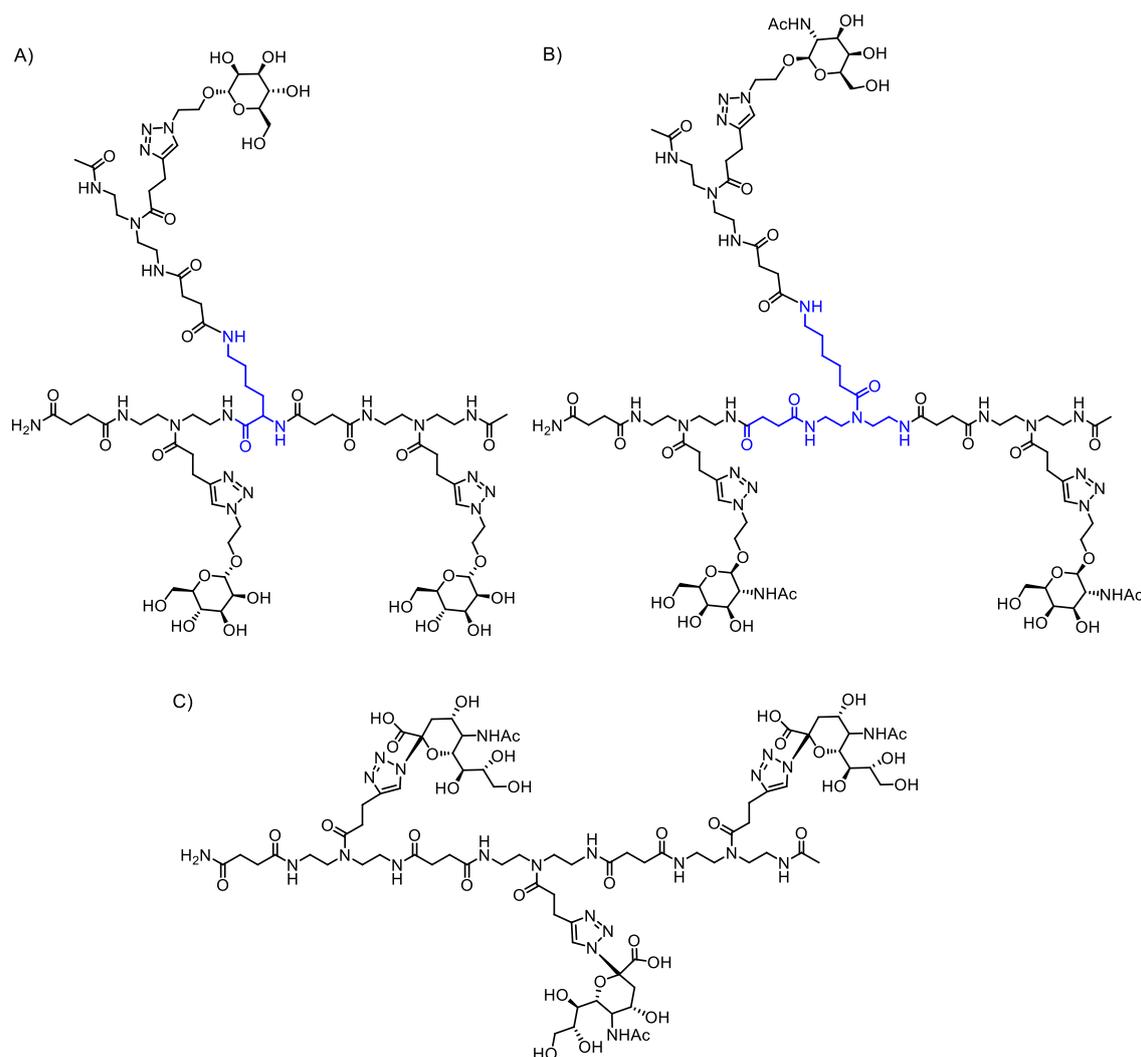


Figure 2: Exemplary structures of linear and branched glycooligomers. A) Mannose functionalized asymmetrically branched glycooligomers targeting Langerin and ConA, B) N-Acetylgalactosamine functionalized asymmetrically branched glycooligomers targeting ASGPR, C) Sialic acid functionalized linear glycooligomers targeting hemagglutinin.

1-armed and 3-armed branched glycooligomers bearing mannose were then investigated in binding studies towards Langerin and ConA to evaluate the influence of the branched structure on the affinity as well as selectivity in lectin binding. Results showed that the smallest 3-armed glycooligomers had the highest affinity towards Langerin. Since simultaneous binding to all binding sites seems unlikely, this finding could point towards the smallest structure sitting in between the three binding sites where it participates in a fast ligand exchange. Interestingly, increasing the length of just one of the arms leads to a clear decrease in binding affinity. One reason could be that with the increasing size of the glycooligomer, the structures adopt a more coiled conformation thereby decreasing the accessibility of the mannose ligands rather than enabling contact with the binding sites.

When considering the application of glycomacromolecular ligands in biomedical applications such as drug delivery or drug development, not only high affinity but also selectivity is important. Selectivity is given if a glycomimetic ligand binds to a specific lectin with higher binding affinity in comparison to

other lectins, which bind to the same kind of carbohydrate ligand. Comparing the binding of glycomacromolecules towards Langerin and ConA showed higher affinity binding towards Langerin in dependence of the scaffold is possible.

In summary, this thesis presents a novel SPPoS strategy to synthesize asymmetrically branched precision glycooligomers. The asymmetrically branched precision glycooligomers showed high binding affinities towards lectins and it could be demonstrated that by varying the arm length of the glycooligomer binding affinity and selectivity can be tuned. Such glycomimetic ligands have a potential use in biotechnological and biomedical applications e.g. for drug delivery in cancer therapy. As proof-of-concept, a first glycooligomer bearing GalNAc was functionalized with a porphyrin for future use in photodynamic therapy (PDT).

## Inhaltsverzeichnis

Kurzzusammenfassung.....	I
Abstract .....	V
Inhaltsverzeichnis.....	1
1. Einleitung.....	3
1.1. Kohlenhydrate als Liganden und ihre Rolle in biologischen Prozessen .....	3
1.2. Prinzip von Glykomimetika.....	5
1.2.1. Glykopolymere .....	7
1.2.2. Verzweigte Glykomimetika.....	8
1.3. Multivalente Lektin-Kohlenhydrat Wechselwirkungen.....	11
1.4. Festphasensynthese von Präzisionsglykomakromolekülen .....	14
1.4.1. Festphasenpeptidsynthese nach Merrifield.....	14
1.4.2. Festphasenpolymersynthese von Präzisionsglykomakromolekülen.....	18
2. Aufgabenstellung.....	23
3. Ergebnisse und Diskussionen .....	25
3.1. Synthese eines Azid-funktionalisierten Bausteins.....	26
3.2. Synthese asymmetrisch verzweigter Glykooligomere .....	29
3.2.1. Verwendung von ADS als Verzweigungsbaustein .....	30
3.2.2. Verwendung von Fmoc-L-Lys(Dde)-OH als Verzweigungsbaustein.....	31
3.2.3. Verwendung von AADS als Verzweigungsbaustein .....	32
3.2.4. Vergleich der drei Verzweigungsbausteine ADS, Fmoc-L-Lys(Dde)-OH und AADS .....	34
3.3. Asymmetrisch verzweigte Mannose-Präzisionsglykomakromoleküle .....	36
3.3.1. Synthese asymmetrisch verzweigter Mannose-Präzisionsglykomakromoleküle.....	36
3.3.2. <sup>19</sup> F basierende NMR Kompetitive-Inhibierungsbindungsstudie mit Langerin.....	40
3.3.3. SPR Messungen mit Langerin und ConA .....	44
3.4. Asymmetrisch verzweigte N-Acetylgalactoseamin-Präzisionsglykomakromoleküle .....	48
3.4.1. Synthese Azid-funktionalisiertes N-Acetylgalactoseamin .....	49
3.4.2. Synthese asymmetrisch verzweigter N-Acetylgalactoseamin-Präzisionsglykomakromoleküle mit FITC.....	51
3.4.3. Synthese N-Acetylgalactoseamin-Präzisionsglykomakromoleküle mit Phorphyrin.....	53
3.4.3.1. Phorphyrin-Konjugation in Lösung.....	54
3.4.3.2. Phorphyrin-Konjugation an der Festphase.....	58
3.5. Lineare N-Acetylneuraminsäure-Präzisionsglykomakromoleküle .....	60
3.5.1. Synthese linearer N-Acetylneuraminsäure-Präzisionsglykomakromoleküle .....	61
3.5.2. ELISA-Bindungsstudien mit Hämagglutinin .....	63

4. Zusammenfassung und Ausblick .....	65
5. Experimentalteil .....	70
5.1. Materialien .....	70
5.2. Instrumente .....	71
5.3. Synthesen .....	72
5.3.1. Synthesen in Lösung .....	73
5.3.2. Synthesen an der Festphase .....	79
5.4. Bindungsstudien zwischen monodispersen, sequenzkontrollierten Glykooligomeren und Lektinen .....	104
5.4.1. SPR Experimente von monodispersen, sequenzdefinierten Glykooligomeren mit Langerin und Con A .....	104
5.4.1.1. Immobilisation von monodispersen, sequenzdefinierten Glykooligomeren auf den SPR-Chips C1 .....	104
5.4.1.2. <i>Direct binding</i> Studien mit den immobilisierten Glykooligomeren 7, 12 und 13 auf den SPR-Chips C1 mit Langerin und Con A .....	105
5.4.1.3. <i>Reduced IC<sub>50</sub> Bindungsstudie</i> : Inhibierung-Kompetitive Studien mit Con A und dem SPR- C1.1 Chip, mit dem immobilisierten Glykooligomer 12 und den Glykooligomeren 7 und 9-17 in Lösung .....	112
5.4.2. ELISA Bindungsstudien mit Hämagglutinin .....	113
6. Verzeichnisse .....	115
6.1. Schemenverzeichnis .....	115
6.2. Abbildungsverzeichnis .....	115
6.3. Abkürzungsverzeichnis .....	118
6.4. Tabellenverzeichnis .....	119
6.5. Literaturverzeichnis .....	120
7. Appendix .....	136

## 1. Einleitung

Kohlenhydrate können als „Allrounder“ bezeichnet werden. Sie begegnen uns in unserem täglichen Leben als Energielieferanten in Form von Glukose oder Fruktose, aber auch als Polysaccharide, z.B. in Form von Zellulose, die Hauptbestandteil von pflanzlichen Zellwänden ist. Zellulose ist eine der wichtigsten Rohstoffquellen für umweltgerechte und biokompatible Materialien.<sup>1</sup> Im menschlichen Körper spielen Kohlenhydrate als Liganden, die spezifisch an Proteinrezeptoren binden, eine essentielle Rolle, z.B. bei der Zellkommunikation sowie bei bakteriellen oder viralen Infektionen.<sup>2</sup> Das Forschungsgebiet der Glykobiologie untersucht genau diese Rolle von Kohlenhydraten in biologischen Prozessen und wird im Kapitel 3.1. vorgestellt. Um ein besseres Verständnis über die Funktion von Kohlenhydraten zu erlangen, werden neben den natürlichen Kohlenhydratliganden auch sogenannte Glykomimetika untersucht, die einfache Kohlenhydratmotive wie Monosaccharide mit synthetischen Gerüsten wie den Polymeren verknüpfen. Das Prinzip der Glykomimetika, insbesondere von verzweigten Glykomimetika, wird in Kapitel 3.2. diskutiert. Ein besonderes Interesse der Forschung an Glykomimetika gilt der Untersuchung von monovalenten und multivalenten Wechselwirkungen, etwa zwischen Glykomimetika und Lektinen. Wichtige Aspekte der Multivalenz von Lektinwechselwirkungen werden in Kapitel 3.4. erörtert. Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Synthese und Charakterisierung neuer verzweigter Glykomimetika, die auf den von Hartmann *et al.* etablierten Synthesen von monodispersen und sequenzkontrollierten Glykooligo(amidoaminen) basieren. Diese Synthesestrategie verwendet Protokolle der klassischen Peptidsynthese, die kurz in Kapitel 3.4.1. vorgestellt wird und erweitert diese durch den Einsatz neuer, speziell entwickelter Bausteine und Konjugationsmethoden (Kapitel 3.4.2.).

### 1.1. Kohlenhydrate als Liganden und ihre Rolle in biologischen Prozessen

Das Forschungsgebiet der Glykobiologie beschäftigt sich sowohl mit chemischen als auch biologischen Fragestellungen zur Rolle von Kohlenhydraten in biologischen Prozessen.<sup>3</sup> Neben den Proteinen und Nukleinsäuren bilden die Kohlenhydrate die dritte Klasse der Biomakromoleküle. Lange Zeit wurde angenommen, dass die meisten biologischen Prozesse im Körper von Nukleotiden und Proteinen gesteuert bzw. dominiert werden. Somit wurde die Rolle der Kohlenhydrate vorwiegend als Energielieferant und Strukturelement intensiv erforscht. Der Aspekt, dass Kohlenhydrate auch als

wichtige Informationsüberträger in zahlreichen biologischen Prozessen wie z.B. der Zell-Zell-Kommunikation dienen, ist erst in den letzten Jahrzehnten in den Fokus der Forschung getreten.<sup>4-5</sup>

In lebenden Organismen sind Kohlenhydrate als Glykokonjugate wie Glykolipide und Glykoproteine die Hauptkomponenten in der Zellmembran. Die Kohlenhydrate bilden einen Mantel um die Zelle, der Glykokalyx genannt wird und eine Dicke von bis zu 100 nm erreichen kann.<sup>3</sup> Die Glykokalyx ist charakteristisch für jeden Zelltyp und dessen Entwicklungsstadien<sup>4</sup> und dient als Andockstelle für Rezeptoren anderer Zellen, Antikörper, Viren und andere Pathogene (Abbildung 1).<sup>6</sup>

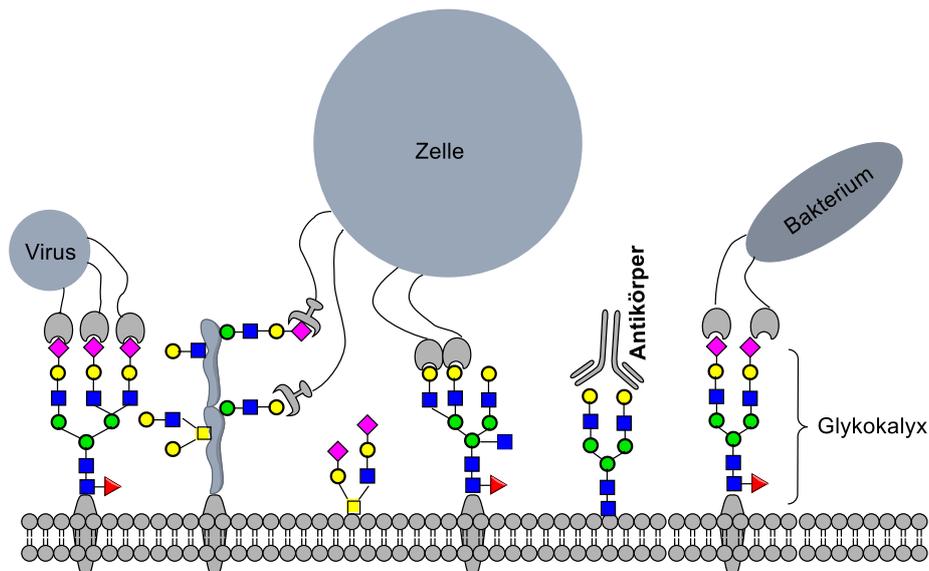


Abbildung 1: Schematische Präsentation der Glykokalyx und die Wechselwirkungen zu Rezeptoren von Viren, Bakterien, Antikörpern wie auch zu anderen Zellen, in Anlehnung an <sup>6</sup>

Die Glykokalyx nimmt somit eine Schlüsselrolle in zellulären Kommunikationsprozessen ein und ist u.a. verantwortlich für die Informationsaufnahme und -verarbeitung von Zell-Zell-Prozessen, Zell-Pathogene-Prozessen oder Zell-Signalmolekül-Prozessen wie z.B. zu Hormonen und spielt eine essentielle Rolle in biologischen Signaltransduktionsprozessen.<sup>6-7</sup>

Eine Herausforderung bei der Untersuchung von Kohlenhydraten ist ihre strukturelle Vielfalt.<sup>8</sup> Die kleinste Einheit bilden Monosaccharide, die wiederum zu Oligosacchariden oder Polysacchariden verknüpft sein können.<sup>9</sup> Die Anordnung der unterschiedlichen Kohlenhydrate bietet eine viel höhere strukturelle Variation (Abbildung 2) im Vergleich zu den exklusiv linear verknüpften Nukleotiden in der DNA und Aminosäuren in Proteinen.<sup>3</sup> Insbesondere Oligosaccharide liegen häufig verzweigt vor. Desweiteren können die verschiedenen Hydroxylgruppen der Monosaccharide durch eine Amin-, Amid- und Sulfatgruppe zusätzlich funktionalisiert sein. Außerdem besitzen Kohlenhydrate mehrere Stereozentren und können sowohl als Fünf- oder Sechsring vorhanden sein. Die glykosidische Bindung ist entweder  $\alpha$ - oder  $\beta$ -konfiguriert. Insgesamt haben Oligo- bzw. Polysaccharide somit eine extrem

hohe strukturelle Diversität.<sup>10-12</sup> Die Kombination von nur drei Kohlenhydratbausteinen ermöglicht die Bildung von mehr als 1000 verschiedenen Oligosacchariden.

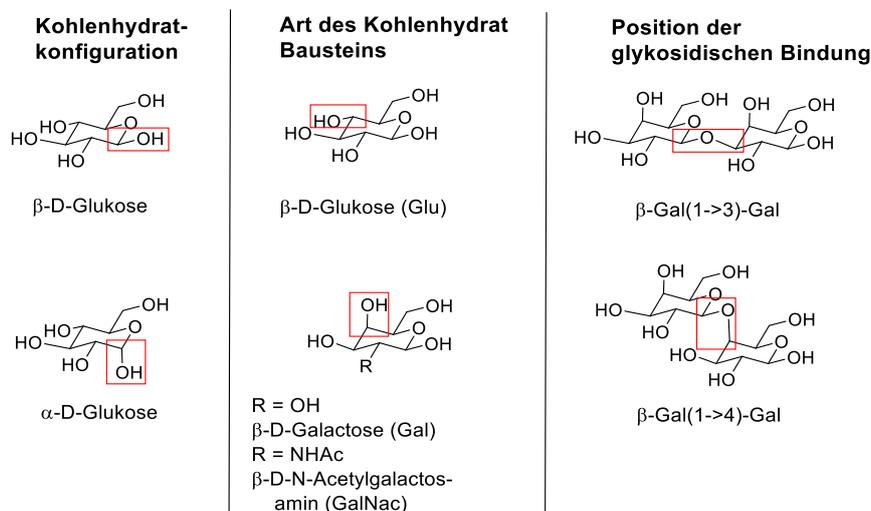


Abbildung 2: Beispiele für die Diversität der Kohlenhydrate, in Anlehnung an <sup>13</sup>

Trotz der hohen Diversität der Kohlenhydrate zeichnen sich aber auch immer wieder ähnliche Motive im Zusammenhang mit bestimmten biologischen Funktionen ab. Es ist daher möglich, basierend auf diesen Informationen auch stark vereinfachte, sogenannte Glykomimetika zu erzeugen. Diese sind in ihrer Struktur deutlich einfacher als ihre natürlichen Kohlenhydrat-Vorbilder, vermögen aber deren biologische Aktivität nachzuempfinden.

## 1.2. Prinzip von Glykomimetika

Um die Rolle der Kohlenhydrate in biologischen Prozessen besser verstehen zu können, ist die Korrelation zwischen Struktur und Wirkung ein zentrales Forschungsgebiet der Glykobiologie.<sup>2</sup> Trotz der enormen Bedeutung von natürlichen Kohlenhydratliganden in der Biologie<sup>14-16</sup>, erschwert die komplexe strukturelle Vielfalt natürlicher Kohlenhydrate, eine direkte Struktur-Wirkungsbeziehung zwischen Kohlenhydratligand und Rezeptor zu ziehen. Um ein besseres Verständnis dieser Struktur-Wirkungsbeziehung zu erlangen, wird in der Forschung auf künstliche Modellsysteme zurückgegriffen, mit deren Hilfe gezielt eine Fragestellung zum Mechanismus der Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkungen untersucht werden kann. Häufig findet die Bindung zwischen Rezeptor und Ligand zwischen den terminalen Kohlenhydrat-bindenden Epitopen und den CRDs (*carbohydrate recognition domain*) der Lektine statt.<sup>14, 17-18</sup> In den künstlichen Modellsystemen wird das Kohlenhydrat-Gerüst

durch ein künstliches Gerüst ersetzt, das eine multivalente Präsentation an Kohlenhydratgruppen trägt (Abbildung 3).<sup>2, 6-7, 19-26</sup>

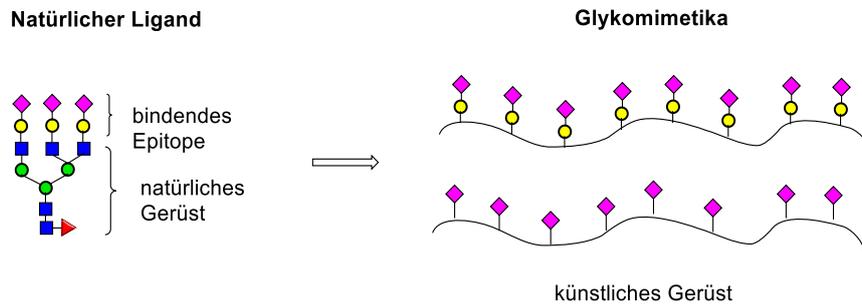


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Prinzips von Glykomimetika, in Anlehnung an<sup>27</sup>

Glykomimetika werden nach ihren unterschiedlichen Gerüsten unterteilt. Abbildung 4 gibt einen schematischen Überblick über wichtige Beispiele für unterschiedliche Gerüste der Glykomimetika.

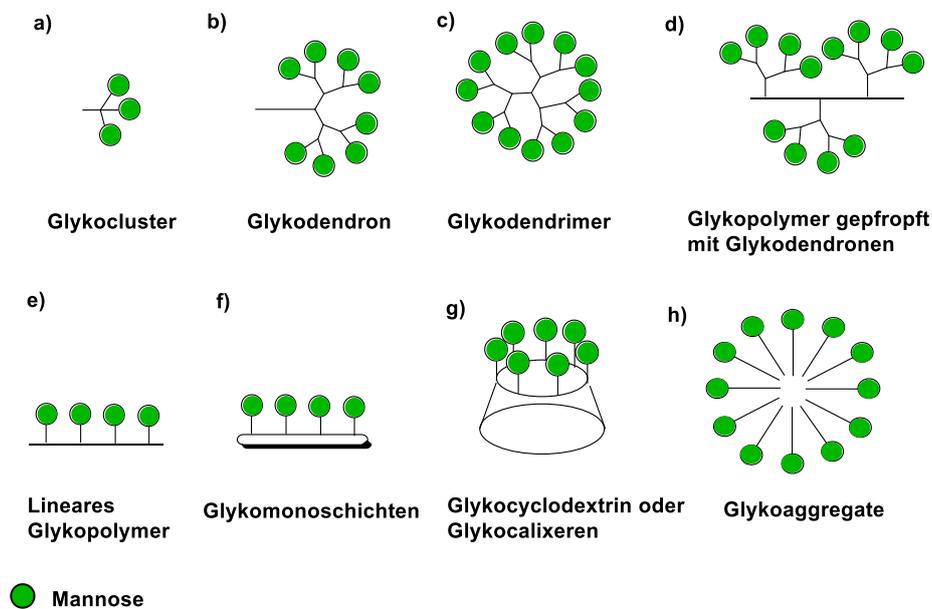


Abbildung 4: Schematische Darstellung von unterschiedlichen Glykomimetika in Abhängigkeit des gewählten Gerüsts, in Anlehnung an<sup>17, 28</sup>

Das künstliche Gerüst von Glykomimetika kann sowohl niedermolekular als auch makromolekular sein, z.B. in Form von Dendronen<sup>29-31</sup> oder Dendrimeren<sup>30, 32-33</sup>, verzweigter<sup>30, 34</sup> oder linearer Polymeren<sup>35-40</sup>. Solche Glykomimetika können wieder genutzt werden, um Oberflächen zu funktionalisieren<sup>17, 41</sup> oder zur Konjugation an Calixarene<sup>17, 42</sup> bzw. Cyclodextrine<sup>17, 43-45</sup> oder Nanopartikel<sup>46-47</sup>. Amphiphile Glykomimetika, z.B. auf Basis von Blockcopolymeren, bilden unterschiedliche Aggregate<sup>40, 48-49</sup>. Bei dieser großen Vielfalt der Gerüste gibt es jedoch auch die folgenden Gemeinsamkeiten in den Strukturvariationen, die im Hinblick auf die Entwicklung verbesserter Glykomimetika in den letzten 20 Jahren untersucht wurden:

- Ligandendichte<sup>7, 20, 23, 32, 37, 50-53</sup>: Der Abstand zwischen den einzelnen Kohlenhydratliganden am Gerüst kann variiert werden.
- Linker<sup>26, 38-39, 54-56</sup>: Es können unterschiedliche Linker zur Anknüpfung der Kohlenhydratliganden am Gerüst verwendet werden, diese können sich z.B. in ihrer Länge aber auch in ihrer chemischen Zusammensetzung unterscheiden.
- Valenz<sup>2, 7, 20, 22-23, 37, 46, 50</sup>: Die Valenz ist sicher einer der wichtigsten Parameter eines Glykomimetikums und beschreibt die Anzahl der am Gerüst präsentierten Liganden.
- Größe der Glykomimetika<sup>2, 7, 20, 23-24, 32, 37-39, 55</sup>: Bei funktionalisierten Nanopartikeln oder selbstassemblierenden Systemen kann die Größe variiert werden, aber auch polymerbasierte Glykomimetika können z.B. mit unterschiedlichen Molekulargewichten erzeugt werden.
- Position der Kohlenhydratliganden<sup>28, 40, 57-58</sup>: Wenn es der Syntheseweg bzw. die Struktur des Gerüsts ermöglicht, können Liganden an spezifischen Positionen und somit möglicherweise definierten Abständen entlang des Gerüsts angebracht werden.
- Art der Kohlenhydratliganden<sup>18, 24, 26, 35, 37, 54, 59</sup>: Je nach natürlichem Vorbild für das Mimetikum bzw. Lektin-Rezeptor wird das Kohlenhydrat-Epitop zur Anbindung an das Gerüst gewählt.
- Kombination verschiedener Kohlenhydrattypen<sup>40, 51, 58-63</sup>: Hierbei werden im Glykomimetikum verschiedene Liganden miteinander kombiniert. Meist handelt es sich dabei um verschiedene Kohlenhydratliganden, es können aber auch andere Arten von Liganden, z.B. Peptide mit eingebaut werden.

Diese Variation von künstlichen Gerüsten bietet die Möglichkeit, Fragestellungen zur Struktur-Aktivitäts-Korrelation von Glykomimetika-Lektin-Wechselwirkungen zu untersuchen. Eine wichtige Klasse von Glykomimetika sind die Glykopolymere, die in Kapitel 1.2.1. vorgestellt werden. In Hinblick auf die Aufgabenstellung, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht worden ist, werden verzweigte Glykomimetika mit ihren jeweiligen Synthesemethoden detailliert in Kapitel 1.2.2. diskutiert.

### 1.2.1. Glykopolymere

Eine wichtige Klasse der Glykomimetika sind die Glykopolymere. Im Vergleich zu anderen Glykomimetika liegt der Vorteil von Glykopolymeren in ihrer Größe bzw. in ihrem Molekulargewicht<sup>17</sup>, das im Bereich von Lektinen oder noch höher liegt. Diese Größe ermöglicht ein unterschiedliches Verhalten in der Assoziation mit dem Zielprotein.<sup>64-66</sup> Die Bindung an das Protein kann entweder erleichtert oder erschwert werden, was zu höheren oder niedrigeren Bindungsaffinitäten führt. Beide Prozesse können für eine Anwendung der Glykopolymere genutzt werden.

Der Aufbau des Polymergerüsts hängt von der jeweiligen Polymerisationsstrategie und somit von den jeweiligen Monomeren ab. Die Liganden werden entweder während der Polymerisation durch Verwendung geeigneter Glykomonomere<sup>2, 51, 67-68</sup> oder nach der Polymerisation durch polymeranaloge Reaktionen an zuvor eingebrachten funktionellen Seitenketten<sup>26, 63</sup> eingeführt. Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Wahl der Polymerisationsmethode ist die zu erwartende Dispersität der Probe. Methoden wie die anionische oder kontrollierte radikalische Polymerisation ermöglichen die Synthese von Polymeren mit sehr niedrigen Dispersitäten von  $D < 1.01$ . Glykopolymere können außerdem in unterschiedlichen Architekturen wie z.B. linear<sup>35-40</sup>, verzweigt<sup>30, 34</sup> oder sternförmig<sup>2, 69-70</sup> erhalten werden. Insbesondere verzweigte Glykopolymere, aber auch andere verzweigte Glykomimetika wie Glykodendrimere, zeigen besonders gute Eigenschaften im Bereich der Proteinbindung und werden im nächsten Kapitel genauer betrachtet.

### 1.2.2. Verzweigte Glykomimetika

Eine wichtige Klasse der Glykomimetika basiert auf verzweigten Gerüsten. Zu den verzweigten Glykomimetika gehören z.B. i) sternförmige Glykopolymere, ii) Kamm-Glykopolymere, iii) Dendrimere und Dendronen sowie iiiii) niedermolekulare verzweigte Glykocluster (Abbildung 5). Synthese und die wichtigsten Eigenschaften dieser Beispielklassen werden im Folgenden kurz beleuchtet.

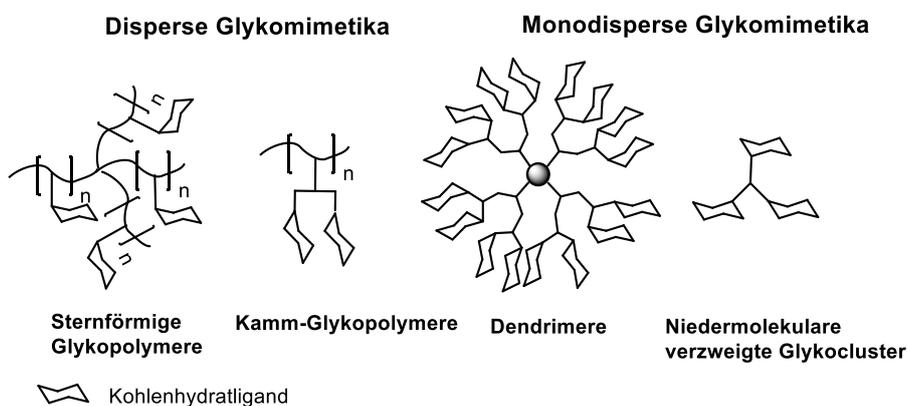


Abbildung 5: Schematische Darstellung eines dispersen sternförmigen und eines Kamm-Glykopolymers sowie monodisperse Dendrimere und niedermolekulare verzweigte Glykocluster.

- Sternförmige Glykopolymere

Glykopolymere können in einer sternförmigen<sup>2, 69-70</sup> Architektur vorliegen. Die Synthese solcher sternförmigen Systeme kann mittels verschiedener Strategien erfolgen, z.B. durch die Nutzung eines mehrfachfunktionalen Initiator-moleküls oder durch die Verknüpfung mehrerer Polymerketten an

ihren Kettenenden. Ein aktuelles Beispiel aus dem Jahr 2017 von *Chen et al.*<sup>69</sup> vergleicht direkt ein sternförmiges mit einem linearen Glykopolymer mit vergleichbarem Molekulargewicht. Mittels Trübungsexperimenten konnte gezeigt werden, dass das sternförmige Glykopolymer eine höhere Bindungsaffinität zum untersuchten Rezeptor als das lineare System besitzt. Sternförmige Polymere sind jedoch auch bei Nutzung kontrollierter Polymerisationsmethoden immer dispers. Bisher wurden zudem nur symmetrische sternförmige Glykopolymere betrachtet, d.h. Kettenlänge sowie Art und Dichte der Liganden war für alle Arme gleich.

- Kamm-Glykopolymere

Kamm-Glykopolymere sind durch ein Polymergerüst, das mit Seitenketten funktionalisiert ist, symmetrisch verzweigt aufgebaut. Das Polymerrückgrad kann mit klassischen Polymerisationen synthetisiert werden. Ein aktuelles Beispiel aus dem Jahr 2016 von *Chen et al.*<sup>63</sup> stellt die Synthese eines heterovalenten strukturdefinierten monodispersen Kamm-Glykopolymers vor. Die Synthesestrategie basiert auf einem Polymethacrylsäure-Gerüst, das mittels *reversible addition-fragmentation chain transfer* (RAFT) polymerisiert worden ist. Das Gerüst wurde via Ugi Reaktion mit dem ersten Kohlenhydratliganden und im zweiten Schritt mit einer Click-Reaktion mit dem zweiten Kohlenhydratliganden post-funktionalisiert. Somit entsteht eine Kontrolle mittels orthogonalen Reaktionen über die heterovalente Struktur. Mit dieser Synthesestrategie konnten die Seitenketten des Kamm-Glykopolymers zwar mit zwei unterschiedlichen Kohlenhydratliganden funktionalisiert werden, aber insgesamt liegt das Kamm-Glykopolymer symmetrisch verzweigt vor. Eine asymmetrische Verzweigung einzelner Seitenketten ist mit dieser Synthesestrategie nicht möglich. Zusätzlich sind die mit RAFT synthetisierten Polymere dispers.

- Dendrimere und Dendronen

Dendrimere und Dendronen haben in einer Vielzahl von Publikationen ihr Potenzial als Glykomimetikum gezeigt.<sup>30, 32-33, 71</sup> Ihr großer Vorteil liegt in der großen Anzahl an Kohlenhydratliganden, mit denen sie funktionalisiert sind. Durch die große Anzahl an Kohlenhydratliganden können sich Cluster-Effekte (Kapitel 1.3.) zwischen den Dendrimern und den Lektinen ausbilden.<sup>71</sup> Es konnte gezeigt werden, dass diese Cluster-Effekte zu einer 3-4 Male höheren Bindungsaffinität der Dendrimere, im Vergleich zu einzelnen Kohlenhydratliganden, führt.<sup>71</sup> Dendrimere bzw. Dendronen werden in der Regel sphärisch aufgebaut und können entweder mittels einer divergenten oder konvergenten Synthesestrategie synthetisiert werden. Beide Synthesestrategien bauen Dendrimere bzw. Dendronen in Sphären auf. Der sphärische Aufbau von

Dendrimere bietet sowohl die Vorteile der Monodispersität als auch der Strukturdefiniertheit. Der Nachteil der divergenten sowie konvergenten Synthesestrategien liegt jedoch in der Variation der Sequenz. Eine Sphäre kann immer nur identisch aufgebaut werden, sodass Dendrimere bzw. Dendronen eine symmetrische Struktur aufweisen. Der Parameter der asymmetrischen Verzweigung kann mittels Dendrimere bzw. Dendronen nicht auf eine Korrelation zwischen der Struktur des Glykomimetikums und dessen Bindungsaktivität untersucht werden.

- Niedermolekulare verzweigte Glykocluster

Es wurde herausgefunden, dass gerade niedermolekulare Glykomimetika, sogenannte Glykocluster, eine sehr hohe Bindungsaffinität zu ihren Rezeptoren zeigen.<sup>60, 72-73</sup> Im Fall von monodispersen und strukturdefinierten Glykoclustern kann eine Struktur-Wirkungsbeziehung zwischen der Glykoclusterstruktur und deren Wechselwirkung zum Rezeptor untersucht werden.

Das große Potenzial von symmetrisch verzweigten Glykoclustern konnten Meyer *et al.*<sup>74</sup> aufzeigen. Mittels Festphasenchemie (Kapitel 1.4.) konnten Sialinsäuren-Glykopeptidarme synthetisiert werden, die in Lösung an ein 1,3,5-funktionalisiertes Benzolderivat konjugiert worden sind. Mittels Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) –Spektroskopie wurde eine 4000-fach stärkere Bindungsaffinität zwischen dem Lektin Hämagglutinin und dem trivalenten verzweigten Glykocluster im Vergleich zu monovalenter Sialinsäure gemessen. Die trivalenten verzweigten Glykocluster sind strukturdefiniert wie auch monodispers. Jedoch trägt der verzweigte Glykocluster identische Sialinsäure-funktionalisierte Glykopeptidarme und liegt somit symmetrisch verzweigt vor. Mit dieser Synthesestrategie ist es nicht möglich, asymmetrisch verzweigte Glykocluster zu synthetisieren.

Wichtige Arbeiten auf dem Gebiet von verzweigten Glykoclustern haben auch Lee *et al.* geleistet.<sup>14, 75-77</sup> In ihren Publikationen haben sie mehrere mono-, di- und trivalente N-Acetylgalactoseamin (GalNac) und N-Acetylglucosamin (GluNac) funktionalisierte verzweigte Glykocluster in ihrem Bindungsverhalten zu unterschiedlichen Lektinen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Valenz einen großen Einfluss auf die Bindungsaffinität hat. Trivalente verzweigte Glykocluster zeigen im Vergleich zu divalenten Strukturen eine 10-20-fach höhere Bindungsaffinität zu den jeweiligen Rezeptoren. Die verzweigten Glykocluster basierten u.a. auf Asparaginsäure<sup>14, 75-76</sup> oder Glutaminsäure<sup>14, 76-77</sup>. Die beiden Carbonsäuren wurden während der Synthese immer symmetrisch funktionalisiert. Im Gegensatz dazu konnte die Aminogruppe orthogonal funktionalisiert werden. Diese Synthesestrategie erlaubt es, einen der drei Arme asymmetrisch zu funktionalisieren, jedoch können nicht alle drei Arme asymmetrisch aufgebaut werden.

Ein Beispiel für asymmetrisch verzweigte Glykocluster wurde von Lönnberg *et al.*<sup>78-79</sup> publiziert, die sich auf die Synthese von trivalenten heterovalenten Glykoclustern über orthogonale Schutzgruppen spezialisiert haben. Die drei Aminogruppen von  $\alpha,\alpha$ -Bis(aminomethyl)- $\beta$ -alanin werden über 8-11 Syntheseschritte mit orthogonalen Schutzgruppen funktionalisiert. Jeder dieser Syntheseschritte wie auch die jeweiligen orthogonalen Entschützungen und Konjugationen erfordern eine Aufreinigung, wodurch die Synthese sehr aufwendig und zeitintensiv ist.

Zusammenfassend lassen sich verschiedene verzweigte Glykomimetika synthetisieren. Das besondere Interesse an verzweigten Glykomimetika beruht auf ihren häufig verbesserten Bindungseigenschaften an entsprechenden Rezeptoren und wird im nächsten Kapitel genauer betrachtet.

### 1.3. Multivalente Lektin-Kohlenhydrat Wechselwirkungen

Der Begriff Lektin wurde das erste Mal von Boyd *et al.*<sup>80</sup> verwendet. Er definiert ein Lektin als ein Protein, das sich durch eine starke und spezifische Bindung an glykosilierten Strukturen auszeichnet. Ein Lektin kann pflanzlichen, tierischen oder bakteriellen Ursprungs sein.<sup>26, 81-82</sup> Lektine können Kohlenhydrate erkennen und reversibel binden. Dadurch sind sie in der Lage, spezifisch an Zellen zu binden und dort biochemische Reaktionen auszulösen. Der Aufbau der Lektine variiert in Form, Größe und Anordnung ihrer Kohlenhydrat erkennenden Domänen, den sogenannten CRDs (*carbohydrate recognition domain*). Viele Lektine besitzen zwei oder mehr Erkennungs-Domänen, die mit Kohlenhydraten der Glykokalyx auf anderen Zellen in Kontakt treten können. Eine solche multivalente Wechselwirkung ist insbesondere für die Kohlenhydrat-basierten Wechselwirkungen relevant, da die Bindung eines einzelnen Liganden meist nur mit sehr geringer Affinität im  $\mu\text{M}$ -mM Bereich erfolgt. Wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln diskutiert, basieren auch Glykomimetika auf der mehrfachen Präsentation von Kohlenhydratliganden und somit auf dem Prinzip der Multivalenz.

Multivalenz ist aber nicht nur für Kohlenhydrate von Bedeutung sondern auch ein allgemeines Schlüsselprinzip in der Natur.<sup>20, 83-84</sup> Multivalente Effekte sind gewöhnlich stärker als ihre korrespondierenden monovalenten Wechselwirkungen. Somit kann mit Hilfe der multivalenten Wechselwirkungen eine stärkere und möglicherweise spezifischere aber immer noch reversible Bindung zwischen einem multivalenten Liganden und Rezeptor generiert werden. Im Folgenden werden die multivalenten Effekte von Glykomimetika zu Lektinen diskutiert. Hierbei unterscheidet man verschiedene Arten der multivalenten Bindung oder sogenannte Bindungseffekte. Vier der wichtigsten Effekte, auch im Hinblick auf die Wechselwirkung von Glykomimetika mit Lektinen, sind

der Chelat-Effekt, der Cluster-Effekt, das *Statistical Rebinding* und *Sterical Shielding*, die im Folgenden näher beschrieben werden (Abbildung 6).

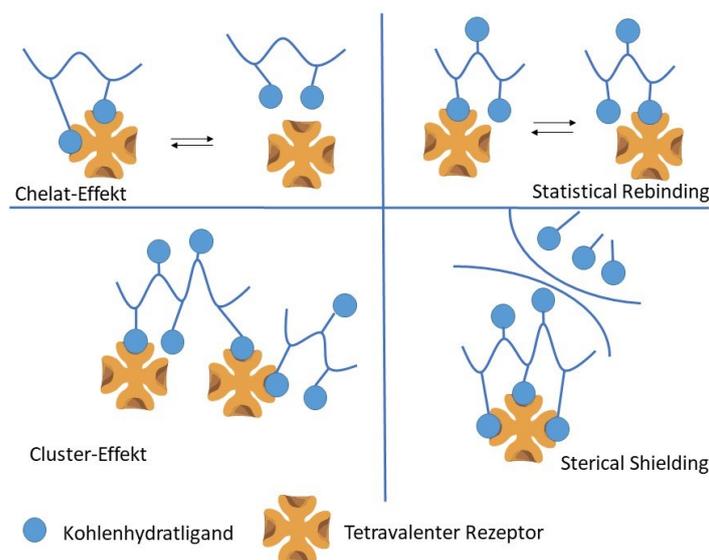


Abbildung 6: Schematische Präsentation der multivalenten Effekte zwischen Rezeptor und Liganden, in Anlehnung an <sup>20</sup>.

**Chelat-Effekt:** Der Chelatbegriff wurde im Forschungsgebiet der anorganischen Koordinationschemie eingeführt und beschreibt das Binden von einem Zentralatom oder Molekül über koordinative Bindungen an mehrzählige Liganden. Diese Chelatkomplexe sind erheblich stabiler als ihre entsprechenden Komplexe mit einem einfachen Liganden.<sup>85-87</sup> Im Rahmen der Glykomimetika beschreibt der Chelatbegriff die Bindung von mehreren Kohlenhydratliganden des gleichen Glykomimetikums an verschiedene Bindungsstellen desselben Rezeptors.<sup>8, 84</sup> Rezeptoren sind in den meisten Fällen nicht monovalent, sodass mehrere Bindungsstellen für eine Komplexbindung zur Verfügung stehen. Es wurde bisher meist angenommen, dass eine mögliche Chelat-Bindung zu einer starken Erhöhung der Affinität führt<sup>84</sup>, da mit Bindung des ersten Kohlenhydratmoleküls bereits die Translations- und Rotationsentropie für die Komplexbindung aufgebracht wurde. Für die Bindung eines zweiten Kohlenhydratmoleküls wäre dieser Beitrag nicht mehr zu leisten und dieser wäre somit entropisch günstig. Neuere Berechnungen und experimentelle Bestimmungen der Bindungsentropien haben jedoch ergeben, dass die Bindungsentropie während des Bindungsprozesses insgesamt ungünstig ist und somit vermutlich weniger Einfluss auf die Komplexbildung hat als ursprünglich angenommen.<sup>8</sup>

**Cluster-Effekt:** Der Cluster-Effekt basiert auf intermolekularen Wechselwirkungen zwischen einem multivalenten Glykomimetikum und verschiedenen Rezeptoren.<sup>8, 14, 65, 84, 88-89</sup> Die Möglichkeit eines Liganden, an mehrere Rezeptoren gleichzeitig zu binden, erhöht durch Bildung eines Clusters die Bindungsaffinität. Die biologische Bedeutung des Cluster-Effekts ist u.a., dass lösliche Rezeptoren zu

größeren Clustern gebunden werden. Diese Cluster, sogenannte Toxine, werden z.B. vom Immunsystem als schädlich erkannt und können ausgeschleust werden.

*Statistical Rebinding Effekte:* *Statistical Rebinding* Effekte basieren auf schneller Assoziation, Dissoziation und einer Reassoziaton von multivalenten Glykomimetika. Die Bindung von einem einzelnen Kohlenhydratmolekül zum Rezeptor ist schwach. Wird jedoch die lokale Kohlenhydratkonzentration erhöht, kann durch die räumliche Nähe der einzelnen Kohlenhydratmoleküle ein schneller Bindungswechsel und damit eine statistische Wiederbindung zwischen multivalentem Glykomimetikum und Rezeptor erfolgen. Zwischen den einzelnen Kohlenhydratliganden stellt sich ein Gleichgewicht von bindendem und nichtbindendem Zustand ein und verstärkt somit die apparente Bindungsaffinität des multivalenten Systems.<sup>65, 83, 90-92</sup>

*Sterical Shielding Effekte:* Das *Sterical Shielding* betrachtet die Konkurrenz mehrerer Kohlenhydratliganden. Wenn ein Ligand bereits an den Rezeptor gebunden hat und durch diese Bindung noch nicht besetzte Bindungsstellen desselben Rezeptors blockiert, ist somit eine Art Inhibition der Bindung weiterer Liganden erfolgt. Dieser Effekt wird häufig mit der Größe des Glykomimetikums in Verbindung gebracht, wobei große Glykomimetika während des Bindungsprozesses stärker zusätzliche Bindungstaschen des Rezeptors abschirmen als niedermolekulare Glykomometika. Dieses sogenannten *Sterical Shielding* Effekte sind daher besonders relevant für den Einsatz von Glykomimetika als Inhibitoren. Ein wichtiges Beispiel für mögliche Anwendungen solcher Inhibitoren ist die Bindung von Pathogenen wie Viren oder Bakterien an die Glycocalix der Zelle. Wenn das Glykomimetikum an die Bakterie bindet und Bindungsstellen blockiert, kann das Bakterium nicht an den konkurrierenden Liganden der Glycocalix binden und es kommt somit idealerweise zu keiner Infektion.<sup>47, 65</sup>

Meist treten die oben diskutierten Multivalenzeffekte jedoch nicht getrennt auf und es ist häufig nicht möglich, diese mittels verschiedener analytischer Methoden zu differenzieren. Nichtsdestotrotz konnten bereits Zusammenhänge zwischen der Struktur der Glykomimetika und der resultierenden multivalenten Bindung aufgeklärt werden. Für solche Struktur-Wirkungsbeziehungen ist jedoch der Einsatz möglichst hoch-definierter Moleküle erforderlich. Das folgende Kapitel stellt daher die Festphasensynthese sogenannter Präzisionsglykomakromoleküle vor, die aufgrund ihrer monodispersen und sequenzkontrollierten Struktur besonders gut als Modelle für solche grundlegenden Studien geeignet sind.

## 1.4. Festphasensynthese von Präzisionsglykomakromolekülen

Eine der aktuellen Herausforderungen in der synthetischen Polymerchemie der letzten Jahrzehnte ist die Synthese von sequenzkontrollierten Polymeren.<sup>38, 93-97</sup> Im Fokus liegt die Kontrolle über die Parameter Dispersität, Architektur, Monomersequenz sowie Kettenlänge. Während fast alle Biopolymere wie DNS, Proteine und viele der Kohlenhydrat-basierten Strukturen sequenzkontrolliert vorliegen, ist eine solche Kontrolle für synthetische Polymere meist nicht möglich. Erst die in den letzten Jahren entwickelten neuen Methoden, die etwa klassische Polymerisationstechniken mit Synthesestrategien aus Biologie, Bioanalytik und organischer Synthese kombinieren, ermöglichen Zugang zu sequenzkontrollierten synthetischen Polymeren.<sup>38</sup> Auch im Bereich der zuvor diskutierten Glykomimetika auf Basis von Polymeren- und Oligomeren-Gerüsten ist die Kontrolle der Sequenz von großem Interesse. Es konnte bereits gezeigt werden, dass z.B. die Abfolge unterschiedlicher Zucker entlang eines Gerüsts, aber auch der Abstand der Zucker auf dem Gerüst, einen Einfluss auf die resultierende Eigenschaft als Glykomimetikum hat.<sup>7, 20, 23, 32, 37, 50-53</sup>

Hartmann *et al.* entwickelten hierzu eine neue Synthesestrategie, die Zugang zu monodispersen und sequenzkontrollierten Glykooligo(amidoaminen) oder sogenannten Präzisionsglykomakromolekülen bietet.<sup>60, 72-73, 98-107</sup> Basierend auf der Verwendung maßgeschneiderter funktioneller Bausteine in Kombination mit etablierten Festphasenpeptidkupplungsprotokollen und Konjugationsmethoden ermöglicht dieser Ansatz die Monomersequenz, die Kettenlänge, die Gerüstzusammensetzung und die Architektur des Zielmoleküls zu kontrollieren.

Im Folgenden werden die klassische Festphasenpeptidsynthese (*solid-phase peptide synthesis* (SPPS)) nach Merrifield<sup>108</sup>, Beispiele für maßgeschneiderte bereits etablierte Bausteine aus der Gruppe von L. Hartmann sowie eine Modellsynthese für Präzisionsglykomakromoleküle nach Hartmann *et. al.*<sup>60, 72-73, 98-107</sup> kurz erläutert.

### 1.4.1. Festphasenpeptidsynthese nach Merrifield

Die SPPS nach Merrifield<sup>108</sup> ist eine etablierte Synthesemethode. Vor ihrer Einführung gab es nur die Möglichkeit, Peptide in Lösung durch alternierende Kupplungs- und Entschützungsreaktionen zu synthetisieren. Die Synthesestrategie war zwar erfolgreich, aber die Aufreinigung der einzelnen Reaktionsschritte war mühsam, zeitintensiv und führte zusätzlich zu einem großen Ausbeuteverlust. Merrifield erkannte diese Problematik und löste sie, indem das aufzubauende Peptid während der

kompletten Synthese an einem unlöslichen Träger, einem Harz, kovalent gebunden ist. Auf diese Weise können lösliche überschüssige Edukte und Nebenprodukte durch Filtration entfernt werden. Durch diese einfache Methode der Aufreinigung können die Edukte im Überschuss eingesetzt werden, wodurch sich Vorteile in Form von verkürzten Reaktionszeiten und erhöhten Ausbeuten ergeben. Eine Beispielsynthese der SPPS ist in Abbildung 7 dargestellt.

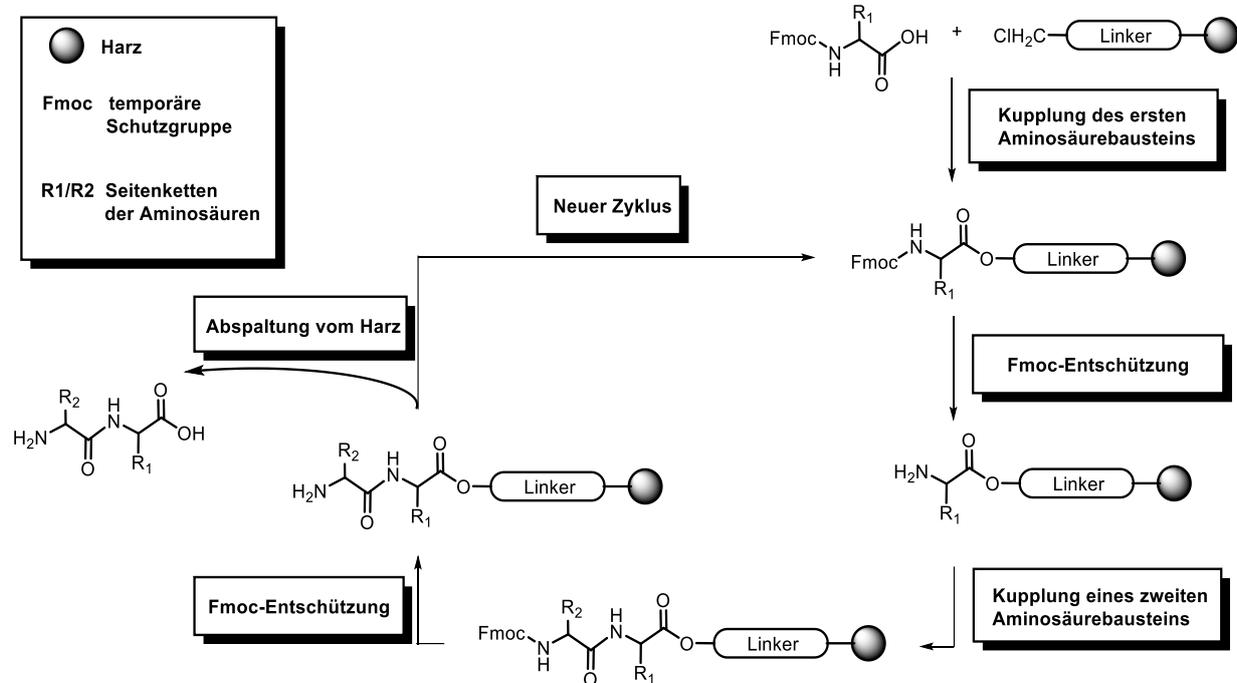


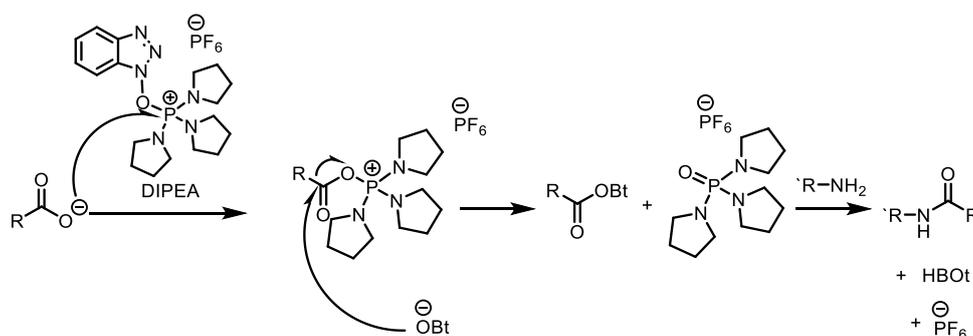
Abbildung 7: Darstellung einer Model SPPS nach Merrifield<sup>108</sup> mit der Erweiterung der Fmoc-Schutzgruppe<sup>109</sup>

Die Synthese beginnt beim C-Terminus hin zum N-Terminus, basierend auf alternierenden Kupplungs- und Entschützungsschritten. Während des ersten Syntheseschritts kuppelt die Carboxylgruppe der Aminosäure kovalent zum Harzlinker.<sup>110-111</sup> Die standardmäßig eingesetzten Aminosäuren tragen an ihrer  $\alpha$ -Aminofunktion eine Schutzgruppe, um unkontrollierte Oligomerisierung und/oder Nebenreaktionen zu verhindern. Früher war die säurelabile Butyloxycarbonyl- (Boc-) Schutzgruppe als temporäre Schutzgruppe weit verbreitet.<sup>112</sup> Diese Schutzgruppentechnik wurde durch die basenlabile Fluorenylmethoxycarbonyl- (Fmoc-) ersetzt.<sup>109</sup> Fmoc wird unter basischen Konditionen leicht abgespalten, ist aber unter den Kupplungsreaktionsbedingungen stabil. Ein weiterer Vorteil der Fmoc-Schutzgruppe besteht in der Möglichkeit, die Abspaltung mittels UV-Signal zu quantifizieren.<sup>113</sup> Das nach der Entschützung erhaltene Amin steht für eine weitere Kupplung zur Verfügung. Sofern die Aminosäure eine Seitenkette trägt, wird diese mit einer permanenten orthogonalen Schutzgruppe geschützt. Dieser Zyklus von Kupplung und endständiger Schutzgruppenabspaltung kann bis zur gewünschten Sequenz wiederholt werden. Im Folgenden werden die Parameter Kupplungsreagenzien, die feste Phase bzw. Harz und Linker diskutiert.

Kupplungsreagenzien: Die Reaktion der SPPS basiert auf einer Kondensation von zwei Aminosäuren. Die Kondensation findet nur langsam statt, sodass geeignete Kupplungsreagenzien eingesetzt werden. Die Kupplungsreagenzien haben die Aufgabe, den C-Terminus der einen Aminosäure vorübergehend in eine reaktive Zwischenstufe zu überführen, die anschließend mit dem N-Terminus der zweiten Aminosäure reagiert. Während der Reaktion besteht die Möglichkeit einer Racemisierung, die durch geeignete Additive gehemmt werden kann.<sup>114-115</sup> Heutzutage gibt es zahlreiche kommerziell erhältliche Kupplungsreagenzien<sup>114, 116</sup> wie z.B. i) Carbodiimide, ii) Phosphoniumsalze, iii) Uroniumsalze, die je nach Bedarf gewählt werden können.

Zur Klasse der Carbodiimide gehören Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)<sup>117</sup>, Diisopropylcarbodiimid (DIC) und 3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid. Nur DIC und 3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid werden in der SPS (*solid-phase synthesis*) eingesetzt, da sie DCM- und wasserlösliche Urea Derivate generieren.<sup>116</sup>

Eine andere Klasse der Kupplungsreagenzien stellen die Phosphoniumsalze dar. Der erste Vertreter dieser Klasse war Benzotriazoloxyltris(dimethylamino)-phosphonium hexafluorophosphat (BOP) oder Castro's Reagenz.<sup>110</sup> Während der Kupplungsreaktion wird jedoch ein toxisches Phosphoniumoxid generiert, sodass BOP im Laufe der Zeit durch Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat (PyBOP)<sup>118</sup> ersetzt worden ist. Die Reaktion basiert auf dem gleichen Mechanismus, jedoch wird bei PyBOP Phosphorsäuretriimid generiert (Schema 1). PyBOP ist eines der am häufigsten verwendeten Kupplungsreagenzien.



Schema 1: Kupplungsreaktion mit PyBOP als Kupplungsreagenz.

Die Kupplung findet in einer Eintopfreaktion statt, indem die zu kuppelnde Aminosäure, PyBOP und eine nicht nukleophile Base wie z.B. Diisopropylethylamin (DIPEA) in einem geeigneten Lösungsmittel wie DMF oder NMP zur Festphase hinzugefügt werden. Im basischen Reaktionsmilieu wird die Carbonsäure deprotoniert und reagiert mit PyBOP zu einem aktivierten Acylphosphoniumderivat und 1-Hydroxybenzotriazols (HOBt). HOBt reagiert im nächsten Schritt mit dem Acylphosphoniumderivat zu einem Aktivester, der durch einen nukleophilen Angriff des Amins zum Amid koppelt. Die Triebkraft der Reaktion ist die Bildung des stabilen Phosphorsäuretriamins.<sup>111</sup>

Gross *et al.*<sup>119-120</sup> führten im Jahr 1978 mit der Verbindung (3-[Bis(dimethylamino)methylumyl]-3*H*-benzotriazol-1-oxid-hexafluorphosphat) (HBTU) die Uroniumsalze als Kupplungsreagenzien ein. Knorr *et al.*<sup>121</sup> entwickelten zahlreiche Derivate auf Basis von HBTU. Eines der wichtigsten Derivate von HBTU ist O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorphosphat (HATU). HATU hat einen Phenylring anstelle des Pyridins.<sup>116</sup> HATU ist insbesondere für sterisch anspruchsvolle Kupplungen sehr effektiv.<sup>122</sup>

Harz: Die feste Phase ist ein funktionalisiertes Harz, das über einen Linker mit der aufzubauenden Sequenz verknüpft ist. Die Auswahl des Harzes spielt für die Festphasensynthese eine ebenso wichtige Rolle wie z.B. die Wahl des Lösemittels. Die Art des Linkers gibt die Funktionalität des C-Terminus nach Abspaltung der Sequenz vom Harz vor.<sup>123-124</sup> Merrifield hat für seine SPPS ein mit Divinylbenzol vernetztes Polystyrolharz verwendet, das auch heute noch breiten Einsatz findet.<sup>125-127</sup> Dieses wird als Merrifield Harz bezeichnet und ist zur Zeit das am häufigsten verwendete Harz.<sup>125</sup> Vor dem ersten Kupplungsschritt wird das Harz in einem geeigneten Lösungsmittel wie DCM gequollen. Das Quellverhalten hat einen signifikanten Einfluss auf die Reinheit und die Ausbeute der Zielstruktur, da die Reaktion nicht nur außerhalb des Harzes, sondern auch in der Harz Matrix ablaufen kann.<sup>113, 124, 128</sup> Da die Reaktion in einem heterogenen Medium stattfindet, wird die Reaktionsgeschwindigkeit nicht nur von der Konzentration der Reaktionspartner und der Temperatur beeinflusst, sondern auch vom Diffusionsverhalten der Edukte in der Harz Matrix.<sup>129</sup> Polystyrolharze quellen nur in apolaren Lösemitteln. Diese Limitierung wurde durch eine Modifikation des Polystyrolharzes mit dem hydrophilen Poly(ethylene glykol) (PEG), wie z.B. das Tentagel® S RAM, aufgehoben, die nun eine Quellung in polaren Lösemitteln erlaubt.

Linker: Nach einer erfolgreichen SPPS wird das Peptid durch Abspaltung vom Harz isoliert. Die Abspaltung findet zwischen Harz und dem sogenannten Linker statt. Der Linker stellt somit die Verbindung zwischen Harz und erster gekuppelter Aminosäure bzw. Baustein dar. Somit muss der Linker gegenüber allen Reaktionsbedingungen, die während der SPPS gewählt werden, stabil sein. Nach der Harzabspaltung entscheidet der Linker über die Funktionalität des C-Terminus der Sequenz.<sup>123-124</sup> Heute gibt es zahlreiche Arten von kommerziell erhältlichen Harzen, die sich im Wesentlichen in ihren Linkern unterscheiden, z.B. säurelabilen, basen- bzw. nukleophilablen oder photolablen Linkern.<sup>129</sup>

Die SPPS kann nicht nur zur Synthese von monodispersen, sequenzkontrollierten Peptiden<sup>130-134</sup> verwendet werden, sondern ist heute auch für die Synthese von anderen Biopolymeren wie Oligosacchariden<sup>12, 135-137</sup>, Oligonukleotiden<sup>138-139</sup>, Glykopeptiden<sup>74, 140-141</sup>, aber auch für zahlreiche synthetische Biomimetika<sup>60, 72-74, 79, 98-99</sup> wie z.B. Peptidomimetika etabliert. Mehr und mehr wird die Festphasensynthese auch für die Synthese vollständig synthetischer Materialien eingesetzt. Neben der

hohen Kontrolle aber auch Variabilität während der Synthese, ist ein wichtiger weiterer Vorteil die vollständige Automatisierbarkeit. Hierzu können kommerziell erhältliche Synthesizer eingesetzt werden, die lediglich mit den entsprechenden Reagenzien bestückt werden müssen und anschließend die gesamten Kupplungsschritte vollautomatisiert bis zum gewünschten Produkt durchführen.

Neben den beschriebenen Vorteilen der SPPS sind aber durchaus auch Nachteile zu beachten. Die SPPS wird als Mehrschrittsynthese verwendet. Um eine hohe Reinheit des Endprodukts generieren zu können, sollte jeder Syntheseschritt somit eine quantitative Umsetzung haben. Damit das Ziel der maximalen Umsetzung erreicht werden kann, wird meist ein hoher Überschuss an Reagenzien eingesetzt. Dieser hohe Chemikalienverbrauch ist kostenintensiv und dementsprechend ein wesentlicher Nachteil der SPPS. Außerdem müssen die eingesetzten Edukte in einer hohen Reinheit vorliegen, da sonst die Gefahr von Nebenreaktionen bzw. Nebenprodukten entsteht. Die Harzabspaltung findet oft unter harschen Bedingungen statt, sodass gewährleistet sein muss, dass das Endprodukt gegenüber diesen Abspaltbedingungen stabil ist. Die SPPS hat jedoch auch eine Limitierung in der Kettenlänge. Da die SPPS eine Mehrschrittsynthese ist, beeinträchtigt die Kettenlänge die Reinheit des Endprodukts. Auch wenn theoretisch ein Upscaling möglich wäre, wird dieser Syntheseansatz momentan meist nur für kleinere Ansätze im g-Maßstab verwendet.

#### 1.4.2. Festphasenpolymersynthese von Präzisionsglykomakromolekülen

Wie im vorangegangenen Kapitel erläutert, ermöglicht die schrittweise Kupplung von Aminosäuren an einer Festphase unter Verwendung geeigneter temporärer und orthogonaler Schutzgruppen den Aufbau monodisperser, sequenzdefinierter Peptide. Hartmann *et al.* konnten zeigen, dass sich diese Strategie sowohl auf nicht Aminosäuren-basierte als auch auf aus der klassischen Polyamidchemie inspirierte Bausteine übertragen lässt.<sup>60, 72-73, 98-99, 101-102, 107</sup> Hierbei wird zwischen sogenannten funktionellen und Spacer-Bausteinen unterschieden, die entweder funktionelle Seitenketten oder variable Hauptkettenmotive in das resultierende Oligo(amidoamin) einbauen (Abbildung 8). Besonderer Fokus der Entwicklung der letzten Jahre lag auf der Nutzung dieser sogenannten Festphasenpolymersynthese zur Erzeugung monodisperser, sequenzdefinierter Glykomimetika. Nach Aufbau eines Gerüsts durch Festphasenkupplung gewählter Bausteine, kann dieses Gerüst mit Kohlenhydrat-Liganden, z.B. über eine Cu(I) vermittelte Azide-Alkin Cycloaddition<sup>60, 72-73, 98-99, 101-102</sup> (CuAAC), Thiol-En-Konjugation<sup>106</sup> (TEC) oder Staudinger-Ligation<sup>99</sup> funktionalisiert werden. Insgesamt ermöglicht diese Strategie den Zugang zu einer Vielzahl von Glykomakromolekülen, wobei verschiedene strukturelle Parameter wie die Position und Art der Kohlenhydratliganden entlang des

Gerüsts, die Zusammensetzung des Gerüsts sowie seine Architektur kontrolliert variiert werden können.<sup>60, 73, 98, 107, 142</sup> Im Folgenden werden einige etablierte Bausteine und eine Beispielsynthese für Präzisionsglykomakromoleküle vorgestellt.

Bausteine: Die Bausteine haben eine Carbonsäure- wie Amin-Funktionalität. Für einen schrittweisen Aufbau und eine Verhinderung einer Oligomerisierung, ist die Amin-Funktionalität über die temporäre Fmoc-Schutzgruppe geschützt. Für weitere Funktionalitäten werden permanente Schutzgruppen verwendet. Es wurde ein Baukastenprinzip von unterschiedlichen Bausteinen eingeführt (Abbildung 8). Die Bausteine müssen eine Reihe von Kriterien erfüllen, um für die Festphasensynthese anwendbar zu sein:

- Löslichkeit: Die Bausteine müssen in Lösemitteln wie z.B. DMF löslich sein, um sie mit dem etablierten SPS Protokoll verwenden zu können.
- Reaktivität: Die permanenten Schutzgruppen bzw. die Funktionalität der Seitenketten müssen stabil gegenüber den typischen SPS Reaktionsbedingungen sein. Zusätzlich müssen die jeweiligen Bausteine eine hohe Kupplungseffizienz aufweisen.
- Reinheit: Die eingesetzten Bausteine müssen meist als Edukt eine hohe Reinheit besitzen, um vollständige Nebenprodukt-freie Kupplungen zu garantieren.

Hohe Ausbeuten in der Synthese: Da während der SPS meist hohe Überschüsse des Bausteins eingesetzt werden, muss dieser effizient, in hoher Ausbeute und im großen Maßstab, synthetisiert werden können.

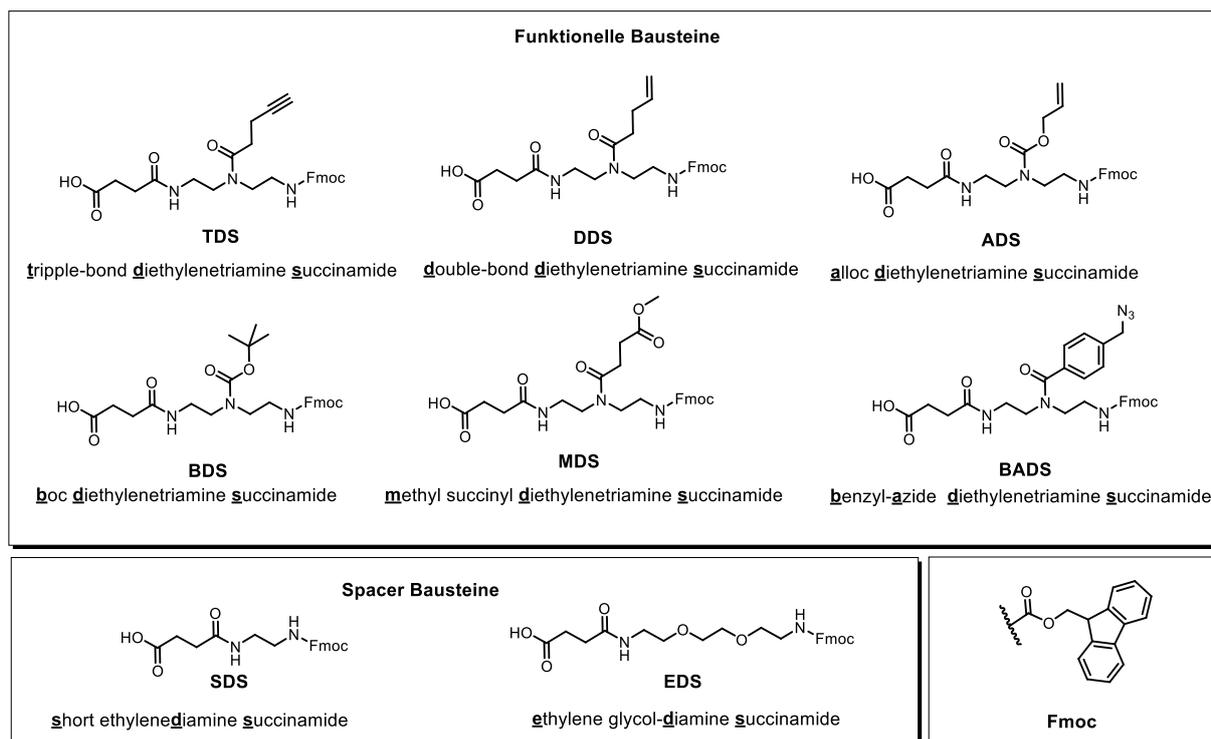
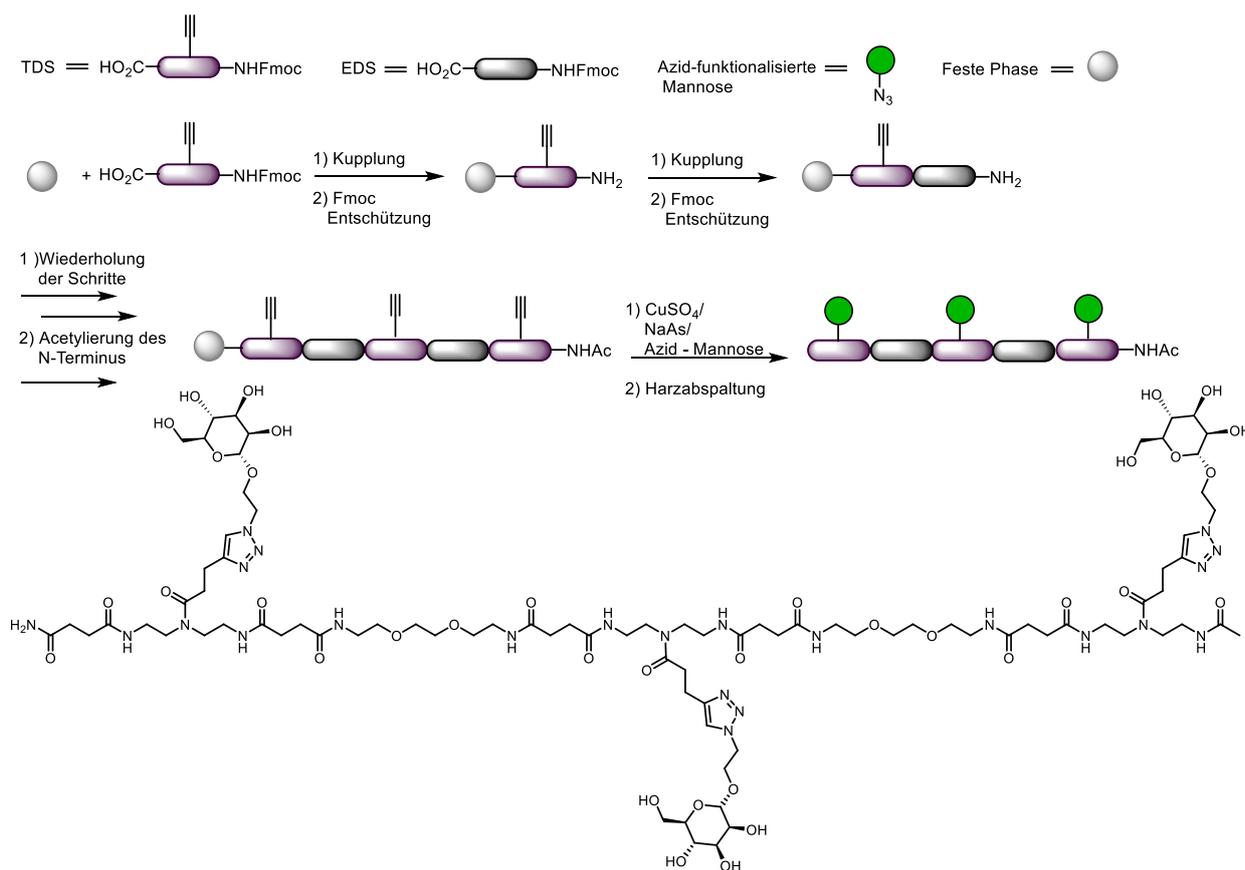


Abbildung 8: Beispiele für funktionelle und Spacer Bausteine, etabliert von Hartmann et al., TDS<sup>73, 103</sup>, DDS<sup>105</sup>, ADS<sup>107</sup>, MDS<sup>99</sup>, BDS<sup>107</sup>, BADS<sup>142</sup>, SDS<sup>102</sup>, EDS<sup>73, 103</sup>.

Abbildung 8 zeigt einige der funktionellen<sup>60, 72-73, 98-99, 107, 142</sup> und Spacer-Bausteine<sup>60, 72, 101</sup>, die in der Festphasenpolymersynthese eingesetzt werden. Diese sind beliebig auch mit Aminosäuren oder anderen kompatiblen Bausteinen kombinierbar.

Modellsynthese eines linearen monodispersen, sequenzdefinierten Glykooligo(amidomines): Mit Hilfe der gezeigten Bausteine und in Kombination mit etablierten Fmoc-Kupplungsprotokollen können nicht nur lineare<sup>96-97, 143-144</sup>, sondern auch verzweigte Oligo(amidoamine)<sup>103, 107, 145-147</sup> erzeugt werden. Neben der Einführung von Kohlenhydratliganden in der Seitenkette zur Erzeugung von Präzisionsglykomakromolekülen<sup>60, 72-73, 98-99, 101, 105, 142, 146</sup> können auch sogenannte  $\beta^{3r3}$ -Peptide<sup>148</sup> oder kationische Oligomere synthetisiert werden. Im Folgenden wird beispielhaft die Synthese eines linearen Glykooligo(amidoamins) dargestellt (Schema 2).



Schema 2: Beispielhafte Synthese eines linearen, monodispersen, sequenzdefinierten Glykooligo(amidoamins) mittels Festphasenpolymersynthese nach Hartmann et al.<sup>73</sup>

Das in der Modellsynthese verwendete Harz ist ein säurelabiles Tentagel-Harz, sodass während der Synthese eine basenlabile Schutzgruppentechnik mittels der Fmoc-Schutzgruppe verwendet werden kann. Im ersten Syntheseschritt wird der erste Baustein TDS mit geeigneten Kupplungsreagenzien wie z.B. PyBOP an die feste Phase, das Harz, gekuppelt. Üblich sind hier Überschüsse des Bausteins von 5 eq. Im zweiten Schritt wird die temporäre Fmoc-Schutzgruppe im basischen Milieu abgespalten. Zur Kupplung des nächsten Bausteins, hier ein EDS Spacer Baustein, werden die Schritte der Kupplung und Entschützung unter den gleichen gewählten Bedingungen wiederholt. Je nach gewünschter Monomersequenz wiederholt sich die Kupplung und Entschützung mit den gewählten Bausteinen. Für den terminalen Baustein der Sequenz wird nach Fmoc-Abspaltung der freie N-Terminus mit Essigsäureanhydrid umgesetzt. Alternativ können an dieser Stelle aber auch weitere funktionelle Einheiten wie z.B. Lipide, Chromophore oder andere Liganden konjugiert werden.<sup>102, 149</sup> Im hier gewählten Beispiel wurden über die TDS Bausteine gezielt Alkin-Seitenketten im Gerüst platziert. Diese können nun im folgenden Schritt und immer noch an der Festphase mittels CuAAC mit Azid-funktionalisierten Kohlenhydrat-Liganden umgesetzt werden.<sup>60, 72-73, 98-99, 101-102</sup> Auch in diesem Schritt werden die Kupplungspartner, hier schematisch gezeigt ein Mannose-Azid Derivat, im Überschuss eingesetzt. Wichtig für die spätere Anwendung des Glykooligo(amidoamins) ist die Entfernung des Cu-

Katalysators mit Hilfe von Natriumdiethyldithiocarbamat nach vollständiger Kupplung der Kohlenhydrat-Liganden. Im finalen Syntheseschritt wird das gewünschte Produkt von der festen Phase abgespalten, für das im Beispiel gewählte Tentagel S-RAM Harz mit 95% TFA und durch Fällung aus Diethlyether aufgereinigt. In den meisten Fällen haben die synthetisierten Glyko(oligoamidoamine) Reinheiten von über 95%. Trotzdem wird der Großteil der Produkte noch mittels präparativer Chromatographie aufgereinigt und potenziell vorhandene TFA-Salze durch einen Ionentauscher entfernt.

## 2. Aufgabenstellung

Oligo- und Polysaccharide zählen neben den Proteinen und Oligonukleotiden zur dritten Klasse der Biopolymere. Neben ihrer wichtigen Rolle als Energielieferant fungieren sie auch als Liganden, die spezifisch an Proteinrezeptoren binden und sind in dieser Rolle an vielen biologischen Prozessen, z.B. der Pathogenerkennung oder Zellproliferation beteiligt. Da die Bindung eines einzelnen Zuckerliganden zu schwach ist, nutzt die Natur die multivalente Präsentation mehrerer Zucker bzw. Rezeptoren zur Verstärkung der Bindung. Auf diesem Prinzip basiert daher auch die Entwicklung sogenannter multivalenter Glykomimetika, die an einem synthetischen Gerüst mehrere Zuckerliganden präsentieren. Eine wichtige Klasse der Glykomimetika sind die Glykopolymere, die als bioaktive Materialien z.B. in der Entwicklung neuer antibakterieller Wirkstoffe oder der Krebstherapie untersucht werden. Hartmann *et al.* haben eine Synthesestrategie entwickelt, die Zugang zu monodispersen und sequenzkontrollierten Glykooligomeren bietet und so neue Einblicke in die Struktur-Eigenschaftsbeziehungen von polymeren Glykomimetika ermöglicht.

Im Rahmen dieser Arbeit in der Gruppe von Prof. Dr. Hartmann wird dieses Konzept um asymmetrisch verzweigte Glykooligomere erweitert. In der Natur liegen Zuckerliganden häufig asymmetrisch verzweigt und nicht linear vor. Es ist daher zu erwarten, dass die Nachbildung des natürlichen Gerüsts zur einer verbesserten und eventuell selektiveren Bindung an Rezeptoren führen kann.

Die Doktorarbeit kann dabei in drei Segmente unterteilt werden:

- Entwicklung einer Synthesestrategie zur Herstellung asymmetrisch verzweigter Glykooligomere
- Synthese von verschiedenen Serien asymmetrisch verzweigter Glykooligomere
- Durchführung und Evaluation erster Bindungsstudien an verschiedenen Lektinen zur Ermittlung von Struktur-Wirkungsbeziehungen der asymmetrisch verzweigten Glykooligomere

Die Herausforderung bei der Synthese von verzweigten Glykooligomeren liegt in der Entwicklung einer geeigneten Synthesestrategie, die mit den etablierten Syntheseprotokollen kompatibel ist. Die Parameter Ligandendichte, Sequenz und Valenz sollen auch für die verzweigten Glykooligomere einfach zu variieren sein. Um dieses Ziel zu erreichen, wird auf der einen Seite der Fokus auf orthogonale Schutzgruppen mit ihren jeweiligen Abspaltmethoden gelegt, auf der anderen Seite wird ein Azid-funktionalisierter Baustein etabliert, der die Einführung einer Seitenkette mittels Staudinger-Ligation erlaubt.

Die Aufgabe im zweiten Teil dieser Arbeit besteht darin, mit Hilfe der entwickelten Synthesestrategie verschiedene verzweigte Glykooligomere, die sich z.B. in ihren Armlängen bzw. ihrer Ligandendichten unterscheiden, zu synthetisieren. Drei verschiedene Serien sollen erhalten werden: i) Asymmetrisch verzweigte Glykooligomere, die Mannose tragen, zur späteren Testung an den Lektinen Concanvalin A (ConA), Langerin und DC SIGN. ii) N-Acetylgalactosamin tragende tri- und monovalente Glykooligomere, die zusätzlich ein Chromophor tragen iii) Lineare Glykooligomere, die N-Acetylneuraminsäure tragen zur späteren Testung an Hämagglutinin.

Im dritten Teil der Arbeit sollen die so erhaltenen Glykooligomere in verschiedenen Assays zur Untersuchung der Bindung an verschiedenen Lektinen eingesetzt werden. Hierbei sollen erste Struktur-Wirkungsbeziehungen im Besonderen mit Hinblick auf den Einfluss einer linearen oder verzweigten Struktur der Glykooligomere aufgestellt werden.

Zusammenfassend liegt der Fokus dieser Arbeit in der Entwicklung einer neuen Klasse von synthetischen Glykomimetika für die Untersuchung von multivalenten Ligand-Rezeptor Wechselwirkungen. Basierend auf diesen Erkenntnissen besitzen die hier erhaltenen Strukturen das Potenzial, auch in biotechnologischen und biomedizinischen Anwendungen z.B. für den gezielten Wirkstofftransport eingesetzt zu werden.

### 3. Ergebnisse und Diskussionen

Ziel dieser Arbeit ist es, monodisperse und sequenzkontrollierte, asymmetrisch verzweigte Glykooligomere zu synthetisieren und diese in Lektin Bindungsstudien auf ihre Struktur-Wirkungsbeziehungen zu untersuchen. Aufgrund der räumlichen Anordnung der Bindungstaschen der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Lektine ist anzunehmen, dass asymmetrisch verzweigte Glykooligomere die Geometrie der Bindungstaschenabstände im Vergleich zu linearen Glykooligomeren besser erfassen und somit eine höhere Bindungsaffinität ermöglichen. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Synthesestrategie für asymmetrisch verzweigte Glykooligomere ist mit den etablierten Festphasensynthesen von Glykomakromolekülen nach Hartmann *et al.* kompatibel und ermöglicht die Parameter Ligandendichte, Sequenz und Valenz der Glykooligomere gezielt zu variieren.

Im Folgenden werden drei Synthesestrategien diskutiert, die zu asymmetrisch verzweigten monodispersen, sequenzdefinierten Glykooligomeren führen (Kapitel 3.2.). Zwei der drei Synthesestrategien stützen sich auf Schutzgruppen, die orthogonal zur Fmoc-Schutzgruppe eingesetzt werden können. Die Verzweigung bzw. Seitenkette kann dann nach selektiver Entschützung am Hauptkettengerüst eingeführt werden. Die dritte Synthesestrategie basiert auf einem, im Rahmen dieser Arbeit entwickelten, Azid-funktionalisierten Baustein (Kapitel 3.1.). Dieser Baustein bietet die Möglichkeit als Verzweigungsbaustein zu fungieren und eine Seitenkette mittels Staudinger-Ligation an das Gerüst einzuführen. Mit Hilfe der neu etablierten Synthesestrategien werden Mannose- (Man) (Kapitel 3.3.), N-Acetylgalactoseamin- (GalNAc) (Kapitel 3.4.) und N-Acetylneuraminsäure- (NeuNAc) funktionalisierte Glykooligomere synthetisiert. Für die GalNAc-funktionalisierten monodispersen, sequenzdefinierten Glykooligomere wurde eine Syntheseroute für ein Azid-funktionalisiertes GalNAc, das am anomeren Kohlenstoffatom ein Azid trägt, etabliert. Diese drei verschiedenen Serien von Präzisionsglykomakromolekülen wurden in Lektin Bindungsstudien im Hinblick auf eine Korrelation zwischen Ligandenstruktur und deren Wirkung zu Lektinen untersucht.

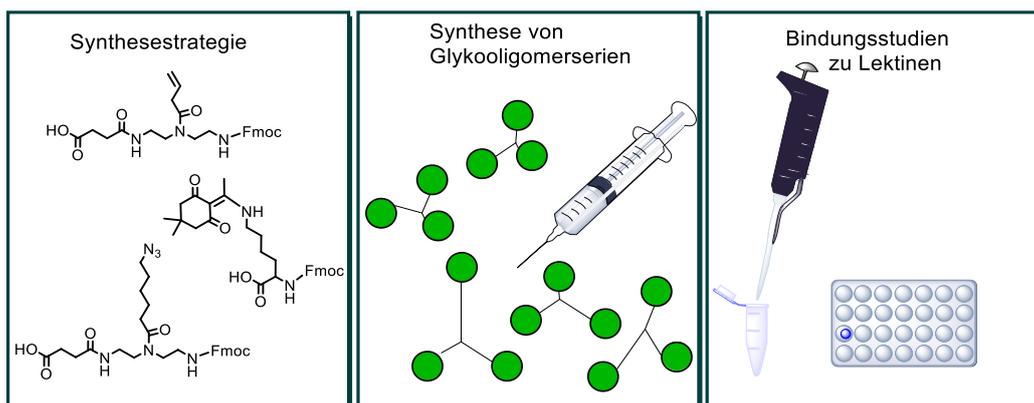


Abbildung 9: Schematische Präsentation der Ziele dieser Doktorarbeit.

### 3.1. Synthese eines Azid-funktionalisierten Bausteins

Die Synthese von monodispersen, sequenzdefinierten Glykooligomeren basiert auf den etablierten Protokollen von Hartmann *et al.*<sup>27, 60, 72-73, 98-99, 105-107, 142</sup>, in der geeignete Bausteine über eine standardisierte Kupplungschemie addiert werden. Die Bausteine tragen im Gerüst sowohl eine Carboxyl- als auch eine geschützte Amin-Funktionalität, um eine Oligomerisierung zu verhindern. Funktionelle Bausteine wie z.B. TDS<sup>73, 103</sup>, MDS<sup>99</sup> oder ADS<sup>107</sup> haben zudem noch eine weitere funktionelle Gruppe in ihrer Seitenkette, um z.B. Kohlenhydratliganden einzuführen. Generell müssen die Bausteine eine Reihe von Parametern erfüllen, damit sie in der Festphasensynthese erfolgreich angewendet werden können: Löslichkeit in geeigneten Lösemitteln wie DMF oder DCM, Chemo Selektivität gegenüber den SPS Reaktionsbedingungen, hohe Reinheiten und hohe Ausbeuten in der Synthese wie auch eine hohe Kupplungseffizienz.

Der BADS<sup>142</sup> Baustein ist im Jahr 2017 veröffentlicht worden und trägt in seiner Seitenkette eine p-(Azidomethyl) Benzyl-Gruppe. Es konnte schon gezeigt werden, dass via CuAAC sowohl Seitenketten als auch Mannose-Liganden an BADS eingeführt werden können.<sup>142</sup> Da die Benzyl-Funktionalität durch ihre  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen einen Einfluss auf die Bindungstaschen und somit auf das Bindungsverhalten zum Lektin haben kann<sup>150-153</sup>, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Alkyl-basierter Azid Baustein entwickelt. Dieser Alkyl Azid-funktionalisierte Baustein trägt im Gerüst eine Carboxylgruppe und auch ein Fmoc geschütztes Amin. Orthogonal zum Gerüst ist ein Azidohexyl-Linker eingeführt (Abbildung 10), der im Folgenden alkyl-azide diethylenetriamine succinamide, kurz AADS genannt wird.

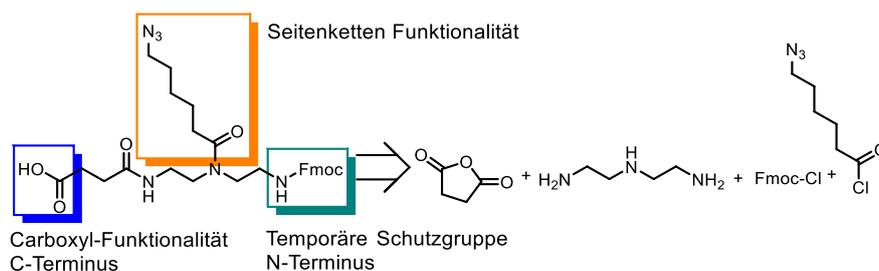
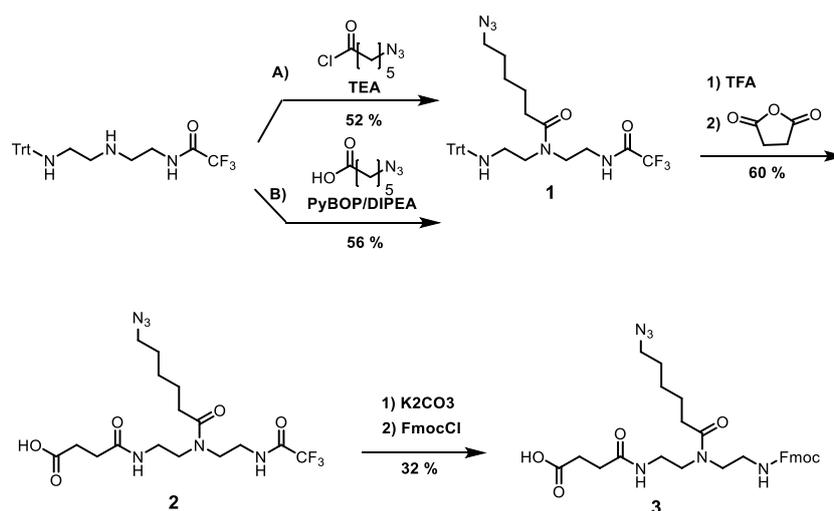


Abbildung 10: Retrosynthetische Darstellung des AADS Bausteins mit seinen Edukten.

AADS basiert auf Diethylentriamin, das die Möglichkeit bietet, die drei Amin-Gruppen mit einer Carbonsäure, Fmoc-Schutzgruppe und auch Azid-Gruppe zu funktionalisieren. Diethylentriamin wurde schon früher als Edukt zur Synthese von diversen Bausteinen gewählt und bietet den Vorteil, dass bereits etablierte Protokolle zur selektiven Schützung und Einführung der funktionellen Gruppen bestehen.<sup>143</sup> Als Linkerlänge wurde für den AADS Baustein das Hexyl-Derivat gewählt. Niedermolekulare Azide neigen zur explosiven Zersetzung, sodass 6 Kohlenstoffatome pro Azid im Molekül vorhanden sein sollten, um die Reaktivität zu verringern.<sup>154</sup>

Startmaterial für die AADS Synthese ist das sogenannte Keyintermediat 2,2,2-trifluoro-N-(2-((2-(tritylamino)ethyl)amino)ethyl)acetamide<sup>103</sup>, welches für eine Reihe von Bausteinen verwendet wird.<sup>99, 103, 107, 142</sup> Das Keyintermediat besteht aus Diethylentriamin, das mittels eines etablierten Protokolls mit einer säurelabilen Trityl-Schutzgruppe (Trt) und einer basenlabilen Trifluoracetylenschutzgruppe (TFA-) asymmetrisch funktionalisiert wird. Insgesamt wird die Synthese von AADS in drei Syntheseschritten durchgeführt (Schema 3).

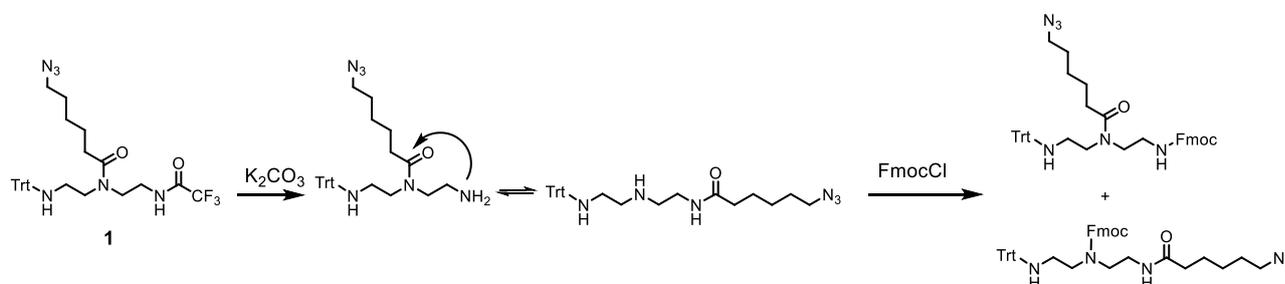


Schema 3: Dreistufige Synthese von AADS.

Der erste Schritt der AADS Synthese stellt die Kupplung kommerziell erwerblicher 6-Azido-Hexansäure an das Keyintermediat dar. Diese Reaktion kann über zwei Synthesewege stattfinden. Syntheseweg A führt dabei über das Säurechlorid, welches durch die Umsetzung der 6-Azido-Hexansäure mit

Oxalylchlorid generiert wird. Eine alternative Syntheseroute für **1** ist die Kupplung der 6-Azido-Hexansäure mit dem in der Einleitung vorgestellten Kupplungsreagenz PyBOP (Syntheseweg B). Beide Syntheserouten führen zu ähnlichen Ausbeuten von 52% bzw. 56%, wobei die Aufreinigung durch Ausschütteln des überschüssigen Säurechlorids und Triethylamins (TEA) gegenüber der Fällung des Reaktionsgemisches in Wasser mit anschließender Sedimentierung zeitsparender und somit zu bevorzugen ist.

In den nächsten beiden Reaktionsschritten wurden die zwei Schutzgruppen Trt- und TFA- durch die Carbonsäure- und Fmoc-Funktionalität ausgetauscht. Es ist u.a. für TDS bekannt, dass bei der basischen Entschützung der TFA-Schutzgruppe eine Umlagerungsreaktion zu einem Produktgemisch von Strukturisomeren führen kann. Die etablierten Bauteinprotokolle<sup>38, 73, 99, 103, 107</sup> spalten in einer Eintopfreaktion im basischen Milieu die TFA-Schutzgruppe ab und führen die Fmoc-Schutzgruppe ein. Da die Hexyl-Seitenkette hydrophober Natur ist, findet die basische Entschützung der TFA-Gruppe von **1** nur sehr langsam statt. Nach 18 Stunden Reaktionszeit, die bei etablierten Bausteinen gewählt wurde, liegen sowohl Edukt **1** als auch das entschützte Produkt und ein entschütztes Umlagerungsprodukt vor. Dieses Umlagerungsprodukt entsteht durch eine intramolekulare  $S_N2t$  Reaktion (Schema 4). Die Reaktionszeiten können nicht kürzer gewählt werden, da die Entschützung sonst nicht mit ausreichendem Umsatz stattfindet. Die zwei Strukturisomere sind durch eine standardmäßige Aufreinigung mittels Umkristallisation nicht von einander zu isolieren.



Schema 4: Darstellung des Umlagerungsprodukts des AADS Bausteins bei der Trifluoressigschutzgruppe Entschützung.

Um die löslichkeitsvermittelnden Eigenschaften zu erhöhen, wurden in der Synthese von AADS die Schritte der TFA- und Trt-Entschützung und somit auch der Fmoc- und Carboxyl-Gruppen Einführung, wie auch beim Baustein BADS<sup>142</sup>, vertauscht. Dabei wird die säurelabile Trt-Schutzgruppe zunächst durch Trifluoressigsäure (TFA) entschützt. Das freie Amin liegt nun im sauren Milieu als unreaktives TFA-Salz vor. Erst unter basischen Reaktionsbedingungen reagiert das freie Amin mit Bernsteinsäureanhydrid zu **2**, sodass die Carboxyl-Funktionalität eingeführt wird. **2** ist durch die Carboxyl-Funktionalität hydrophiler als zuvor, wodurch die Entschützung der TFA-Schutzgruppe bei 30°C innerhalb von 3 Stunden vollständig stattfindet. Zudem kann die Reaktion in wässriger 10%iger Kaliumcarbonat Lösung ohne Zugabe von Methanol stattfinden, und auch die Folgereaktion mit Fmoc-Cl läuft innerhalb von 2 Stunden zu einem vollständigen Produktumsatz ab (Schema 3).

AADS (**3**) und seine Zwischenstufen **1** und **2** wurden erfolgreich synthetisiert und konnten mittels  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, HR-ESI und reversed-phase HPLC (RP-HPLC) eindeutig identifiziert werden.

Der generelle Vorteil der Azid-Gruppe besteht darin, dass orthogonal zur Fmoc-Kupplungschemie Liganden wie auch Seitenketten mittels CuAAC oder Staudinger-Ligation (Kapitel 3.2.3.) an das Oligo(amidoamin)-Gerüst eingeführt werden können. Somit wird keine weitere Schutzgruppe benötigt, was die Verwendung eines Azid-Bausteins gegenüber etablierten Bausteinen mit Schutzgruppen attraktiv macht. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass AADS erfolgreich als Verzweigungsbaustein mittels Staudinger-Ligation für die Synthese von asymmetrisch verzweigten, monodispersen, sequenzdefinierten Glykooligomeren verwendet werden kann (Kapitel 3.2.3.).

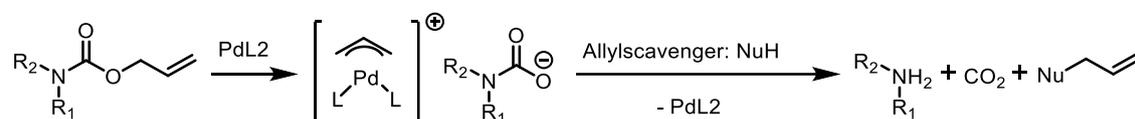
### 3.2. Synthese asymmetrisch verzweigter Glykooligomere

Wie schon in Kapitel 1.2.2. diskutiert, ist die aktuelle Forschung daran interessiert, verzweigte Glykomimetika, die die natürliche Glykokalyx nachbilden, in Lektin-Bindungsstudien zu untersuchen. Es wurden eine Vielzahl von symmetrisch verzweigten Glykomimetika in Form von Dendrimeren, Dendronen und niedermolekularen Glykoclustern publiziert. Sobald die Glykomimetika asymmetrisch verzweigt sind, ist die Synthese und Aufreinigung der Zwischenprodukte sehr aufwendig. Aus diesem Grund war es bis jetzt nur möglich, einzelne asymmetrisch verzweigte Glykomimetika zu synthetisieren.

In dieser Arbeit wird eine Synthese für asymmetrisch verzweigte, monodisperse, sequenzdefinierte Glykooligomere basierend auf der SPS eingeführt. Die Parameter Ligandendichte, Sequenz und Valenz können durch diese Synthesestrategie einfach variiert werden. Die Herausforderung lag dabei in der Identifizierung geeigneter Verzweigungsbausteine und den entsprechenden Reaktionsbedingungen zur Einführung der Verzweigung an das Oligo(amidoamin)-Gerüst. Hierzu wurden sowohl Verzweigungsbausteine mit orthogonalen Schutzgruppen und ihren jeweiligen Abspaltmethoden untersucht, als auch AADS (Kapitel 3.1.) zur Einführung einer Seitenkette mittels Staudinger-Ligation etabliert. Eine zwingende Voraussetzung für die Synthesestrategie war die Kompatibilität mit dem etablierten SPS Protokollen von Hartmann *et al.*<sup>27, 60, 72-73, 98-99, 105-107, 142</sup>.

### 3.2.1. Verwendung von ADS als Verzweigungsbaustein

Der ADS Baustein wurde im Jahr 2012 etabliert.<sup>105</sup> ADS besitzt eine Allyloxycarbonyl- (Alloc) Schutzgruppe, die im Jahr 1950 von Stevens *et al.*<sup>155</sup> eingeführt worden ist und unter Palladium katalytischen Bedingungen abgespalten werden kann (Schema 5). Die Palladium katalytischen Abspaltbedingungen ermöglichen den Einsatz von Alloc als orthogonale Schutzgruppe zur Fmoc-Kupplungschemie. Die Reaktion basiert auf einem kationischen  $\pi$ -Allylpalladium Komplex.<sup>156-159</sup> Dieser Komplex reagiert in Anwesenheit eines Allylscavenger z.B. 1.3-Dimethyl-barbitursäure (N,N-DMBA)<sup>160-161</sup>, das als Nucleophil fungiert, zu einem Allyl-funktionalisierten Nucleophil, Kohlenstoffdioxid und einem freien Amin am Edukt. Dieses freie Amin kann für die Einführung einer Seitenkette genutzt werden.



Schema 5: Palladium katalysierte Alloc Entschützung

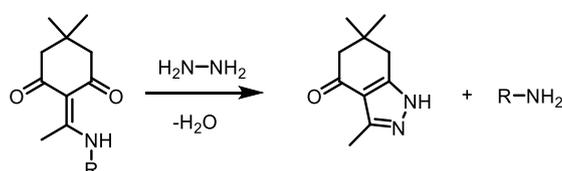
Der Einsatz von Alloc ist in der SPS durch viele Publikationen gut etabliert.<sup>109, 161-164</sup> Es konnte schon erfolgreich gezeigt werden, dass ADS zusammen mit BDS mehrfach symmetrisch verzweigte Oligo(amidoamin) Strukturen aufbauen kann.<sup>105</sup> Im Rahmen dieser Arbeit wird ADS das erste Mal als Verzweigungsbaustein für asymmetrisch verzweigte Präzisionsglykomakromoleküle verwendet. Die Reaktionsbedingungen wurden auf Basis von Wojcik *et al.* angepasst (Experimentalteil 5.).

Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) ( $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ ) wurde als Katalysator gewählt. Er wird in vielen Publikationen in katalytischen Mengen von 0.1eq eingesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine vollständige Entschützung nur unter Verwendung von 0.3eq  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  in Bezug auf einen ADS Baustein erreicht werden.  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  wird von verschiedenen Händlern angeboten, jedoch konnten die besten Reinheiten des Endprodukts mit dem Katalysator vom Hersteller Sigma-Aldrich erreicht werden. Während der Entschützung von Alloc wird ein *Allyl Scavenger* benötigt, der das freiwerdende Allyl abfängt, da das bei der Entschützung freiwerdende Amin auch selbst als Nucleophil zum Allyl-Amin reagieren kann. Es mussten mindestens 10eq N,N-DMBA in Bezug auf einen ADS Baustein eingesetzt werden, um das Allyl vollständig abfangen zu können.  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  ist lichtempfindlich, sodass trotz der laborüblichen Schutzmaßnahmen die Reaktivität abnehmen kann. Es hat sich als wirkungsvoll erwiesen, die Entschütungszeit zu verkürzen und die Reaktion zweimal für 45 min durchzuführen. Nach der erfolgreichen Entschützung war es trotz wiederholten Waschens des Harzes nicht möglich, den Palladium Katalysator vollständig zu entfernen. Deshalb sollte für kleinere Testabspaltungen, die sogenannten *mircolevages*, sofern TDS in der Sequenz vorhanden ist, auf Triisopropylsilan (TIPS) in

der Abspalllösung verzichtet werden. Die Dreifachbindung von TDS kann über den Hydridlieferanten TIPS mit Palladium als Katalysator hydriert werden. Die Hydridprodukte entstehen zwar nur in dem Produkt der *microcleavage*, erschweren aber insgesamt die Auswertung der Entschützung. Nach der Alloc-Entschützung wird die Seitenkette an einem sekundären Amin aufgebaut. Um die Reinheit des Endprodukts zu verbessern, wurden sowohl die in der Einleitung genannten Kupplungsreagenzien HATU und PyBOP für die Kupplung eines weiteren Bausteins an das sekundäre Amin getestet. Für die Reinheit des Endproduktes machte es jedoch keinen Unterschied, ob HATU oder PyBOP als Kupplungsreagenz verwendet wurden.

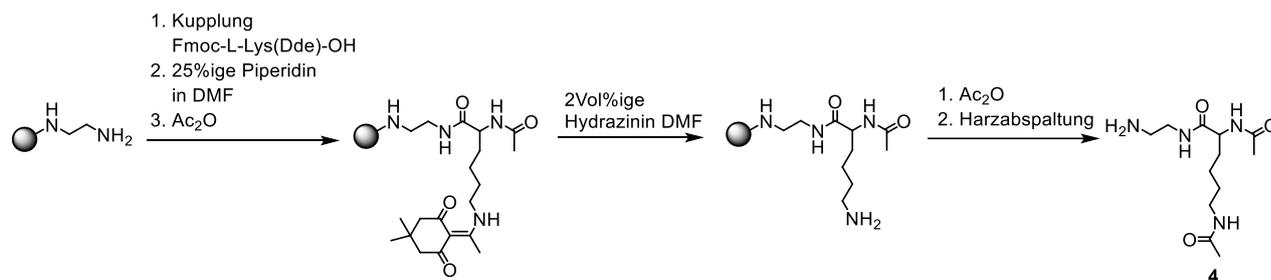
### 3.2.2. Verwendung von Fmoc-L-Lys(Dde)-OH als Verzweigungsbaustein

In der aktuellen Fachliteratur wird beschrieben, dass N-(1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexylidene)ethyl) (Dde) als orthogonale Schutzgruppe in der SPS zu Fmoc eingesetzt werden kann.<sup>109, 165-169</sup> Dde wurde von Bycroft *et al.*<sup>170</sup> im Jahr 1993 eingeführt. Dde ist genau wie Fmoc eine basenlabile Schutzgruppe, jedoch wird Dde unter härteren basischen Bedingungen mit einer Hydrazin-DMF Lösung abgespalten (Schema 6).



Schema 6: Dde Entschützung unter basischen Bedingungen.

Da noch kein Amidoamin Baustein basierend auf der Dde Schutzgruppe von Hartmann *et al.* etabliert worden ist, wurden die Abspaltbedingungen von einer kommerziell erwerblichen Aminosäure N-alpha-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-N-epsilon-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidene)ethyl-L-lysin (Fmoc-L-Lys(Dde)-OH) untersucht. Hierzu wurde die Modellschubstanz **4** synthetisiert, um die Kupplungsbedingungen, die Stabilität gegenüber den Fmoc Abspaltbedingungen und die Dde Entschützungbedingungen zu testen. Im ersten Schritt wurde die Aminosäure an ein Ethylendiamin-(EDA) funktionalisiertes Harz<sup>73</sup> gekuppelt. Das EDA-Harz wurde verwendet, da die späteren Zielstrukturen auch mit diesem Harz synthetisiert werden sollten. Die temporäre Fmoc Schutzgruppe wurde abgespalten und das terminale freie Amin mit Essigsäureanhydrid acetyliert. Dde konnte mit einer 2Vol%igen Hydrazin in DMF Lösung und mit einer Reaktionszeit von 30 min und einer Wiederholung von 15 min vollständig abgespalten werden. Das freie Amin in der Seitenkette wurde vor der finalen Abspaltung acetyliert, um eine <sup>1</sup>H-NMR Auswertung zu vereinfachen (Schema 7).

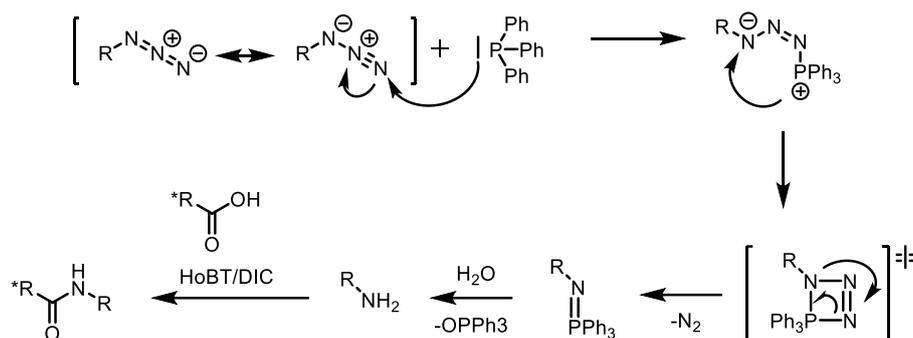


Schema 7: Untersuchung der Abspaltbedingungen für Dde an der Festphase mittels Modelsubstanz 4.

Fmoc ist gegenüber Hydrazin nicht stabil und behält die Funktion als temporäre Schutzgruppe beim Einsatz der Fmoc-L-Lys(Dde)-OH bei. Die Stabilität von Dde gegenüber den Fmoc Entschützungskonditionen ist für seine Anwendung als Verzweigungsbaustein akzeptabel. Dennoch hat sich gezeigt, dass eine bessere Reinheit des Endprodukts erzielt werden kann, wenn nach der Kupplung von Fmoc-L-Lys(Dde)-OH, die Fmoc-Entschützung unter mildereren Bedingungen durchgeführt wird. Das etablierte Protokoll sieht eine Fmoc-Entschützung mit 25Vol%iger Piperidin Lösung in DMF von 20 min und eine Wiederholung von 10 min vor. Das Protokoll wurde im Rahmen dieser Arbeit verändert. Die Konzentration an Piperidin in DMF wurde auf 20Vol% reduziert, und auch die Reaktionszeit wurde auf zweimal 10 min verringert. Mittels der mildereren Bedingungen konnte Fmoc vollständig entfernt werden. Minimale Spuren von Dde wurden trotz der optimierten Fmoc Entschützung entfernt (ca. 0,5% pro Fmoc Entschützung). Dde ist somit nur für kleine verzweigte Strukturen geeignet, um eine hohe Reinheit der Produkte weiterhin gewährleisten zu können.

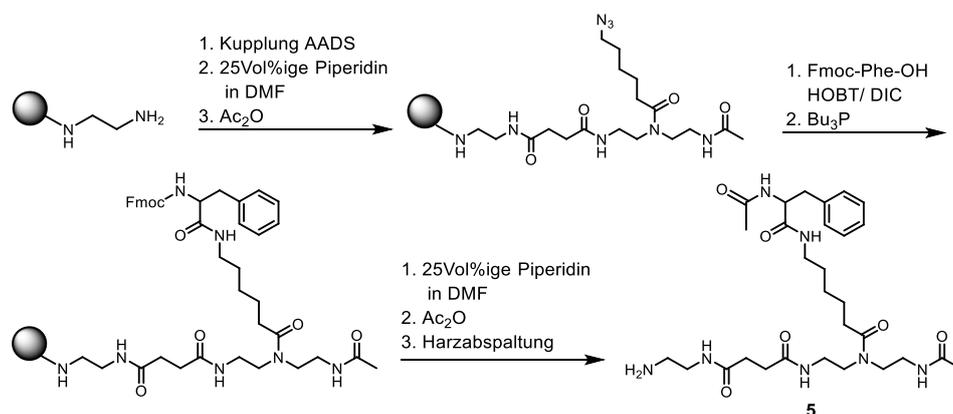
### 3.2.3. Verwendung von AADS als Verzweigungsbaustein

Die Synthese und Verwendung von AADS wurde in Kapitel 3.1. diskutiert. AADS kann auf Grund seiner Azid-Funktionalität über die Staudinger-Ligation an eine Carbonsäure unter Ausbildung einer Amid Bindung gekuppelt werden. Die Reaktion der Staudinger-Ligation ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Von Lin *et al.*<sup>171</sup> wurde jedoch ein Mechanismus postuliert, nachdem Triphenylphosphan oder jedes andere organische Phosphan in einem nukleophilen Angriff das Azid angreift. Das entstandene Phosphazid cyclisiert intramolekular zu einem viergliedrigen Übergangszustand. Unter Abspaltung von Stickstoff wird ein Phosphazen gebildet, das durch Wasser zu einem Amin und Triphenylphosphinoxid reagiert. An das freie Amin kann mit Hilfe von Kupplungsreagenzien wie 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT) und 1,3-Diisopropylcarbodiimide (DIC), eine Carbonsäure gekuppelt werden (Schema 8).



Schema 8: Darstellung des postulierten Mechanismus der Staudinger-Ligation nach Lin et al.<sup>171</sup>.

Generell gibt es nur wenige Publikationen, die die Staudinger-Ligation in Verbindung mit der SPS beschreiben.<sup>172-177</sup> Im Jahr 2017 wurde der Baustein MDS<sup>99</sup> eingeführt. MDS hat eine Seitenkette mit einer geschützten Carbonsäure, die nach erfolgreicher Kupplung an der Festphase selektiv entschützt werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass Azid-Liganden an die Carbonsäure mittels Staudinger-Ligation konjugiert werden können. Bei diesem Beispiel ist die Carbonsäure über das Oligo(amidoamin)-Gerüst kovalent an die feste Phase gebunden und der Azid-Ligand wird konjugiert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass AADS als Verzweigungsbaustein mittels Staudinger-Ligation verwendet werden kann. Das Azid ist in diesem Fall über das Oligo(amidoamin)-Gerüst ans Harz gebunden und der gekoppelte Baustein liegt in der Lösung vor. Es wurde eine Modellschubstanz **5** synthetisiert, um die Kupplungseffizienz von AADS und die Reaktionsbedingungen der Staudinger-Ligation an der Festphase zu untersuchen (Schema 9).



Schema 9: Untersuchung der Reaktionsbedingung der Staudinger-Ligation an der Festphase mittels Modellschubstanz **5**.

AADS wird im letzten Schritt seiner Synthese mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (Experimententeil 5.). Da AADS eine freie Säure trägt, wird dem Laufmittel 0,1% Essigsäure zugesetzt. Nach Entfernen des Laufmittels unter reduziertem Druck, wird AADS gegen wässrige 10Gew%ige Zitronensäurelösung gewaschen. Obwohl AADS gegen eine wässrige Phase ausgeschüttelt wird, können nicht alle Reste der Essigsäure entfernt werden. Es hat sich gezeigt, dass nur gute Kupplungseffizienzen erreicht werden, wenn während der Kupplung 30 eq DIPEA statt 20 eq DIPEA

(etablierte Kupplungsbedingungen<sup>72-73, 98-99, 102, 142</sup>) verwendet werden. Im ersten Schritt der Modellschubstanz wurde AADS an ein EDA-Harz<sup>73</sup> gekuppelt. Das EDA-Harz wurde verwendet, da die Zielstrukturen auch mit diesem Harz synthetisiert werden. Die temporäre Fmoc Schutzgruppe von AADS wurde abgespalten und das terminale freie Amin mit Essigsäureanhydrid acetyliert. Die Staudinger-Ligation wurde mit einer kommerziell erwerblichen Aminosäure, Fmoc-Phe-OH untersucht. Es wurden in Bezug auf ein 0,1 mmol Ansatz AADS 5 eq Fmoc-Phe-OH, 5 eq HOBT und 5 eq DIC in 3 mL DMF gelöst. 5 eq Bu<sub>3</sub>P wurden in 1 mL DMF gelöst und der Reaktion zugefügt. Die Reaktion fand für 18 h statt und konnte durch eine Stickstoffentwicklung visuell beobachtet werden. In den letzten Syntheseschritten wurde Fmoc von der Aminosäure entfernt, das freie Amin acetyliert, um die <sup>1</sup>H-NMR spektroskopische Auswertung zu vereinfachen.

Die Staudinger Ligation bietet mehrere Vorteile. Dadurch, dass die Azid-Funktionalität an die feste Phase gebunden ist, kann jeder beliebige Baustein oder Aminosäure, über den C-Terminus an AADS konjugiert werden. Der zusätzliche Syntheseschritt einer Schutzgruppenentschützung entfällt und die Staudinger-Ligation kann als Kupplungsschritt angesehen werden. Azide sind gegenüber den Fmoc-Entschütungs- und Kupplungskonditionen stabil. Nachdem die Seitenkette mittels Staudinger-Ligation eingeführt worden ist, kann TDS weiterhin verwendet werden, um über CuAAC Azid-Liganden an das Oligo(amidoamin)-Gerüst zu konjugieren.

#### 3.2.4. Vergleich der drei Verzweigungsbausteine ADS, Fmoc-L-Lys(Dde)-OH und AADS

Zusammenfassend konnten alle drei Verzweigungsbausteine ADS<sup>107</sup> (Kapitel 3.2.1.), Fmoc-L-Lys(Dde)-OH (Kapitel 3.2.2.) und AADS (Kapitel 3.2.3.) erfolgreich für die Einführung einer Seitenkette verwendet werden. Die Schutzgruppenabspaltbedingungen sowie die Reaktionsbedingungen für die Staudinger-Ligation konnten optimiert werden. Ziel dieser Arbeit ist es, monodisperse und strukturdefinierte Glykooligomere zu synthetisieren. Dabei ist die Reinheit des Endproduktes einer der wichtigsten Parameter, um den Erfolg der Synthese beurteilen zu können. Zum Vergleich der drei Verzweigungsbausteine wurde eine Zielstruktur definiert und diese mit allen drei Verzweigungsbausteinen synthetisiert (Abbildung 11).

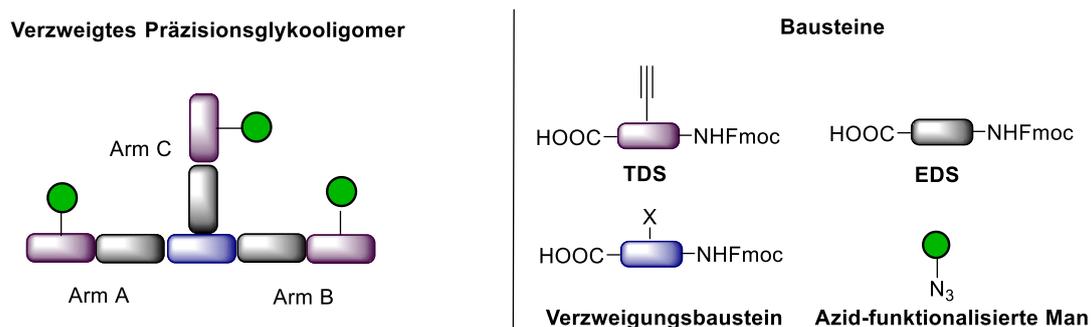


Abbildung 11: Zielstruktur für den Vergleich der Reinheiten der drei untersuchten Verzweigungsbausteine.

Tabelle 1: Zielstruktur 6-8 für den Vergleich der Reinheiten der drei untersuchten Verzweigungsbausteine.

Verzweigungsbaustein	Struktur des Verzweigungsbausteins	Glykooligomer	Reinheit <sup>1</sup>
ADS		6	90 %
Fmoc-L-Lys(Dde)-OH		7	88 %
AADS		8	86 %

<sup>1</sup> RP-HPLC: 5%/95% zu 95%/5% AcN/H<sub>2</sub>O mit 0.1% Ameisensäure in 17 min bei 25°C, 214 nm

Die Glykooligomere **6-8** konnten erfolgreich synthetisiert werden. Arm A wurde aufgebaut, in dem TDS gefolgt von EDS an die feste Phase gekuppelt worden ist. Als zentraler Verzweigungsbaustein wurden die drei diskutierten Bausteine (Kapitel 3.1 und 3.2.) ADS, Fmoc-L-Lys(Dde)-OH und AADS eingeführt. Arm B besteht in umgekehrter Reihenfolge von Arm A aus EDS und TDS. Nach dem erfolgreichen Aufbau des Hauptgerüsts (Arm A und B) wurde die Verzweigung bzw. Seitenkette nach selektiver Entschützung der permanenten Schutzgruppe bzw. Reaktion ans Gerüst eingeführt werden. Arm C wird durch EDS gefolgt von TDS aufgebaut. Wie in der Kapitel 1.4.2. diskutiert können durch die TDS Bausteine gezielt Kohlenhydrat-Liganden mittels CuAAC konjugiert werden.

Die drei Glykooligomere **6** und **8** wurden nur in analytischen Mengen hergestellt und somit nur mittels ESI und RP-HPLC charakterisiert. Die relative Reinheit aller drei Glykooligomere liegt im Bereich von 86% bis 90% und wurde mittels RP-HPLC durch die Integration des UV Signals bestimmt. Da für die gewünschten Glykooligomere und deren Anwendung in Lektin Bindungsstudien Reinheiten von >95% erforderlich ist, ergibt sich somit, dass die Verwendung aller drei Verzweigungsbausteine nur nach präparative HPLC Aufreinigung der Glykooligomere möglich sein wird.

### 3.3. Asymmetrisch verzweigte Mannose-Präzisionsglykomakromoleküle

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit ist die Synthese von asymmetrisch verzweigten, monodispersen, sequenzdefinierten Glykooligomeren und deren Einsatz als Modellsubstanzen in Lektin Bindungsstudien zur Untersuchung der Korrelation zwischen Ligandenstruktur und Lektinbindung. Eine Serie von Mannose-funktionalisierten Glykooligomeren wurde synthetisiert (Kapitel 3.3.1), um das Bindungsverhalten zu verschiedenen Lektinen zu testen. Als Lektine wurden Concanavalin A (ConA) und Langerin im Rahmen dieser Arbeit gewählt. Durch Dr. Eike Wamhoff wurden mittels <sup>19</sup>F basierter NMR kompetitiven Inhibierungsexperimenten (Kapitel 3.3.2.) die Wechselwirkungen der Präzisionsglykomakromoleküle zu Langerin quantifiziert. Die Wechselwirkungen und auch die Selektivität zwischen den Glykooligomeren und Langerin wie auch ConA wurden zudem mittels Oberflächenplasmonenresonanz Studien (SPR- *surface plasmon resonance spectroscopy*) (Kapitel 3.3.3.) untersucht.

#### 3.3.1. Synthese asymmetrisch verzweigter Mannose-Präzisionsglykomakromoleküle

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Reihe von neun Mannose-funktionalisierten Glykokonjugaten synthetisiert. Drei monovalente Strukturen (**9-11**) dienen in Lektin Bindungsstudien als Vergleich für die trivalenten asymmetrisch verzweigten Glykooligomere. Die sieben trivalenten verzweigten Strukturen (**7, 12-17**) wurden mit Fmoc-L-Lys(Dde)-OH als Verzweigungsbaustein synthetisiert. Um eine Struktur-Wirkungsbeziehung zwischen der Struktur des Liganden und den einzelnen Lektinen herzustellen, wurden die drei Arme der trivalenten Glykooligomere, ausgehend von Oligomer **12**, asymmetrisch verlängert, sodass sie sich in ihrer Ligandendichte bzw. in ihren jeweiligen Armlängen

unterscheiden. Auf diese Weise können unterschiedliche Kohlenhydratligandenabstände untersucht werden, um eine Korrelation zwischen Struktur und Wirkung zu bilden. Es wurde das EDA funktionalisierte Harz<sup>73</sup> für die Synthese verwendet, da die Glykooligomere im Rahmen einer weiteren Kooperation an Lipide gekuppelt und zur Funktionalisierung von Liposomen genutzt werden sollten. Die Ergebnisse der Lipidkonjugation und Liposomenformulierung werden im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter diskutiert.

Konjugat **12** ist das kleinste trivalente Glykooligomer in dieser Serie. Arm A besteht aus TDS. Der Verzweigungsbaustein ist Fmoc-L-Lys(Dde)-OH. Die beiden Amine des Lysins wurden mit Pentinsäuren funktionalisiert und bilden somit Arm B und Arm C. An die Pentinsäurelinker und TDS wurden mittels CuAAC Azid-funktionalisierte Mannose konjugiert. Für **13** wurde Arm B asymmetrisch verlängert, indem die Pentinsäure der Hauptkette durch TDS ersetzt wurde. **14** hat im Vergleich zu **12** beide Pentinsäuren (Arm B und Arm C) durch TDS ersetzt. Um gezielt einen Arm zu verlängern, wurde SDS in die Hauptkette von **15** hinzugefügt. Symmetrisch verzweigte Glykooligomere stellen die Oligomere **14**, **16** und **7** dar, da ausgehend von Verbindung **14**, für **16** jeder Arm um einen SDS Baustein und für **7** um einen EDS Baustein erweitert wurde.

**7** ist somit das größte trivalente Glykooligomer und hat gleichzeitig die geringste Ligandendichte. Langerin und auch ConA haben keine Bindungsaffinität zu Galactose, sodass die Galactose-Struktur **17** in allen Bindungsstudien als Negativkontrolle verwendet werden kann. Mittels Negativkontrolle können unspezifische Bindungsbeiträge des Oligo(amidoamin)-Gerüsts berücksichtigt werden (Abbildung 12).

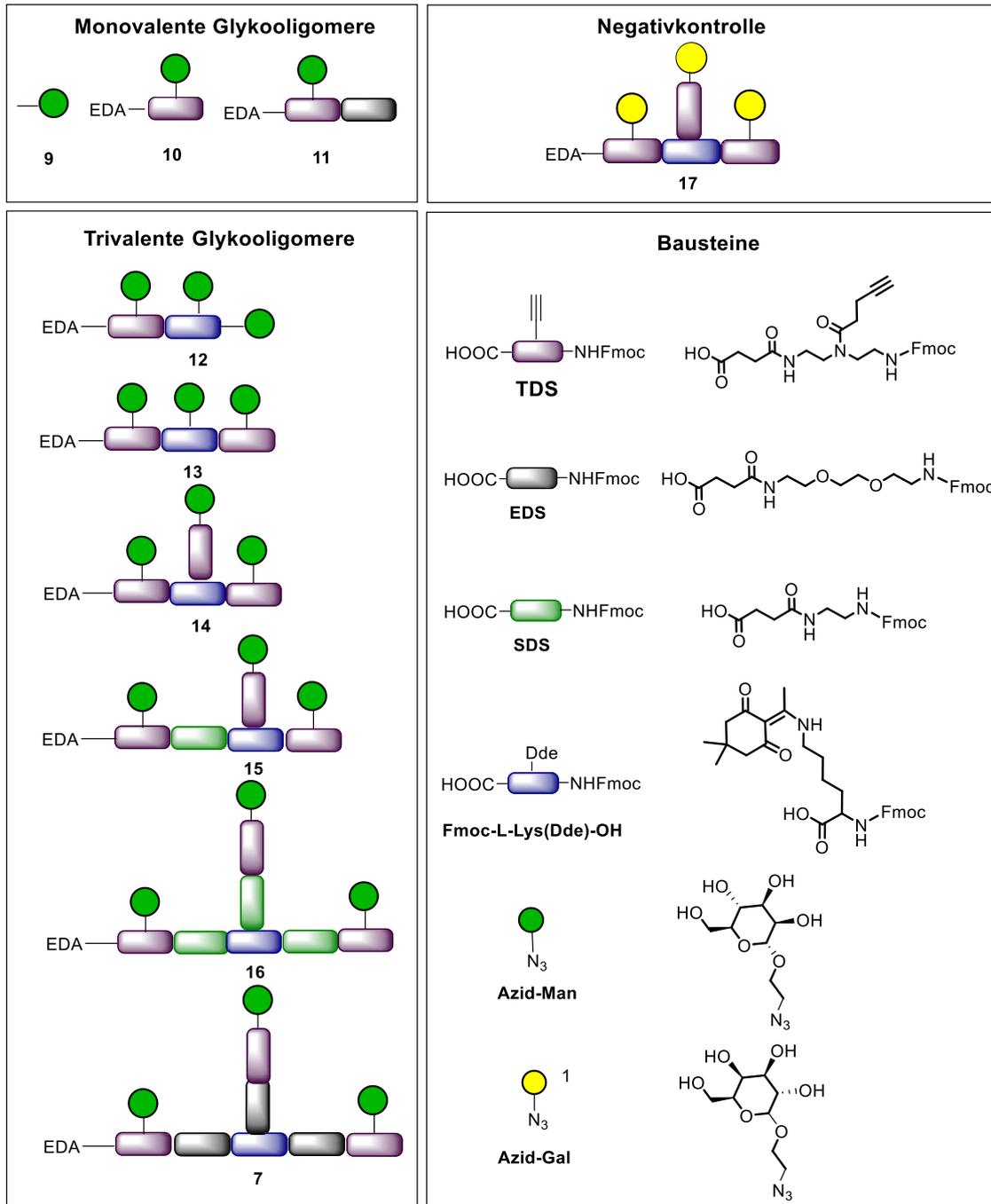


Abbildung 12: Schematische Darstellung von Mannose-Präzisionsglykomakromolekülen **7**, **9-16** und der Negativkontrolle **17** mit den verwendeten Bausteinen.

<sup>1</sup> Azid-funktionalisierte Galactose wurde von Frau Birgit Ohler (Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.

Die Glykooligomere **7** und **10-17** wurden mit einem Ethylendiamin- (EDA) funktionalisiertem Tentagel Harz<sup>73</sup> synthetisiert und tragen somit nach der Abspaltung vom Harz ein freies Amin am C-Terminus. Dieses freie Amin steht für eine spätere Funktionalisierung des Oligomers in Lösung zur Verfügung. **9** wurde als kleinstes monovalentes Fragment mit dem Tentagel S RAM Harz synthetisiert und trägt am

C-Terminus ein unreaktives Amid. Die Glykooligomere **7** und **11-17** wurden mittels präparativer HPLC aufgereinigt und haben eine relative Reinheit von über 97%, ermittelt durch die Integration des UV Signals des RP-HPLC Chromatograms. **7** sowie **9-17** konnten eindeutig mittels  $^1\text{H-NMR}$ , HR-ESI und RP-HPLC identifiziert werden.

Das RP-HPLC Chromatogramm und HR-ESI für das asymmetrisch verzweigte Glykooligomer **12** wird in Abbildung 13 exemplarisch präsentiert.

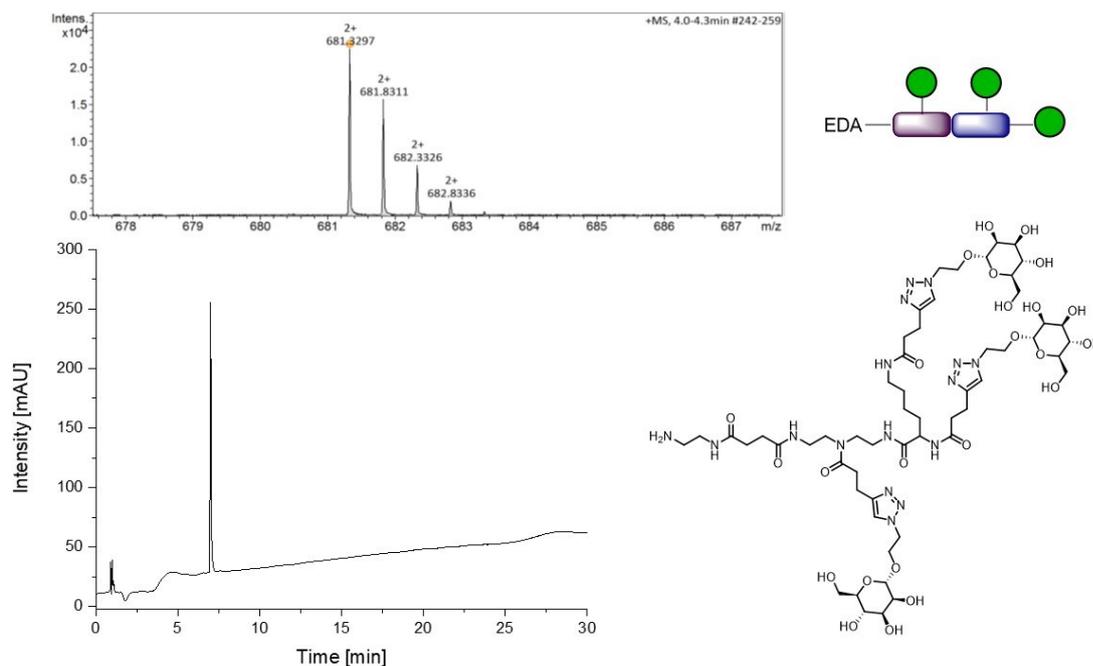


Abbildung 13: Präsentation der chemischen Struktur von Glykooligomer **12**, das HR-MS (ESI+ Q TOF) von **12**  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$  und Chromatogramm von **12** (5%/95% zu 50%/50% AcN/ $\text{H}_2\text{O}$  in 30 min bei  $25^\circ\text{C}$  mit C18 RP Säule).

### 3.3.2. $^{19}\text{F}$ basierende NMR Kompetitive-Inhibierungsbindungsstudie mit Langerin

Das Lektin Langerin hat seit seiner Entdeckung im Jahr 2000<sup>178</sup> rasant an Aufmerksamkeit in der Forschung gewonnen. Ein Grund dafür ist, dass Langerin auf Langerhans Zellen (LC) als Transmembranprotein entdeckt<sup>178</sup> wurde und als solches als natürliche Barriere für *human immunodeficiency virus-1* (HIV-1) Infektionen fungiert. Die LCs befinden sich in der Epidermis, d.h. in der äußeren Schicht der Haut sowie von Schleimhäuten<sup>179</sup> und koordinieren Prozesse des Immunsystems. An dieser Koordination ist Langerin häufig beteiligt. Ein Beispiel dafür ist eine Infektion mit HIV-1. Diese geschieht meist durch sexuelle Übertragung über die Genitalschleimhaut<sup>180</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass Langerin Krankheitserreger durch die Bindung von Glykokonjugaten, die sich auf der Oberfläche von Krankheitserregern befinden, erkennt und bindet. Im Fall von HIV-1 wird das gebundene Virus in sogenannte Birbeck Granula eingelagert und dort abgebaut. Birbeck Granula sind Langerin-spezifische Organellen, die somit zur Hemmung der Infektion beitragen und die LCs gegenüber einer HIV-1 Übertragung unempfindlich machen.<sup>180</sup>

Langerin besitzt als Transmembranprotein eine extrazelluläre Domäne (ECD), die aus einer Halsregion und einer C-terminalen CRD besteht. Es erkennt Oligosaccharide mit terminalen Mannose-, terminalen N-Acetylglucosamin- und 6-Sulfogalactose-Resten.<sup>179, 181</sup> In Lösung liegt es als stabiles Trimer vor.<sup>182-183</sup> Multiple Wechselwirkungen zwischen Halsregion und den CRDs, wie auch eine coiled-coil  $\alpha$ -Helix Faltung der Halsregion, führen zu einem starren Trimer mit fixierten CRDs. Die CRDs haben eine Distanz von 42Å (Abbildung 14).<sup>183</sup>

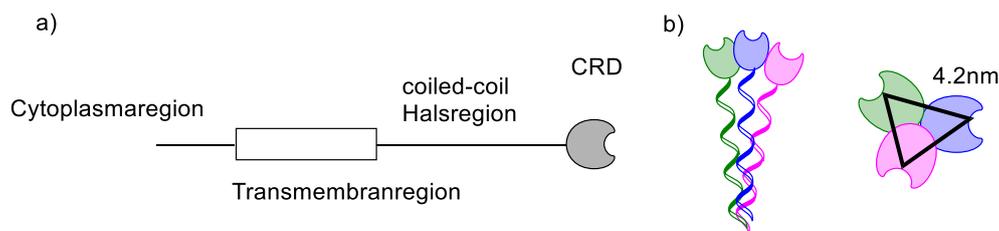


Abbildung 14: a) Schematische Darstellung eines Langerin Monomers, b) Schematische ECDs Darstellung eines Langerin Trimers. Graphische Darstellung in Anlehnung an<sup>183</sup>

Langerin gehört zur Proteinfamilie der C-Typ Lektine. Ein C-Typ Lektin besitzt in seiner CRD neben den Kohlenhydratbindungstaschen auch Bindungstaschen für Calciumionen. Die Bindung zu Calciumionen ist eine Grundvoraussetzung für eine Bindung zu einem Kohlenhydratmolekül.<sup>184</sup>

Die Forschungsgruppe von Dr. Christoph Rademacher am Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung hat sich auf Bindungsstudien zum Lektin Langerin spezialisiert.<sup>185-189</sup> Die Mannose-Glykooligomere, die in dieser Arbeit synthetisiert worden sind, wurden im Rahmen einer Kooperation mit Dr. Christoph Rademacher und seinem wissenschaftlichen Mitarbeiter, Dr. Eike C.

Wamhoff (Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung), mit einem im Jahr 2016 etablierten  $^{19}\text{F}$  basierenden NMR Kompetitive-Inhibierungsexperiment<sup>185</sup> untersucht. Das  $^{19}\text{F}$  basierende NMR Kompetitive-Inhibierungsexperiment beruht auf einer Bindung eines Reporter-moleküls mit Langerin. Als Reporter-molekül wurde ein N-Acetyl-Mannosederivat (ManNAc) gewählt, welches mit einer Trifluoroacetylgruppe funktionalisiert worden ist. Das  $^{19}\text{F}$  NMR Spektrum des Reporter-moleküls zeigt für diese Trifluoroacetylgruppe eine einzelne Resonanz und gewährleistet ein optimales Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Die Linienverbreiterung im  $^{19}\text{F}$  NMR Spektrum der Trifluoroacetylgruppe ist davon abhängig, ob das Reporter-molekül in einem bindenden oder nichtbindenden Zustand zu Langerin vorliegt. Wird zu dem Reporter-molekül ein Inhibierungs-ligand hinzugefügt, entsteht eine Konkurrenz zwischen dem Reporter-molekül und dem Liganden um die Bindungstaschen von Langerin. Durch die Linienverbreiterung des  $^{19}\text{F}$  Signals des Reporter-moleküls können  $K_i$  bzw.  $\text{IC}_{50}$  Werte ermittelt werden (Abbildung 15).

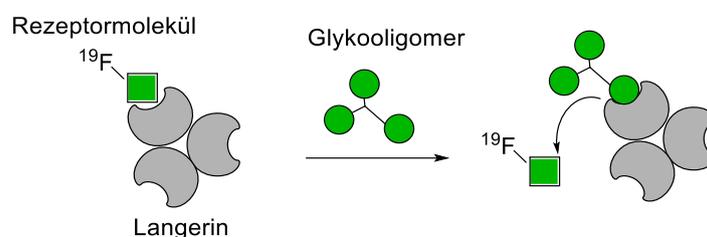


Abbildung 15: Schematische Darstellung des  $^{19}\text{F}$  basierenden NMR Kompetitive-Inhibierungsexperiments, durchgeführt von Dr. Eike C. Wamhoff (Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung). Graphische Darstellung in Anlehnung an<sup>185</sup>

Die CRDs von Langerin haben eine Distanz von  $42 \text{ \AA}$  zueinander.<sup>183</sup> Dr. Eike C. Wamhoff, Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung, konnte die Distanz zum Schwerpunkt von Langerin mit  $24 \text{ \AA}$  modellieren (Abbildung 16).

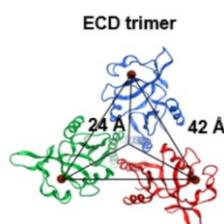


Abbildung 16: Distanz der CRDs von Langerin zum Schwerpunkt, modelliert von Eike C. Wamhoff, Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung.

Die Kohlenhydratabstände der sechs 3-armigen Mannose-funktionalisierten trivalenten Glykooligomere (**7**, **12-16**) wurden in Abhängigkeit ihrer Konturlängen gewählt. Die Konturlängen geben nur einen theoretischen Wert an, da die monodispersen, sequenzdefinierten Glykooligomere ein flexibles Gerüst haben und somit verknäult in Lösung vorliegen. Bezogen auf die CRDs Distanzen von Langerin sind die Kohlenhydratabstände von **12** zu klein, um simultan an alle drei Bindungstaschen

zu binden. **13**, das nächst größere Glykooligomer in der Serie, hätte theoretisch die Möglichkeit, gleichzeitig an alle drei CRDs von Langerin zu binden. Die Kohlenhydratligandenabstände von **7** und **14-16** haben theoretisch eine größere Distanz als die CRDs von Langerin, sodass eine simultane Bindung zu allen drei CRDs generell möglich ist. Alle 10 Glykooligomere (Abbildung 12) wurden im Rahmen dieser Kooperation von Dr. Eike C. Wamhoff (Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung) mittels des  $^{19}\text{F}$  basierenden NMR Kompetitive-Inhibierungsexperiments untersucht. Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse der Bindungsstudie.

Tabelle 2: Ergebnisse des  $^{19}\text{F}$  basierenden NMR Kompetitive-Inhibierungsexperiments, durchgeführt von Dr. Eike C. Wamhoff, Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung<sup>1</sup>.

Rezeptor	Strukturnummer	Konturlänge [Å]	$K_i$ [mM]	$IC_{50}$ [mM]	Hill-Faktor p	Relative Potency
Monovalente Glykooligomere						
ECD	9	-	9.5±0.6	9.7±0.7	1 <sup>*1</sup>	-
ECD	10	-	16.0±0.4	16.0±0.4	1 <sup>*1</sup>	-
ECD	11	-	11.6±1.1	12.0±0.3	1 <sup>*1</sup>	-
Trivalente Glykooligomere						
ECD	12	15 – 21	-	0.044±0.006	0.39±0.02	72.0 <sup>*2</sup>
ECD	13	21 – 27	-	0.13±0.02	0.39±0.03	41.0 <sup>*3</sup>
ECD	14	21 – 33	-	0.2±0.08	0.41±0.08	26.7 <sup>*3</sup>
ECD	15	27 – 33	-	0.6±0.1	0.45±0.08	8.9 <sup>*3</sup>
ECD	16	33 – 45	-	0.7±0.2	0.48±0.08	5.5 <sup>*4</sup>
EDC	7	42 – 54	-	0.8±0.1	0.44±0.09	4.8 <sup>*4</sup>
EDC	17	Negativkontrolle	Keine Inhibierung		-	-
CRD	12	15 – 21	4.4±0.3	4.3±0.2	0.88±0.06	0.8 <sup>*2</sup>

<sup>\*1</sup> Hill Faktor p wurde als Konstante 1 gesetzt.

<sup>\*2</sup> die relative Potenz wurde auf den  $IC_{50}$  Wert von Präzisionsglykomakromolekül **9** normalisiert.

<sup>\*3</sup> die relative Potenz wurde auf den  $IC_{50}$  Wert von Präzisionsglykomakromolekül **10** normalisiert.

<sup>\*4</sup> die relative Potenz wurde auf den  $IC_{50}$  Wert von Präzisionsglykomakromolekül **11** normalisiert.

Alle drei monovalenten Strukturen **9-11** zeigen eine Inhibierung im millimolaren Bereich. In früheren Bindungsstudien von Wamhoff *et al.*<sup>185</sup> konnte gezeigt werden, dass reine Mannose eine Bindungsaffinität von 5 mM<sup>185</sup> hat. Somit haben **9-11** eine geringere Bindungsaffinität zu Langerin

als reine Mannoseliganden. Diese Ergebnisse bestätigen die früheren Arbeiten von Wamhoff *et al.*<sup>185</sup> In dieser Veröffentlichung wurden 15 monovalente Liganden in dem <sup>19</sup>F basierenden NMR Kompetitive-Inhibierungsexperiment getestet, jedoch zeigte nur ein Ligand eine höhere Bindungsaffinität als reine Mannose. Dieser Ligand trägt eine sulfonierte Funktionalisierung und kann somit zusätzliche Wechselwirkungen zu Langerin aufbauen.<sup>185</sup>

**11** trägt im Vergleich zu **10** einen zusätzlichen EDS Baustein im Oligo(amidoamin)-Gerüst, der sich positiv auf die Bindungsaffinität auswirkt. Dieser Effekt wurde schon in früheren Arbeiten beobachtet.<sup>73</sup> Eine Hypothese wäre die Solvatation. EDS besitzt hydrophile Ethylenglycol Einheiten, die solvatisiert sind. Während des Bindungsprozesses wird die Hydrathülle aufgebrochen und durch die Wassermolekülfreisetzung wird die Entropie erhöht. **9** als kleinster monovalenter Ligand wird wahrscheinlich sterische Vorteile gegenüber **10** und **11** haben, die sich in der höchsten Bindungsaffinität von den drei monovalenten Liganden zeigen.

Alle trivalenten Glykooligomere der untersuchten Serie haben eine höhere Bindungsaffinität zu Langerin im Vergleich zu den untersuchten monovalenten Liganden und reiner Mannose. Die IC<sub>50</sub> Werte liegen im mikromolaren Bereich. Die Negativkontrolle **17** zeigt kein Bindungsverhalten zu Langerin, wodurch unspezifische Wechselwirkungen ausgeschlossen werden können. Die Ergebnisse zeigen einen auffallenden Trend der Bindungsaffinität von den trivalenten Glykooligomeren in Abhängigkeit ihrer Armlängen zu Langerin. **12** ist das kleinste trivalente Glykooligomer in der untersuchten Serie und hat die höchste Bindungsaffinität. Es bindet 72 Male stärker als das Fragment **9**. Bei einer asymmetrischen Verlängerung der Arme verringert sich die Affinität. **7** als größtes trivalentes Glykooligomer hat die geringste Bindungsaffinität zu Langerin mit einer 4.8 fachen höheren Bindung als das Strukturfragment **11**.

Obwohl **12** die höchste Bindungsaffinität zu Langerin hat, kann es höchstwahrscheinlich auf Grund seiner Größe (Konturlänge = 21 Å) nicht simultan an alle drei Bindungsstellen binden. Zudem wird wegen des flexiblen Oligo(amidoamin)-Gerüsts keine gestreckte, sondern eher eine verknäulte Konformation der Glykooligomere erwartet. Theoretisch ist eine simultane Erkennung des Liganden nur unter erheblicher konformationeller Umlagerung des Rezeptors möglich um diese kurzen Abstände zu ermöglichen. Diese konformationelle Umlagerung des Rezeptors ist jedoch von der räumlichen Struktur des Proteins nicht zu erwarten. Eine mögliche Erklärung für die gesteigerte Affinität könnte darin begründet sein, dass das Glykooligomer zwischen den CRDs positioniert ist und vom *statistical rebinding* bei minimalem Verlust an Entropie profitiert. Alternativ könnte Langerin auch eine Konformationsveränderung eingehen, um Chelatbindungen einzugehen. Jedoch würde für solche Bindungseffekte eine deutlich höhere Affinität erwartet.

Die Liganden **7** und **13-16** könnten theoretisch auf Grund ihrer Konturlängen simultan an alle drei Bindungsstellen binden, jedoch wird auch für diese Liganden eine verknäulte Konformation der Glykooligomere erwartet. Insgesamt müssen für eine Rezeptor-Ligand-Bindung enthalpische sowie entropische Beiträge von beiden Bindungspartnern aufgebracht werden. Eine potenzielle Konformationsänderung des Liganden oder Rezeptors würde zwar zu einer maximalen räumlichen Nähe führen, die aber auf entropischen Verlusten basiert. Diese Verluste stehen im Verhältnis zum enthalpischen Gewinn der multivalenten Wechselwirkung zwischen Rezeptor und Ligand und sind wahrscheinlich für **7** und **13-16** zu hoch im Vergleich zu dem besten Binder **12**.

Anschließend wurde **12** als bester Binder wurde gewählt, um das Bindungsverhalten zu Langerin als Monomer ( $IC_{50} = 4.3 \text{ mM}$ ) wie auch als Trimer ( $IC_{50} = 0,044 \text{ mM}$ ) zu untersuchen. Interessanterweise verändern sich die  $IC_{50}$  Werte signifikant. Die Bindungsaffinität zum monomeren Langerin ist 100-mal schwächer als die zum Trimer. Auch dieses Ergebnis kann wahrscheinlich auf statistische Effekte zwischen Langerin und den Kohlenhydratliganden zurückzuführen sein.

Alle Glykooligomere zeigen keine komplette Inhibierung bis zu einer Konzentration von 5 mM. Der Hill Faktor  $p$ , der über den Dose-Response-Fit bestimmt worden ist, deutet auf eine negative Kooperativität hin, da die Werte kleiner als 0.5 sind.<sup>190</sup> Eine negative Kooperativität bedeutet, dass die Bindung eines Liganden an ein Lektin die Affinität eines anderen Liganden vermindert.<sup>83</sup> Eine potenzielle Möglichkeit der negativen Kooperativität entsteht z.B. durch eine sterische Abschirmung.

Für weiterführende Studien wäre es interessant zu untersuchen, ob noch kleinere trivalente Strukturen den Trend der Ergebnisse bestätigen oder ob diese geringere Bindungsaffinitäten zu Langerin im Vergleich zu Glykooligomer **12** haben. Zusätzlich konnte in einigen Publikationen schon gezeigt werden, dass heterovalente Strukturen höhere Bindungsaffinitäten im Vergleich zu ihren homovalenten Strukturen haben.<sup>60, 191-192</sup> Deshalb könnten Untersuchungen von heterovalenten Strukturen bezüglich der Bindungsaffinität zu Langerin auch von Interesse sein, um neue Erkenntnisse über Struktur-Wirkungsbeziehungen zwischen Ligand und Rezeptor zu gewinnen.

### 3.3.3. SPR Messungen mit Langerin und ConA

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Glykooligomere (Abbildung 12) in SPR Bindungsstudien mit den Lektinen Langerin und ConA untersucht. Durch die SPR Messungen können die bisherigen Ergebnisse des  $^{19}\text{F}$  basierenden NMR Kompetitive-Inhibierungsexperiments bestätigt werden. Außerdem bietet

dies die Möglichkeit nicht nur eine gesteigerte Affinität sondern auch potenzielle Selektivität der Glykooligomere zu untersuchen.

Bei der Oberflächenplasmonenresonanz werden Bindungsstudien an der Grenzfläche einer funktionalisierten Goldoberfläche untersucht. Die Bindung findet dabei zwischen dem Liganden, der auf der Oberfläche immobilisiert ist, und dem Analyten statt, der in einem kontinuierlichen Fluss über die Oberfläche geleitet wird. Dabei wird die Bindung als eine Änderung im Brechungsindex und somit auch als Änderung des Resonanzwinkels detektiert. Das Signal wird dabei als *response units* (RU) wiedergegeben. Die Phase der Analytinjektion wird Assoziations-Phase genannt, bei der es zur Anlagerung des Analyten an die Oberfläche kommt. Nach dem Injektionsende findet die Dissoziation der reversiblen Bindung zwischen Ligand und Analyt statt. Um zur Basislinie für die nächste Messung zurückzukehren, findet meistens eine Regeneration statt, um die Bindung zwischen Liganden und Analyt aufzuheben (Abbildung 17).

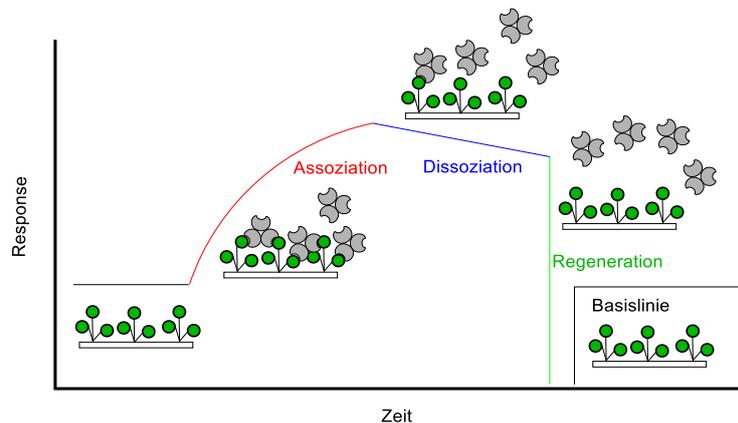


Abbildung 17: Schematische Darstellung eines SPR Sensograms einer "direct-binding" Bindungsstudie.

In diesen Bindungsstudien wurde ConA als zusätzliches Protein gewählt, da es eins der bekanntesten und am besten untersuchten Lektine ist und oft als Modellektin verwendet wird. Im Jahr 1919 wurde ConA von Bohnen als pflanzliches Lektin extrahiert.<sup>193</sup> Es bindet wie auch Langerin zu Mannose und Glucose, jedoch nicht zu Galactose.<sup>194</sup> ConA kann abhängig vom pH-Wert als Dimer (pH < 6) oder Tetramer (pH > 7) vorliegen.<sup>195</sup> Jede Monomereinheit hat eine CRD und eine Bindungstasche für  $Mn^{2+}$  und  $Ca^{2+}$ .<sup>196-197</sup>

Da die  $^{19}F$  basierende NMR Bindungsstudie ein Inhibierungsexperiment darstellt, ist es von großem Interesse, auch das direkte Bindungsverhalten von den Glykooligomeren zu Langerin bzw. ConA zu untersuchen. Es war nicht möglich, Langerin auf dem Chip zu immobilisieren, da die Gefahr bestand, dass die kovalente Bindung die CRDs von Langerin verändern könnte. So wurden die Glykooligomere über das freie Amin der Ethylendiamin-Funktionalisierung am C-Terminus auf die Chip-Oberfläche immobilisiert. Die Glykooligomere **7**, **12** und **13** wurden an die Chip-Oberfläche der Messzelle und **17**

als Negativkontrolle an die Oberfläche der Referenzzelle mit der EDC/NHS Kupplungschemie gekuppelt (Experimentalteil 5.). Es wurde ein sogenannter C1 Chip gewählt, der freie Carboxylgruppen für eine Kupplung trägt. Die drei Glykooligomere wurden gewählt, da **12** durch die bisherigen Ergebnisse der „best-binder“, **13** der „2nd best-binder“ und **7** der „worst-binder“ ist. Sowohl mit ConA als auch mit Langerin wurden „direct-binding“ Bindungsstudien durchgeführt. In „direct-binding“ SPR Bindungsstudien wird der Einfluss der Bindung zwischen Lektin und Glykooligomer anhand der *Response unit* abgebildet.

Das jeweilige Lektin wurde in fünf unterschiedlichen Konzentrationen vermessen (Langerin 0.09 – 21.02 mM und ConA 0.12 – 10.03 mM). Ein einzelner Zyklus wurde durchgeführt, indem eine Flussrate von 30  $\mu\text{l}/\text{min}$  und eine Kontaktzeit von 60 s gewählt wurden. Die Dissoziation fand innerhalb von 30 s statt. Die Regeneration wurde fünf Male für 60 s für Langerin und drei Male für 60 s für ConA mit einer Lösung von 2.5 M NaCl und 1.6 M Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside durchgeführt (Experimentalteil 5). Die apparenten Gleichgewichtskonstanten  $K_D$  wurden mit Hilfe des „steady-state-fit“ ermittelt. Die apparenten Gleichgewichtskonstanten  $K_D$  sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Apparente  $K_D$  Werte der „direct-binding“ SPR Bindungsstudien mit ConA und Langerin mit einem C1 Chip.

Chip	C1.1 mit 12	C1.2 mit 13	C1.3 mit 7
<b>K<sub>D</sub> [<math>\mu\text{M}</math>]</b>	$1.46 \pm 0.02^1$	$0.90 \pm 0.01^1$	$7.18 \pm 0.07^2$
<b>Langerin</b>			
<b>K<sub>D</sub> [<math>\mu\text{M}</math>]</b>	$1.51 \pm 0.05^1$	$1.37 \pm 0.05^1$	$1.79 \pm 0.08^1$
<b>ConA</b>			

<sup>1</sup> Die Messung wurde als Dublikat in dreifacher Wiederholung durchgeführt

<sup>2</sup> Die Messung wurde als Dublikat in zweifacher Wiederholung durchgeführt

Die Chips können untereinander nicht verglichen werden, da sie ein unterschiedliches Immobilisationslevel haben. Alle apparenten  $K_D$  Werte liegen im Konzentrationsbereich von 0.896  $\mu\text{M}$  bis 7.180  $\mu\text{M}$ . Die  $K_D$  Werte für Chip C1.1 liegen im gleichen Konzentrationsbereich. Somit zeigt **12** zu beiden Lektinen die annähernd gleiche Bindungsaffinität. **13**, das auf dem Chip C1.2 immobilisiert ist, zeigt eine 1.5 mal höhere Bindungsaffinität zu Langerin als zu ConA. Auffallend ist, dass **7** eine vierfach höhere Bindungsaffinität zu ConA im Vergleich zu Langerin hat. Die apparenten  $K_D$  Werte zeigen folgende Trends auf. Langerin besitzt eine höhere Bindungsaffinität zu Glykooligomeren mit kürzeren und ConA mit längeren Kohlenhydrat-Liganden-Abständen.

Die „direct-binding“ SPR Bindungsstudienresultate für Langerin bestätigen somit zusätzlich den Trend des <sup>19</sup>F basierenden NMR Kompetitive-Inhibierungsexperiments und der Kompetitive-Inhibierungszellstudien.

Um die Korrelation zwischen Ligandenstruktur und Bindungswechselwirkung für ConA eingehender zu untersuchen, wurde ein Kompetitive-Inhibierungsexperiment am SPR durchgeführt. ConA wurde mit einer definierten Konzentration von  $0.55 \mu\text{M}$  auf dem Chip 1.1 vermessen. Der erhaltene Wert ist der Bindungswert von ConA zum Chip mit 0% Inhibierung. Wird ConA jedoch mit einem weiteren Liganden inkubiert und dann vermessen, sinkt die Bindungsaffinität, da eine Konkurrenz zwischen dem Liganden in der Lösung und dem Glykooligomer **12**, das auf dem Chip immobilisiert ist, entsteht. Es wurden Lösungen von  $0.55 \mu\text{M}$  ConA und den Glykooligomeren **7** und **9-17** mit einer Konzentration von  $0.75 \mu\text{M}$  untersucht (Abbildung 18). Alle Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt (Experimententeil 5).

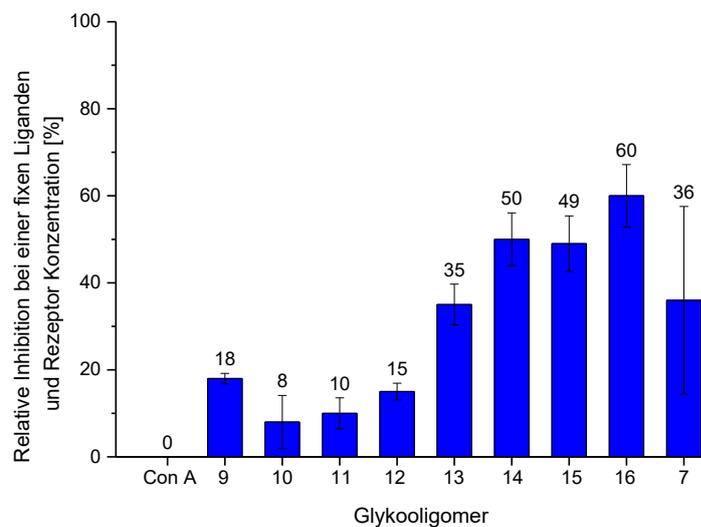


Abbildung 18: Messergebnisse des SPR Kompetitive-Inhibierungsexperiments mit ConA auf dem C1.1 Chip.

Die Inhibierung von ConA mit den jeweiligen Glykooligomeren **7** und **9-16** reicht von 8% bis 60%. **15** hat die stärkste inhibierende Wirkung auf ConA. Das trivalente Glykooligomer **12** hat die geringste inhibierende Wirkung auf ConA. Diese Bindungsstudie gibt einen weiteren Hinweis darauf, dass ConA eine hohe Bindungsaffinität zu Glykooligomeren mit längeren Kohlenhydrat-Liganden-Abständen hat. Es ist interessant, dass **7** anscheinend zu große Kohlenhydrat-Liganden-Abstände für ConA hat. Eine Erklärung wäre, dass sich insgesamt der Verlust an Konformationsentropie während des Bindungsprozesses zwischen **7** und ConA anscheinend mit höherem Einfluss als der enthalpische Gewinn auswirkt. Obwohl anzunehmen ist, dass **16** aufgrund seiner Größe auch einen hohen Verlust an Konformationsentropie während des Bindungsprozesses hat, weist **16** mit 60% die größten Inhibierungseigenschaften auf. Die Kohlenhydratabstände von Ligand **16** in seiner verknäulten Form könnten eine maximale räumliche Nähe zu den CRDs von Langerin aufweisen und somit neben statistischen Effekten auch Chelat Bindungen begünstigen. Die Wahrscheinlichkeit von statistischen Effekten nimmt mit jeder Verkürzung des Glykooligomers bis hin zu Glykooligomer **12** ab. **17** zeigt als Negativkontrolle keine Bindungsaffinität zu ConA.

Die erhaltenen Ergebnisse können zusätzlich noch mit den CRD Distanzen der Lektine bestätigt werden. Die CRDs von Langerin haben eine Distanz von  $42\text{\AA}^{183}$ . Liegt ConA als Tetramer vor, was bei den SPR Studien der Fall war, haben die CRDs eine Distanz von  $65\text{\AA}^{195}$ . Somit liegt es nahe, dass Langerin eine höhere Bindungsaffinität zu kleineren und ConA zu größeren Glykooligomeren hat.

In weiterführenden Untersuchungen könnte es von Interesse sein, diese Ergebnisse in *direct Binding*-Studien zwischen ConA und allen Glykooligomeren **7** sowie **9-17** intensiver zu untersuchen. Außerdem könnten die Ergebnisse mit ITC überprüft werden.

### 3.4. Asymmetrisch verzweigte N-Acetylgalactoseamin-Präzisionsglykomakromoleküle

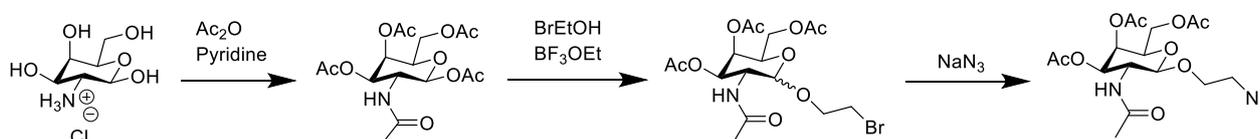
Der Asialoglykoproteinrezeptor (ASGPR) ist ein Membranprotein der Leber und bindet spezifisch den Hepatitis B Virus.<sup>198</sup> Es ist ein C-Typ Lektin, das neben der CRD auch eine Bindungstasche für  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen im Monomer hat.<sup>199</sup> Es wurden viele Bindungsstudien mit natürlichen wie auch synthetischen Kohlenhydratliganden durchgeführt, um Struktur-Affinitätsbeziehungen zwischen Kohlenhydratliganden und ASGPR zu untersuchen. Baenzinger *et al.*<sup>200-201</sup> konnten in ihren Publikationen zeigen, dass der Rezeptor spezifisch zu terminalen N-Acetylgalactoseamin- und mit einer 50-fach schwächeren Bindung zu terminalen Galactoseresten bindet.<sup>199, 202</sup> Das  $\alpha$ - und auch das  $\beta$ -Anomer von GalNAc zeigen die gleiche Bindungsaffinität zu ASGPR.<sup>203</sup> Neben der Ligandenart konnte auch schon der Einfluss der Valenz untersucht werden. Trivalente Liganden haben eine höhere Bindungsaffinität zu ASGPR als ihre mono- und divalenten strukturähnlichen Liganden.<sup>74, 200-201</sup> Untersuchungen an Kaninchenhepatozyten von Lee *et al.*<sup>204-205</sup>, unter Verwendung von synthetischen Glykanen, konnten diesen Trend bestätigen. Untersucht wurde die Bindungsaffinität einer tetravalenten Struktur, die die höchste Bindungsaffinität pro Mannose zeigt. Jedoch ist die Bindungsaffinität vom trivalenten im Vergleich zum tetravalenten Liganden minimal, sodass angenommen wird, dass eine trivalente Struktur in der Lage ist, simultan an alle drei CRDs des Rezeptors zu binden. Der vierte Kohlenhydratligand ist nicht zwangsläufig am Bindungsprozess beteiligt. Außerdem hat sich herausgestellt, dass die Länge des Linkers der multivalenten Liganden ein entscheidender Faktor für deren Bindungsaffinität zu ASGPR ist.<sup>203</sup> Die Distanzen der CRDs von ASGPR werden auf eine Länge von  $15\text{-}25\text{\AA}$  geschätzt.<sup>203</sup> Aus zahlreichen bereits veröffentlichten Studien

wurde deutlich, dass eine hohe Bindungsaffinität dann erreicht wird, wenn der Abstand zwischen den Kohlenhydraten 19 bis 32 Å beträgt.<sup>203</sup> In den Publikationen konnte jedoch nur ein Arm asymmetrisch verlängert werden.<sup>203</sup> Den Einfluss der asymmetrischen Verzweigung von allen drei Armen auf die Bindungsaffinität wurde bislang nicht untersucht. Dieser Einfluss ist jedoch besonders spannend zu untersuchen, da ASGPR ein heterotrimer mit drei unterschiedlichen CRD Distanzen ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden N-Acetylgalactosamin-funktionalisierte monodisperse, sequenzdefinierte, asymmetrisch verzweigte Glykooligomere synthetisiert, um ihr Bindungsverhalten zum Lektin ASGPR in einer Zellstudie zu untersuchen. Die Zellbindungsstudien werden im Rahmen einer Kooperation mit Dr. Nicole L. Synder am Davidson College, North Carolina, USA, durchgeführt. Vier dieser Glykooligomere tragen das kommerziell erhältliche Fluoresceinisothiocyanat Isomer 1 (FITC) als Fluoreszenzmarker (Kapitel 3.4.2.). Zusätzlich wurden zwei Präzisionsglykomakromoleküle, die mit Phorphyrin funktionalisiert sind, synthetisiert (Kapitel 3.4.3.). Als *Prof of concept* wird die Konjugation von Phorphyrin im Rahmen dieser Arbeit an die Glykooligomere etabliert, um potenziell neue Photosensibilisatoren für die Photodynamische Therapie (PDT) zu entwickeln.

### 3.4.1. Synthese Azid-funktionalisiertes N-Acetylgalactoseamin

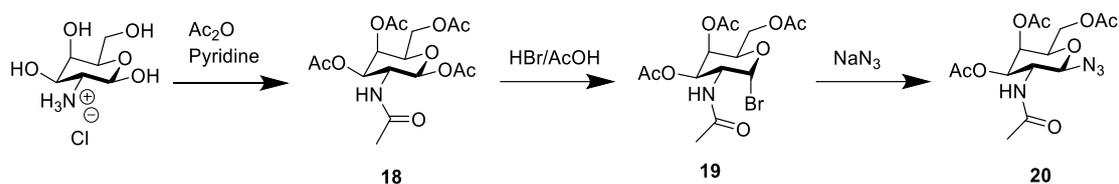
An das verzweigte Oligo(amidoamin)-Gerüst werden mittels CuAAC<sup>60, 72-73, 98-99, 101-102</sup> die jeweiligen Kohlenhydratliganden konjugiert. Eine Synthese für Azid-funktionalisiertes N-Acetylgalactoseamin mit Ethoxylinker ist bereits in der Literatur bekannt.<sup>206</sup> Als Produkt entsteht bei der Synthese ein  $\alpha$ -/ $\beta$ -Produktgemisch, das mittels Säulenchromatographie zu dem jeweiligen Anomer aufgereinigt werden kann. Insgesamt konnte eine Gesamtausbeute von nur 5% erreicht werden (Schema 10).



Schema 10: Synthese von Azid-funktionalisiertem N-Acetylgalactoseamin mit Ethoxylinker<sup>206</sup>

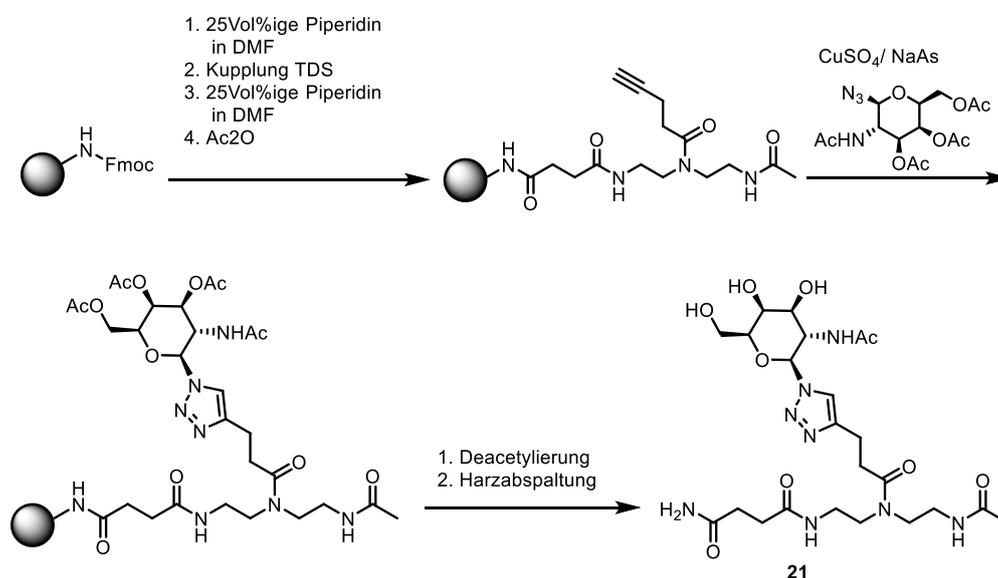
Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Synthese für Azid-funktionalisiertes N-Acetylgalactoseamin ohne Linker etabliert werden (Schema 11). Der Vorteil dieser Synthese liegt in der Selektivität zum  $\beta$ -Produkt, sodass eine Aufreinigung mittels Umkristallisation des Endproduktes ausreicht. Die Bromierung wird in saurem Milieu mit Bromwasserstoffsäure durchgeführt. Da Brom ein sterisch anspruchsvolles Nukleophil ist, findet die Bromierung in einer  $S_N2$  Reaktion statt. Somit liegt der Bromsubstituent ausschließlich in der axialen Ebene vor. Die Azidierung läuft auch über eine  $S_N2$

Reaktion ab und als Endprodukt entsteht ausschließlich die  $\beta$ -Konfiguration. Die Gesamtausbeute dieser Reaktion liegt bei 31%.



Schema 11: Synthese von Azid-funktionalisiertem N-Acetylgalactoseamin ohne Linker.

Produkt **20** konnte eindeutig mittels <sup>1</sup>H-NMR und <sup>13</sup>C-NMR Spektroskopie sowie HR-ESI identifiziert werden. Durch die Synthese einer Modelsubstanz **21** konnten die Reaktionsbedingungen für die CuAAC und die Entschützung der Acetylgruppen des Azid-funktionalisierten GalNAc **20** an der festen Phase untersucht werden (Schema 12).



Schema 12: Untersuchung der CuAAC Reaktionsbedingungen und Deacetylierungsreaktion von Azid-funktionalisierten GalNAc **20** an der Festphase mittels Modelsubstanz **21**.

Die Modelsubstanz **21** wurde synthetisiert, indem TDS an das Tentagel S RAM Harz gekuppelt wurde. Nach erfolgreicher Fmoc Entschützung und Acetylierung des N-Terminus wurde die CuAAC mit dem in dieser Arbeit etablierten Azid-funktionalisierten GalNAc **20** durchgeführt. Die CuAAC kann unter den etablierten Reaktionsbedingungen<sup>60, 72-73, 98-99, 142</sup> stattfinden, indem 2.5 eq des Azid-funktionalisierten GalNAc (**18**) zusammen mit 30 mol% Natriumascorbat (NaAs) und 30 mol% Kupfersulfat (CuSO<sub>4</sub>) dem Harz zugefügt werden. Die CuAAC fand mit einer Reaktionszeit von 18 h statt. Auch war es möglich, die Entschützung der Acetylschutzgruppen des Kohlenhydratliganden mit dem etablierten Protokoll<sup>98-99, 142</sup> durchzuführen. Für die Entschützung der Acetylschutzgruppen des Azid-funktionalisierten GalNAc **20** wurde eine Lösung von 0.2 M Natriummethanolat in Methanol Lösung für 30 min zum Harz hinzugegeben.

Die Modellschubstanz **21** konnte eindeutig mittels  $^1\text{H-NMR}$  Spektroskopie und HR-ESI identifiziert werden. Die Reinheit von **21** wurde mittels  $^1\text{H-NMR}$  Spektroskopie mit  $> 93\%$  bestimmt.

### 3.4.2. Synthese asymmetrisch verzweigter N-Acetylgalactoseamin-Präzisionsglykomakromoleküle mit FITC

Um gezielt den ASGPR Rezeptor anzusteuern, sollte in Zellstudien das Bindungsverhalten zwischen ASGPR und GalNAc-funktionalisierten Glykooligomeren untersucht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei GalNAc-funktionalisierte Glykooligomere und ein GluNAc-funktionalisiertes Glykooligomer, das als Negativkontrolle dient, synthetisiert. Da die Glykooligomere in Zellstudien untersucht werden sollen, müssen sie mit einem Farbstoff markiert sein (Abbildung 19). Die Kohlenhydratabstände wurden entsprechend den Ergebnissen der Langerin Bindungsstudien und der bekannten Literatur<sup>74, 203-205</sup> gewählt. Als asymmetrisches Trimer sind die CRDs entsprechend asymmetrisch angeordnet und haben eine geschätzte Distanz von 15-25 Å.<sup>203</sup> Aus mehreren Veröffentlichungen wurde deutlich, dass eine hohe Bindungsaffinität zwischen Ligand und ASGPR erzielt wurde, wenn der Abstand zwischen den Kohlenhydraten 19 bis 32 Å beträgt.<sup>203</sup> Kleinere trivalente Präzisionsglykomakromoleküle haben eine hohe Ligandendichte und profitieren vom *statistical Rebindung*. Zusätzlich ist der Entropieverlust durch Konformationsänderungen während des Bindungsprozesses bei kleineren Strukturen geringer. Diese Hypothesen sollen durch Zellstudien an ASGPR bestätigt werden.

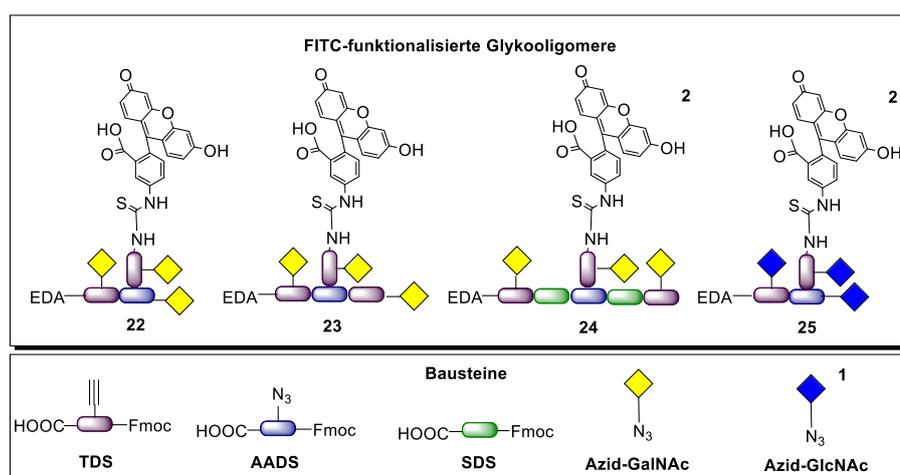


Abbildung 19: GalNAc- und GlcNAc-funktionalisierte Glykooligomere, die an FITC konjugiert sind.

$^1\text{Azid}$ -funktionalisiertes GluNAc wurde von den Herren Sebastian Bauer (Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf) und Fadi Shamout (Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.

<sup>2</sup>Die Durchführung der Festphasensynthese ohne Aufreinigung und Charakterisierung der Glykooligomere wurde von Frau Nicole L. Fielder, Davidson College, an der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf im Rahmen eines Forschungspraktikums durchgeführt.

Die verzweigten 3-armigen Glykooligomere (Abbildung 19) wurden mit AADS (**3**) (Kapitel 3.2.1) als Verzweigungsbaustein synthetisiert, sodass die Seitenkette mittels Staudinger-Ligation eingeführt worden ist. Um die monodispersen, sequenzdefinierten Glykooligomere in Zellstudien untersuchen zu können, wurden sie mit einem Farbstoff markiert. Hierzu wurde der kommerziell erwerbliche Farbstoff FITC gewählt, der häufig in vergleichbaren Zellstudien eingesetzt wird.<sup>207</sup> Es konnte auch schon in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass FITC an die monodispersen, sequenzdefinierten Glykooligomere konjugiert werden kann.<sup>102, 149</sup> Für eine Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehung zwischen der Ligandenstruktur und deren Wirkung auf das Bindungsverhalten zum Rezeptor ASGPR, wurden die drei Arme der trivalenten Glykooligomere, ausgehend von Oligomer **22**, asymmetrisch verlängert. Die trivalenten Glykooligomere unterscheiden sich auf diese Weise in ihren Ligandendichten bzw. in ihren jeweiligen Armlängen. Glykooligomer **22** ist das kleinste Glykooligomer in dieser Serie. Es besitzt in seiner Hauptkette die Sequenz TDS, AADS und Pentinsäure (Arm A und B). Als Seitenkette wurde TDS gewählt, um über die Alkin-Funktionalität Kohlenhydratliganden und an die Amin-Funktionalität FITC zu konjugieren. Für Konjugat **23** wurde gezielt Arm B asymmetrisch verlängert, indem die Pentinsäure der Hauptkette durch TDS ersetzt wurde. Es ist somit ein symmetrisch verzweigtes, monodisperses, sequenzdefiniertes Glykooligomer. Glykooligomer **24** besitzt in der Hauptkette SDS als Spacer Baustein und ist somit das größte Präzisionsglykomakromolekül in dieser Serie. ASGPR hat keine Bindungsaffinität zu GlcNAc, sodass die GlcNAc-Struktur **25** in der Zellstudie als Negativkontrolle verwendet werden kann. Die Glykooligomere wurden mittels präparativer PP-HPLC aufgereinigt und haben eine Reinheit von über 90%, gemessen als relative Reinheit mittels UV Signal. **22-25** konnten eindeutig mittels <sup>1</sup>H-NMR, HR-ESI und RP-HPLC identifiziert werden.

Die Analytik für das asymmetrisch verzweigte Glykooligomer **22** wird im Folgenden exemplarisch präsentiert (Abbildung 20).

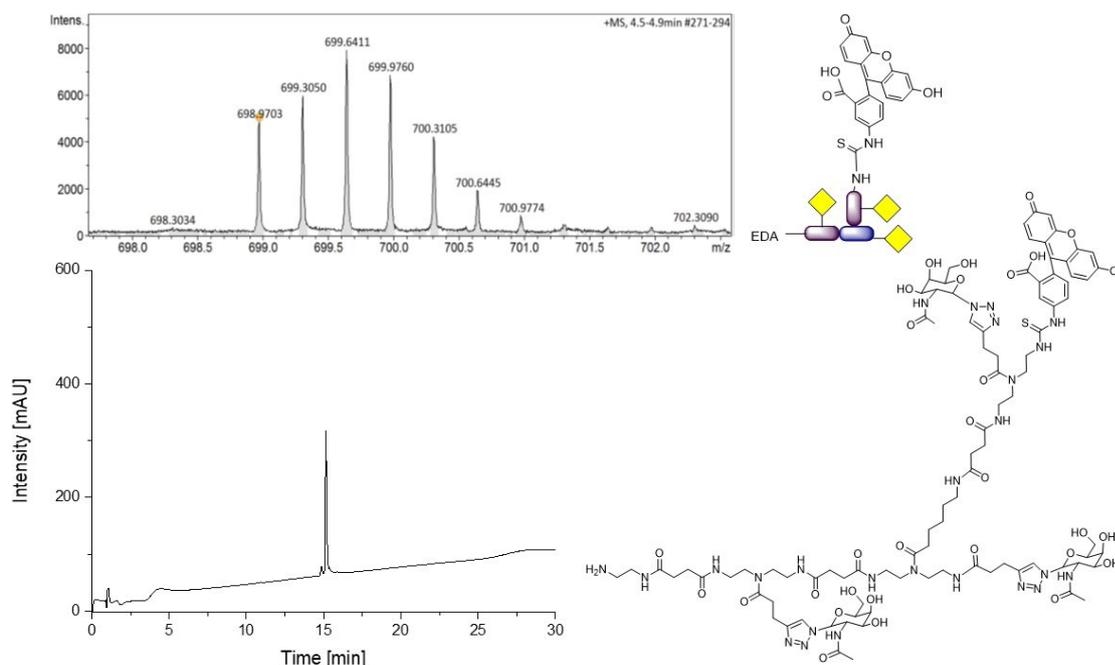


Abbildung 20: Präsentation der chematischen Struktur von Glykooligomer **22**, das HR-MS (ESI<sup>+</sup> Q TOF) von **22** [M+3H]<sup>3+</sup> und Chromatogramm von **22** (5%/95% zu 50%/50% AcN/H<sub>2</sub>O in 30 min bei 25°C mit C18 RP Säule).

Die Glykooligomere wurden im Rahmen einer Kooperation mit Dr. Nicole L. Synder am Davidson College in Zellstudien untersucht.

### 3.4.3. Synthese N-Acetylgalactoseamin-Präzisionsglykomakromoleküle mit Phorphyrin

Die Krankheit Krebs war im Jahr 2015 laut Statistisches Bundesamt die zweithäufigste Todesursache aller Krankheiten in Deutschland.<sup>208</sup> Lange Zeit stützte sich die Tumorthherapie auf die Bereiche Chirurgie, Radio- und Chemotherapie. Als neue Therapiemöglichkeit wurde die Photodynamische Therapie (PDT) in den letzten 20 Jahren etabliert. Die PDT rückt gerade in den Fachgebieten Augenheilkunde, Dermatologie, Zahnmedizin und Onkologie in den Vordergrund.<sup>209</sup> Während der PDT werden die Tumore mit einer photosensibilisierenden Substanz angereichert. Durch Aktivierung dieser photosensibilisierenden Substanz durch Belichtung mit geeigneter Wellenlänge werden photooxidative Reaktionen initiiert, die zu einer Gewebedestruktion oder Immunmodulation führen.<sup>209</sup> Ideale Sustanzen, die als Photosensibilisatoren eingesetzt werden können, sollten folgende Eigenschaften erfüllen: i) chemische Reinsubstanz, ii) hohe Quantenausbeuten von Singulett-Sauerstoff, iii) ausreichende Gewebepenetration, iiiii) selektive Anreicherung im erkrankten Gewebe und iiiiii) topische Applikationen.<sup>210</sup>

Neben den chemischen und photophysikalischen Eigenschaften ist die selektive Anreicherung im erkrankten Gewebe von besonderer Bedeutung, wodurch der Tumor gezielt behandelt werden kann und das äußere gesunde Gewebe so gut wie nicht angegriffen wird. Ziel der aktuellen Forschung ist die Synthese von Photosensibilisatoren, die ein selektives Bindungsverhalten zu Tumorzellen aufweisen. Die am häufigsten eingesetzten photosensibilisierenden Substanzen sind Phorphyrine, wie Hämatorporphyrin und seine Derivate.<sup>210-212</sup>

Um die monodispersen, sequenzdefinierten Glykooligomere als potenzielle Photosensibilisatoren, die spezifische an Zellen binden, für die PDT zu nutzen, wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals erfolgreich ein Phorphyrin-Derivat an monodisperse, sequenzdefinierte Glykooligomere konjugiert. Die Phorphyrin-Konjugation wurde in Kooperation mit Dr. Nicole L. Snyder am Davidson College in North Carolina und an der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf durchgeführt. Die Konjugation fand mittels CuAAC statt, da das Phorphyrin-Derivat eine Alkin-Funktionalität trägt. Es wurde sowohl die Konjugation in Lösung (Kapitel 3.4.3.1.) als auch an der Festphase (Kapitel 3.4.3.2) getestet.

### 3.4.3.1. Phorphyrin-Konjugation in Lösung

Für die Phorphyrin-Konjugation in Lösung wurden drei verschiedene GalNAc-funktionalisierte monodisperse, sequenzdefinierte Glykooligomere, die sich in ihrer Valenz unterscheiden, mittels Festphasensynthese synthetisiert (Abbildung 21). Zwischen den Edukten der Phorphyrin-Konjugation gibt es einen großen Polaritätsunterschied. Die Präzisionsglykomakromoleküle sind durch ihre konjugierten Kohlenhydratliganden eher polarer Natur. Im Gegensatz dazu ist das Phorphyrin-Derivat durch die aromatische Struktur eher unpolar. Dieser Polaritätsunterschied kann während der CuAAC zu langsamen Reaktionsgeschwindigkeiten führen. Aus diesem Grund wurde auch die Konjugation in Lösung getestet, da in Lösung die Möglichkeit besteht, die Reaktionsgeschwindigkeit mittels höherer Temperatur zu beschleunigen.

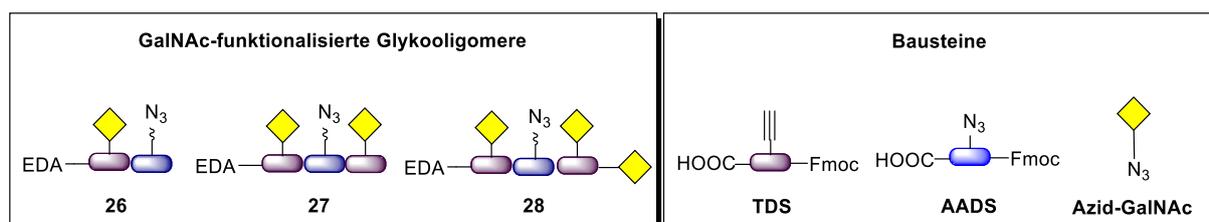


Abbildung 21: GalNAc-funktionalisierte monodisperse, sequenzdefinierte Glykooligomere, die als Präkursor für eine Phorphyrin-Derivat Konjugation dienen.

Die Glykooligomere wurden am EDA-Tentagel Harz<sup>73</sup> synthetisiert, da die Möglichkeit einer späteren Konjugation an Lipide gegeben sein sollte. **26** ist monovalent und wurde synthetisiert, indem TDS, gefolgt von Fmoc-L-Lys(Dde)-OH, ans Harz gekuppelt wurde. An TDS konnte das im Rahmen dieser Arbeit synthetisierte GalNAc-Azid **20** mittels CuAAC konjugiert werden. Die Aminosäure wurde an ihrem N-Terminus acetyliert und die Dde-Schutzgruppe wurde entschützt, um einen Azid-funktionalisierten Hexansäure Linker einzuführen. Über diesen Linker sollte in Lösung ein Alkin-funktionalisiertes Phorphyrin-Derivat mittels CuAAC konjugiert werden. Ausgehend vom Glykooligomer **26** wurde gezielt die Valenz erhöht. Beim Glykooligomer **27** wurde der N-Terminus der Aminosäure nicht acetyliert, sondern mit TDS funktionalisiert. Über die zwei TDS in der Sequenz konnten mittels CuAAC zwei GalNAc-Azide konjugiert werden, sodass **27** divalent ist. **28** ist ein trivalentes Glykooligomer, bei dem der N-Terminus der Hauptkette nicht acetyliert vorliegt, sondern mit kommerziell erwerblicher Pentinsäure funktionalisiert ist. Über die drei Alkin-Funktionalitäten konnte ein trivalentes Präzisionsglykomakromolekül **28** synthetisiert werden. Die Glykooligomere **26** - **28** konnten eindeutig durch <sup>1</sup>H-NMR und HR-ESI identifiziert werden. Die Reinheit liegt bei über 91%, bestimmt mittels <sup>1</sup>H-NMR Spektroskopie.

Die drei Glykooligomere **26-28** wurden für die Phorphyrin-Derivat Konjugation in Lösung ausgewählt. Es wurden unterschiedliche Reaktionsbedingungen für eine effiziente Konjugation getestet. Alle Testreaktionen fanden bei 60°C für 6 Tage statt. Es wurde getestet, ob ein Edukt reaktiver als das andere ist. Dazu wurde entweder das Phorphyrin-Derivat oder das jeweilige Präzisionsglykomakromolekül im Überschuss mit 1,5 eq in Bezug zum anderen Edukt eingesetzt. Es wurden zwei verschiedene Katalysatoren getestet. Einerseits wurde eine Mischung aus Kupferiodid (CuI) mit Natriumascorbat (NaAs) getestet, andererseits auch eine Mischung aus mit Kupferulfat (CuSO<sub>4</sub>) und NaAs. Für die Testreaktionen wurden 30 mol% des jeweiligen Katalysators und 30 mol% von NaAs, bezogen auf 1 eq Edukt eingesetzt. Da beide Edukte eine unterschiedliche Polarität aufweisen, wurde neben 100 Vol% DMF auch eine Mischung aus 80 Vol% DMF zu 20 Vol% H<sub>2</sub>O als Lösemittel getestet, um die löslichkeitsvermittelnden Eigenschaften zu erhöhen. Alle untersuchten Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Übersicht der Reaktionsbedingungen der Phorphyrin-Konjugation in Lösung zwischen den GalNac-funktionalisierten Präzisionsglykomakromolekülen **26-28** und einem Phorphyrin-Derivat.

Überschuß des Edukts (1,5eq)	Katalysator [30mol%]	Lösemittel [Vol%]
<b>Phorphyrine<sup>1</sup></b>	CuI/NaAs	100% DMF
<b>Phorphyrine<sup>1</sup></b>	CuI/NaAs	80% DMF, 20% H <sub>2</sub> O
<b>Phorphyrine<sup>1</sup></b>	CuSO <sub>4</sub> /NaAs	100% DMF
<b>Phorphyrine<sup>1</sup></b>	CuSO <sub>4</sub> /NaAs	80% DMF, 20% H <sub>2</sub> O
<b>Struktur 26, 27, 28</b>	CuI/NaAs	100% DMF
<b>Struktur 26, 27, 28</b>	CuI/NaAs	80% DMF, 20% H <sub>2</sub> O
<b>Struktur 26, 27, 28</b>	CuSO <sub>4</sub> /NaAs	100% DMF
<b>Struktur 26, 27, 28</b>	CuSO <sub>4</sub> /NaAs	80% DMF, 20% H <sub>2</sub> O

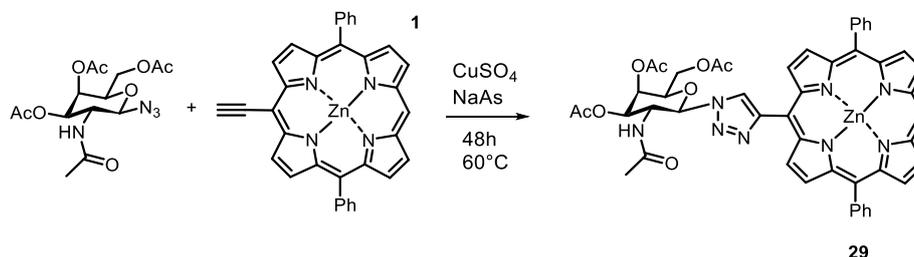
<sup>1</sup>Das Phorphyrin-Derivat wurde von Dr. Nicole L. Synder zur Verfügung gestellt. Die Reaktionen wurden am Davidson College durchgeführt.

Der Reaktionsverlauf wurde mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt. Auch nach 6 Tagen bei einer Temperatur von 60°C führte keine der untersuchten Reaktionsbedingungen zu einem vollständigen Reaktionsumsatz. Anhand der Dünnschichtchromatographie war kein Unterschied zwischen den einzelnen Glykooligomeren **26-28** sichtbar, sodass es keinen Hinweis auf einen sterischen Einfluss der Edukte **26-28** gibt. Da am Davidson College keine HPLC zur Verfügung stand, konnte der Produktumsatz nicht quantitativ ausgewertet werden.

Eine Aufreinigung dieser Reaktionen durch die Trennmethode Extraktion war nicht möglich, da die jeweiligen Produkte sowohl in der wässrigen als auch in der organischen Phase vorlagen. Eine säulenchromatographische Aufreinigung war aufgrund der geringen Produktmenge ebenfalls nicht möglich. Wenn dieser Reaktionsansatz in Lösung nochmals untersucht wird, müssten größere Eduktmengen verwendet werden, um eine säulenchromatographische Aufreinigung zu ermöglichen. Auch eine Aufreinigung mittels präparativer RP-HPLC war nicht möglich, da am Davidson College keine präparative RP-HPLC zur Verfügung stand. Jedoch müssten die jeweiligen Produkte vorab von Kupfer grob befreit werden, um die Säule bzw. das ganze präparative RP-HPLC System nicht zu stark zu verunreinigen. Diese grobe Aufreinigung hat, wie bereits diskutiert, mittels Extraktion nicht funktioniert. Zusammenfassend hat sich herausgestellt, dass dieser Synthesansatz nicht effizient ist, da einerseits keine hohen Ausbeuten generiert werden konnten und andererseits auch die Aufreinigung nicht praktikabel ist.

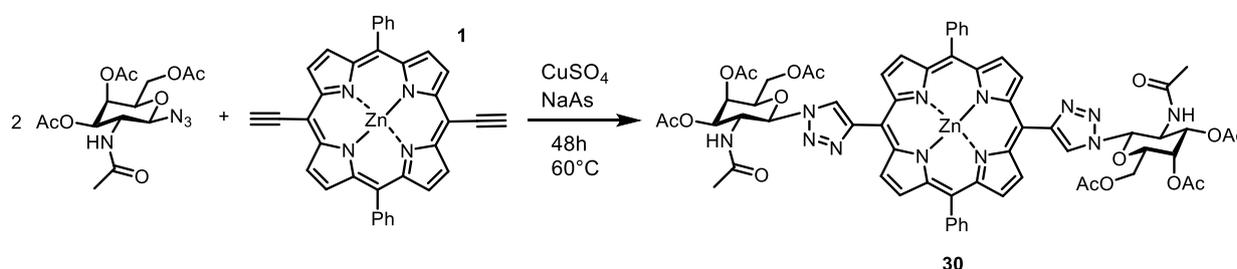
Um den Einfluss des Polaritätsunterschieds zwischen den Edukten zu untersuchen und auch eine Aufreinigung des Produkts zu ermöglichen, wurde das Azid-funktionalisierte GalNAC **20** an zwei verschiedene Phorphyrin-Derivate konjugiert (Schema 13 und Schema 14). Da das Azid-

funktionalisierte GalNAc **20** geschützte Hydroxyl-Gruppen hat, ist seine Polarität geringer als die der Glykooligomere **26-28**. Die verwendeten Phorphyrin-Derivate unterscheiden sich in ihrer jeweiligen Anzahl an Alkingruppen in Mono- und Dialkin-funktionalisiertes Phorphyrin-Derivat.



Schema 13: Konjugation von Azid-funktionalisiertem GalNAc **15** an monoalkin-funktionalisiertes Phorphyrin-Derivat.

<sup>1</sup>Das Phorphyrin-Derivat wurde von Dr. Nicole L. Synder (Davidson College) zur Verfügung gestellt. Die Reaktion wurde am Davidson College durchgeführt.



Schema 14: Konjugation von Azid-funktionalisiertem GalNAc **15** an dialkin-funktionalisiertes Phorphyrin-Derivat.

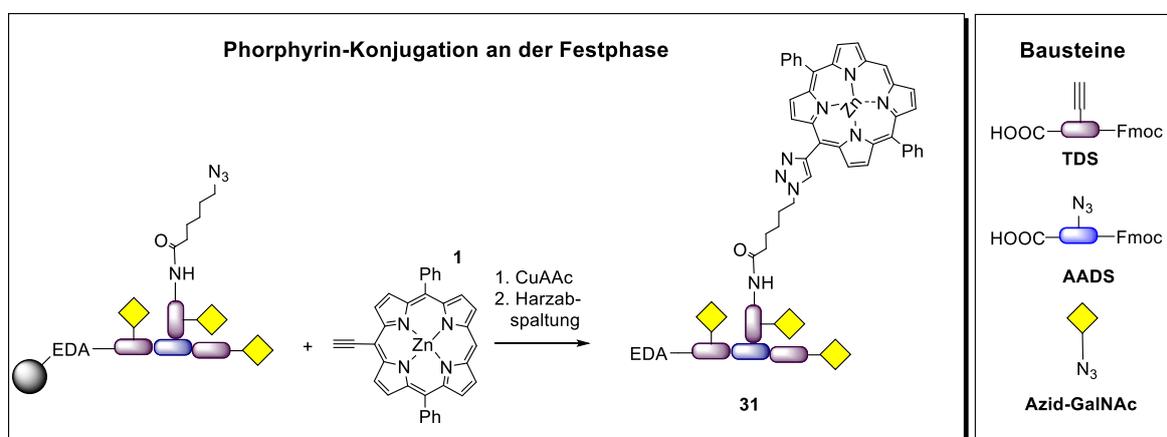
<sup>1</sup>Das Phorphyrin-Derivat wurde von Dr. Nicole L. Synder (Davidson College) zur Verfügung gestellt. Die Reaktion wurde am Davidson College durchgeführt.

Die Konjugation zwischen geschützten Kohlenhydraten wie z.B. Mannose oder Glukose und den Phorphyrin-Derivaten hat Morgen Burch in ihrer Bachelorarbeit am Davidson College näher untersucht (*unpublished work*). Basierend auf ihren Ergebnissen wurde die CuAAC mit 30 mol% NaAs und 30 mol%  $\text{CuSO}_4$  in DMF für 48 h bei  $60^\circ\text{C}$  durchgeführt. Die Reaktion wurde mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt. Auch nach 48 h Reaktionszeit waren die beiden Edukte und das jeweilige Produkt in der Reaktionslösung vorhanden. Bei der Verwendung von geschützten Kohlenhydraten in Lösung liegt der Vorteil darin, dass das Rohprodukt durch Ausschütteln leicht von Kupferresten befreit werden kann. Die jeweiligen Produkte wurden mittels Säulenchromatographie aufgereinigt. Beide Produkte wurden anhand von  $^1\text{H-NMR}$  Spektroskopie analysiert.

Da es keinen vollständigen Reaktionsumsatz gab, sollten die Reaktionsbedingungen optimiert werden, z.B. durch die Verwendung eines anderen Katalysators. Zusätzlich könnte auch die Kinetik der Reaktion in weiteren Studien untersucht werden. Es sollten die Edukte **29** und **30** nochmals synthetisiert werden, um die analytischen Daten durch HR-ESIs und  $^{13}\text{C-NMR}$  Spektroskopie zu vervollständigen.

## 3.4.3.2. Phorphyrin-Konjugation an der Festphase

Da die Phorphyrin-Konjugation in Lösung keinen 100% Umsatz ergab und die Aufreinigung sehr aufwendig ist, wurde die Phorphyrin-Konjugation auch an der Festphase getestet. Die Festphasensynthese hat den Vorteil, dass lösliche, überschüssige Edukte und Nebenprodukte durch Filtration einfach entfernt werden können. Durch diese einfache Methode der Aufreinigung können die Edukte mit großem Überschuss eingesetzt werden, wodurch es Vorteile in Form von verkürzten Reaktionszeiten und erhöhten Ausbeuten gibt. Die Phorphyrin-Konjugation an der Festphase wurde mit einem verzweigten Glykooligomer durchgeführt (Schema 15).



Schema 15: Phorphyrin-Derivat Konjugation an der Festphase mit einem verzweigten GalNAc-funktionalisiertem Glykooligomer **31**.

<sup>1</sup>Das Phorphyrin-Derivat wurde von Dr. Nicole L. Synder (Davidson College) zur Verfügung gestellt.

Das Glykooligomer **31** wurde mit dem etablierten Protokoll und dem Verzweigungsbaustein AADS (**3**) (Kapitel 3.2.3.) synthetisiert. Es ist ein mit TDS symmetrisch verzweigtes Glykooligomer. Als Kohlenhydratligand wurde das im Rahmen dieser Arbeit etablierte Azid-funktionalisierte GalNAc **20** konjugiert. Der N-Terminus der Hauptkette wurde acetyliert. Das terminale freie Amin der Seitenkette wurde mit 6-Azido-Hexansäure als Linker funktionalisiert, das die Konjugation des Phorphyrin-Derivats mittels CuAAC erlaubt. Die CuAAC wurde zweimal nach dem etablierten Protokoll<sup>60, 72-73, 98-99, 101-102</sup> durchgeführt. Es wurden 30 mol% NaAs, 30 mol% CuSO<sub>4</sub> und 1.1 eq Phorphyrin-Derivat basierend auf einem 0,1 mmol Ansatz eingesetzt. Das Lösemittel bestand aus 66% DMF und 34% H<sub>2</sub>O und die Reaktionszeit betrug 18 h.

Der 61%ige Umsatz wurde mittels RP-HPLC durch die Integration des UV Signals bestimmt. Es wurde versucht, das Produkt mittels präparativer RP-HPLC von Abbruchsequenzen aufzureinigen. Da das Konjugat durch das Phorphyrin eine sehr große Absorption hat, war das Produktsignal sehr breit und

konnte nicht gezielt fraktioniert werden. Durch die geringe Ausbeute war eine Charakterisierung nur mittels HPLC und ESI möglich.

Um die Reaktionsbedingung für die Phorphyrin-Konjugation an der Festphase besser zu untersuchen und auch optimieren zu können, wurde als *proof of concept* Modelsubstanz **32** synthetisiert. Diese Modelsubstanz besteht aus TDS mit konjugiertem GalNAc, das am N-Terminus mit 6-Azido-Hexansäure als Linker funktionalisiert worden ist. An den Azid-Linker kann via CuAAC das Phorphyrin-Derivat konjugiert werden. Die Reaktion wurde basierend auf dem etablierten CuAAC Protokoll<sup>[60, 72-73, 98-99, 101-102]</sup> in 18 h durchgeführt. Das Lösemittel besteht aus 66% DMF und 34% H<sub>2</sub>O und als Katalysatoren wurden 30 mol% NaAs und 30 mol% CuSO<sub>4</sub>, basierend auf einem 0,1 mmol Ansatz gewählt. Das Phorphyrin-Derivat wurde mit 1.1 eq eingesetzt (Abbildung 22).

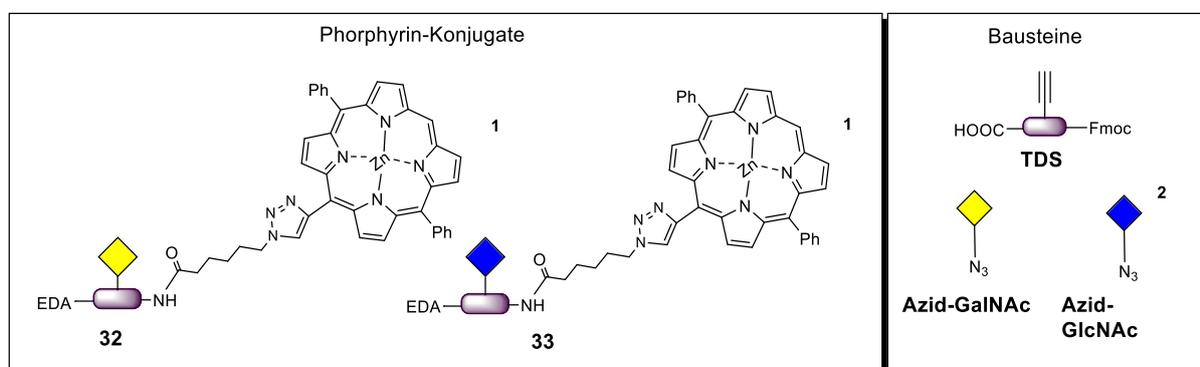


Abbildung 22: Phorphyrin-Derivat Konjugation an der Festphase mit einer GalNAc-funktionalisierten Modelsubstanz **32** und **33**.

<sup>1</sup>Das Phorphyrin-Derivat wurde von Dr. Nicole L. Synder (Davidson College) zur Verfügung gestellt.

<sup>2</sup>Azid-funktionalisiertes GluNAc wurde von Sebastian Bauer (Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf) und Fadi Shamout (Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.

Auch unter diesen Reaktionsbedingungen war es nicht möglich, eine 100%ige Konjugation zu erreichen. Der Reaktionsverlauf der Konjugation wurde mittels RP-HPLC durch die Integration des UV Signals untersucht. Die CuAAC wurde insgesamt drei Male durchgeführt. Nach der ersten CuAAC wurden 40%, nach der zweiten CuAAC 66% und nach der dritten CuAAC 84% Konjugationsumsatz erreicht. Diese Umsätze wurden nochmals mit einer GluNAc-funktionalisierten Modelsubstanz **32** überprüft und es konnten die gleichen Konjugationsumsätze ermittelt werden. Während der Durchführung der *microcleavages* wurde ersichtlich, dass die Produkte **32** und **33** zum Teil in Diethylether löslich sind. Deshalb wurde die Makro-Harzabspaltung mit Fällung des Produkts nicht wie im etablierten Protokoll<sup>[60, 72-73, 98-99, 101-102]</sup> in kaltem Diethylether, sondern in Hexan aufgereinigt.

Die Phorphyrin-Glykooligomere **32** und **33** wurden mittels präparativer HPLC aufgereinigt, indem sie sehr verdünnt und in kleinen Mengen auf die Säule gebracht worden sind. Obwohl die beiden Konjugate **32** und **33** eine hohe Absorption aufwiesen, war es möglich, die beiden Phorphyrin-

Glykooligomere **32** und **33** fraktioniert zu sammeln. Die Konjugate **32** und **33** konnten eindeutig durch  $^1\text{H-NMR}$  Spektroskopie, HR-ESI und RP-HPLC identifiziert werden. **32** und **33** haben eine Reinheit von 91%, die mittels RP-HPLC durch die Integration des UV Signals bestimmt worden ist.

Trotz der erfolgreichen Synthese der Produkte **32** und **33** sollte die Phorphyrin-Konjugation an der Festphase weiter optimiert werden. Da das Phorphyrin-Derivat von einem Kooperationspartner zur Verfügung gestellt worden ist, wurde es nur mit 1,1 eq im Überschuss für die Konjugation eingesetzt. Es könnte in weiteren Optimierungsreaktionen versucht werden, die Äquivalente des Phosphyrin-Derivats zu erhöhen und nicht umgesetztes Phorphyrin nach der CuAAC wieder zurück zu gewinnen.

### 3.5. Lineare N-Acetylneuraminsäure-Präzisionsglykomakromoleküle

Der Grippevirus wurde für die menschliche Gesundheit seit dem 20. Jahrhundert zu einer grundsätzlichen Belastung, insbesondere auch deshalb, weil der Grippevirus äußerst wandlungsfähig ist. Neben der in fast jedem Jahr wiederkehrenden humanen saisonalen Grippewelle gibt es weitere Erkrankungsformen, z.B. in Form von Vogel-, Schweine- oder Pferdegrippe.<sup>213</sup> Schätzungen des Robert-Koch-Institutes besagen, dass sich 3.4 Millionen Menschen in Deutschland während der Grippesaison 2016/2017 mit dem Virus infiziert hatten.<sup>214</sup> Deshalb ist die Forschung von geeigneten Grippeimpfstoffen immer noch ein aktuelles Thema.

Hämagglutinin (HA) sitzt auf der Oberfläche des Influenza A Virus.<sup>213</sup> Die Infektion entsteht durch die Bindung von HA an die Wirtszelle. HA ist ein Heterotrimer und in hoher Konzentration mit 600-1200 Molekülen auf dem Virus vorhanden.<sup>215</sup> Die CRDs von HA haben eine Distanz von 40-50 Å zueinander und zum zentralen Punkt eine Distanz von 30-35 Å.<sup>151</sup> HA bindet zu terminaler N-Acetylneuraminsäure<sup>74, 215</sup> (NeuNAc).

Paulson *et al.*<sup>216</sup> haben den Einfluss der Valenz in ihrem Bindungsverhalten zu HA in einem *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) untersucht. Sie konnten zeigen, dass trivalente NeuNAc-funktionalisierte Glykane eine höhere Bindungsaffinität im Vergleich zu ihren mono- und divalenten Strukturderivaten haben. Modellierungen zeigten außerdem, dass die Differenz zwischen dem terminalen NeuNAc zum zentralen Punkt des Liganden zwischen 17.1 Å und 52.6 Å liegen sollte, um eine simultane Bindung an HA zu erreichen.

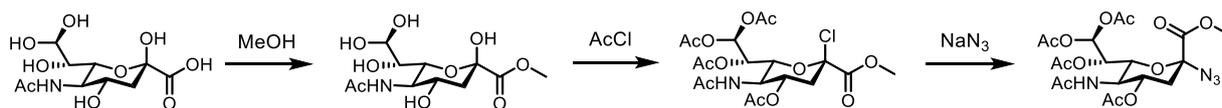
Das große Potenzial von symmetrisch verzweigten Glykoclustern wurde schon in Kapitel 1.2.2. diskutiert. Meyer *et al.*<sup>74</sup> konnten mittels Festphasenchemie (Kapitel 1.4.) NeuNAc-funktionalisierte

Glykopeptid-Arme synthetisieren, die in Lösung an ein 1,3,5-funktionalisiertes Benzolderivat konjugiert worden sind. Mittels SPR-Spektroskopie konnte eine 4000-fach stärkere Bindungsaffinität zwischen HA und dem trivalent verzweigten Glykocluster im Vergleich zu monovalenter Sialinsäure gemessen werden.

Die aktuelle Forschung ist daran interessiert, spezifische Binder für HA sowohl für Diagnosezwecke als auch für Impfstoffe gegen Grippeviren zu finden.<sup>74, 215</sup> Im Rahmen dieser Arbeit wurden NeuNAc-funktionalisierte strukturdefinierte monodisperse Glykooligomere synthetisiert (Kapitel 3.5.1.). Es wurde außerdem versucht, ein ELISA Bindungsexperiment (Kapitel 3.5.2.) zu etablieren, um die Glykooligomere in ihrem Bindungsverhalten zu HA zu untersuchen.

### 3.5.1. Synthese linearer N-Acetylneuraminsäure-Präzisionsglykomakromoleküle

Die Synthese von Azid-funktionalisierter NeuNAc ist in der Literatur bekannt.<sup>217</sup> Die Säurefunktionalität der Sialinsäure wird im ersten Syntheseschritt als Methylester geschützt. Die Hydroxylgruppe am anomeren Zentrum wird mittels Acetylchlorid chloriert. Der Chlorsubstituent liegt wegen seiner Größe ausschließlich in der axialen Ebene vor. Gleichzeitig werden auch in diesem Syntheseschritt die Hydroxylgruppen geschützt. Die Azidierung läuft über eine  $S_N2$  Reaktion ab, sodass als Endprodukt ausschließlich die  $\beta$ -Konfiguration entsteht (Schema 16).



Schema 16: Synthese von Azid-funktionalisierter Sialinsäure, die die Azid-Funktionalisierung am anomeren Kohlenstoffatom trägt<sup>217</sup>

Generell sind Chlorsubstituenten gute Abgangsgruppen, sodass während der Synthese ein Teil der Chlorsubstituenten hydrolysiert wird. Es entstehen ca. 15% Hydrolyseprodukt, ermittelt anhand Integration des UV Signals (Abbildung 23). Dieses Hydrolyseprodukt kann unter den Reaktionsbedingungen nicht azidiert werden. Da das Hydrolyseprodukt während der CuAAC an der Festphase nur als unreaktives Nebenprodukt vorliegt, wurde das Produktgemisch nicht weiter aufgereinigt.

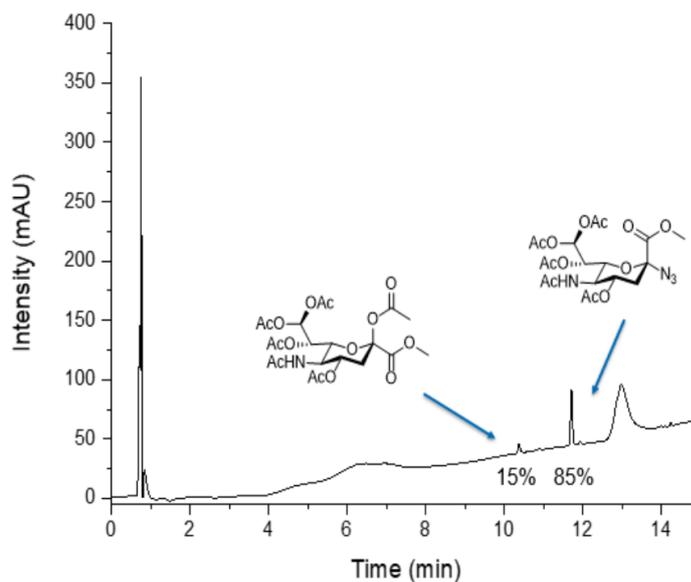


Abbildung 23: Chromatogramm (RP-HPLC 5%/95 zu 95%/5% ACN/H<sub>2</sub>O mit 0,1% Ameisensäure in 15min bei 25°C) des Azid-funktionalisierten NeuNAc mit 15% Hydrolyseprodukt.

Um Bindungsexperimente an HA zu etablieren (Kapitel 3.5.2.), wurden NeuNAc-funktionalisierte strukturdefinierte monodisperse Glykooligomere synthetisiert (Abbildung 24).

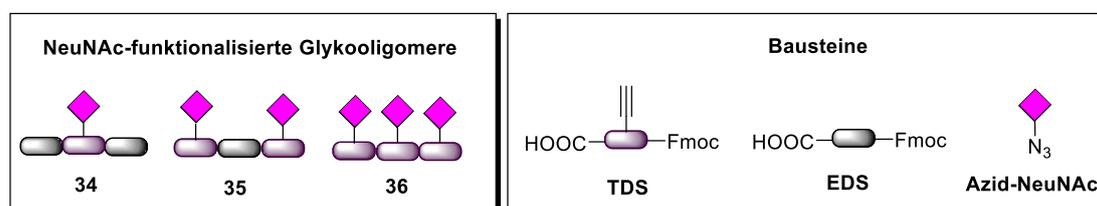


Abbildung 24: NeuNAc-funktionalisierte strukturdefinierte monodisperse Glykooligomere **34** -**36**.

Die Glykooligomere unterscheiden sich in ihrer Valenz zwischen mono-, di- und trivalenten bei ungefähr gleichem Molekulargewicht. **34-36** wurden mit den Bausteinen TDS, EDS und Azid-funktionalisierter NeuNAc synthetisiert. Es wurde das Tentagel S RAM Harz für die Synthese verwendet, da dieses kommerziell erwerblich ist und eine spätere Funktionalisierung der Glykooligomere ausgeschlossen werden konnte. Alle drei Glykooligomere wurden mit geschützten Kohlenhydraten mittels präparativer HPLC aufgereinigt. Die Aufreinigung mit ungeschützten Kohlenhydraten war mit einer RP-HPLC Säule nicht möglich, da die Glykooligomere ausschließlich im Injektionspeak detektiert werden. Die Reinheit von 99% wurde nach der präparativen HPLC Aufreinigung, mittels RP-HPLC durch die Integration des UV Signals, bestimmt. Die Glykooligomere wurden mittels Lithiumhydroxid<sup>218</sup> in Lösung entschützt (Experimentalteil 5). Die Glykooligomere **34** – **36** konnten eindeutig durch <sup>1</sup>H-NMR und ESI identifiziert werden.

### 3.5.2. ELISA-Bindungsstudien mit Hämagglutinin

Das Konzept von ELISA-Bindungsstudien wurde von Engvall und Perlmann im Jahr 1971 eingeführt.<sup>219</sup> Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, die Bindungsaffinität von NeuNAc-funktionalisierten strukturdefinierten monodispersen Glykooligomeren **34-36** in ELISA-Bindungsexperimenten zu untersuchen. Das Prinzip des ELISA-Tests wird in Abbildung 25 dargestellt. Mikrotiterplatten werden mit HA funktionalisiert. Die NeuNAc-funktionalisierten Liganden könnten im zweiten Schritt in unterschiedlichen Konzentrationen auf die HA-funktionalisierten Platten gegeben werden. Die Liganden können an HA binden. Ungebundene Liganden werden durch Waschvorgänge entfernt. An die freien Bindungsstellen von HA, die nicht durch die NeuNAc-funktionalisierten Liganden besetzt sind, kann der primäre Antikörper binden. Durch Waschvorgänge können überschüssige primäre Antikörper entfernt werden. Der sekundäre Antikörper bindet ausschließlich am primären Antikörper und die Bindung kann kolorimetrisch detektiert werden (Abbildung 25).

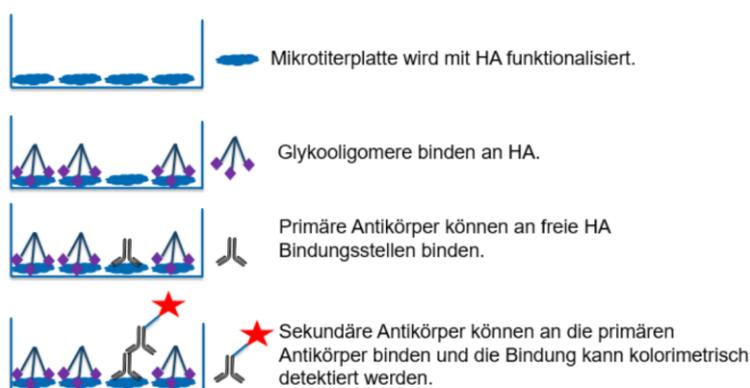


Abbildung 25: Prinzip des ELISA-Bindungstests mit HA als Lektin und NeuNAc-funktionalisierten Liganden.

Der ELISA Test wurde mit einem kommerziell erwerblichen Kid (Experimentalteil 5.) durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde Puffer verwendet. Die Positivkontrolle wurde gemäß Protokoll des Herstellers (Experimentalteil 5.) durchgeführt, ohne die Inkubation mit den NeuNAc-funktionalisierten Liganden durchzuführen, sodass ein 100%iges Bindungssignal detektiert werden konnte. Die Wechselwirkung der Glykooligomere **34-36** und kommerziell erwerbliche  $\alpha$ -Methyl-NeuNAc wurden in einem Konzentrationsbereich von 1 mM bis 0.1  $\mu$ mol mit dem Kid getestet. Durch die Auftragung der Konzentration gegen die Absorbanz können  $IC_{50}$  Werte bestimmt werden. Abbildung 26 stellt die ELISA Bindungsstudienergebnisse dar.

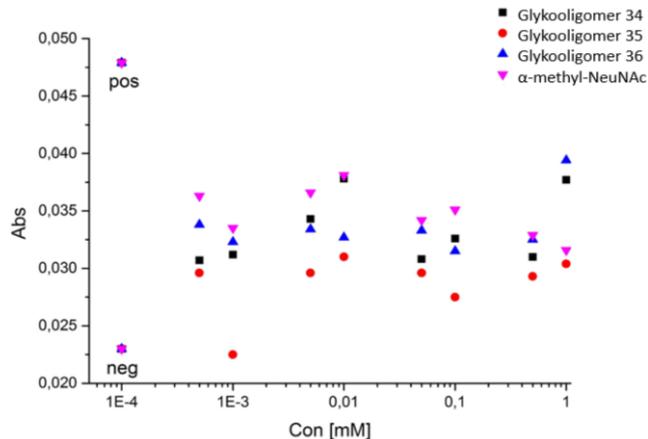


Abbildung 26: Auftragung der Konzentration an Glykooligomeren **34-36** und  $\alpha$ -methyl-NeuNAc gegen die gemessene Absorption der ELISA Bindungsstudien mit HA

Bei der Auswertung dieser Bindungsergebnisse des kommerziell erwerblichen Kids, konnte sowohl die Positiv- als auch die Negativkontrolle detektiert werden, sodass davon ausgegangen wird, dass das Kid richtig gelagert und verwendet worden ist. Die einzelnen monodispersen Glykooligomere **34-36** zeigen eine Bindung zu HA. Jedoch konnte innerhalb der Konzentrationsreihe kein Trend im Bindungsverhalten zu HA bestimmt werden. Auch gab es keinen Unterschied im Bindungsverhalten von Glykooligomere **34-36** in Abhängigkeit der Valenz. Die Messergebnisse von  $\alpha$ -Methyl-NeuNAc zeigen auch keine Konzentrationsabhängigkeit. Sowohl Pipettierfehler als auch Fehler in den Konzentrationsreihen können ausgeschlossen werden, da der Test 2 Male zusammen mit Frau Sophia Boden (Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf), Frau Tanja Freichel (Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf) und Frau Dr. Nicole L. Snyder (Davidson College) durchgeführt worden ist, indem jede der genannten Personen einzeln ein Glykooligomer verdünnt und auch pipettiert hat. Die Haltbarkeit der Glykooligomere **34-36** wurde nachträglich mittels LCMS bestätigt. Weitere Studien müssen durchgeführt werden, um diese Ergebnisse zu validieren.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte kein ELISA Experiment etabliert werden, wodurch die Bindung zwischen NeuNAc-funktionalisierten Liganden und HA bestimmt werden kann. Eine literatur bekannte Messmethode zur Untersuchung der NeuNAc-funktionalisierten Liganden wäre die SPR.<sup>74</sup> Diese Alternative ist jedoch in ihrer Durchführung deutlich aufwendiger und wurde daher im Rahmen dieser Arbeit nicht verfolgt.

## 4. Zusammenfassung und Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer Synthesestrategie für monodisperse, sequenzkontrollierte, asymmetrisch verzweigte Glykomakromoleküle an der Festphase. Die erhaltenen Glykomakromoleküle wurden zur Untersuchung ihrer Struktur-Eigenschaftsbeziehung im Hinblick auf ihre Bindung an verschiedene Lektine verwendet.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden zu diesem Zweck zwei verschiedene Synthesestrategien für die Konjugation einer Seitenkette und somit der Einführung einer Verzweigung mittels Festphasensynthese an Oligoamid Gerüsten entwickelt (Abbildung 27). Der Aufbau linearer Ketten erfolgte gemäß der etablierten Fmoc-Peptidchemie durch die schrittweise Konjugation von Bausteinen mit einer freien Carboxyl- und einer temporär Fmoc-geschützten Aminogruppe. Zur Einbringung einer Verzweigung musste am Gerüst eine weitere funktionelle Gruppe angebracht werden, die eine Seitenkettenkonjugation ermöglicht. Die erste Synthesestrategie stützte sich dabei auf die Einführung einer primären Aminogruppe in der Seitenkette, die eine selektiv an der Festphase abspaltbarer Schutzgruppe trägt.

Die Reaktionsbedingungen der Abspaltung mussten zudem orthogonal zur Fmoc-Entschützung gewählt werden, so dass die Einführung der Seitenkette unabhängig von der Verlängerung der anderen Teile des Gerüsts erfolgen konnte. Die zweite Synthesestrategie stützt sich auf die Konjugation mittels Staudinger-Ligation und bringt zu diesem Zweck durch einen im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Baustein eine Azidgruppe an das Gerüst ein.

Als erste orthogonale Schutzgruppe wurde Dde gewählt und mittels einer kommerziell erwerblichen Aminosäure Fmoc-L-Lys(Dde)-OH am Gerüst angebracht (Kapitel 3.2.2). Nach Aufbau des Hauptgerüsts konnte Dde mit einer 2 Vol%igen Hydrazin in DMF Lösung vollständig abgespalten werden und an das generierte freie Amin mittels Peptidkupplung eine Seitenkette eingeführt werden. Als zweite orthogonale Schutzgruppe wurde Alloc unter der Verwendung des bereits etablierten ADS Bausteins gewählt (Kapitel 3.2.1). Die Abspaltung von Alloc wurde unter Palladium katalytischen Bedingungen selektiv durchgeführt. Das generierte freie Amin bot nun erneut die Möglichkeit die Seitenkette aufzubauen. Die zweite Synthesestrategie basierte auf einem im Rahmen dieser Arbeit neu entwickelten Azid-funktionalisierten Baustein (Kapitel 3.2.3). Dieser Baustein trägt im Bausteingerüst eine Carboxylgruppe und auch ein Fmoc geschütztes Amin für die Verwendung an der festen Phase. Orthogonal zum Bausteingerüst wurde ein Azidohexyl-Linker eingeführt. Die Azid Funktionalität ermöglichte, eine Seitenkette mittels Staudinger-Ligation an das Gerüst anzubringen.

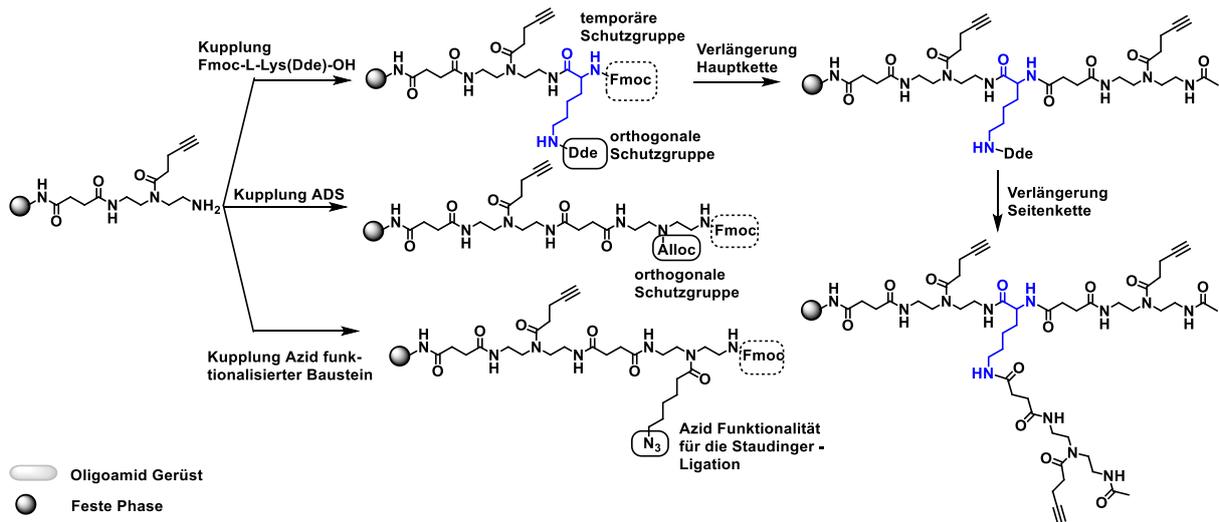


Abbildung 27: Präsentation der drei entwickelten Synthesestrategien basierend auf den orthogonalen Schutzgruppen Dde und Alloc sowie dem Azid funktionalisierten Baustein.

Alle Synthesestrategien lieferten zunächst relative Reinheiten der Glykooligomere von 86% bis 90%. Reinheiten von > 95%, wie sie für weitere Bindungsstudien erforderlich sind, konnten mittels präparativer HPLC Aufreinigung erreicht werden. Ein wichtiger Unterschied der verschiedenen Strategien liegt in der zu erhaltenden Größe des Gerüsts. Durch Verwendung von Fmoc-L-Lys(Dde)-OH als Verzweigungsbaustein wird ein nur kurzes Hauptkettenfragment aber eine längere Seitenkette eingebaut. ADS ermöglicht die Einführung der Seitenkette direkt an der Hauptkette, führt aber ein größeres Hauptkettenmotiv ein. Durch AADS wird sowohl in der Haupt- als auch in der Seitenkette eine Verlängerung des Gerüsts erhalten (Abbildung 27). Je nach gewünschter Zielstruktur kann also zwischen den unterschiedlichen Strategien gewählt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die erfolgreich entwickelten Synthesestrategien verwendet, um asymmetrisch verzweigte Glykomakromoleküle zu synthetisieren und diese in Lektin-Bindungsstudien auf den Einfluss ihrer jeweiligen Struktur zu untersuchen. Es wurden drei Klassen von Glykomakromolekülen mit unterschiedlichen Kohlenhydratliganden hergestellt: Mannose-, N-Acetylgalactosamin- und N-Acetylneuraminsäure-funktionalisierte Glykomakromoleküle.

Eine erste Generation von 1- und 3-armigen verzweigten Präzisionsglykomakromolekülen wurde mittels der auf Dde basierenden Synthesestrategie aufgebaut und mit Mannose funktionalisiert (Kapitel 3.3.1) (Abbildung 28). Diese Mannose-Präzisionsglykomakromoleküle wurden in ihrer Struktur-Wirkungsbeziehung zu zwei Lektin Liganden, dem trivalenten Langerin und dem tetravalenten ConA, getestet. Die Ergebnisse einer  $^{19}\text{F}$  Kompetitive-Inhibierungsbindungsstudie zeigten eine Korrelation zwischen der Armlänge der 3-armigen verzweigten Präzisionsglykomakromoleküle und deren Affinität zu Langerin (Kapitel 3.3.2.). Die stärkste Bindungsaffinität zu Langerin weist die kleinste verzweigte Struktur auf. Die Verlängerung nur eines Armes der kleinsten trivalenten Struktur führt zu einer Reduktion der Bindungsaffinität. Eine schlechtere Passgenauigkeit zu Langerin könnte auf die

zunehmende Größe des Glykooligomers zurückzuführen sein. Ein weiterer Faktor für die Reduktion der Bindungsaffinität könnte auch die Flexibilität und damit resultierende Konformation des Gerüsts sein, die eine multivalente Bindung mit zunehmender Kettenlänge entropisch weniger begünstigt.

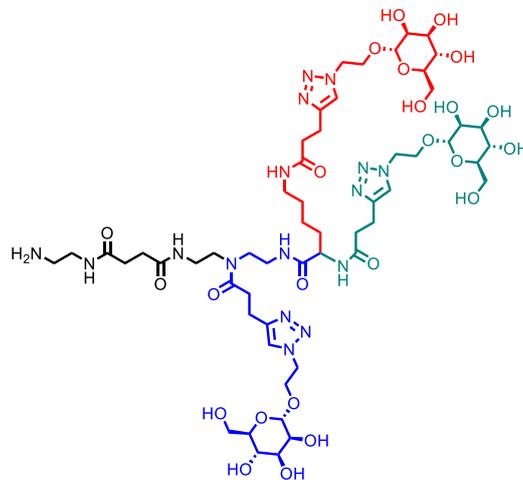


Abbildung 28: Kleinstes 3-armiges verzweigtes, mit Mannose funktionalisiertes, Glykooligomer, das mittels der auf Dde basierenden Synthesestrategie synthetisiert wurde. Ausgehend von diesem Glykooligomer wurden die drei Arme asymmetrisch verlängert.

Neben der Steigerung der Affinität ist auch die Selektivität im Fokus der Entwicklung neuer Glykomimetika. Selektivität ist immer dann gegeben, wenn eine deutlich höhere Affinität zwischen einem Glykomimetikum und einem ausgewählten Lektin im Vergleich zu anderen Lektinen gemessen werden kann. Die ausgewählten Lektine binden jeweils denselben Kohlenhydratliganden. Zu diesem Zweck wurden in weiteren Bindungsstudien mittels SPR die Selektivität der Glykomakromoleküle in Abhängigkeit ihrer Gerüststruktur zu Langerin und ConA untersucht. Hierzu wurden drei Glykomakromoleküle ausgewählt und jeweils auf einem SPR Chip immobilisiert. Die Bindung der Lektine zu den drei Chips wurde in direkten Bindungsstudien vermessen. Während die Größenabhängigkeit der Bindung an Langerin bestätigt werden konnte, zeigten die Glykomakromoleküle unabhängig von ihrer Struktur ein ähnliches Bindungsverhalten an ConA. Dieses ähnliche Bindungsverhalten an ConA resultiert wahrscheinlich aus der Größe der Glykomakromoleküle. Es ist anzunehmen, dass die Glykomakromoleküle zu klein sind, um simultan an mehrere Bindungsstellen des ConA zu binden. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse eine potenzielle Selektivität des kleinsten Liganden an Langerin im Vergleich zu ConA. (Kapitel 3.3.3).

In einer Versuchsreihe zur Inhibierung der Bindung von ConA durch die verschiedenen trivalenten Glykomakromoleküle konnte eine Größenabhängigkeit aufgezeigt werden (Kapitel 3.3.3). Im Gegensatz zu direkten Bindungsstudien können sich in Inhibierungsbindungsstudien zusätzliche Effekte, wie die sterische Abschirmung der Bindungstaschen durch bereits gebundene Liganden auswirken.

In zukünftigen Studien könnten die im Rahmen dieser Arbeit etablierten Synthesestrategien auch zur Synthese von 4-armigen Liganden verwendet werden. Mit diesen 4-armigen Liganden könnten

Untersuchungen zur weiteren Steigerung der Selektivität am trivalenten Rezeptor Langerin gegenüber dem tetravalenten Rezeptor ConA durchgeführt werden. Des Weiteren sollte getestet werden, ob die Selektivität zu Langerin auch in direkter Konkurrenz zu anderen Mannose-bindenden Lektinen besteht. Erste Versuche von trivalenten Glykomakromolekülen, die als Lipidkonjugate fungieren, zeigten in Zellstudien vielversprechende Ergebnisse.

Als zweite Klasse der Glykomimetika wurden drei 3-armige verzweigte Präzisionsglykomakromoleküle, die *N*-Acetyl-galactosamine (GalNAc) tragen und an FITC konjugiert sind, erfolgreich synthetisiert (Kapitel 3.4) (Abbildung 29).

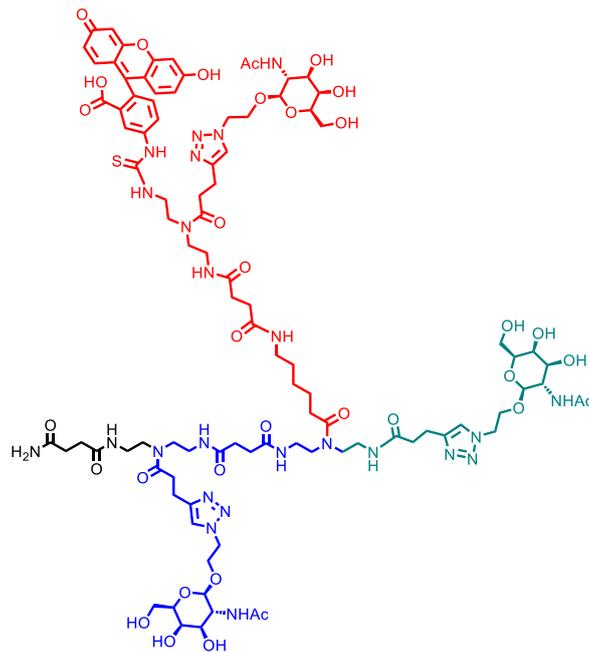


Abbildung 29: Kleinstes 3-armiges verzweigtes, mit GalNAc funktionalisiertes Glykooligomer, das mittels der auf Staudinger-Ligation basierenden Synthesestrategie synthetisiert wurde. Ausgehend von diesem Glykooligomer wurden die drei Arme asymmetrisch verlängert.

Hierzu wurde eine Synthese für Azid-funktionalisiertes GalNAc entwickelt, das mittels Cu-vermittelter Azid-Alkin-Konjugation an das Gerüst angebracht werden konnte (Kapitel 3.4.1.). Die Verzweigung für diese Glykomakromoleküle basierte auf dem neu entwickelten funktionellen Baustein AADS und wurde mittels Staudinger-Ligation eingeführt (Kapitel 3.4.2). Der Struktureinfluss auf die Bindungsaffinität zwischen GalNAc-bindendem ASGPR und den 3-armigen verzweigten Präzisionsglykomakromolekülen wird derzeit in einem Zellexperiment untersucht. ASGPR ist ein trivalenter Rezeptor, hat aber im Gegensatz zu Langerin asymmetrische und auch größere Bindungstaschenabstände. Es ist nun interessant, ob sich die Designregeln von Langerin auch auf andere trivalente Rezeptoren übertragen lassen.

Als *proof of concept* wurde die Konjugation zwischen einem monovalenten GalNAc funktionalisierten Glykooligomer an ein Phorphyrin-Derivat untersucht. Das Produkt kann potenziell in der Photodynamischen Therapie (*photodynamic therapy* (PDT)) eingesetzt werden (Kapitel 3.4.3.).

Zukünftige Arbeiten könnten die Phorphyrin-Konjugation an der Festphase optimieren und eine Konjugation nicht nur zu monovalenten, sondern auch höher valenten Glykooligomeren ermöglichen. Diese Glykooligomere könnten in ihrer Affinität und Selektivität zu Zellen getestet werden. Durch eine hohe Selektivität könnten die Glykooligomere eine potenzielle Anwendung in der Krebstherapie finden. Im letzten Teil dieser Arbeit wurden drei lineare mit N-Acetylneuramin Säure (Neu5Ac) funktionalisierte Glykomakromoleküle, die sich in ihrer Valenz zwischen mono-, di- und trivalent unterscheiden, erfolgreich synthetisiert (Kapitel 3.5.). Erste Versuche eines Bindungstests in Form eines ELISAs wurden zwischen den Neu5Ac Liganden und Hämagglutinin durchgeführt. Obwohl das ELIAS eine etablierte Methode ist, um Bindungsaffinitäten zu messen, konnte im Rahmen dieser Arbeit leider keine Ergebnisse generiert werden. Eine alternative Messmethode zur Untersuchung der NeuNAc-funktionalisierten Liganden wäre die für andere Liganden bereits erfolgreich eingesetzte SPR.

Zusammenfassend konnte mit dieser Arbeit eine effiziente Synthesestrategie zum Erhalt asymmetrisch verzweigter Glykomakromoleküle entwickelt werden, die in ersten Bindungsstudien großes Potenzial sowohl in ihrer Funktion als Ligand wie auch als Inhibitor aufzeigen. Durch den schrittweisen Aufbau des makromolekularen Gerüsts konnte eine Seitenkette gezielt eingeführt werden. Es ist möglich, mit dieser Synthesestrategie Strukturparameter wie z.B. die Länge der jeweiligen Arme zu variieren. Dies bietet Zugang nicht nur zu passgenauen hochaffinen, sondern auch zu potenziell selektiven Glykomimetika. Diese Eigenschaften sind Grundvoraussetzungen für die zukünftige Anwendung in verschiedenen biotechnologischen und biomedizinischen Bereichen, wie etwa zur gezielten Erkennung von Krebszellen und Anwendung in der Krebstherapie.

## 5. Experimentalteil

### 5.1. Materialien

Das Anionen Austauschharz (AG1-X8, quarternary ammonium, 100-200 mesh, acetate form, BioRad). Benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium-hexafluorophosphat (PyBOP, Iris Biotech GmbH), Bernsteinsäureanhydrid (Carbolution Chemicals GmbH), 6-Bromohexansäure (98%, Carbolution Chemicals GmbH), Calciumchlorid ( $\geq 97\%$ , AppliChem), Concanavalin A für SPR-Messungen, (LKT Laboratories), Dichlormethan (DCM 99.99%, Fluorochem), Diethylether (mit BHT als Inhibitor,  $\geq 99.8\%$ , Sigma-Aldrich), N,N'-Diisopropylcarbodiimid (DIC, 98%, Sigma-Aldrich), N,N-Diisopropylethylamin (DIPEA,  $\geq 99\%$ , Carl Roth), Dimethylformamid für Peptidsynthese (DMF, 99.8%, Acros Organics), Essigsäure (99,9%, VWR), Essigsäureanhydrid (99.7%, VWR), Ethanolamin Hydrochlorid (GE Healthcare Bio-Sciences), Ethylacetat (100%, VWR), 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC, GE Healthcare Bio-Sciences), 9-Fluorenylmethoxycarbonylchlorid (Fmoc-Cl, chemPur Feinchemikalien und Forschungsbedarf GmbH), N-alpha-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-N-epsilon-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidene)ethyl-L-lysin (Fmoc-L-Lys(Dde)-OH, Iris Biotech GmbH), *Fluorescein isothiocyanate*, Isomer 1 (FITC, 95%, Alfa Aesar), Glycin (>99%, Carl Roth), HBS-P+ Puffer (0.1 M HEPES, 1.5 M NaCl, 0.5% v/v *surfactant* P20, pH 7.4, GE Healthcare Bio-Sciences), Hexan (98%, VWR), Human Anti-Influenza Virus A IgG ELISA Kit (ab108745, abcam), Hydrazin Monohydrat ( $N_2H_4 \cdot H_2O$ , 64-65%, 98%; Sigma-Aldrich), Hydroxybenzotriazol (HOBt, (97%, Sigma-Aldrich), 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethansulfonsäure (HEPES, 99%, Fisher Scientific), N-Hydroxysuccinimid (NHS, GE Healthcare Bio-Sciences Amberlite® IR 120H<sup>+</sup> (Fulka), Isopropanol (p.a., VWR), Kaliumcarbonat (99,6%, Fisher Scientific), Kupfer-(II)-sulfat (98%, Acros Organic), Magnesium-(II)-chlorid Tetrahydrat (99%, Sigma-Aldrich), Methanol (100%, VWR), Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid (>99%, Alfa Aesar), (+)-Natrium-L-ascorbat ( $\geq 99.0\%$ , Sigma-Aldrich), Natriumazid (rein, AppliChem), Natriumchlorid (99.98%, Fisher Scientific), Natriumdiethyldithiocarbamat (99%, Acros Organic), Natriumhydrogencarbonat (p.a., Fisher Scientific), Natriumhydroxidlösung (1 Molare Lösung, p.a., VWR), Natriumhydroxidlösung (5 Molare Lösung, GE Healthcare Bio-Sciences), Natriummethoxid (97%, Acros Organic), Natriumsulfat (p.a. Sigma-Aldrich), Oxalylchlorid (98%, Alfa Aesar), Piperidin (99%, Acros Organic), ), SPR Sensorchips C1 (GE Healthcare Bio-Sciences). TentaGel® S RAM (Rink Amind, Rapp Polymere), TentaGel® S TRT Cl (Rapp Polymere), Tetrahydrofuran (p.a., Sigma-Aldrich), Tributylphosphin (97%, Sigma-Aldrich), Triethylamin (99,5%, AppliChem), Trifluoroessigsäure (TFA, 99%, Fluorochem), Triisopropylsilan (TIPS, (98%, Sigma-Aldrich) wurden ohne weitere Aufreinigung zur Synthese eingesetzt.

## 5.2. Instrumente

### NMR-Spektroskopie

#### <sup>1</sup>H-NMR

Die spektroskopischen Messungen wurden an einem Bruker AVIII 300 oder Bruker DRX500 FT-NMR-Spektrometer mit 1024 Pulsen bei einer Temperatur von 25 °C aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen ( $\delta$ -Skala) wurden auf das nicht vollständig deuterierte Lösungsmittel als internen Standard oder auf Tetramethylsilan kalibriert. Als Lösungsmittel für die NMR-Messungen wurden CDCl<sub>3</sub>, MeOD, D<sub>2</sub>O oder DMSO-D<sub>6</sub> verwendet.

#### <sup>13</sup>C-NMR

Diese Messungen wurden ebenfalls an einem FT-NMR-Spektrometer vom Typ Bruker DRX500 bei 25°C durchgeführt. Die chemischen Verschiebungen wurden auf das nicht vollständig deuterierte Lösungsmittel als internen Standard oder auf Tetramethylsilan kalibriert.

Spinmultiplizitäten wurden mit s (Singulett), d (Dublett), dd (Dublett von Dublett), t (Triplet), td (Triplet vom Dublett), tt (Triplet vom Triplet), quart. (Quartett), quint. (Quintett) oder m (Multiplet) abgekürzt.

### Massenspektroskopie gekoppelt mit *Reversed-Phase High Pressure Liquid Chromatography* (RP-HPLC/MS)

RP-HPLC/MS wurden am Agilent Technologies 1260 Infinity System mit einer analytischen Zorbax SB-C18 Säule (2.1x50 mm), die eine Partikelgröße von 1.8  $\mu$ m hat, bei 25°C und einer Flussrate von 0.4 mL/min durchgeführt.

Eluenten: (A) 95 Vol% Wasser + 4.9Vol% AcN + 0.1 Vol% Ameisensäure; (B) 95 Vol% AcN + 4.9 Vol% Wasser + 0.1 Vol% Ameisensäure. Die Retentionszeiten  $t_R$  und die Reinheiten der einzelnen Stoffe wurden mittels Agilent VWD Detektor bei einer Wellenlänge von 214 nm durch Integration des UV Signals bestimmt. Die Massendetektion wurde durchgeführt am Agilent 6120 Quadrupole LC/MS. Die Analyse der UV und MS Spektren wurde mit OpenLab ChemStation Software für LC/MS von Agilent Technologies durchgeführt.

### *High Resolution* - Massenspektrometrie (HR-MS)

HR-MS-Analysen wurden an einem Bruker HR-QTOF maXis 4G Instrument mittels ESI Quelle, Quadrupol gefolgt von einer *Time Of Flight* (QTOF) Massenanalysator gemessen.

### Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden Folien der Firma Merck verwendet (Kieselgel 60 F254 auf Aluminiumfolie).

### Oberflächenplasmonenresonanz (*Surface Plasmon Resonance*) (SPR)

SPR Messungen wurden am Biacore X100 von GE Healthcare Life Sciences durchgeführt. Die Glykooligomere **7**, **12** und **13** wurden auf einem C1 Chip, unter Verwendung der EDC/NHS Kupplungschemie, immobilisiert. Die Immobilisierung fand in HEPES Puffer statt. Die Sensogramme wurden mittels Biacore X100 Control Software aufgenommen und mit der Biacore X100 Evaluation Software ausgewertet.

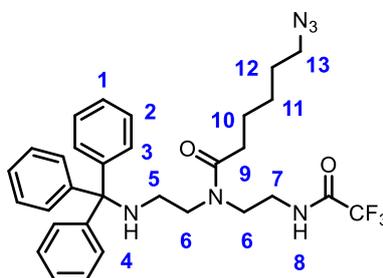
### Gefriertrocknung

Die finalen Glykooligomere und Oligomere wurden mittels Alpha 1-4 LD plus von Martin Christ Freeze Dryers GmbH gefriergetrocknet. Die Gefriertrocknung fand bei -55°C und 0.1 mbar statt.

## 5.3. Synthesen

Die Synthese von 2,2,2-Trifluoro-N-(2-((2-(tritylamino)ethyl)amino)ethyl)acetamid, 1-(Fluorenyl)-3,11-dioxo-7-(pent-4-ynoyl)-2-oxa-4,7,10-triazatetradecansäure (**TDS**) und 1-(9H-fluoren-9-yl)-3,14-dioxo-2,7,10-trioxa-4,13-diazaheptadecansäure (**EDS**) wurde nach Ebbesen *et al.*<sup>103</sup> durchgeführt. 4-((2-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)ethyl)amino)-4-oxobutansäure (**SDS**) und acetyl-geschützte 2-Azidoethyl- $\alpha/\beta$ -D-galactopyranose wurden synthetisiert nach Rikker *et al.*<sup>102</sup> synthetisiert. Der literaturbekannte Synthesevorschrift für 2-6-Azidohexansäure wurde leicht modifiziert und für die Herstellung eingesetzt. DMF wurde als Lösungsmittel für die Synthese Lösemittel verwendet.<sup>220</sup> Die Synthese von 6-Azidohexansäurechlorid wurde nach Su *et al.*<sup>221</sup> durchgeführt. Ein kommerziell erwerbliches Trityl-Tenagel-Cl Harz wurde nach dem Protokoll von Ponader *et al.*<sup>73</sup> modifiziert. Acetyl-geschützte 2-azidoethyl- $\alpha$ -D-mannopyranose wurde nach Ponader *et al.*<sup>73</sup> synthetisiert. Die Synthese von acetyl-geschütztem 2-Azido- $\beta$ -NeuNAc ist in der Literatur bekannt.<sup>217</sup> Die Synthese von acetyl-geschütztem 2-Azido- $\beta$ -GluNAc wurde leicht modifiziert, indem das Produkt aus Ethanol umkristallisiert wurde<sup>222</sup>. Die Synthese von acetyl-geschütztem 2-azidoethyl- $\alpha/\beta$ -GalNAc wurde nach dem etablierten Protokoll durchgeführt.<sup>206</sup>

## 5.3.1. Synthesen in Lösung

6-Azido-N-(2-(2,2,2-trifluoroacetamido)ethyl)-N-(2-(tritylamino)ethyl)hexanamid (**1**)

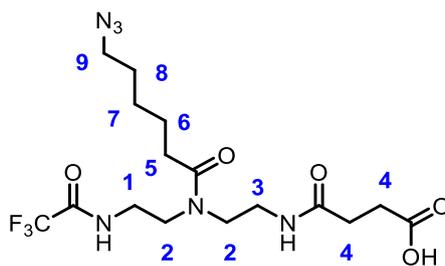
Chemical Formula:  $C_{31}H_{35}F_3N_6O_2$   
Molecular Weight: 580,66

Die Reaktion wurde unter inerten Bedingungen bei einer Temperatur von 0°C durchgeführt. 18.45 g (0.042 mol, 1eq) 2,2,2-Trifluoro-N-(2-((2-(tritylamino)ethyl)amino)ethyl)acetamid<sup>103</sup> wurden in 180 mL DCM gelöst. Zu dem Reaktionsgemisch wurden tropfenweise zuerst 17.49 mL (0.125 mol, 3 eq) TEA, gefolgt von 11.02 g (0.063 mol, 1.5 eq) 6-Azidohexansäurechlorid hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde für 20 h bei Raumtemperatur gerührt und der Reaktionsverlauf wurde mittels DC (EtOAc: Hex, 1:2 Vol%) verfolgt. Die organische Phase wurde drei Male mit wässriger, gesättigter NaHCO<sub>3</sub> Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über NaSO<sub>4</sub> getrocknet, gefiltert und das Lösemittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (EtOAc: Hex, 1:2 Vol%). **1** ist ein bräunlicher Feststoff und konnte mit einer Ausbeute von 13.57 g (0.027 mol, 56%) hergestellt werden.

HR-MS kalk. für  $C_{31}H_{35}F_3N_6O_2$  [M+H]<sup>+</sup> 581.66, gefunden 581.28.

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 8.05 (s, 1H, 8), 7.40 – 7.30 (m, 6H, 2), 7.25 – 7.18 (m, 6H, 3), 7.16 – 7.09 (m, 3H, 1), 3.46 – 3.40 (m, 2H, 7), 3.35 – 3.27 (m, 4H, 6), 3.19 (t, J = 6.8 Hz, 2H, 13), 2.41 (t, J = 7.45 Hz, 2H, 5), 2.34 (t, J = 6.50 Hz, 2H, 9), 1.80 – 1.52 (m, 5H, 4, 10, 12), 1.44 – 1.34 (m, 2H, 11) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (600MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 175.90, 158.08, 157.83, 157.58, 157.34, 145.51, 128.45, 128.19, 126.78, 118.75, 116.85, 114.95, 113.04, 71.15, 51.34, 49.23, 44.91, 42.58, 40.52, 33.02, 28.85, 26.61, 24.86 ppm.

4-((2-(6-Azido-N-(2-(2,2,2-trifluoroacetamido)ethyl)hexanamido)ethyl)amino)-4-oxobutansäure (**2**)

 Chemical Formula:  $C_{16}H_{25}F_3N_6O_5$ 

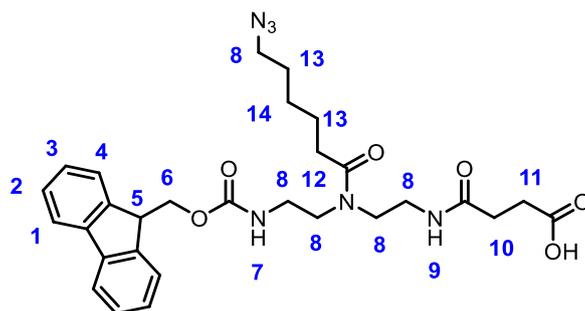
Molecular Weight: 438,41

Die Reaktion wurde unter inerten Bedingungen bei einer Temperatur von 0°C durchgeführt. 13.57 g (0.027 mol, 1 eq) **1** und 9.42 g (0.081 mol, 3 eq) TIPS wurden in 200 mL DCM gelöst. Zu dem Reaktionsgemisch wurden tropfenweise 40.02 g (0.351 mol, 13 eq) TFA hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde für 1 h bei Raumtemperatur gerührt und der Reaktionsverlauf wurde mittels DC (EtOAc: Hex, 1:2 Vol%) verfolgt. Das Lösemittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und TFA wurde mit Toluol zwei Male coevaporiert. Der gelbe Rückstand wurde in 100 mL DCM gelöst und in Diethylether gefällt. Nach der Sedimentation wurde der Diethylether abdekantiert und das Zwischenprodukt im Hochvakuum getrocknet. Nachdem das Zwischenprodukt getrocknet worden ist, wurde es in 100 mL DCM gelöst und 11.22 mL (0.081 mol, 3 eq) TEA wurden tropfenweise hinzugefügt. Nachdem 2.99 g (0.03 mol, 1,1 eq) Bernsteinsäure der Reaktion hinzugefügt worden sind, wurde das Gemisch für 1 h gerührt und die Reaktion wurde mittels DC (EtOAc: Hex, 1:2 Vol%) verfolgt. Die organische Phase wurde drei Male mit 15Vol%iger wässriger Zitronensäurelösung gewaschen. Die organische Phase wurde über  $NaSO_4$  getrocknet, gefiltert und das Lösemittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Das Produkt wurde in DCM umkristallisiert. **2** ist ein weißer Feststoff und konnte mit einer Ausbeute von 7.1 g (0.016 mol, 60%) hergestellt werden.

HR-MS kalk. für  $C_{16}H_{25}F_3N_6O_5$   $[M+H]^+$  439.41, gefunden 439.19.

$^1H$ -NMR (600MHz, MeOD)  $\delta$  = 3.57 – 3.51 (m, 2H, 1), 3.48 – 3.40 (m, 4H, 2), 3.38 – 3.31 (m, 2H, 9), 3.30 – 3.25 (m, 2H, 3), 2.61 – 2.53 (m, 2H, 5), 2.47 – 2.35 (m, 4H, 4), 1.65 – 1.56 (m, 4H, 6, 8), 1.46 – 1.36 (m, 2H, 7) ppm.

$^{13}C$ -NMR (600MHz, MeOD)  $\delta$  = 176.36, 176.10, 176.01, 175.95, 174.94, 174.75, 159.44, 159.26, 159.02, 158.78, 159.44, 159.26, 159.02, 158.78, 120.18, 118.36, 116.41, 114.56, 52.28, 48.40, 47.81, 46.35, 45.80, 38.99, 38.88, 38.76, 38.34, 33.70, 33.64, 31.48, 31.41, 30.07, 30.00, 29.70, 29.68, 27.49, 25.98, 25.93 ppm.

7-(6-Azidohexanoyl)-1-(9H-fluoren-9-yl)-3,11-dioxo-2-oxa-4,7,10-triazatetradecansäure (**3**)

Chemical Formula:  $C_{29}H_{36}N_6O_6$   
Molecular Weight: 564,64

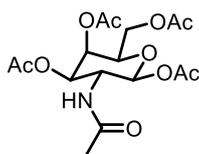
7.1 g (0.016 mol, 1 eq) **2** und 15.46 g (0.112 mol, 7 eq)  $K_2CO_3$  wurden in 70 mL Wasser gelöst. Die Reaktionslösung wurde für exakt 3 h bei einer Temperatur von 30°C gerührt. 4.55 g (0.018 mol, 1.1 eq) Fmoc-Cl wurden in 70 mL THF gelöst und dem Reaktionsgemisch zugefügt. Das Gemisch wurde für weitere 2 h gerührt und die Reaktion wurde mittels DC (EtOAc: Hex: AcOH 1:2:0.1 Vol%) verfolgt. Nach der Beendigung der Reaktion wurde THF unter reduziertem Druck entfernt und die Wasserphase drei Male mit EtOAc gewaschen. Die organischen Phasen wurden vereinigt und mit 15 Vol%iger wässriger Zitronensäurelösung gewaschen. Die organische Phase wurde über  $NaSO_4$  getrocknet, gefiltert und das Lösemittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Startbedingungen EtOAc: Hex: AcOH 7:1:0.1 Vol% mit einem Gradienten zu 19:1:0.1 Vol%). Die vereinigten Fraktionen wurden gegen 15 Vol%iger wässriger Zitronensäurelösung gewaschen. Die organische Phase wurde über  $NaSO_4$  getrocknet, gefiltert und das Lösemittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. **3** ist ein weißer klebriger Feststoff und konnte mit einer Ausbeute von 2.89 g (0.005 mol, 32 %) hergestellt werden.

RP-HPLC: (100% Eluenten A zu 100% Eluent B in 17 min bei 25°C):  $t_R = 11.50$  min.

HR-MS kalk. für  $C_{29}H_{36}N_6O_6$   $[M+H]^+$  565.64, gefunden 565.23.

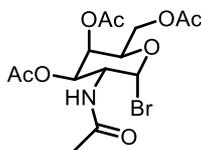
$^1H$ -NMR (600MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta = 7.75 - 7.63$  (m, 2H, 1), 7.58 - 7.45 (m, 2H, 4), 7.39 - 7.28 (m, 2H, 2), 7.27 - 7.19 (m, 2H, 3), 7.06 - 6.90 (m, 1H, 7), 5.84 - 5.61 (m, 1H, 9), 4.54 - 4.21 (m, 2H, 6), 4.19 - 4.04 (m, 1H, 5), 3.49 - 3.02 (m, 10H, 8), 2.69 - 2.50 (m, 2H, 11), 2.47 - 2.34 (m, 2H, 10), 2.31 - 2.14 (m, 2H, 12), 1.63 - 1.37 (m, 4H, 13), 1.21 - 1.18 (m, 2H, 14) ppm. Nicht zuordnenbare Signale:  $\delta$  7.97, 6.69, 6.18, 5.99, 2.96, 2.00, 1.91, 1.18, 0.79 (s) ppm.

$^{13}C$ -NMR (600MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta = 174.58, 174.45, 174.08, 173.95, 171.98, 171.82, 156.19, 155.77, 142.72, 140.23, 126.75, 126.04, 123.99, 119.00, 65.97, 65.89, 50.16, 47.24, 46.96, 46.11, 44.99, 44.68, 38.80, 37.68, 37.39, 31.85, 31.66, 29.65, 28.50, 28.34, 27.58, 25.37, 23.76$  ppm.

(2S,3R,4R,5R,6R)-3-Acetamido-6-(acetoxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2,4,5-triyl triacetat (**18**)

Chemical Formula:  $C_{16}H_{23}NO_{10}$   
Molecular Weight: 389,36

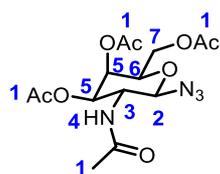
10.0 g D-Galactosamin Hydrochlorid (0.0463 mol, 1 eq) wurden in 56.1 mL Pyridin (0.6945 mol, 15 eq) bei einer Temperatur von 0°C gelöst. 32.8 mL  $Ac_2O$  (0,3473 mol, 7.5 eq) wurden tropfenweise hinzugefügt und das Reaktionsgemisch wurde für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde gefiltert und der Feststoff mit Wasser gewaschen. **18** ist ein weißer Feststoff und konnte mit einer Ausbeute von 83% (14.92g, 0.0383 mol) hergestellt werden. Charakterisierung siehe Klaffke *et al.*<sup>223</sup>.

(2R,3R,4R,5R,6R)-5-Acetamido-2-(acetoxymethyl)-6-bromotetrahydro-2H-pyran-3,4-diyl diacetat (**19**)

Chemical Formula:  $C_{14}H_{20}BrNO_8$   
Molecular Weight: 410,22

9.78 g (0.025 mol, 1eq) **18** wurden in 150 mL DCM unter inerten Bedingungen bei einer Temperatur von 0°C suspendiert. 19.35 mL von einer Lösung aus Bromwasserstoffsäure (8.13 g, 0.1 mol, 4eq) in Essigsäure wurde tropfenweise hinzugefügt und das Reaktionsgemisch wurde 5 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde in Eiswasser gegeben. Die wässrige Phase wurde mit Natriumhydrogencarbonat neutralisiert und drei Male mit DCM gewaschen. Alle organischen Phasen wurden vereinigt und zweimal gegen gesättigte Natriumhydrogencarbonat Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über  $NaSO_4$  getrocknet, gefiltert und das Lösemittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung für den nächsten Syntheseschritt verwendet.

(2R,3R,4R,5R,6R)-5-Acetamido-2-(acetoxymethyl)-6-azidotetrahydro-2H-pyran-3,4-diyl diacetate (**20**)



Chemical Formula:  $C_{14}H_{20}N_4O_8$   
Molecular Weight: 372,33

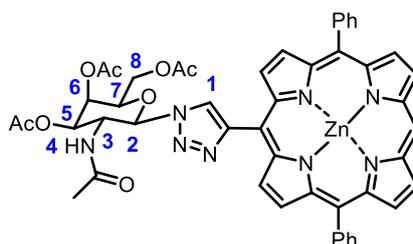
**19** wurde in 94 mL DMF gelöst und 6.51 g Natriumazid (0.1 mol, 4eq) wurden hinzugefügt. Die Reaktion wurde bei einer Temperatur von 60°C für 18 h durchgeführt. Das Reaktionsgemisch wurde nach Beendigung der Reaktion in Eiswasser gegeben. Die wässrige Phase wurde dreimal mit EtOAc gewaschen. Alle organischen Phasen wurden vereinigt und über  $NaSO_4$  getrocknet, gefiltert und das Lösemittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde in DMF umkristallisiert und der erhaltene Feststoff wurde mit kaltem Diethylether gewaschen. **20** ist ein gelber Feststoff und konnte mit einer Ausbeute von 38% (3.53 g, 0.0095 mmol) hergestellt werden.

HRMS kalk. für  $C_{14}H_{20}N_4O_8$   $[M+Na]^+$  395.14 gefunden, 395.14;  $[M+H]^+$ .

$^1H$ -NMR (400 MHz, in  $CDCl_3$ )  $\delta$  = 5.43 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H, 2), 5.35 – 5.30 (m, 1H, 4), 5.18 (m, 1H, 3), 4.73 (d,  $J$  = 9.2 Hz, 1H, 6) 4.13 – 4.08 (m, 2H, 5), 4.01 – 3.93 (2H, m, 7), 2.11 (s, 3H, 1), 2.0 (s, 3H, 1), 1.96 (s, 3H, 1), 1.93 (s, 3H, 1) ppm.

$^{13}C$ -NMR (400 MHz, in  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 170.69, 170.65, 170.57, 170.27, 88.81, 72.98, 69.82, 66.67, 61.55, 51.03, 23.55, 20.83, 20.82, 20.79 ppm.

## Verbindung **29**



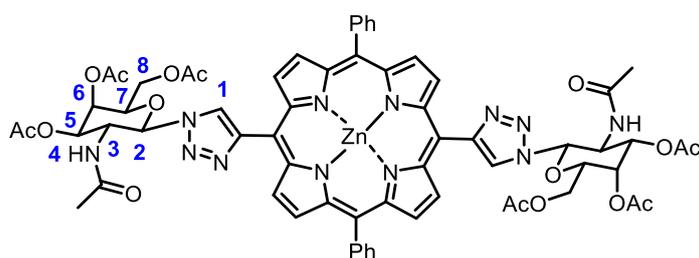
Chemical Formula:  $C_{48}H_{40}N_8O_8Zn$   
Molecular Weight: 922,28

0.08 mmol (1 eq) **20** wurden in 2 mL DMF gelöst. Zu dieser Lösung wurden 0.088 mmol (1.1 eq) Phorphyrin-Derivat, 30 mol% NaAs und 30 mol%  $CuSO_4$  gegeben. Die Reaktion fand für 5 Tage bei 60°C statt. Das Lösemittel wurde nach Beendigung der Reaktion unter reduziertem Druck entfernt. Der erhaltene Feststoff wurde in EtOAc gelöst und mit Wasser 3 Male gewaschen. Die organische Phase wurde über  $NaSO_4$  getrocknet, gefiltert und das Lösemittel wurde unter reduziertem Druck entfernt.

Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (EtOAc: Hex). **29** ist ein roter Feststoff und konnte mit einer Ausbeute von 5% (4 mg, 0.004 mmol) hergestellt werden.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, in DMSO)  $\delta$  = 9.60 – 7.72 (m, 20H, 1, Phorphyrin-H), 6.44 – 6,33 (m, 1H, 2), 5.61 – 5.37 (m, 2H, 3, 4), 5.07 – 4.90 (m, 1H, 7), 4.78 – 4.66 (m, 1H, 6), 4.35 – 4.11 (m, 3H, 5, 8), 2.37 – 1.66 (m, 12H, OAc) ppm. Nicht zuordnenbare Signale: 10.39 (s), 4.55 (s) 1.70 – 0.58 (m) ppm.

### Verbindung **30**



Chemical Formula:  $\text{C}_{64}\text{H}_{60}\text{N}_{12}\text{O}_{16}\text{Zn}$   
Molecular Weight: 1318,63

0.08 mmol (1 eq) von **20** wurden in 2 mL DMF gelöst. Zu dieser Lösung wurden 0.176 mmol (2.2 eq) Phorphyrin-Derivat, 60 mol% NaAs und 60 mol%  $\text{CuSO}_4$  gegeben. Die Reaktion fand für 5 Tage bei  $60^\circ\text{C}$  statt. Das Lösemittel wurde nach Beendigung der Reaktion unter reduziertem Druck entfernt. Der erhaltene Feststoff wurde in EtOAc gelöst und mit Wasser 3 Male gewaschen. Die organische Phase wurde über  $\text{NaSO}_4$  getrocknet, gefiltert und das Lösemittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (EtOAc: Hex). **29** ist ein roter Feststoff und konnte mit einer Ausbeute von 3% (3 mg, 0.002 mmol) hergestellt werden.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, in DMSO)  $\delta$  = 9.20 – 7.80 (m, 20H, 1, Phorphyrin-H), 6.51 – 6,10 (m, 2H, 2), 5.68 – 5.25 (m, 4H, 3, 4), 5.09 – 4.90 (m, 2H, 7), 4.78 – 4.69 (m, 2H, 6), 4.43 – 3.87 (m, 6H, 5, 8), 2.37 – 1.66 (m, 24H, OAc) ppm. Nicht zuordnenbare Signale: 1.41 – 0.07 (m), 0.06 (m) ppm.

### 5.3.2. Synthesen an der Festphase

Die Ansatzgröße für die synthetisierten Glykooligomere sowie Oligomere war 0.1 mmol. Ausnahmen bilden Glykooligomer **6** und **8**, die jeweils nur in analytischen Mengen synthetisiert worden sind.

#### Harz Modifikation.

Ein kommerziell erwerbliches Trityl-Tentagel-Cl Harz wurde mit einem Ethylendiamin- (EDA) Linker<sup>73</sup> modifiziert. Die Harz-Ladung wurde mittels Fmoc-basierenden Ladungstest mit einer Ladung von 0.2 mmol/g bestimmt.

#### Harzquellung

Die Synthesen für die Glykooligomere **9**, **26–28** und **34–36** wurden mit einem kommerziell erwerblichen Tentagel S RAM Harz durchgeführt. Alle anderen Glykooligomere wurden mit dem EDA modifizierten Harz durchgeführt. Die jeweiligen Harze wurden in 5 mL DCM für 30 min aufgequellert und anschließend zehnmal mit 7 mL DMF gewaschen.

#### Kupplungsprotokoll

0.5 mmol (5 eq) des Bausteins, Linkers oder Aminosäure wurden zusammen mit 0.5 mmol (5eq) PyBOP in 2 mL DMF für 30 s in einem Stickstoffstrom gelöst. 2 mmol (20 eq) DIPEA wurden zum Reaktionsgemisch zugefügt und unter Stickstoffgegenstrom zum Harz gegeben. Die Kupplung wurde für 1 h durchgeführt. Das Harz wurde anschließend zehnmal mit 7 mL DMF gewaschen.

#### Fmoc-Entschützung

Die Fmoc-Entschützung fand statt, indem 5 mL einer Lösung von 25 Vol% Piperidin in DMF dem Harz zugegeben worden sind. Die Entschützung fand für 20 min und anschließend für 10 min statt.

Nachdem Fmoc-L-Lys(Dde)-OH ans Harz gekuppelt worden ist, wurde die Fmoc-Entschützung mit 5 mL einer Lösung von 20 Vol% Piperidin in DMF für eine Reaktionszeit von zweimal 10 min durchgeführt.

Nach der Entschützung wurde das Harz 10 Male mit 7 mL DMF gewaschen.

#### Dde-Entschützung

Die Dde-Entschützung wurde durchgeführt, indem 5 mL einer 2 Vol% Hydrazin in DMF Lösung dem Harz für 30 min und anschließend für 15 min zugefügt worden sind. Das Harz wurde nach der Entschützung zehnmal mit 7 mL DMF gewaschen.

#### Alloc-Entschützung

Die Dde-Entschützung wurde durchgeführt, indem 0.03 mmol (0.3 eq) Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> und 0.1 mmol (10eq) N,N-DMBA in 2 mL DCM gelöst worden sind. Nachdem das Reaktionsgemisch 30 s mit Argon gespült worden ist, wird es zum Harz gegeben. Die Reaktion fand zweimal für 45 min, geschützt vor Licht, statt. Nach der Entschützung wurde das Harz zehnmal mit je 7 mL DCM, 6 Male mit 7 mL einer 0.2M DIPEA in DMF Lösung und 10 Male mit je 7mL DMF gewaschen.

#### Acetylierung des N-Terminus der Seiten- wie auch Hauptkette

Nach erfolgreichem Sequenzaufbau wurde der N-Terminus acetyliert, indem 5 mL Essigsäureanhydrid für 30 min dem Harz zugefügt worden sind. Anschließend wurde das Harz zehnmal mit je 7 mL DMF gewaschen.

#### Staudinger-Ligation

0.5 mmol (5eq) des Bausteins oder der Aminosäure, 0.5 mmol (5eq) HOBt und 0.5 mmol (5eq) DIC wurden in 3 mL DMF gelöst und dem Harz zugefügt. 0.5 mmol (5eq) Tributylphosphin wurden in 1 mL DMF gelöst und dem Harz zugefügt. Die Reaktion fand für 18 h, geschützt vor Licht, statt. Nach Beendigung der Reaktion wird das Harz 10 Male mit 7 mL DMF gewaschen.

#### Generelles CuAAC Protokoll für Kohlenhydratliganden

0.25 mmol (2.5 eq) von Acetyl-geschütztem Kohlenhydratliganden wurden pro Alkin-Gruppe in 2 mL DMF gelöst. Zu dieser Lösung wurden 30 mol% NaAs pro Alkin-Gruppe, gelöst in 0.5 mL Wasser, gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 30 s mit Stickstoff gespült und zum Harz gegeben. 30 mol% CuSO<sub>4</sub> pro Alkin-Gruppe wurden in 0.5 mL Wasser gelöst, 30 s mit Stickstoff gespült und zum Harz gegeben. Die Reaktion fand für 18 h, geschützt vor Licht, statt. Das Harz wurde intensiv mit einer 23 mM Lösung von Natriumdiethyldithiocarbamat in DMF, Wasser, DMF und DCM gewaschen.

**Deacetylierung der Kohlenhydratschutzgruppen**

Die Deacetylierung der Kohlenhydratschutzgruppen fand statt, indem 5 mL von einer 0.2 M Natriummethanolat in Methanol Lösung dem Harz zugefügt worden sind. Die Reaktion fand für 30 min statt. Das Harz wurde zehnmal mit 7 mL DMF und zehnmal mit 7 mL MeOH gewaschen.

**Methyl-Schutzgruppen Entfernung der Sialinsäure**

Methyl-Schutzgruppen Entfernung der Sialinsäure wurde ausschließlich nach der Abspaltung von der Festphase in Lösung durchgeführt. Glykooligomer **34–36** wurden in 2 mL einer 0.175 M LiOH in 50 Vol% Methanol und 50 Vol% Wasser gelöst. Die Entschützung fand für 1 h statt. Der pH-Wert lag während der Reaktion zwischen pH = 12 - 14. Nach Beendigung der Entschützung wurde Amberlite® IR 120H<sup>+</sup> der Reaktionslösung zugefügt, bis der pH Wert bei pH = 3 – 4 lag. Das Harz wurde gefiltert und das Lösemittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde zuerst in einem Stickstoffstrom getrocknet, danach erfolgte die Gefriertrocknung.

**Kupplung von FITC**

0.3 mmol (3 eq) von FITC und 2 mmol (20 eq) DIPEA wurden in 2 mL DMF gelöst und dem Harz zugefügt. Die Reaktion fand, geschützt vor Licht, für 18 h statt. Das Harz wurde solange mit DMF gewaschen, bis die Waschlösung farblos geworden war.

**Generelles CuAAC Protokoll für Phorphyrin-Derivate**

0.11 mmol (1.1 eq) des Phorphyrin-Derivats wurden in 2 mL DMF gelöst. Zu dieser Lösung wurden 30 mol% NaAs, gelöst in 0.5 mL Wasser, gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 30 s mit Stickstoff gespült und zum Harz gegeben. 30 mol% CuSO<sub>4</sub> wurden in 0.5 mL Wasser gelöst, 30 s mit Stickstoff gespült und zum Harz gegeben. Die Reaktion fand für 18 h, geschützt vor Licht, statt. Die Reaktion wurde zweimal wiederholt. Das Harz wurde intensiv mit einer 23 mM Lösung von Natriumdiethyldithiocarbamat in DMF, Wasser, DMF und DCM gewaschen, bis die Waschlösung farblos geworden war.

**Abspaltung von der Festphase**

EDA modifiziertes Harz: 5 mL einer Lösung von 60 Vol% TFA, 35 Vol% DCM und 5 Vol% of TIPS wurden dem Harz zugefügt.

Tentagel S RAM: 5 mL einer Lösung von 95 Vol% TFA, 2.5 Vol% DCM und 2.5 Vol% of TIPS wurden dem Harz zugefügt.

Die Abspaltung fand für 1 h statt. Das Filtrat wurde in 35 mL kaltem Diethylether gefällt. Für die Oligomere **32** und **33** wurde Hexan statt Diethylether verwendet. Das Harz wurde nochmal mit 5 mL DCM gewaschen und zur Fällungslösung hinzugefügt. Der erhaltene Feststoff wurde zentrifugiert und das Lösemittel dekantiert. Das Rohprodukt wurde in einem Stickstoffstrom getrocknet, bevor die Gefriertrocknung erfolgte.

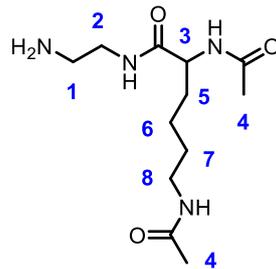
**TFA-Salz Entfernung**

Die TFA-Salz Entfernung wurde mit 2 g AG1-X8, quartäres Ammoniumsalz, durchgeführt. Das Harz wurde vorab dreimal mit 15 mL 1.6 M wässrige Essigsäurelösung und dreimal mit 15 mL mit 0.16 M wässrige Essigsäurelösung gewaschen. Jedes Glykooligomer wurde in 2 mL Wasser gelöst und zum Harz gegeben. Die TFA-Salz Entfernung fand für 1 h statt. Das Harz wurde wiederholt dreimal mit je 2 mL Wasser gewaschen. Alle Fraktionen wurden vereinigt und gefriergetrocknet. Die TFA-Salz Entfernung wurde mittels <sup>19</sup>F NMR Spektroskopie überprüft.

**Aufreinigung**

Glykooligomere **7**, **12-17**, **22-25** und **31–36** wurden mittels präparativer RP- HPLC aufgereinigt.

Monodisperses, sequenzkontrolliertes Monomer **4**



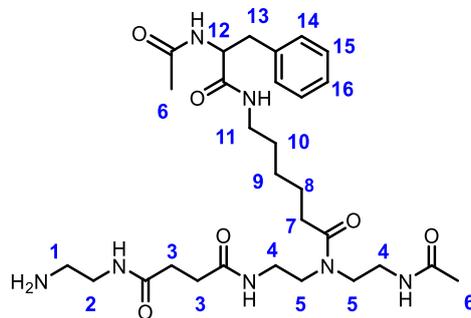
Chemical Formula:  $C_{12}H_{24}N_4O_3$   
Molecular Weight: 272,35

Reinheit: > 93% ( $^1H$ -NMR Spektroskopie)

HR-MS kalk. für  $C_{12}H_{24}N_4O_3$   $[M+H]^+$  273.35, gefunden 273.3.

$^1H$ -NMR (600MHz, MeOD)  $\delta$  = 4.18 – 4.09 (m, 1H, 3), 3.59 – 3.52 (m, 1H, 5), 3.43 – 3.36 (m, 1H, 5), 3.16 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 2H, 1), 3.11 – 3.01 (m, 2H, 2), 2.00 (s, 3H, 4), 1.93 (s, 3H, 4), 1.84 – 1.75 (m, 1H, 8), 1.71 – 1.61 (m, 1H, 8), 1.55 – 1.48 (m, 2H, 7), 1.46 – 1.30 (m, 2H, 6) ppm. Nicht zuordnenbare Signale: 2.86 (s), 2.45 (s), 1.06 (s) ppm.

Monodisperses, sequenzkontrolliertes Monomer **5**



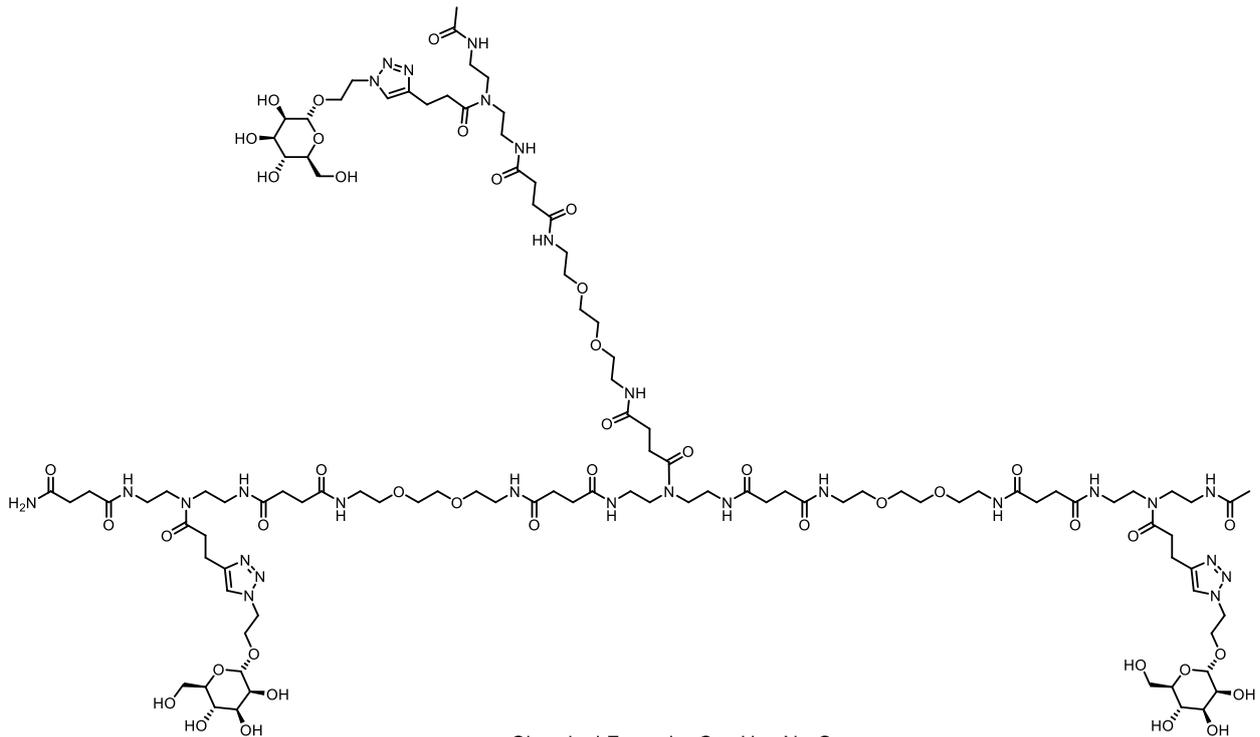
Chemical Formula:  $C_{29}H_{47}N_7O_6$   
Molecular Weight: 589,74

Reinheit: > 95% ( $^1H$ -NMR Spektroskopie)

HR-MS kalk für  $C_{29}H_{47}N_7O_6$   $[M+H]^+$  590.74, gefunden 590.9.

$^1H$ -NMR (600MHz, MeOD)  $\delta$  = 7.03 – 6.80 (m, 5H, 14, 15, 16), 4.27 – 4.14 (m, 1H, 12), 3.14 – 3.09 (m, 4H, 4), 3.06 – 2.94 (m, 8H, 5, 11, 13), 2.85 – 2.71 (m, 4H, 1, 2), 2.24 – 2.16 (m, 2H, 3), 2.15 – 2.09 (m, 2H, 3), 2.07 – 2.00 (m, 2H, 7), 1.61, 1.58 (s, s 6H, 6), 1.28 – 1.19 (m, 2H, 10), 1.15 – 1.04 (m, 2H, 8), 0.99 – 0.91 (m, 2H, 9) ppm. Nicht zuordnenbare Signale: 6.78 (m), 5.32 (s), 5.15 (s), 2.60 – 2.51 (m), 1.82 (m), 1.77 (m).

Monodisperses, sequenzkontrolliertes Glykooligomer **6**



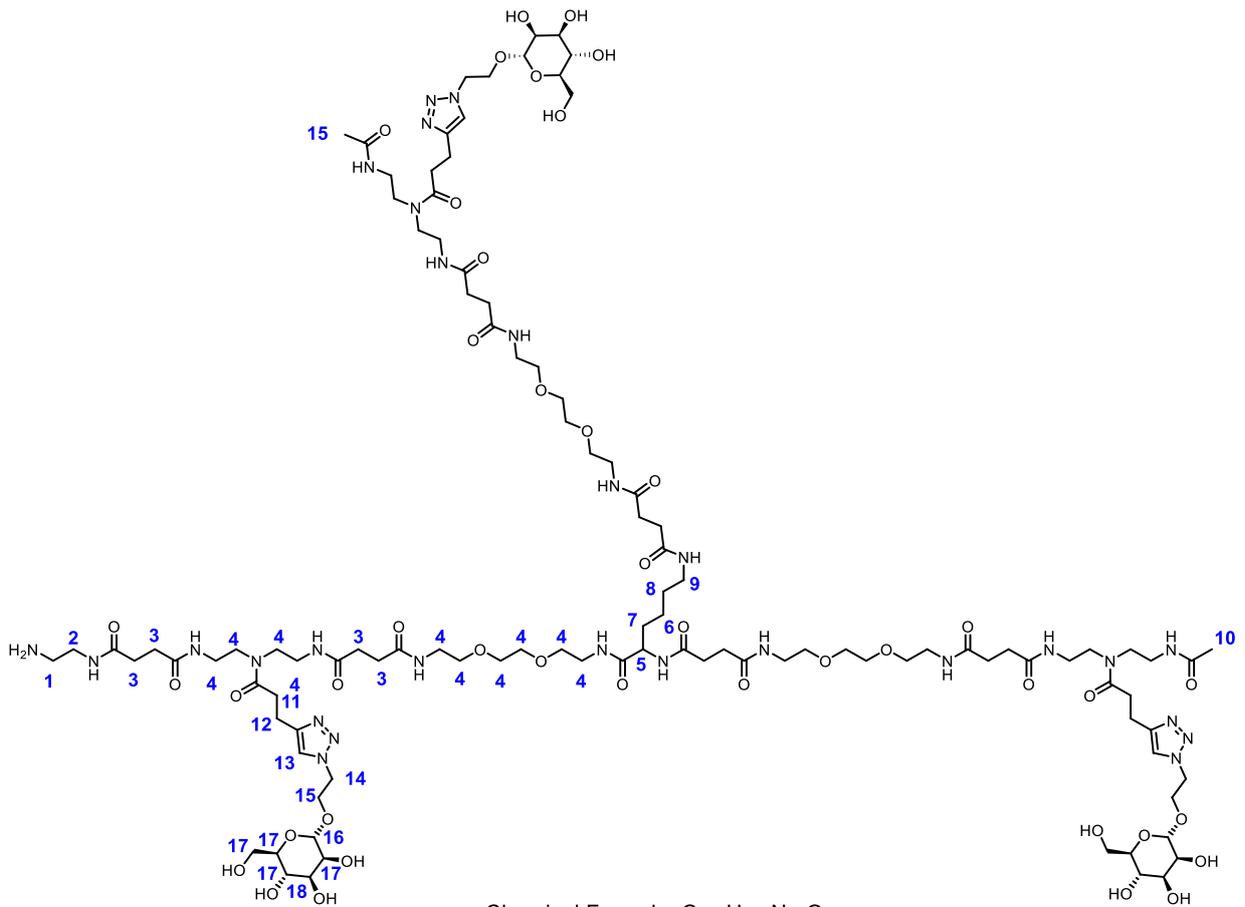
Chemical Formula:  $C_{105}H_{178}N_{28}O_{43}$   
 Molecular Weight: 2520,73

Reinheit: 90% (Integration des UV Signals  $\lambda = 214$  nm).

RP-HPLC: (100% Eluenten A zu 100% Eluent B in 17 min bei 25°C):  $t_R = 5.33$  min.

ESI kalk. für  $C_{105}H_{176}N_{28}O_{43}$   $[M+2H]^{2+}$  1261.35, gefunden 1261.8.

Monodisperses, sequenzkontrolliertes Glykooligomer **7**



Chemical Formula:  $C_{105}H_{180}N_{28}O_{42}$   
 Molecular Weight: 2506,75

Ausbeute: 71%.

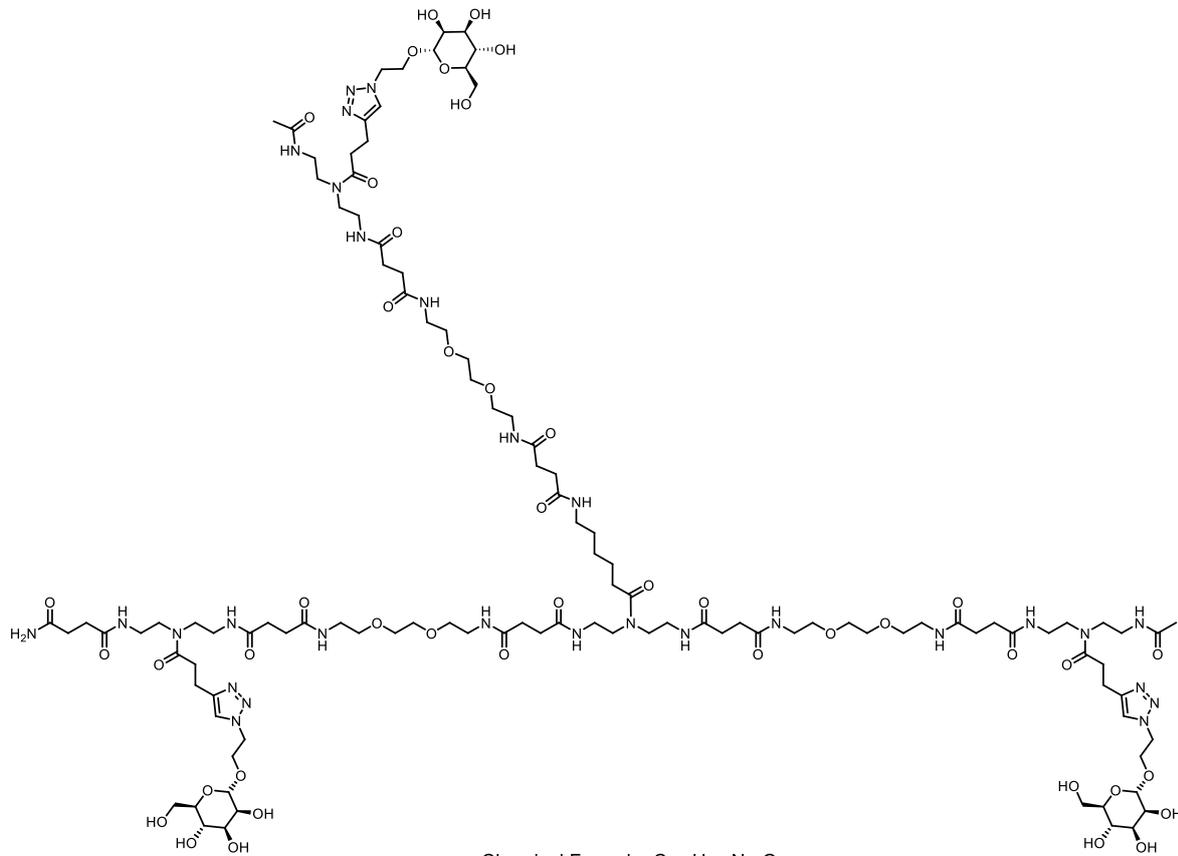
Reinheit: 99% (Integration des UV Signals  $\lambda = 214$  nm).

RP-HPLC: (100% Eluenten A zu 100% Eluent B in 30 min bei 25°C):  $t_R = 9.13$  min.

ESI-MS kalk. für  $C_{75}H_{126}N_{22}O_{30}$ ;  $[M+2H]^{2+}$  1254.4, gefunden 1254.0.

$^1H$ -NMR (600 MHz, in  $D_2O$ )  $\delta = 7.88, 7.88, 7.87$  (s, s, s, 3H, 13), 4.64 (m, 6H, 14), 4.20 (m, 1H, 5), 4.09, 3.93 (m, m, 6H, 15), 3.86 (m, 3H, 16), 3.77-3.30 (m, 77H, 4, 9, 17), 3.16 (m, 4H, 1, 2), 3.00 (m, 9H, 12, 18), 2.80 (m, 6H, 11), 2.65 – 2.40 (m, 24H, 3), 1.95, 1.93 (s, s, 6H, 10), 1.78, 1.70 (m, m, 2H, 7), 1.51 (m, 2H, 8), 1.36 (m, 2H, 6) ppm.

Monodisperses, sequenzkontrolliertes Glykooligomer **8**



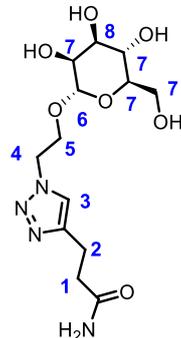
Chemical Formula:  $C_{111}H_{189}N_{29}O_{44}$   
 Molecular Weight: 2633,89

Reinheit: 86% (Integration des UV Signals  $\lambda = 214$  nm).

RP-HPLC: (100% Eluenten A zu 100% Eluent B in 17 min bei 25°C):  $t_R = 11.07$  min.

ESI-MS kalk. für  $C_{111}H_{189}N_{29}O_{44}$   $[M+2H]^{2+}$  1318.0, gefunden 1317.4.

Monodisperses, sequenzkontrolliertes Glykooligomer **9**



Chemical Formula:  $C_{13}H_{22}N_4O_7$   
Molecular Weight: 346,34

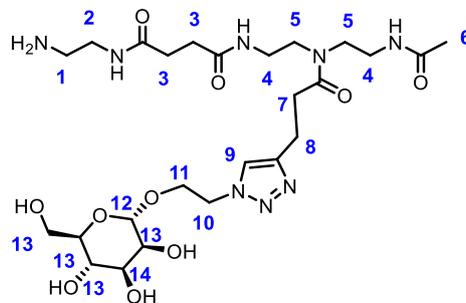
Ausbeute 70%.

HR-MS kalk. Für  $C_{12}H_{22}N_4O_7$   $[M+H]^+$  347,34, gefunden 347.16.

$^1H$ -NMR (600 MHz, in  $D_2O$ )  $\delta$  = 7.86 (s, 1H, 3), 4.64 (m, 2H, 4), 4.09, 3.91 (m, m 2H, 5), 3.86 (m, 1H, 6), 3.77 – 3.55 (m, 5H, 7), 3.02 (m, 3H, 2, 8), 2.66 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 2H, 1) ppm.

$^{13}C$ -NMR (600 MHz in MeOD)  $\delta$  = 178.09, 146.63, 123.96, 99.70, 72.89, 70.55, 70.03, 66.49, 65.66, 60.77, 50.08, 34.44, 20.86 ppm.

Monodisperses, sequenzkontrolliertes Glykooligomer **10**



Chemical Formula:  $C_{25}H_{44}N_8O_{10}$   
Molecular Weight: 616,67

Ausbeute 76%.

Reinheit: 99% (Integration des UV Signals  $\lambda$  = 214 nm).

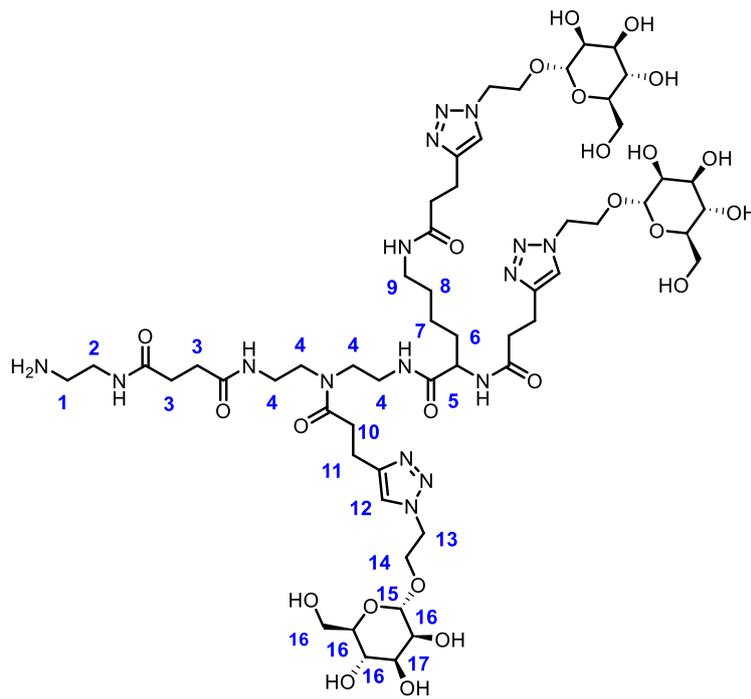
RP-HPLC: (100% Eluenten A zu 100% Eluent B in 30 min bei 25°C):  $t_R$  = 5.4 min.

HR-MS kalk. für  $C_{25}H_{44}N_8O_{10}$   $[M+H]^+$  616.67, gefunden 617.33.

$^1H$ -NMR (600 MHz, in  $D_2O$ )  $\delta$  = 7.89 – 7.86 (m 1H, 9), 4.64 (m, 2H, 10), 4.09, 3.93 (m, m, 2H, 11), 3.86 (m, 1H, 12), 3.77 - 3.57 (m, 5H, 13), 3.54 – 3.44 (m, 6H, 2, 4), 3.40 – 3.30 (m, 4H, 5), 3.15 (t,  $J$  = 5.9 Hz, 2H, 1), 3.06 – 2.98 (m, 3H, 8, 14), 2.80 (m, 2H, 7), 2.57 – 2.47 (m, 4H, 3), 1.94, 1.93 (s, s 3H, 6) ppm.



Monodisperses, sequenzkontrolliertes Glykooligomer **12**



Chemical Formula:  $C_{55}H_{92}N_{16}O_{24}$   
 Molecular Weight: 1361,43

Ausbeute 88%.

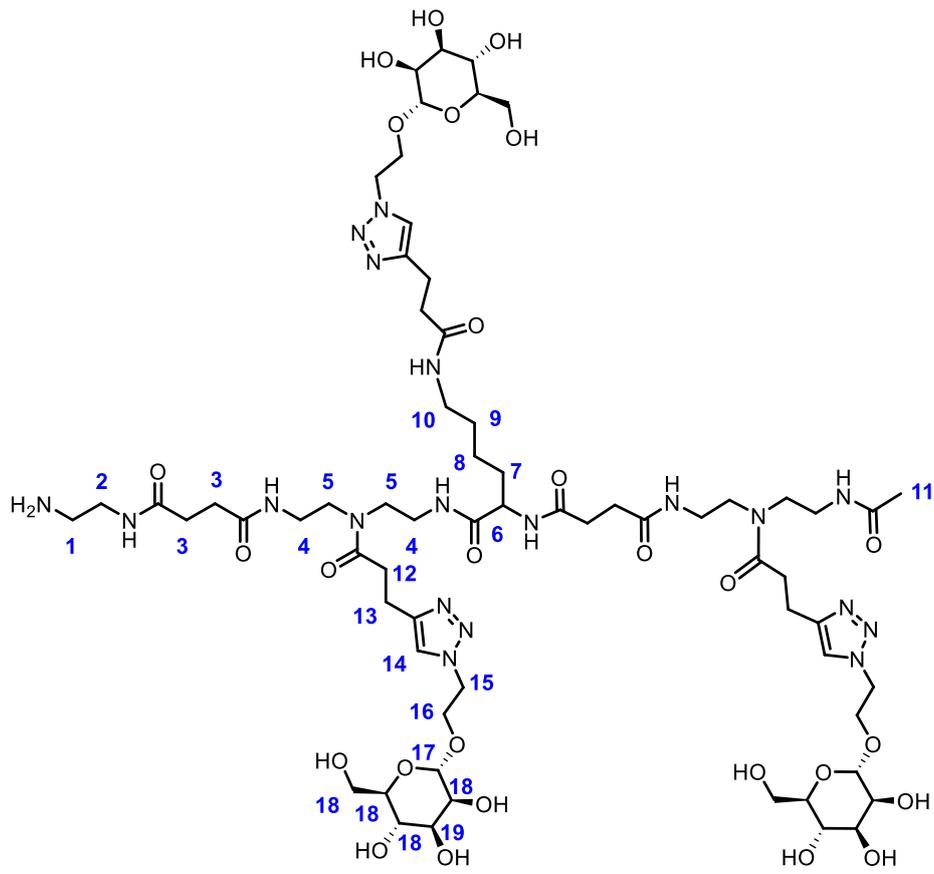
Reinheit: 99% (Integration des UV Signals  $\nu = 214$  nm).

RP-HPLC: (100% Eluenten A zu 100% Eluent B in 30 min bei 25°C):  $t_R = 7.00$  min.

HR-MS kalk. Für  $C_{55}H_{92}N_{16}O_{24}$   $[M+2H]^{2+}$  681.72, gefunden 681.33.

$^1H$ -NMR (600 MHz, in  $D_2O$ )  $\delta = 7.89 - 7.83$  (m, 3H, 12), 4.76 (m, 6H, 13), 4.14 (m, 1H, 5), 4.07, 3.92 (m, m, 6H, 14), 3.86 (m, 3H, 15), 3.77 - 3.57 (m, 15H, 16), 3.55 - 3.28 (m, 10H, 4, 9), 3.15 (t,  $J = 5.9$  Hz, 2H, 2), 3.10 (m, 2H, 1), 3.00 (m, 9H, 11, 17), 2.83 - 2.56 (m, 6H, 10), 2.52 (m, 4H, 3), 1.70, 1.57 (m, m, 2H, 6), 1.39 (m, 2H, 8), 1.17 (m, 2H, 7) ppm.

Monodisperses, sequenzkontrolliertes Glykooligomer **13**



Chemical Formula:  $C_{65}H_{109}N_{19}O_{27}$   
 Molecular Weight: 1588,69

Ausbeute 76%.

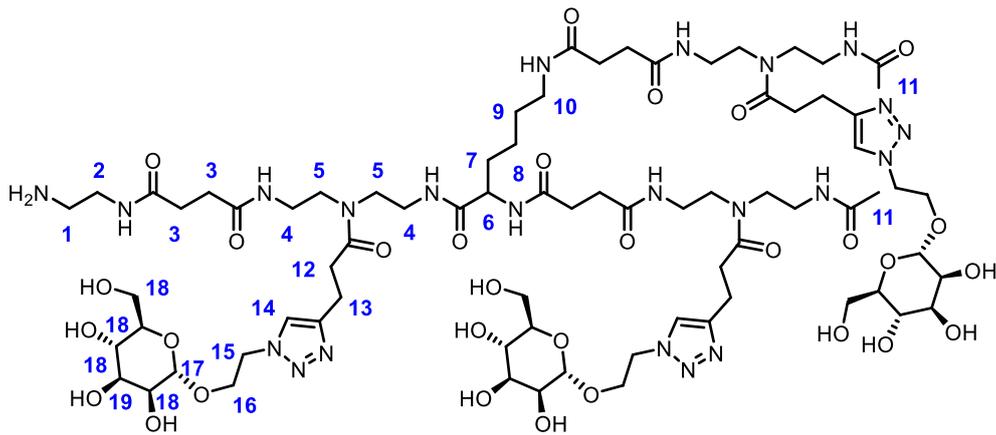
Reinheit: 97% (Integration des UV Signals  $\lambda = 214$  nm).

RP-HPLC: (100% Eluenten A zu 100% Eluent B in 30 min bei 25°C):  $t_R = 8.36$  min.

HR-MS kalk. für  $C_{65}H_{109}N_{19}O_{27}$   $[M+2H]^{2+}$  795.35, gefunden 794.89.

$^1H$ -NMR (600 MHz, in  $D_2O$ )  $\delta = 7.88, 7.87, 7.84$  (s, s, s, 3H, 14), 4.63 (m, 6H, 15), 3.15 (m, 1H, 6), 4.08, 3.92 (m, m, 6H, 16), 3.86 (m, 3H, 17), 3.76 - 3.57 (m, 15H, 18), 3.53 - 3.43 (m, 10H, 4, 10), 3.42 - 3.29 (m, 8H, 5), 3.15 (t,  $J = 5.9$  Hz, 2H, 2), 3.06 (m, 2H, 1), 3.06 - 2.94 (m, 7H, 13, 19), 2.79 (m, 6H, 12), 2.67 - 2.43 (m, 8H, 3), 1.94, 1.93 (s, s, 3H, 11), 1.74, 1.61 (m, m, 2H, 7), 1.42 (m, 2H, 9), 1.27 (m, 2H, 8) ppm.

Monodisperses, sequenzkontrolliertes Glykooligomer **14**



Chemical Formula:  $C_{75}H_{126}N_{22}O_{30}$   
 Molecular Weight: 1815,96

Ausbeute 77%.

Reinheit: 99% (Integration des UV Signals  $\lambda = 214$  nm).

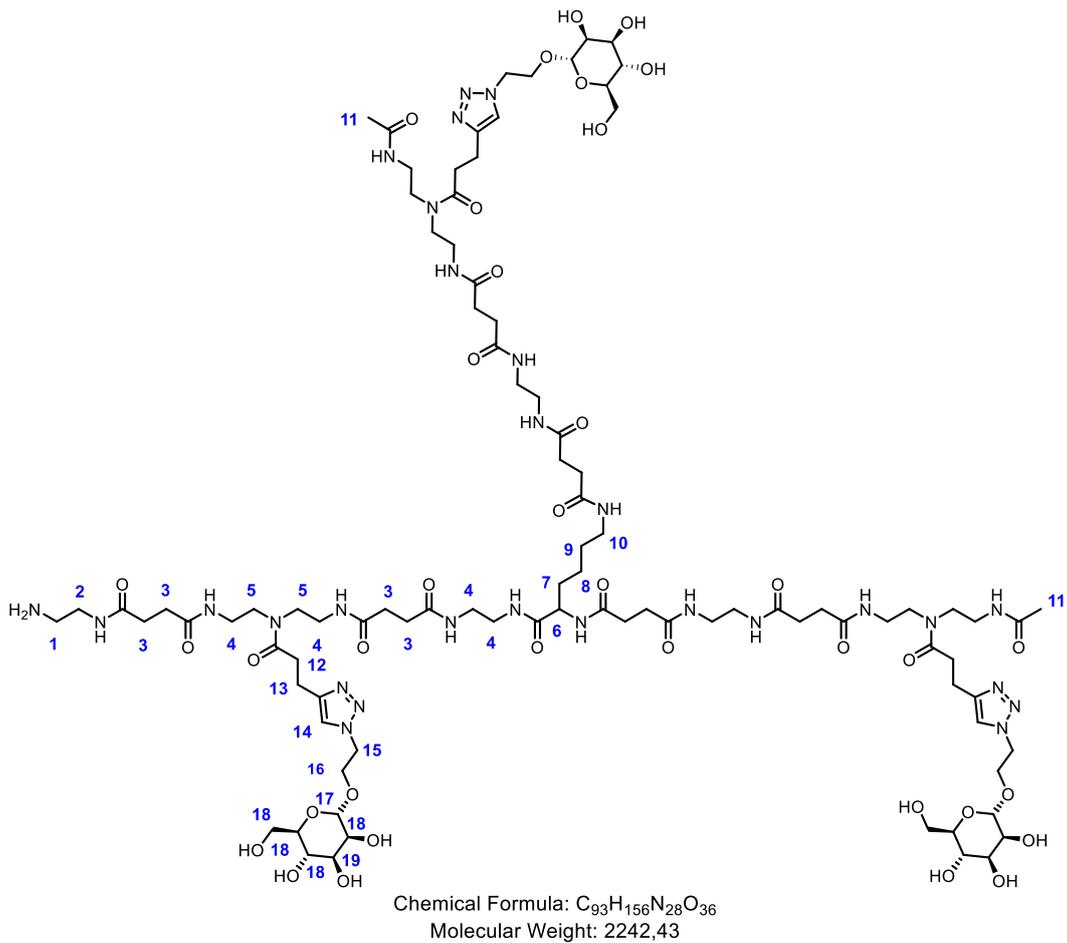
RP-HPLC: (100% Eluenten A zu 100% Eluent B in 30 min bei 25°C):  $t_R = 8.92$  min.

HR-MS kalk. für  $C_{75}H_{126}N_{22}O_{30}$   $[M+2H]^{2+}$  908.98, gefunden 908.46.

$^1H$ -NMR (600 MHz, in  $D_2O$ )  $\delta = 7.88, 7.87, 7.8$  (s, s, s, 3H, 14), 4.63 (m, 6H, 15), 4.17 (m, 1H, 6), 4.08, 3.92 (m, m, 6H, 16), 3.86 (m, 3H, 17), 3.79 - 3.55 (m, 15H, 18), 3.54 - 3.42 (m, 14H, 4, 10), 3.42 - 3.28 (m, 12H, 5), 3.14 (m, 2H, 2), 3.11 (m, 2H, 1), 3.06 - 2.95 (m, 9H, 13, 19), 2.80 (m, 6H, 12), 2.63 - 2.42 (m, 12H, 3), 1.94, 1.93 (s, s, 3H, 11), 1.75, 1.63 (m, m, 2H, 7), 1.47 (m, 2H, 9), 1.33 (m, 2H, 8) ppm.



Monodisperses, sequenzkontrolliertes Glykooligomer **16**



Ausbeute 56%.

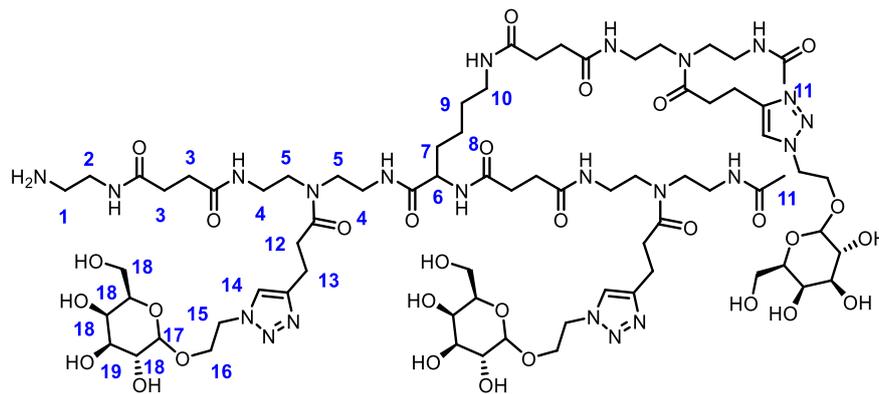
Reinheit: 99% (Integration des UV Signals  $\nu = 214$  nm).

RP-HPLC: (100% Eluenten A zu 100% Eluent B in 30 min bei 25°C):  $t_R = 9.29$  min.

HR-MS kalk. für  $C_{93}H_{156}N_{28}O_{39}$   $[M+3H]^{3+}$  748.48, gefunden 748.05.

$^1H$ -NMR (600 MHz, in  $D_2O$ )  $\delta = 7.88, 7.87, 7.87$  (s, s, s, 3H, 14), 4.63 (m, 6H, 15), 4.17 (m, 1H, 6), 4.09, 3.92 (m, m, 6H, 16), 3.86 (m, 3H, 17), 3.77 - 3.57 (m, 15H, 18), 3.53 - 3.44 (m, 14H, 4, 10), 3.40 - 3.25 (m, 24H, 4), 3.15 (m, 4H, 1, 2), 3.05 - 2.96 (m, 9H, 13, 19), 2.80 (m, 6H, 12), 2.61 - 2.42 (m, 24H, 3), 1.94, 1.93 (s, s, 6H, 11), 1.76, 1.67 (m, m, 2H, 7), 1.49 (m, 2H, 9), 1.35 (m, 2H, 8) ppm.

Monodisperses, sequenzkontrolliertes Glykooligomer **17**



Chemical Formula:  $C_{75}H_{126}N_{22}O_{30}$   
Molecular Weight: 1815,96

Ausbeute 70%.

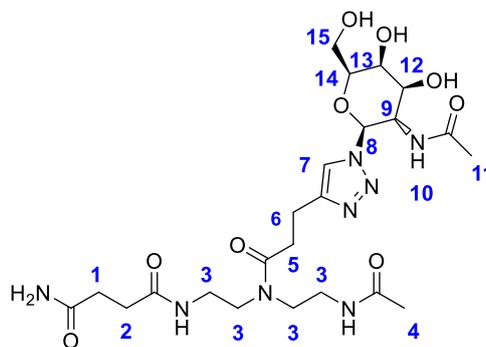
Reinheit: 98% (Integration des UV Signals  $\lambda = 214$  nm).

RP-HPLC: (100% Eluenten A zu 100% Eluent B in 30 min bei 25°C):  $t_R = 8.22 - 8.66$  min.

HR-MS kalk. für  $C_{75}H_{126}N_{22}O_{30}$   $[M+2H]^{2+}$  908.98, gefunden 908.46.

$^1H$ -NMR (600 MHz, in  $D_2O$ )  $\delta = 7.90$  (m, 3H, 14), 4.65 (m, 6H, 15), 4.42 – 3.97 (m, 10H, 6, 16, 17), 3.93 – 3.58 (m, 15H, 18), 3.56 – 3.223 (m, 28H, 2, 4, 5, 10), 3.15 (m, 5H, 1, 19), 3.00 (m, 6H, 13), 2.79 (m, 6H, 12), 2.63 – 2.41 (m, 12H, 3), 1.94, 1.92 (s, s, 3H, 11), 1.83 – 1.58 (m, m, 2H, 7), 1.47 (m, 2H, 9), 1.34 (m, 2H, 8) ppm. Nicht zuordnenbares Signal:  $\delta$  4.92 (s) ppm.

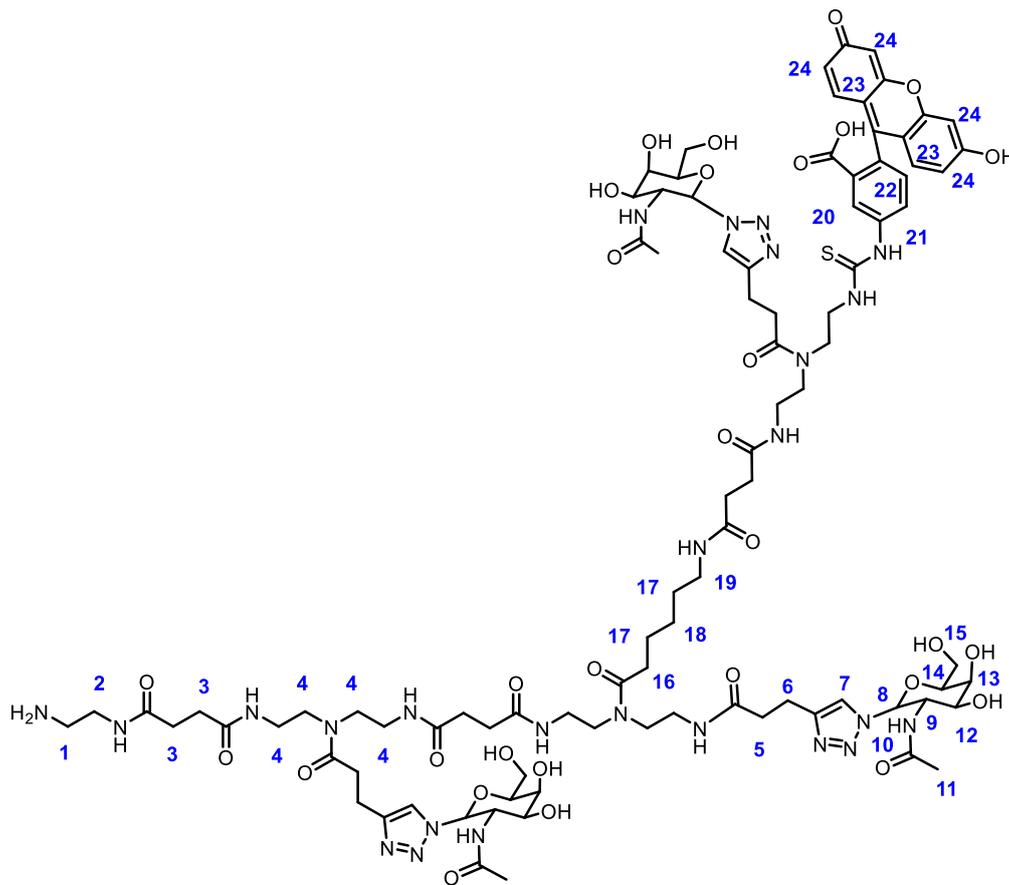
Monodisperses, sequenzkontrolliertes Glykooligomer **21**



Chemical Formula:  $C_{23}H_{38}N_8O_9$   
Molecular Weight: 570,60

$^1H$ -NMR (600 MHz, in  $D_2O$ )  $\delta = 8.09, 8.06$  (m, 1H, 7), 5.72, 5.69 (d,  $J = 9.7$  Hz, 1H, 8), 4.36 (t,  $J = 10.2$  Hz, 1H, 9), 4.09 – 4.04 (m, 1H, 10), 3.90 – 3.83 (m, 2H, 13, 14), 3.74 – 3.83 (m, 2H, 15), 3.48 – 3.22 (m, 9H, 3, 12), 3.03 – 2.91 (m, 2H, 6), 2.82 – 2.70 (m, 2H, 5), 2.54 – 2.39 (m, 4H, 1, 2), 1.90, 1.88, 1.79 (m, 6H, 4, 11) ppm. Nicht zuordnenbares Signal:  $\delta$  0.99 (s) ppm.

Monodisperses, sequenzkontrolliertes Glykooligomer **22**



Chemical Formula:  $C_{92}H_{129}N_{25}O_{30}S$   
 Molecular Weight: 2097,25

Ausbeute: 5.2%.

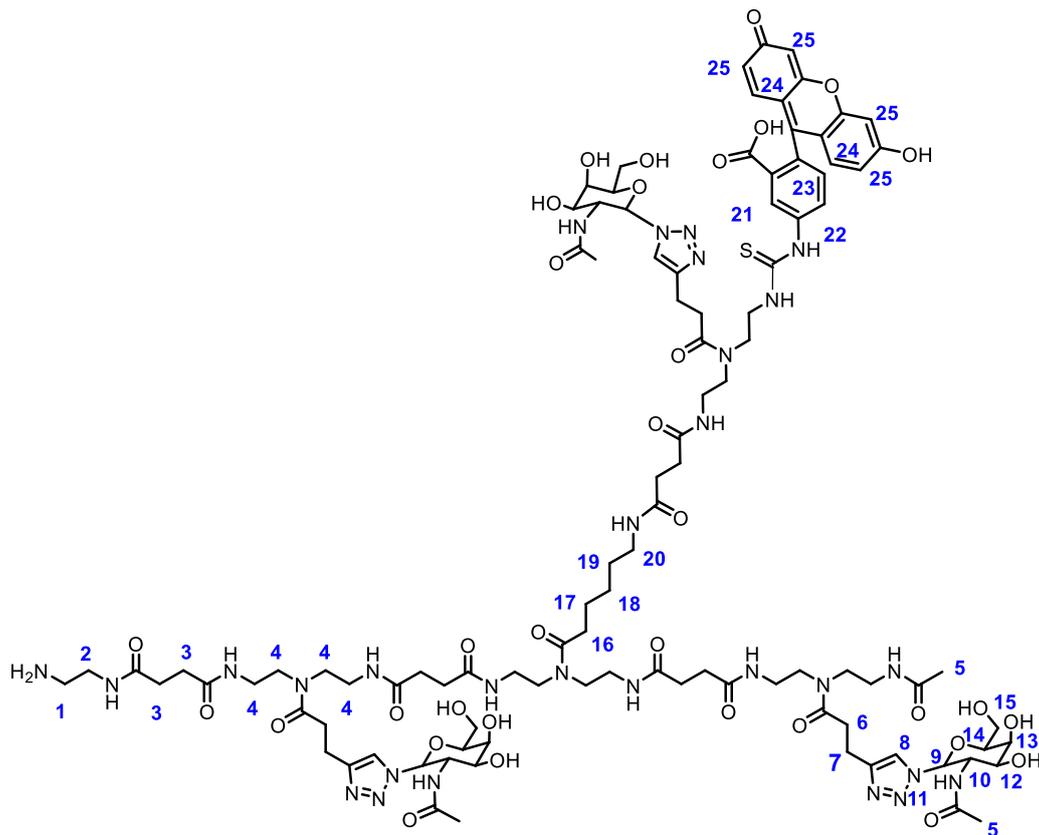
Reinheit: 95% (Integration des UV Signals  $\lambda = 214$  nm).

RP-HPLC: (100% Eluenten A zu 100% Eluent B in 30 min bei 25°C):  $t_R = 15.15$  min.

HR-MS kalk. für  $C_{92}H_{129}N_{25}O_{30}S [M+3H]^{3+}$  700.08, gefunden 699.64.

$^1H$ -NMR (600MHz,  $D_2O$ )  $\delta = 8.43$  (m, 1H, 20), 8.10 – 7.96 (m, 3H, 7), 7.92 – 7.78 (m, 1H, 21), 7.62 – 7.40 (m, 1H, 22), 7.00 – 6.86 (m, 2H, 23), 6.70 – 6.53 (m, 4H, 24), 5.77 – 5.64 (m, 3H, 8), 4.48 – 4.33 (m, 3H, 10), 4.12 – 4.06 (m, 3H, 9), 4.04 – 3.92 (m, 6H, 13, 14), 3.91 – 3.68 (m, 9H, 12, 15), 3.65 – 3.53 (m, 2H, 19), 3.51 – 3.21 (m, 24H, 4), 3.13 (t,  $J = 5.9$ , 2H, 2), 3.11 – 3.04 (m, 2H, 1), 3.01 – 2.88 (m, 6H, 6), 2.87 – 2.82 (m, 2H, 16), 2.78 – 2.67 (m, 3H, 5), 2.57 – 2.34 (m, 15H, 3, 5), 2.32 – 2.22 (m, 2H, 16), 1.81, 1.79, 1.77 (s, s, s, 9H, 11), 1.52 – 1.36 (m, 4H, 17), 1.27 – 1.16 (m, 2H, 18) ppm. Nicht zuordnenbare Signale:  $\delta$  6.80 – 6.61 (m) ppm. 8.43 (s), 7.05 (m).

Monodisperses, sequenzkontrolliertes Glykooligomer **23**



Chemical Formula:  $C_{102}H_{146}N_{28}O_{33}S$   
 Molecular Weight: 2324,51

Ausbeute: 7.5%.

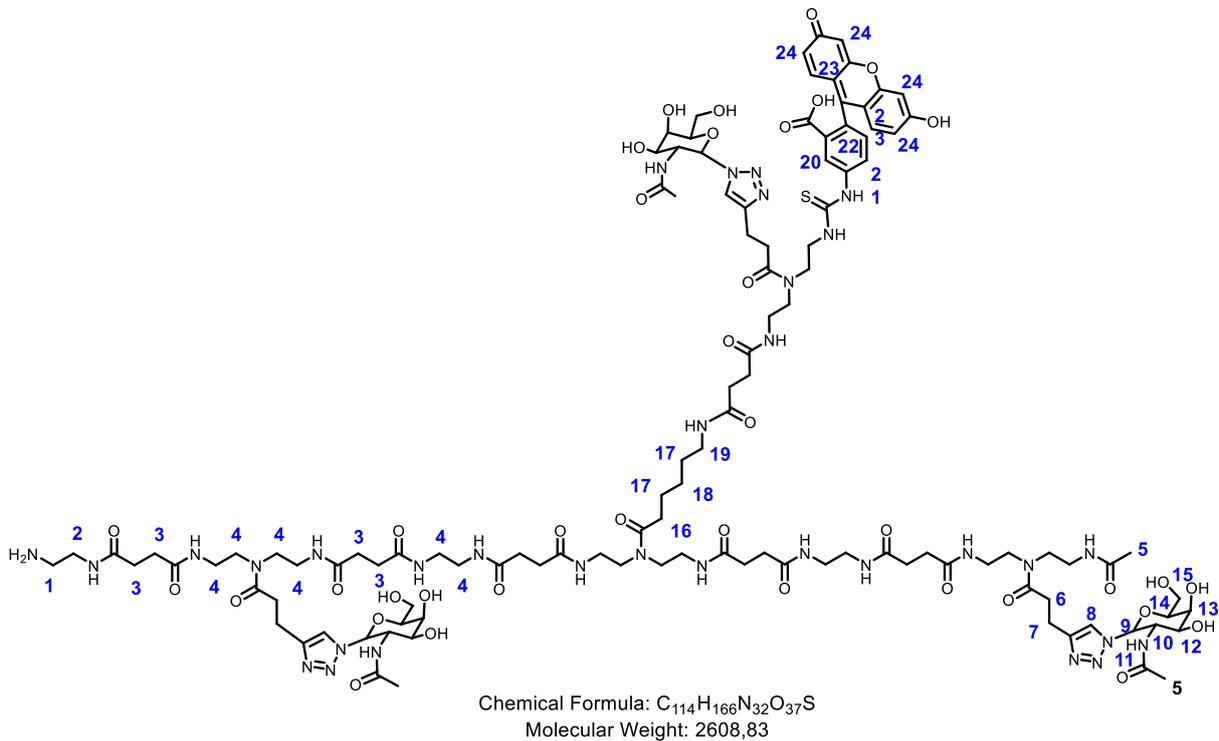
Reinheit: 90% (Integration des UV Signals  $\lambda = 214$  nm).

RP-HPLC: (100% Eluenten A zu 100% Eluent B in 30 min bei 25°C):  $t_R = 15.27$  min.

HR-MS kalk. für  $C_{102}H_{146}N_{28}O_{33}S [M+3H]^{3+}$  775.83, gefunden 775.69.

$^1H$ -NMR (600MHz,  $D_2O$ )  $\delta = 8.42$  (m, 1H, 21), 8.10 – 7.96 (m, 3H, 8), 7.90 – 7.81 (m, 1H, 22), 7.23 – 7.11 (m, 1H, 23), 7.09 – 6.94 (m, 2H, 24), 6.70 – 6.53 (m, 4H, 25), 5.77 – 5.62 (m, 3H, 9), 4.47 – 4.34 (m, 3H, 11), 4.15 – 4.06 (m, 3H, 10), 4.04 – 3.92 (m, 6H, 13, 14), 3.90 – 3.70 (m, 9H, 12, 15), 3.65 – 3.56 (m, 2H, 20), 3.53 – 3.24 (m, 32H, 4), 3.13 (t,  $J = 5.9$ , 2H, 2), 3.10 – 3.05 (m, 2H, 1), 3.04 – 2.91 (m, 6H, 7), 2.89 – 2.70 (m, 6H, 6), 2.53 – 2.37 (m, 16H, 3), 2.32 – 2.25 (m, 2H, 16), 1.92, 1.91, 1.81, 1.77 (s, s, s, s 12H, 5), 1.51 – 1.44 (m, 2H, 19), 1.43 – 1.37 (m, 2H, 17), 1.26 – 1.18 (m, 2H, 18) ppm. Nicht zuordnenbares Signal:  $\delta$  6.80 – 6.61 (m) ppm.

Monodisperses, sequenzkontrolliertes Glykooligomer **24**



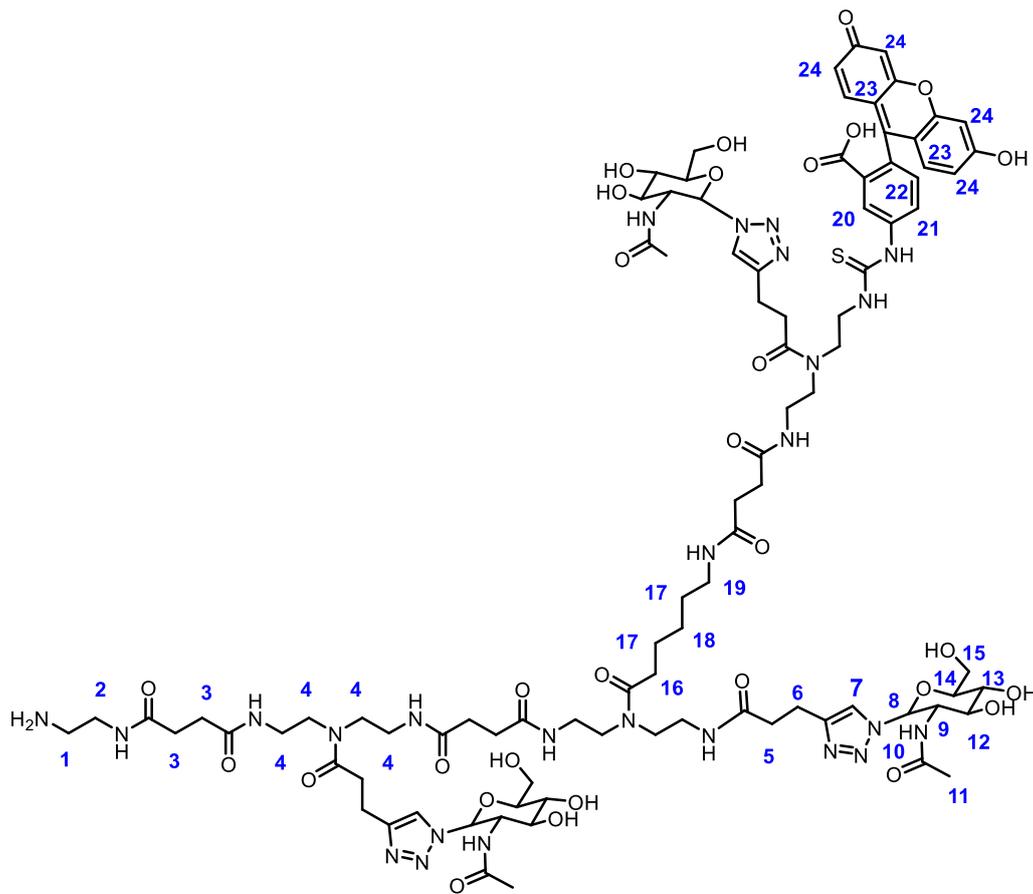
Ausbeute: 1.2%.

Reinheit: 95% (Integration des UV Signals  $\lambda = 214$  nm).

RP-HPLC: (100% Eluenten A zu 100% Eluent B in 30 min bei 25°C):  $t_R = 14.20$  min.

ESI kalk. für  $C_{114}H_{166}N_{32}O_{37}S^5 [M+2H]^{2+}$  1305.4, gefunden 1305.5.

$^1H$ -NMR (600MHz,  $D_2O$ )  $\delta = 8.18 - 7.8$  (m, 4H, 8, 20), 7.73 - 7.48 (m, 1H, 21), 7.22 - 7.01 (m, 1H, 22), 6.95 - 6.74 (m, 4H, 24), 6.72 - 6.50 (m, 2H, 23), 5.85 - 5.59 (m, 3H, 9), 4.49 - 4.34 (m, 3H, 11), 4.16 - 4.06 (m, 3H, 10), 4.03 - 3.60 (m, 15H, 12 - 15), 3.55 - 3.19 (m, 42H, 4, 19), 3.17 - 3.12 (m, 2H, 1), 3.10 - 3.03 (m, 2H, 2), 3.02 - 2.88 (m, 6H, 7), 2.84 - 2.68 (m, 6H, 6), 2.56 - 2.36 (m, 24H, 3), 2.29 - 2.18 (m, 2H, 16), 1.92, 1.91, 1.82, 1.80, 1.77 (s, s, s, s, s 12H, 5), 1.50 - 1.30 (m, 4H, 17), 1.28 - 1.12 (m, 2H, 18) ppm. Nicht zuordnenbares Signal:  $\delta$  0.94 (m) ppm.

Monodisperses, sequenzkontrolliertes Glykooligomer **25**

Chemical Formula:  $C_{92}H_{129}N_{25}O_{30}S$   
Molecular Weight: 2097,25

Ausbeute: 17%.

Reinheit: 91% (Integration des UV Signals  $\lambda = 214$  nm).

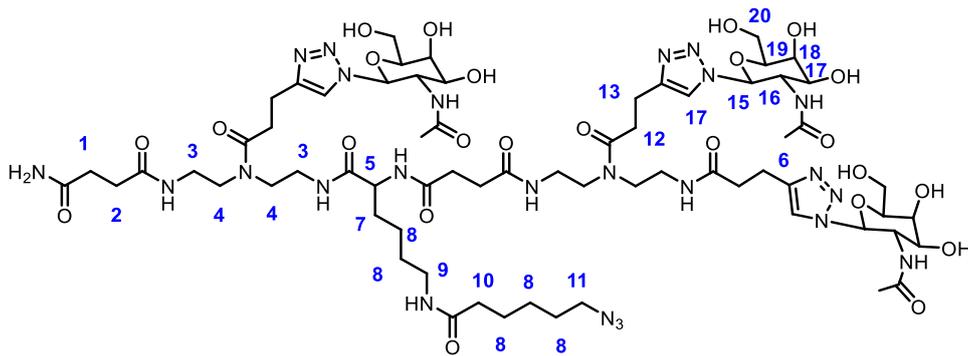
RP-HPLC: (100% Eluenten A zu 100% Eluent B in 30 min bei 25°C):  $t_R = 14.34$  min.

HR-MS kalk. für  $C_{92}H_{129}N_{25}O_{30}S [M+3H]^{3+}$  700.08, gefunden 699.64.

$^1H$ -NMR (600 MHz,  $D_2O$ )  $\delta = 8.05 - 7.83$  (m, 4H, 7, 20),  $7.66 - 7.47$  (m, 1H, 21),  $7.00 - 6.83$  (m, 1H, 22),  $6.77 - 6.58$  (m, 4H, 24),  $6.55 - 6.38$  (m, 2H, 23),  $5.84 - 5.67$  (m, 3H, 8),  $4.29 - 4.14$  (m, 3H, 10),  $3.99 - 3.60$  (m, 18H, 9, 12 - 15),  $3.59 - 3.18$  (m, 26H, 4, 19),  $3.14$  (t,  $J = 5.9$  Hz, 2H, 2),  $3.08 - 2.98$  (m, 2H, 1),  $2.97 - 2.82$  (m, 6H, 6),  $2.80 - 2.66$  (m, 3H, 5),  $2.62 - 2.31$  (m, 15H, 3, 5),  $2.30 - 2.13$  (m, 2H, 16), 1.80, 1.78, 1.76 (s, s, s, 9H, 11),  $1.49 - 1.30$  (m, 4H, 17),  $1.24 - 1.11$  (m, 2H, 18) ppm.



Monodisperses, sequenzkontrolliertes Glykooligomer **28**



Chemical Formula:  $C_{67}H_{108}N_{24}O_{24}$

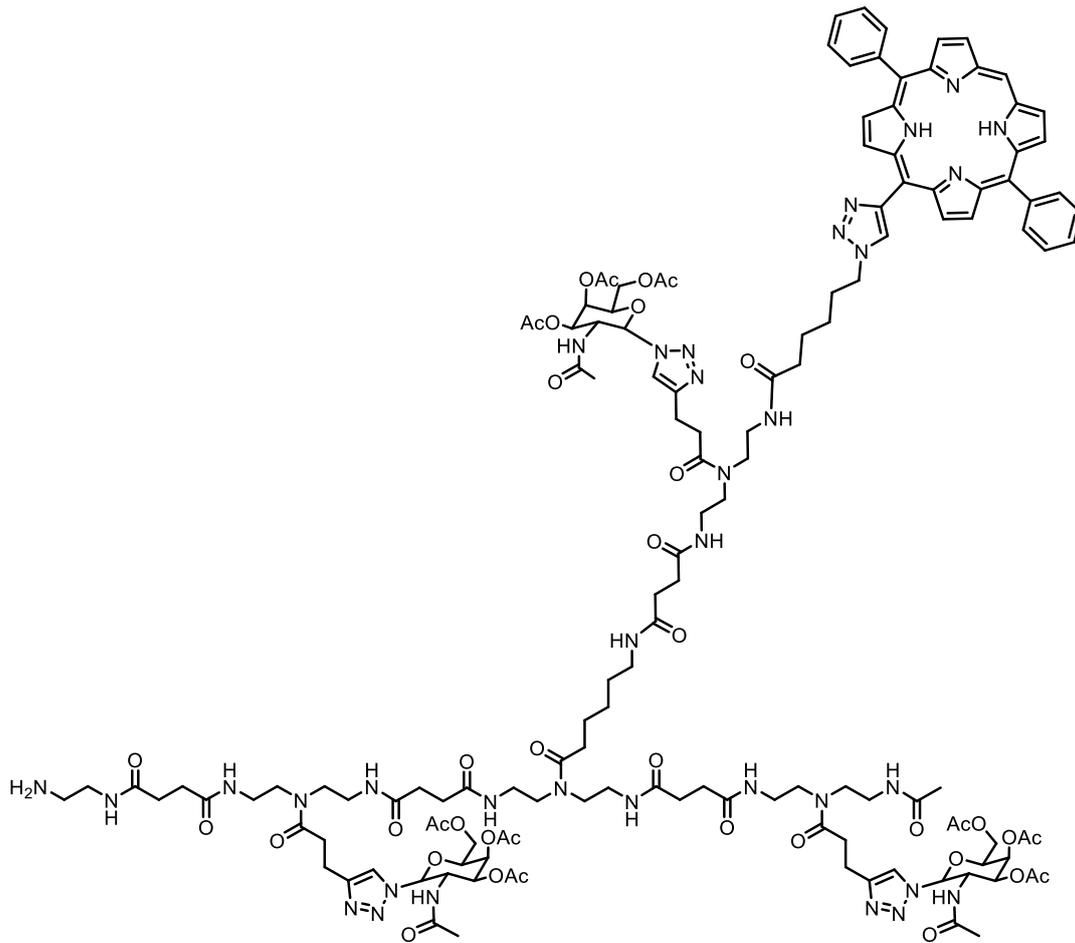
Molecular Weight: 1633,75

Reinheit: 96% ( $^1H$ -NMR Spektroskopie).

HR-MS kalk. für  $C_{67}H_{108}N_{24}O_{24}$   $[M+Na]^+$  1655.78, gefunden 1655.78.

$^1H$ -NMR (400 MHz, in  $D_2O$ )  $\delta$  = 8.09 - 8.00 (m, 3H, 14), 5.75 - 5.65 (m, 3H, 15), 4.44 - 4.31 (m, 3H, 16), 4.18 - 4.04 (m, 4H, 5, 19), 4.01 - 3.90 (m, 6H, 17, 18), 3.83 - 3.73 (m, 6H, 20), 3.50 - 3.21 (m, 20H, m, 3, 4, 9, 11), 3.16 - 3.05 (m, 2H, 7), 3.01 - 2.87 (m, 6H, 13), 2.81 - 2.67 (m, 3H, 12), 2.59 - 2.37 (m, 11H, 1, 2, 12), 2.23 - 2.13 (m, 2H, 10), 1.84 - 1.74 (m, 9H, 6), 1.64 - 1.22 (m, 10H, 8) ppm Nicht zuordnenbare Signale:  $\delta$  1.01 (m) ppm.

Monodisperses, sequenzkontrolliertes Glykooligomer **31**



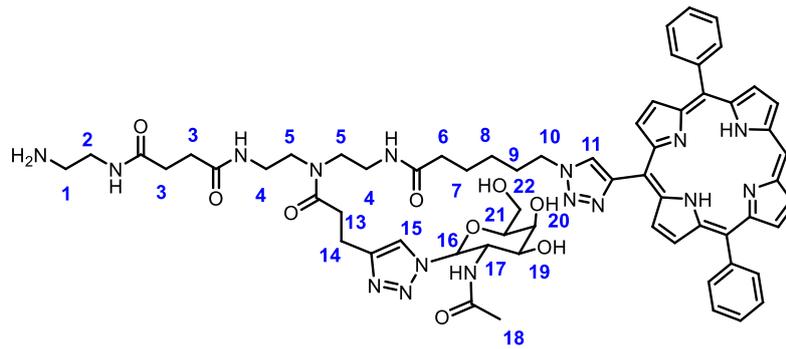
Chemical Formula:  
 $C_{139}H_{184}N_{34}O_{38}$   
 Molecular Weight: 2939,20

Reinheit: 16% (Integration des UV Signals  $\lambda = 214$  nm).

RP-HPLC: (100% Eluenten A zu 100% Eluent B in 17 min bei 25°C):  $t_R = 12.27$  min.

HR-MS kalk. für  $C_{139}H_{184}N_{34}O_{38}$   $[M+3H]^{3+}$  980.7, gefunden 980.4

Monodisperses, sequenzkontrolliertes Glykooligomer **32**



Chemical Formula:  $C_{63}H_{72}N_{16}O_9$   
 Molecular Weight: 1197,37

**12 Für Phorphyrin Signale**

Ausbeute 18%.

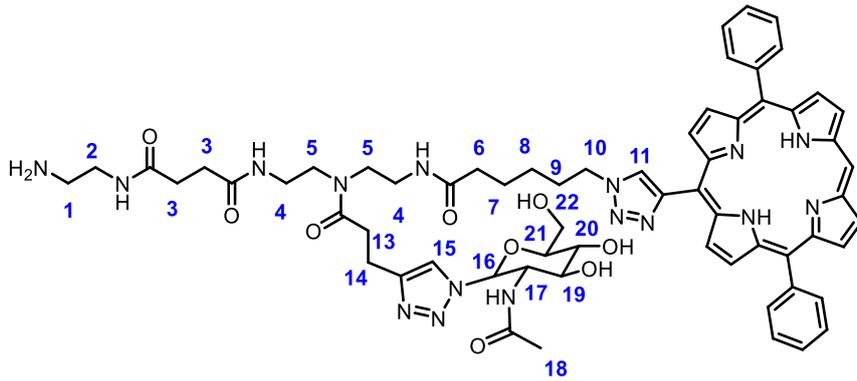
Reinheit: 91% (Integration des UV Signals  $\lambda = 214$  nm).

RP-HPLC: (100% Eluenten A zu 100% Eluent B in 30 min bei 25°C):  $t_R = 18.90$  min.

HR-MS kalk. für  $C_{63}H_{72}N_{16}O_9$   $[M+2H]^{2+}$  599.69, gefunden 599.29.

$^1H$ -NMR (300MHz, MeOH)  $\delta = 10.20$  (s, 1H, 12), 9.29, 9.27 (s, s, 1H, 12), 9.03 – 8.76 (m, 6H, 12), 8.56 (s, 1H, 12), 8.12, 8.10 (s, s, 4H, 12, 15), 7.86 – 7.64 (m, 7H, 12), 5.53, 5.51, 5.49, 5.48 (dd,  $J = 9.8$ Hz, 5.1Hz, 1H, 16), 4.71 – 4.61 (m, 2H, 17, 21), 4.44 – 4.29 (m, 1H, 19), 3.86, 3.85, 3.83, 3.82 (dd,  $J = 8.9$ Hz, 2.7Hz, 1H, 20), 3.72 – 3.55 (m, 4H, 22, 10), 3.36 – 3.15 (m, 4H, 5), 3.15 – 3.01 (m, 2H, 4), 2.96 – 2.81 (m, 4H, 2, 4), 2.80 – 2.65 (m, 2H, 1), 2.60 – 2.50, 2.39 – 2.25 (m, m, 2H, 14), 2.25 – 1.99 (m, 8H, 3, 6, 13), 1.75 – 1.63 (m, 2H, 9), 1.61, 1.60 (s, s, 3H, 18), 1.53 – 1.37 (m, 2H, 7), 1.33 – 0.71 (m, 2H, 8) ppm. Nicht zuordnenbares Signal:  $\delta$  9.29 – 9.27 (s, s), 3.54 – 3.43 (m) ppm.

Monodisperses, sequenzkontrolliertes Glykooligomer **33**



Chemical Formula:  $C_{63}H_{72}N_{16}O_9$   
 Molecular Weight: 1197,37

12 Für Porphyrin Signale

Ausbeute: 32%.

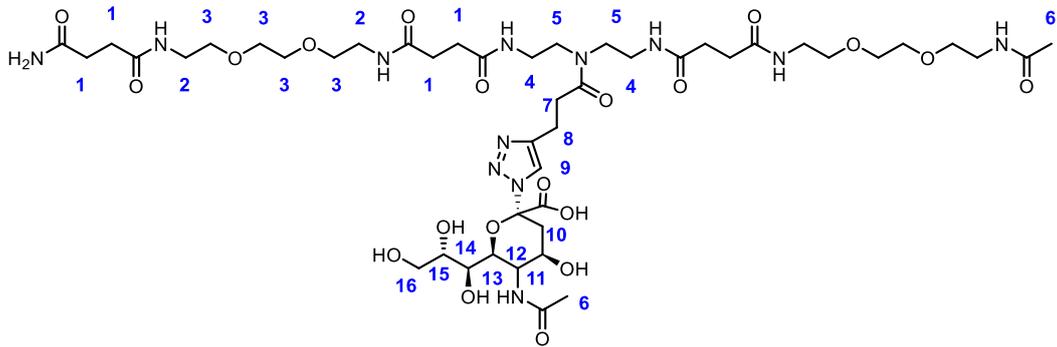
Reinheit: 95% (Integration des UV Signals  $\lambda = 214$  nm).

RP-HPLC: (100% Eluenten A zu 100% Eluent B in 30 min bei 25°C):  $t_R = 18.02$  min.

HR-MS kalk. für  $C_{63}H_{72}N_{16}O_9$   $[M+H]^+$  1198.37, gefunden 1197.57.

$^1H$ -NMR (600 MHz, MeOH)  $\delta = 10.13$  (s, 1H, 12), 9.23 (s, 1H, 12), 8.93 – 8.73 (m, 6H, 12), 8.54 – 8.43 (m, 1H, 12), 8.15 – 8.02 (m, 4H, 12, 15), 7.83 – 7.65 (m, 7H, 12), 5.56, 5.54 (dd,  $J = 9.8$ Hz, 2.3 Hz, 1H, 16), 4.66 – 4.57 (m, 2H, 17, 21), 4.13 – 4.00 (m, 1H, 19), 3.74 – 3.66 (m, 1H, 20), 3.62 – 3.49 (m, 2H, 22), 3.44 – 3.36 (m, 2H, 10), 3.31 – 3.15 (m, 4H, 5), 3.15 – 2.889 (m, 4H, 4), 2.89 – 2.82 (m, 2H, 2), 2.79 – 2.66 (m, 2H, 1), 2.62 – 2.47, 2.41 – 2.27 (m, m, 2H, 14), 2.23 – 2.00 (m, 8H, 3, 6, 13), 1.72 – 1.63 (m, 2H, 9), 1.61, 1.60 (s, s, 3H, 18), 1.49 – 1.33 (m, 2H, 7), 1.30 – 0.65 (m, 2H, 8) ppm. Nicht zuordnenbares Signal:  $\delta$  8.47 (s), 7.32 (s) ppm.

Monodisperses, sequenzkontrolliertes Glykooligomer **34**



Chemical Formula:  $C_{46}H_{78}N_{12}O_{20}$   
 Molecular Weight: 1119,19

Ausbeute 20%.

Reinheit: 99% (Integration des UV Signals  $\nu = 214$  nm).

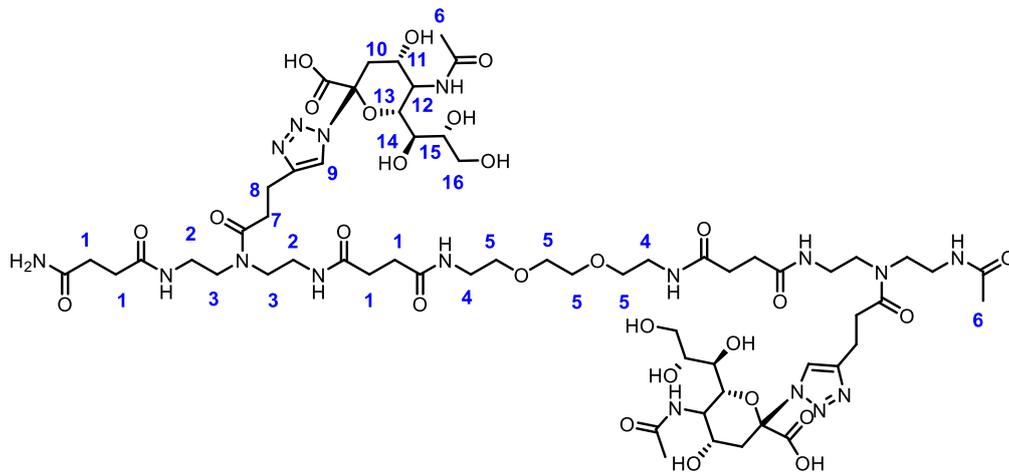
RP-HPLC: (100% Eluenten A zu 100% Eluent B in 30 min bei 25°C):  $t_R = 14.8$  min.

ESI kalk. für  $C_{46}H_{79}N_{12}O_{20}$   $[M-H]^-$  1118.2, gefunden 1117.4

$^1H$ -NMR (600 MHz,  $D_2O$ )  $\delta = 8.06$  (s, 1H, 9), 4.02 – 3.93 (m, 3H, 11, 12, 13), 3.90 – 3.84 (m, 2H, 16), 3.63 – 3.58 (m, 18H, 3, 10), 3.44 (m, 4H, 4), 3.37 (m, 8H, 2), 3.33 (m, 4H, 5), 3.26 (m, 1H, 14), 3.03 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H, 8), 2.79 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H, 7), 2.58 – 2.43 (m, 12H, 1), 2.23 (m, 1H, 15), 2.06, 1.99, (s, 6H, 6) ppm.

Nicht zuordnenbares Signale:  $\delta = 2.67$  (t) ppm.

Monodisperses, sequenzkontrolliertes Glykooligomer **35**



Chemical Formula:  $C_{60}H_{97}N_{17}O_{27}$   
 Molecular Weight: 1488,53

Ausbeute: 19%.

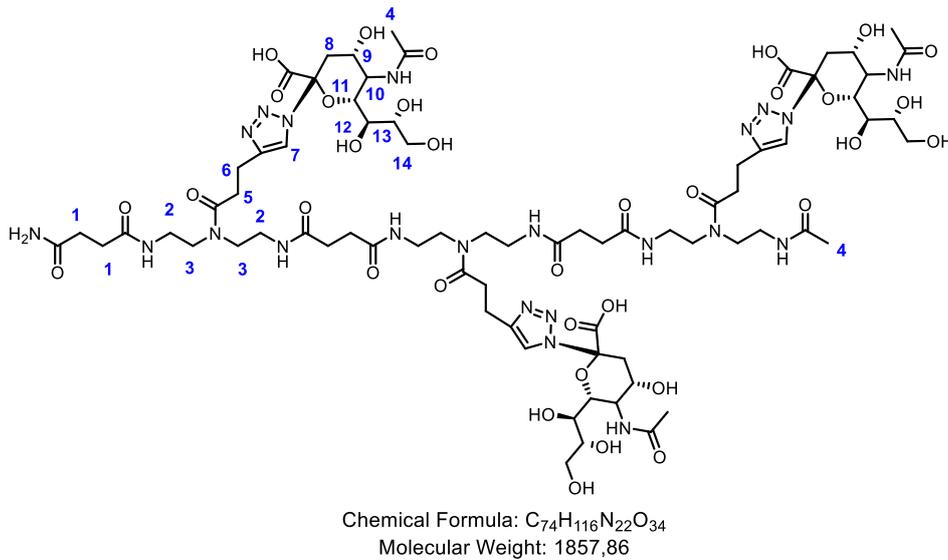
Reinheit: 99% (Integration des UV Signals  $\lambda = 214$  nm).

RP-HPLC: (100% Eluenten A zu 100% Eluent B in 30 min bei 25°C):  $t_R = 18.36$  min.

ESI kalk. für  $C_{60}H_{97}N_{17}O_{27}$  [M-H]<sup>-</sup> 1487.5, gefunden 1487.2.

<sup>1</sup>H-NMR (600MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta = 8.08, 8.05$  (s, s, 2H, 9), 4.01 – 3.94 (m, 6H, 11-13), 3.89 – 3.83 (m, 4H, 16), 3.69 – 3.62 (m, 8H, 5), 3.61 – 3.58 (m, 4H, 10), 3.50 – 3.40 (m, 8H, 3), 3.40 – 3.29 (m, 12H, 2, 4), 3.28 – 3.23 (m, 2H, 14), 3.03 (m, 4H, 8), 2.79 (m, 4H, 7), 2.56 – 2.43 (m, 12H, 1), 2.23 (t,  $J = 11.6$  Hz, 2H, 15), 2.09, 2.06, 1.93, 1.90 (s, s, s, s, 12H, 6) ppm. Nicht zuordnenbare Signale:  $\delta = 7.91$  (s), 7.90 (s), 7.89 (s), 5.26 (d), 4.07 (m), 4.06 (m), 3.64 (m), 3.08 (t), 2.84 (m), 2.68 – 2.58 (m), 2.14 (s), 2.10 (s), 1.43, 1.42 (d), 1.25 (t) ppm.

Monodisperses, sequenzkontrolliertes Glykooligomer **36**



Ausbeute: 11%.

Reinheit: 99% (Integration des UV Signals  $\lambda = 214$  nm).

RP-HPLC: (100% Eluenten A zu 100% Eluent B in 30 min bei 25°C):  $t_R = 20.85$  min.

ESI kalk. für C<sub>74</sub>H<sub>116</sub>N<sub>22</sub>O<sub>34</sub> [M-2H]<sup>2-</sup> 927.5, gefunden 927.5.

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta = 8.13$  (s, 3H, 7), 4.01 (m, 9H, 9-11.), 3.85 (m, 6H, 14), 3.66 – 3.60 (m, 6H, 8), 3.42 (m, 12H, 3), 3.30 (m, 15H, 2, 12), 3.02 (m, 6H, 6), 2.77 (m, 6H, 5), 2.55 (m, 12H, 1), 2.23 (m, 3H, 13) 2.0 – 1.86, (m, 12H, 4) ppm.

## 5.4. Bindungsstudien zwischen monodispersen, sequenzkontrollierten Glykooligomeren und Lektinen

### 5.4.1. SPR Experimente von monodispersen, sequenzdefinierten Glykooligomeren mit Langerin und Con A

#### 5.4.1.1. Immobilisation von monodispersen, sequenzdefinierten Glykooligomeren auf den SPR-Chips C1

Die monodispersen, sequenzdefinierten Glykooligomere **7**, **12** und **13** wurden auf die jeweiligen Flusszellen eines SPR-Chips C1 immobilisiert. Als Negativkontrolle wurde das monodisperse, sequenzdefinierte Glykooligomere **17** auf die Referenzzelle immobilisiert. Für die Immobilisation wurde das Standardkupplungsprotokoll des *Wizard Template* verwendet. Hierfür wurde eine 0.1 M Lösung in MilliQ Wasser der jeweiligen Glykooligomere **7**, **12**, **13** und **17** auf eine finale 1 mM Lösung

mit dem HBS Puffer (pH 7.4 GE Healthcare) verdünnt. Als *running* Puffer wurde HBS-P+ Puffer (pH 7.4, GE Healthcare) verwendet und eine Kontaktzeit von 600 s wurde gewählt. EDC, NHS, Ethanolamin und 1 M Natriumhydroxidlösung wurden nach den Vorgaben des Herstellers verwendet.

Tabelle 5: Überblick der SPR Response Units der C1 Chips, C1.1 mit immobilisiertem Glykooligomer **12**, C1.2 mit immobilisiertem Glykooligomer **13**, C1.3 mit immobilisiertem Glykooligomer **7**, Referenzzelle mit immobilisiertem Glykooligomer **17**.

Chip	C1.1		C1. 2		C1.3	
Struktur	<b>17</b>	<b>12</b>	<b>17</b>	<b>13</b>	<b>17</b>	<b>7</b>
Response final (RU)	83.8	79.5	47.5	46.0	47.2	74.4

Nach der Immobilisation wurden die jeweiligen Chips 1.1-1.3 erst nach einem Waschvorgang von 10 h im *standby* Fluss verwendet.

#### 5.4.1.2. Direct binding Studien mit den immobilisierten Glykooligomeren 7, 12 und 13 auf den SPR-Chips C1 mit Langerin und Con A

Sofern ein Chip-Wechsel stattgefunden hatte, wurden die jeweiligen Chips mit HBS Puffer für Langerin und LBB Puffer für Con A für 6 h gewaschen. SPR *direct binding* Studien wurden mit dem *Wizard Template* für *kinetics/affinity* durchgeführt. Ein *single cycle kinetic run* mit einer Flussrate von 30  $\mu$ l/min und einer Kontaktzeit von 60 s wurde verwendet. Die Dissoziationszeit wurde mit 60 s gewählt. Die Regeneration wurde mit fünfmal für 60 s für Langerin und dreimal für 60 s für Con A (2.5 M NaCl + 1.6 M Methyl- $\alpha$ -D-Man) ausgewählt. Die *equilibrium response* wurde 4 s vor dem Injektionsstop als Funktion der Liganden Konzentration unter Verwendung des Fittingmodells *steady state* bestimmt, wodurch die apparenten Dissoziationskonstanten  $K_D$  ermittelt worden sind.

Konzentration Langerin [ $\mu$ M]: 21.02; 7.01; 2.34; 0.78; 0.26; 0.09.

Konzentration Con A [ $\mu$ M]: 10.03; 3.34; 1.11; 0.37; 0.12.

Tabelle 6.: Apparente  $K_D$  der SPR *direct binding* Studie mit Langerin und Con A unter Verwendung des C1 Chips, C1.1 mit immobilisierten Glykooligomer **12**, C1.2 mit immobilisiertem Glykooligomer **13**, C1.3 mit immobilisiertem Glykooligomer **7**, Referenzzelle mit immobilisiertem Glykooligomer **17**.

Chip	C1.1 mit <b>12</b> <sup>1</sup>	C1.2 mit <b>13</b>	C1.3 mit <b>7</b>
$K_D$ [ $\mu$ M] Langerin	1.456 $\pm$ 0.015	0.896 $\pm$ 0.013	7.180 $\pm$ 0.074
$K_D$ [ $\mu$ M] Con A	0.752 $\pm$ 0.038	0.660 $\pm$ 0.029	0.938 $\pm$ 0.056

<sup>1</sup>Das Experiment wurde nach fünf Tagen für Con A zur Überprüfung der Aktivität des Chips und des jeweiligen Proteins wiederholt. Die Wiederholungsexperimente zeigten vergleichbare Werte, sodass eine Chipstabilität und eine konstante Proteinaktivität für Con A angenommen wurden. Für Langerin zeigt das

Wiederholungsexperiment einen 10%igen Aktivitätsverlust nach 17 Tagen. Mit einer neuen Charge von Langerin konnten vergleichbare Werte ermittelt werden, was auf eine Chipstabilität hinweist.

Alle apparenten  $K_D$  Werte wurden aus einem Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten, die in Dublikatmessungen durchgeführt worden sind, gebildet. Ausnahmen bildet Chip C1.2 mit Langerin. Dieser apparente  $K_D$  Wert wurde aus einem Mittelwert von zwei unabhängigen Experimenten, die in Dublikatmessungen durchgeführt worden sind, gebildet. **17** zeigt als Negativkontrolle keine Bindung zu den beiden getesteten Proteinen.

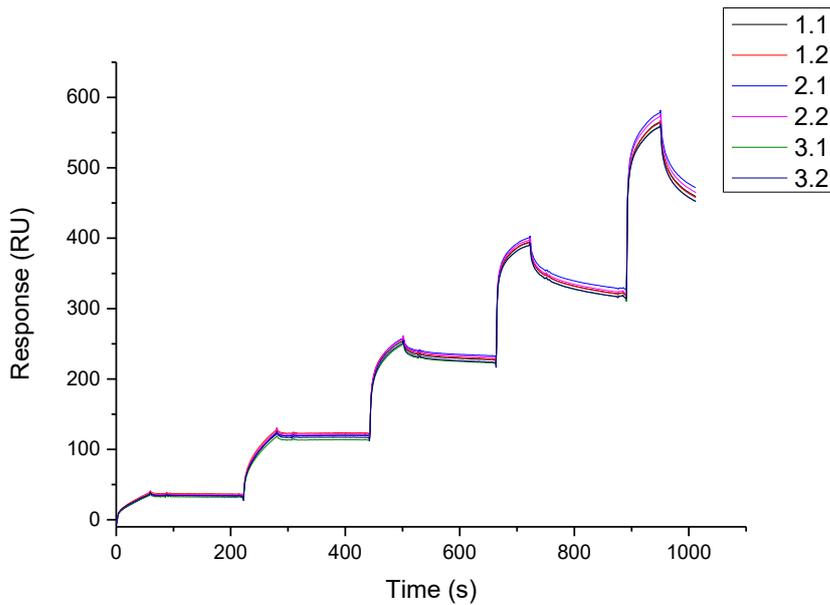


Abbildung 30: Sensogramm, SPR direct binding Studien mit SPR-Chip C1.1 mit immobilisiertem Glykooligomer **12** und Langerin.

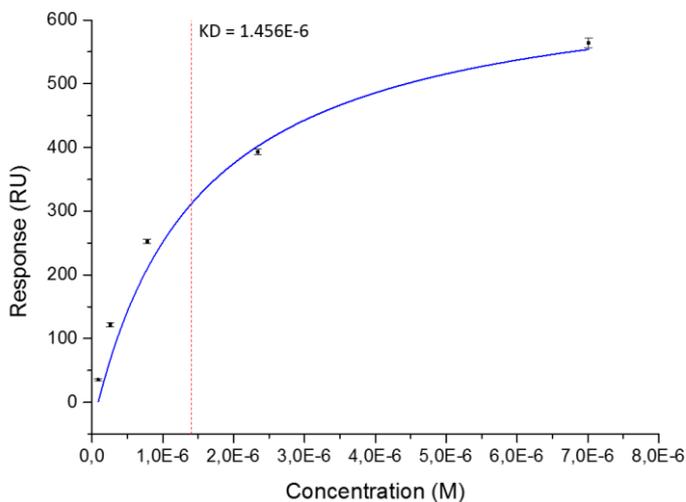


Abbildung 31:  $K_D$  Bestimmung mittels steady state Fittingmodels, SPR direct binding Studien mit SPR-Chip C1.1 mit immobilisiertem Glykooligomer **12** und Langerin ( $c = 21.02; 7.01; 2.34; 0.78; 0.26; 0.09 \mu\text{M}$ ). Die Standardabweichung wird für jeden Datenpunkt als Fehlerbalken gezeigt.

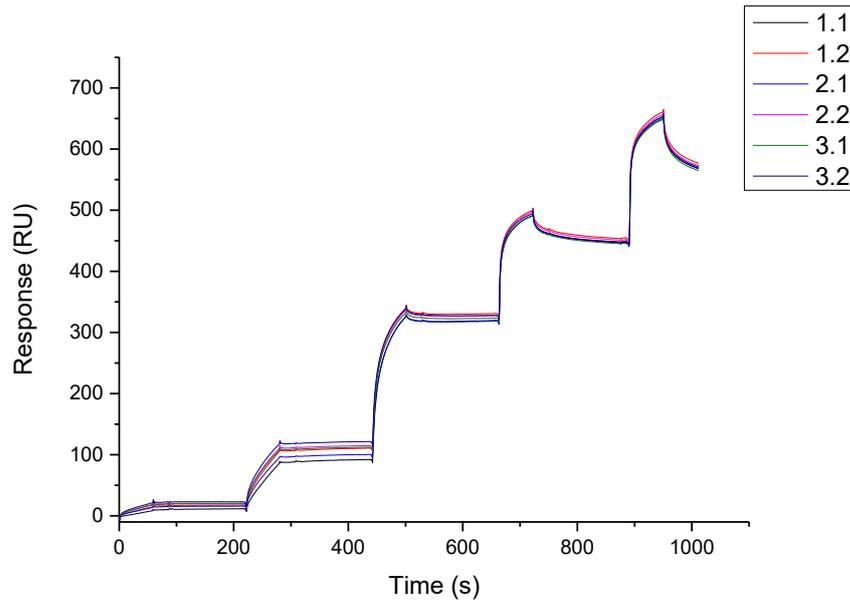


Abbildung 32: Sensogramm, SPR direct binding Studien mit SPR-Chip C1.2 mit immobilisiertem Glykooligomer **13** und Langerin.

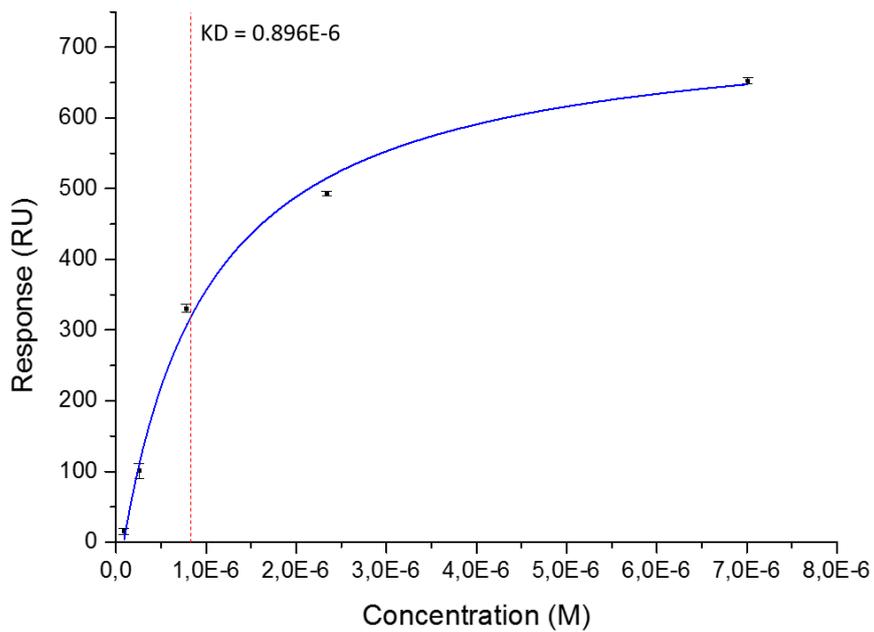


Abbildung 33:  $K_D$  Bestimmung mittels steady state Fittingmodels, SPR direct binding Studien mit SPR-Chip C1.2 mit immobilisiertem Glykooligomer **13** und Langerin ( $c = 21.02; 7.01; 2.34; 0.78; 0.26; 0.09 \mu\text{M}$ ). Die Standardabweichung wird für jeden Datenpunkt als Fehlerbalken gezeigt.

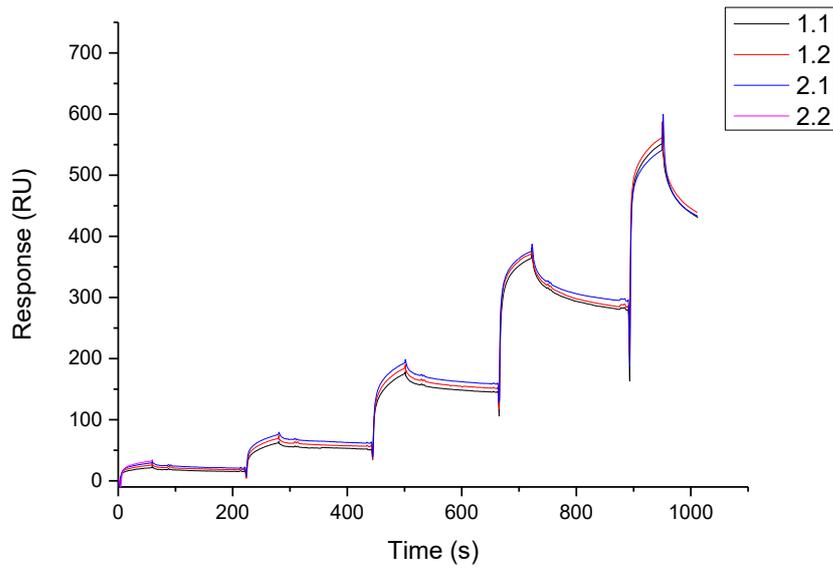


Abbildung 34: Sensogramm, SPR direct binding Studien mit SPR-Chip C1.3 mit immobilisiertem Glykooligomer 7 und Langerin.

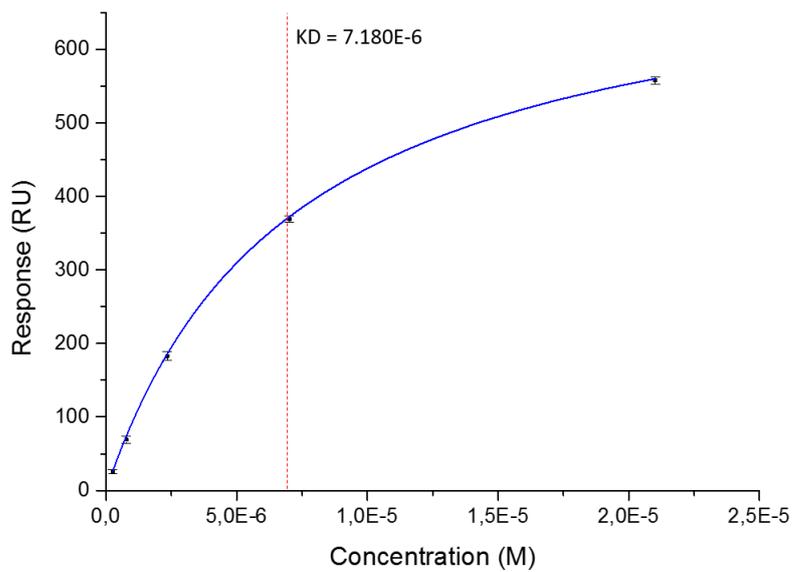


Abbildung 35:  $K_D$  Bestimmung mittels steady state Fittingmodesl, SPR direct binding Studien mit SPR-Chip C1.3 mit immobilisiertem Glykooligomer 7 und Langerin ( $c = 21.02; 7.01; 2.34; 0.78; 0.26; 0.09 \mu M$ ). Die Standardabweichung wird für jeden Datenpunkt als Fehlerbalken gezeigt.

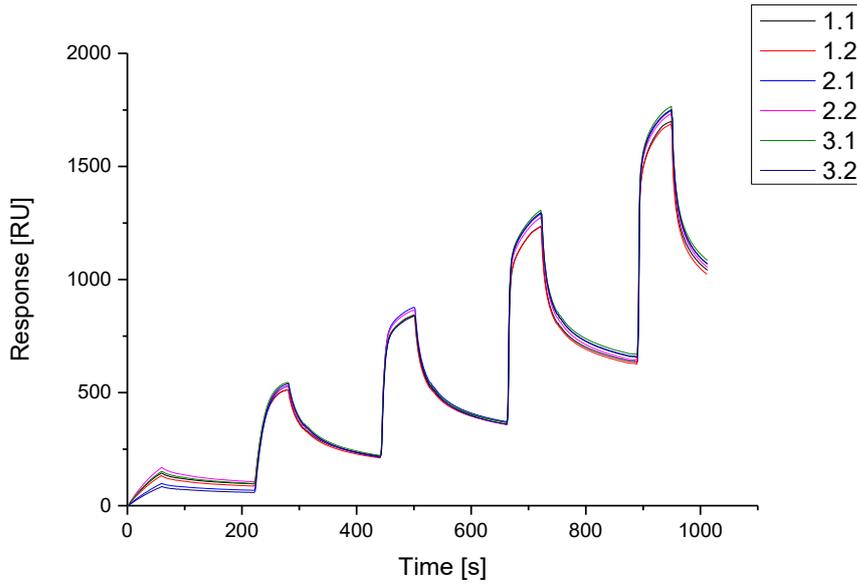


Abbildung 36: Sensogramm, SPR direct binding Studien mit SPR-Chip C1.1 mit immobilisiertem Glykooligomer **12** und Con A.

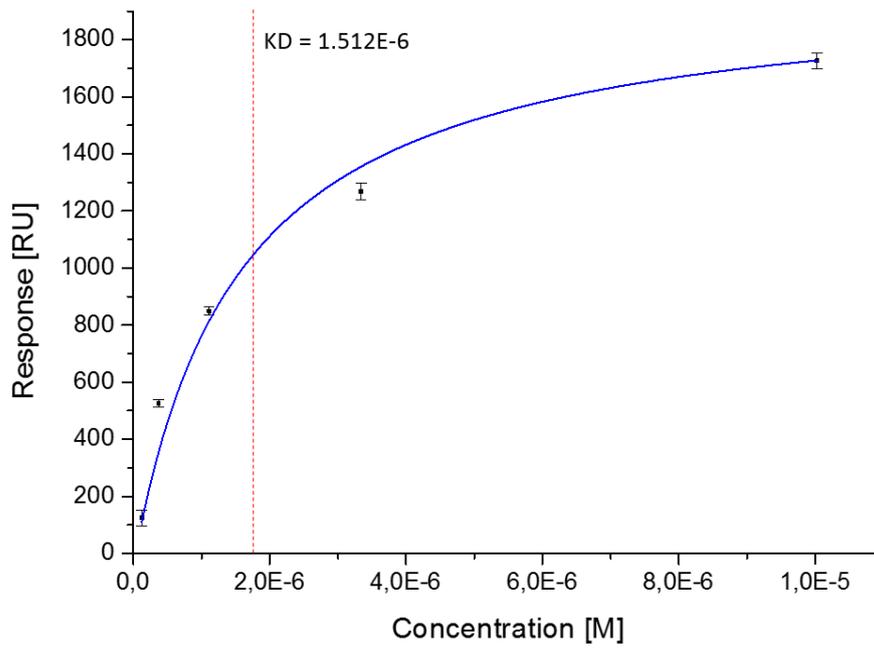


Abbildung 37:  $K_D$  Bestimmung mittels steady state Fittingmodels, SPR direct binding Studien mit SPR-Chip C1.1 mit immobilisiertem Glykooligomer **12** und Con A ( $c = 10.03; 3.34; 1.11; 0.37; 0.12 \mu\text{M}$ ). Die Standardabweichung wird für jeden Datenpunkt als Fehlerbalken gezeigt.

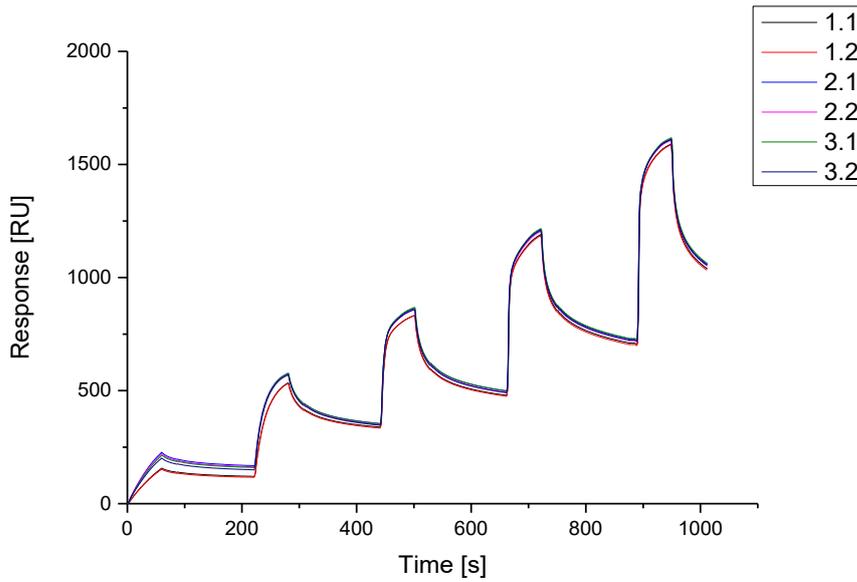


Abbildung 38: Sensogramm, SPR direct binding Studien mit SPR-Chip C1.2 mit immobilisiertem Glykooligomer **13** und Con A.

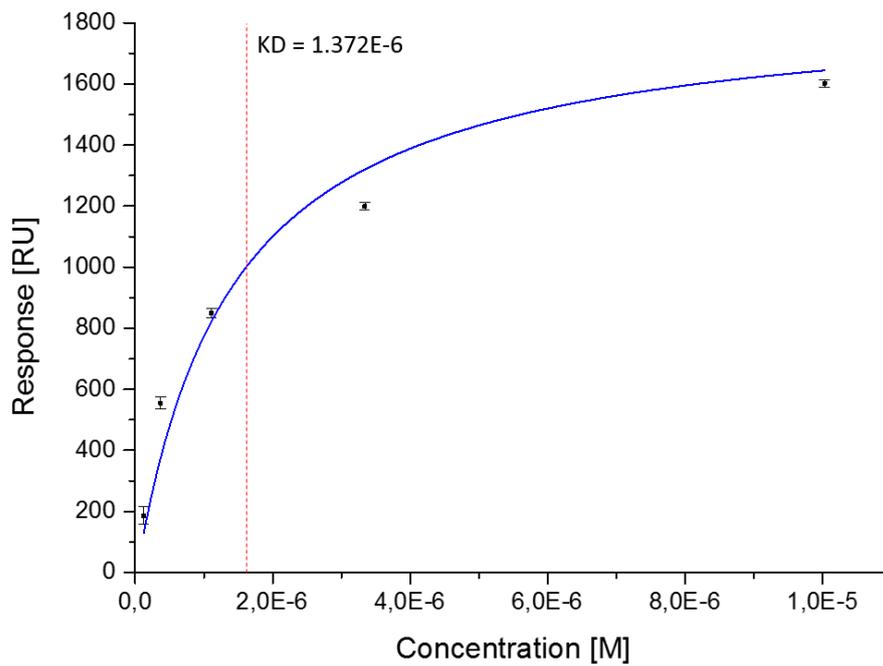


Abbildung 39: KD Bestimmung mittels steady state Fittingmodels, SPR direct binding Studien mit SPR-Chip C1.2 mit immobilisiertem Glykooligomer **13** und Con A ( $c = 10.03; 3.34; 1.11; 0.37; 0.12 \mu\text{M}$ ). Die Standardabweichung wird für jeden Datenpunkt als Fehlerbalken gezeigt.

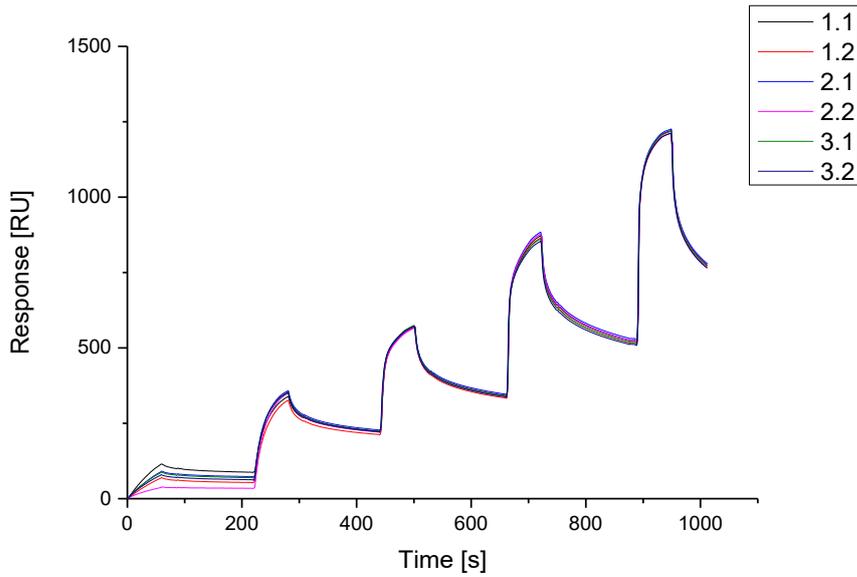


Abbildung 40: Sensogramm, SPR direct binding Studien mit SPR-Chip C1.3 mit immobilisierten Glykooligomer 7 und Con A.

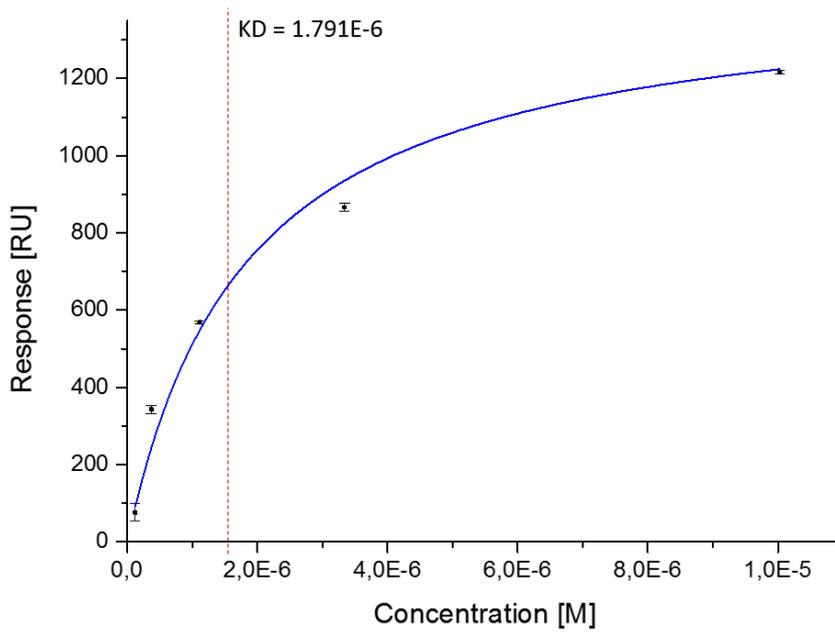


Abbildung 41:  $K_D$  Bestimmung mittels steady state Fittingmodels, SPR direct binding Studien mit SPR-Chip C1.3 mit immobilisiertem Glykooligomer 7 und Con A ( $c = 10.03; 3.34; 1.11; 0.37; 0.12 \mu\text{M}$ ). Die Standardabweichung wird für jeden Datenpunkt als Fehlerbalken gezeigt.

5.4.1.3. *Reduced IC<sub>50</sub> Bindungsstudie*: Inhibierung-Kompetitive Studien mit Con A und dem SPR- C1.1 Chip, mit dem immobilisierten Glykooligomer 12 und den Glykooligomeren 7 und 9-17 in Lösung.

Eine Lösung von einer fixen Konzentration von Con A (0.55µM) mit einer fixen Konzentration der Glykooligomere **7** und **9-17** (75µM) wurde getestet. Con A wurde bevor die Messung stattfand, für 5 h mit dem jeweiligen Glykooligomer **7** oder **9-17** inkubiert. SPR *Reduced IC<sub>50</sub>* Bindungsstudien wurden unter Verwendung des *wizard Templates* für *kinetics/affinity* durchgeführt. Eine *single cycle kinetic* Messung wurde mit einer Flussrate von 15 µl/min und einer Kontaktzeit von 300 s durchgeführt. Die Dissoziationszeit wurde mit 60 s gewählt und die Regeneration fand 1 Mal für 60 s mit 2.5 M NaCl + 1.6 M Methyl-α-D-Man statt. Con A wurde mit meiner Konzentration von 0.55 µM vermessen, wodurch der 100%ige Bindungs- und der 0%ige Inhibierungsreferenzwert ermittelt wurde. Eine Lösung von Con A (0.55µM) und den jeweiligen Glykooligomeren **7** und **9-17** (75µM) gibt die Inhibierungswerte an. Die *equilibrium response* wurde 4 s vor dem Injektionsstop gewählt. Die SPR Inhibierungsdaten sind ein Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten.

Tabelle 7: *Reduced IC<sub>50</sub> Bindungsstudie: Inhibierung-Kompetitive Studien mit Con A (c = 0.55µM) und dem SPR- C1.1 Chip, mit dem immobilisierten Glykooligomer 12 und den Glykooligomeren 7 und 9-17 (c = 0.75µM) in Lösung.*

structure	response unit [RU]	Binding [%]	Inhibition [%]	response unit [RU]	Binding [%]	Inhibition [%]	response unit [RU]	Binding [%]	Inhibition [%]	Average inhibition [%]
<b>Con A</b>	219,3	100,00	0,00	240,1	100,00	0,00	200,65	100,00	0,00	0 ± 0
<b>1</b>	184,6	84,18	15,82	191	79,55	20,45	165,50	82,48	17,52	17,93 ± 1.19
<b>2</b>	203,2	92,66	7,34	237,9	99,08	0,92	168,90	84,18	15,82	8,03 ± 6.11
<b>3</b>	189,4	86,37	13,63	227,1	94,59	5,41	176,60	88,01	11,99	10,34 ± 3.55
<b>4</b>	181,6	82,81	17,19	209,8	87,38	12,62	168,90	84,18	15,82	15,21 ± 1.92
<b>5</b>	139	63,38	36,62	173	72,05	27,95	122,80	61,20	38,80	34,45 ± 4.69
<b>6</b>	116	52,90	47,10	135,6	56,48	43,52	84,60	42,16	57,84	49,49 ± 6.08
<b>7</b>	92,2	42,04	57,96	137,1	57,10	42,90	106,60	53,13	46,87	49,24 ± 6.37
<b>8</b>	84,9	38,71	61,29	117,8	49,06	50,94	63,40	31,60	68,40	60,21 ± 7.17
<b>9</b>	165,8	75,60	24,40	197,4	82,22	17,78	67,30	33,54	66,46	36,21 ± 21.56
<b>10</b>	219,6	100,14	-0,14	245,8	102,37	-2,37	209,10	104,21	-4,21	-2,24 ± 1.67

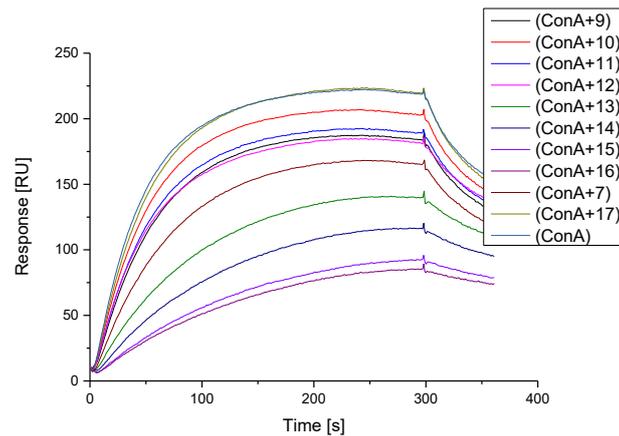


Abbildung 42: Reduced  $IC_{50}$  Bindungsstudie: Inhibierung-Kompetitive Studien mit Con A ( $c = 0.55\mu M$ ) und dem SPR- C1.1 Chip, mit dem immobilisierten Glykooligomer **12** und den Glykooligomeren **7** und **9-17** ( $c = 0.75\mu M$ ) in Lösung – eine Beispielmessung.

#### 5.4.2. ELISA Bindungsstudien mit Hämagglutinin

- Alle Reagenzien und Standards wurden nach Anleitung des Kids vorbereitet
- Monodispere, sequenzkontrollierte Glykooligomere **34-36** wurden zu folgenden Konzentrationen in MilliQ Wasser verdünnt  $c$  [ $\mu M$ ]: 1000, 500, 100, 50, 10, 5, 1, 0.5, 0.1
- 100  $\mu L$  jeder Verdünnung der Glykooligomere **34-36** wurden auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen
- Kontrollreihe wurde freigelassen
- Die Inkubation fand für 30 min bei Raumtemperatur statt
- Die Mikrotiterplatte wurde 3 Male mit jeweils 300  $\mu L$  MilliQ Wasser gewaschen
- 100  $\mu L$  von IgG wurden bis auf die Kontrollreihe pipettiert
- In die Kontrollreihe wurde pipettiert:
  - MilliQ Wasser
  - Positivkontrolle
  - Negativkontrolle
  - *Cut off*
- Die Inkubation fand für 60 min bei  $T = 37^{\circ}C$  statt
- Die Mikrotiterplatte wurde 3 Male mit jeweils 300  $\mu L$  Waschlösung gewaschen
- 100  $\mu L$  von *Influenza virus A anti-IgG HRP Conjugate* wurden bis auf die MilliQ Wasser Kontrolle pipettiert
- Die Inkubation fand für 30 min bei Raumtemperatur geschützt vor Licht statt
- Die Mikrotiterplatte wurde 3 Male mit jeweilg 300  $\mu L$  Waschlösung gewaschen
- 100  $\mu L$  der TMB Substratlösung wurde pipettiert
- Die Inkubation fand für 15 min bei Raumtemperatur geschützt vor Licht statt
- 100  $\mu L$  der Stopplösung wurde pipettiert
- Die Absorbanz wurde bei einer Wellenlänge von  $\nu = 450$  nm gemessen

Tabelle 8: Messdaten des ELISA Tests mit den monodisperse, sequenzkontrollierten Glykooligomeren **34-36** mit Hämagglutinin.

Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]	Abs 34	Abs 35	Abs 36	Abs $\alpha$ -methyl-NeuNAc
1000	0,0377	0,0304	0,0394	0,0316
500	0,031	0,0293	0,0325	0,0329
100	0,0326	0,0275	0,0315	0,0351
50	0,0308	0,0296	0,0333	0,0342
10	0,0378	0,031	0,0327	0,0381
5	0,0343	0,0296	0,0334	0,0366
1	0,0312	0,0225	0,0323	0,0335
0,5	0,0307	0,0296	0,0338	0,0363
0,1	0,0479	0,0479	0,0479	0,0479

## 6. Verzeichnisse

### 6.1. Schemenverzeichnis

Schema 1: Kupplungsreaktion mit PyBOP als Kupplungsreagenz. ....	16
Schema 2: Beispielhafte Synthese eines linearen, monodispersen, sequenzdefinierten Glykooligo(amidoamins) mittels Festphasenpolymersynthese nach Hartmann et al. <sup>73</sup> .....	21
Schema 3: Dreistufige Synthese von AADS. ....	27
Schema 5: Palladium katalysierte Alloc Entschützung .....	30
Schema 6: Dde Entschützung unter basischen Bedingungen. ....	31
Schema 7: Untersuchung der Abspaltbedingungen für Dde an der Festphase mittels Modelsubstanz <b>4</b> . .....	32
Schema 8: Darstellung des postulierten Mechanismus der Staudinger-Ligation nach Lin et al. <sup>171</sup> . ....	33
Schema 9: Untersuchung der Reaktionsbedingung der Staudinger-Ligation an der Festphase mittels Modelsubstanz <b>5</b> . ....	33
Schema 10: Synthese von Azid-funktionalisiertem N-Acetylgalactoseamin mit Ethoxylinker <sup>206</sup> .....	49
Schema 11: Synthese von Azid-funktionalisiertem N-Acetylgalactoseamin ohne Linker.....	50
Schema 12: Untersuchung der CuAAC Reaktionsbedingungen und Deacetylierungsreaktion von Azid-funktionalisierten GalNac <b>20</b> an der Festphase mittels Modelsubstanz <b>21</b> .....	50
Schema 13: Konjugation von Azid-funktionalisiertem GalNac <b>15</b> an monoalkin-funktionalisiertes Phorphyrin-Derivat.....	57
Schema 14: Konjugation von Azid-funktionalisiertem GalNac <b>15</b> an dialkin-funktionalisiertes Phorphyrin-Derivat.....	57
Schema 15: Phorphyrin-Derivat Konjugation an der Festphase mit einem verzweigten GalNac-funktionalisierten Glykooligomer <b>31</b> .....	58
Schema 16: Synthese von Azid-funktionalisierter Sialinsäure, die die Azid-Funktionalisierung am anomeren Kohlenstoffatom trägt <sup>217</sup> .....	61

### 6.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Präsentation der Glykokalyx und die Wechselwirkungen zu Rezeptoren von Viren, Bakterien, Antikörpern wie auch zu anderen Zellen, in Anlehnung an <sup>6</sup> .....	4
Abbildung 2: Beispiele für die Diversität der Kohlenhydrate, in Anlehnung an <sup>13</sup> .....	5
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Prinzips von Glykomimetika, in Anlehnung an <sup>27</sup> .....	6
Abbildung 4: Schematische Darstellung von unterschiedlichen Glykomimetika in Abhängigkeit des gewählten Gerüsts, in Anlehnung an <sup>17, 28</sup> .....	6

Abbildung 5: Schematische Darstellung eines dispersen sternförmigen und eines Kamm-Glykopolymers sowie monodisperse Dendrimere und niedermolekulare verzweigte Glykocluster.....	8
Abbildung 6: Schematische Präsentation der multivalenten Effekte zwischen Rezeptor und Liganden, in Anlehnung an <sup>20</sup> .....	12
Abbildung 7: Darstellung einer Model SPPS nach Merrifield <sup>108</sup> mit der Erweiterung der Fmoc-Schutzgruppe <sup>109</sup> .....	15
Abbildung 8: Beispiele für funktionelle und Spacer Bausteine, etabliert von Hartmann et al., TDS <sup>73, 103</sup> , DDS <sup>105</sup> , ADS <sup>107</sup> , MDS <sup>99</sup> , BDS <sup>107</sup> , BADS <sup>142</sup> , SDS <sup>102</sup> , EDS <sup>73, 103</sup> .....	20
Abbildung 9: Schematische Präsentation der Ziele dieser Doktorarbeit. ....	26
Abbildung 10: Retrosynthetische Darstellung des AADS Bausteins mit seinen Edukten.....	27
Abbildung 11: Zielstruktur für den Vergleich der Reinheiten der drei untersuchten Verzweigungsbausteine. ....	35
Abbildung 12: Schematische Darstellung von Mannose-Präzisionsglykomakromolekülen <b>7</b> , <b>9-16</b> und der Negativkontrolle <b>17</b> mit den verwendenden Bausteinen. ....	38
Abbildung 13: Präsentation der chematischen Struktur von Glykooligomer <b>12</b> , das HR-MS (ESI <sup>+</sup> Q TOF) von <b>12</b> [M+2H] <sup>2+</sup> und Chromatogramm von <b>12</b> (5%/95% zu 50%/50% AcN/H <sub>2</sub> O in 30 min bei 25°C mit C18 RP Säule).....	39
Abbildung 14: a) Schematische Darstellung eines Langerin Monomers, b) Schematische ECDs Darstellung eines Langerin Trimers. Graphische Darstellung in Anlehnung an <sup>183</sup> .....	40
Abbildung 15: Schematische Darstellung des <sup>19</sup> F basierenden NMR Kompetitive-Inhibierungsexperiments, durchgeführt von Dr. Eike C. Wamhoff (Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung). Graphische Darstellung in Anlehnung an <sup>185</sup> .....	41
Abbildung 16: Distanz der CRDs von Langerin zum Schwerpunkt, modelliert von Eike C. Wamhoff, Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung.....	41
Abbildung 17: Schematische Darstellung eines SPR Sensograms einer "direct-binding" Bindungsstudie.....	45
Abbildung 18: Messergebnisse des SPR Kompetitive-Inhibierungsexperiments mit ConA auf dem C1.1 Chip.....	47
Abbildung 19: GalNAc- und GlcNAc-funktionalisierte Glykooligomere, die an FITC konjugiert sind....	51
Abbildung 20: Präsentation der chematischen Struktur von Glykooligomer <b>22</b> , das HR-MS (ESI <sup>+</sup> Q TOF) von <b>22</b> [M+3H] <sup>3+</sup> und Chromatogramm von <b>22</b> (5%/95% zu 50%/50% AcN/H <sub>2</sub> O in 30 min bei 25°C mit C18 RP Säule).....	53
Abbildung 21: GalNAc-funktionalisierte monodisperse, sequenzdefinierte Glykooligomere, die als Präkursor für eine Phorphyrin-Derivat Konjugation dienen. ....	54

Abbildung 22: Phorphyrin-Derivat Konjugation an der Festphase mit einer GalNAc-funktionalisierten Modelsubstanz <b>32</b> und <b>33</b> .	59
Abbildung 23: Chromatogramm (RP-HPLC 5%/95 zu 95%/5% ACN/H <sub>2</sub> O mit 0,1% Ameisensäure in 15min bei 25°C)	62
Abbildung 24: NeuNAc-funktionalisierte strukturdefinierte monodisperse Glykooligomere <b>34 -36</b> .	62
Abbildung 25: Prinzip des ELISA-Bindungstests mit HA als Lektin und NeuNAc-funktionalisierten Liganden.	63
Abbildung 26: Auftragung der Konzentration an Glykooligomeren <b>34-36</b> und $\alpha$ -methly-NeuNAc gegen die gemessene Absorption der ELISA Bindungsstudien mit HA	64
Abbildung 27: Präsentation der drei entwickelten Synthesestrategien basierend auf den orthogonalen Schutzgruppen Dde und Alloc sowie dem Azid funktionalisierten Baustein	66
Abbildung 28: Kleinstes 3-armiges verzweigtes, mit Mannose funktionalisiertes, Glykooligomer, das mittels der auf Dde basierenden Synthesestrategie synthetisiert wurde. Ausgehend von diesem Glykooligomer wurden die drei Arme asymmetrisch verlängert.	67
Abbildung 29: Kleinstes 3-armiges verzweigtes, mit GalNAc funktionalisiertes Glykooligomer, das mittels der auf Staudinger-Ligation basierenden Synthesestrategie synthetisiert wurde. Ausgehend von diesem Glykooligomer wurden die drei Arme asymmetrisch verlängert.	68
Abbildung 30: Sensogramm, SPR direct binding Studien mit SPR-Chip C1.1 mit immobilisiertem Glykooligomer <b>12</b> und Langerin.	106
Abbildung 31: $K_D$ Bestimmung mittels steady state Fittingmodels, SPR direct binding Studien mit SPR-Chip C1.1 mit immobilisiertem Glykooligomer <b>12</b> und Langerin ( $c = 21.02; 7.01; 2.34; 0.78; 0.26; 0.09 \mu\text{M}$ ). Die Standartabweichung wird für jeden Datenpunkt als Fehlerbalken gezeigt.	106
Abbildung 32: Sensogramm, SPR direct binding Studien mit SPR-Chip C1.2 mit immobilisiertem Glykooligomer <b>13</b> und Langerin.	107
Abbildung 33: $K_D$ Bestimmung mittels steady state Fittingmodels, SPR direct binding Studien mit SPR-Chip C1.2 mit immobilisiertem Glykooligomer <b>13</b> und Langerin ( $c = 21.02; 7.01; 2.34; 0.78; 0.26; 0.09 \mu\text{M}$ ). Die Standartabweichung wird für jeden Datenpunkt als Fehlerbalken gezeigt.	107
Abbildung 34: Sensogramm, SPR direct binding Studien mit SPR-Chip C1.3 mit immobilisiertem Glykooligomer <b>7</b> und Langerin.	108
Abbildung 35: $K_D$ Bestimmung mittels steady state Fittingmodesl, SPR direct binding Studien mit SPR-Chip C1.3 mit immobilisiertem Glykooligomer <b>7</b> und Langerin ( $c = 21.02; 7.01; 2.34; 0.78; 0.26; 0.09 \mu\text{M}$ ). Die Standartabweichung wird für jeden Datenpunkt als Fehlerbalken gezeigt.	108
Abbildung 36: Sensogramm, SPR direct binding Studien mit SPR-Chip C1.1 mit immobilisiertem Glykooligomer <b>12</b> und Con A.	109

Abbildung 37: $K_D$ Bestimmung mittels steady state Fittingmodels, SPR direct binding Studien mit SPR-Chip C1.1 mit immobilisiertem Glykooligomer <b>12</b> und Con A ( $c = 10.03; 3.34; 1.11; 0.37; 0.12 \mu\text{M}$ ). Die Standardabweichung wird für jeden Datenpunkt als Fehlerbalken gezeigt. ....	109
Abbildung 38: Sensogramm, SPR direct binding Studien mit SPR-Chip C1.2 mit immobilisiertem Glykooligomer <b>13</b> und Con A. ....	110
Abbildung 39: $K_D$ Bestimmung mittels steady state Fittingmodels, SPR direct binding Studien mit SPR-Chip C1.2 mit immobilisiertem Glykooligomer <b>13</b> und Con A ( $c = 10.03; 3.34; 1.11; 0.37; 0.12 \mu\text{M}$ ). Die Standardabweichung wird für jeden Datenpunkt als Fehlerbalken gezeigt. ....	110
Abbildung 40: Sensogramm, SPR direct binding Studien mit SPR-Chip C1.3 mit immobilisierten Glykooligomer <b>7</b> und Con A. ....	111
Abbildung 41: $K_D$ Bestimmung mittels steady state Fittingmodels, SPR direct binding Studien mit SPR-Chip C1.3 mit immobilisiertem Glykooligomer <b>7</b> und Con A ( $c = 10.03; 3.34; 1.11; 0.37; 0.12 \mu\text{M}$ ). Die Standardabweichung wird für jeden Datenpunkt als Fehlerbalken gezeigt. ....	111
Abbildung 42: Reduced $IC_{50}$ Bindungsstudie: Inhibierung-Kompetitive Studien mit Con A ( $c = 0.55\mu\text{M}$ ) und dem SPR- C1.1 Chip, mit dem immobilisierten Glykooligomer <b>12</b> und den Glykooligomeren <b>7</b> und <b>9-17</b> ( $c = 0.75\mu\text{M}$ ) in Lösung – eine Beispielmessung. ....	113

### 6.3. Abkürzungsverzeichnis

AADS	<i>alkyl-azide diethylenetriamine succinamide</i>
ADS	alloc diethylenetriamine succinamide
AFM	Rasterkraftmikroskopie
Alloc	Allyloxycarbonyl-
ASGPR	Asialoglycoproteinrezeptor
BADS	<i>benzyl-azide diethylenetriamine succinamide</i>
BDS	<i>boc diethylenetriamine succinamide</i>
Boc-	Butyloxycarbonyl-
BOP	Benzotriazolylxytris(dimethylamino)-phosphonium hexafluorophosphat
ConA	Concanavalin A
CRD	<i>carbohydrate recognition domain</i>
CuAAC	<i>Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition</i>
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
Dde	N-(1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexylidene)ethyl)
DDS	double-bond diethylenetriamine succinamide
DIC	1,3-Diisopropylcarbodiimide
DIPEA	Diisopropylethylamin
EDA	Ethylendiamin
EDC	extrazelluläre Domäne
EDS	ethylene glycol-diamine succinamide
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat Isomer 1
Fmoc-	Fluorenylmethoxycarbonyl-

Fmoc-L-Lys(Dde)-OH	N-alpha-(9-Fluorenylmethyloxycarbonyl)-N-epsilon-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidene)ethyl-L-lysin
GalNAc	N-Acetylgalactoseamin
GluNAc	N-Acetylglucosamin
HA	Hämagglutinin
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HBTU	(3-[Bis(dimethylamino)methyliumyl]-3H-benzotriazol-1-oxid-hexafluorophosphat)
HIV-1	Human immunodeficiency virus-1
HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
ITC	Isotherme Titrationskalometrie
LC	Langerhans Zellen
Man	Mannose
ManNAc	N-Acetyl-Mannose
MDS	methyl succinyl diethylenetriamine succinamide
NaAs	Natriumascorbat
NeuNAc	N-Acetylneuraminsäure
N,N-DMBA	1.3-Dimethyl-barbitursäure
PAA	Poly(amidoamin)
PDT	Photodynamische Therapie
PEG	Polyethylenglycol
PS	Polystyrol
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
RAFT	<i>reversible addition-fragmentation chain transfer</i>
RP-HPLC	<i>reversed-phase</i> HPLC
RU	<i>response units</i>
SDS	short diethylene succinamide
SPPoS	Festphasenpolymersynthese
SPPS	Peptid-Festphasensynthese ( <i>solid-phase peptide synthesis</i> )
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz
SPS	Festphasensynthese ( <i>solid-phase synthesis</i> )
TDS	triple-bond diethylenetriamine succinamide
TEA	Triethylamin
TEC	Thiol-En-Konjugation
TFA-	Trifluoracetyl-
TFA	Trifluoressigsäure
TIPS	Triisopropylsilan
Trt	Trityl-

#### 6.4. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zielstruktur 6-8 für den Vergleich der Reinheiten der drei untersuchten Verzweigungsbausteine. ....	35
Tabelle 2: Ergebnisse des <sup>19</sup> F basierenden NMR Kompetitive-Inhibierungsexperiments, durchgeführt von Dr. Eike C. Wamhoff, Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung <sup>1</sup> . ....	42
Tabelle 3: Apparente K <sub>D</sub> Werte der „direct-binding“ SPR Bindungsstudien mit ConA und Langerin mit einem C1 Chip.....	46
Tabelle 4: Übersicht der Reaktionsbedingungen der Phorphyrin-Konjugation in Lösung zwischen den GalNAc-funktionalisierten Präzisionsglykomakromolekülen <b>26-28</b> und einem Phorphyrin-Derivat. ...	56

Tabelle 5: Überblick der SPR Response Units der C1 Chips, C1.1 mit immobilisiertem Glykooligomer <b>12</b> , C1.2 mit mit immobilisiertem Glykooligomer <b>13</b> , C1.3 mit immobilisiertem Glykooligomer <b>7</b> , Referenzzelle mit immobilisiertem Glykooligomer <b>17</b> .....	105
Tabelle 6:: Apparente $K_D$ der SPR direct binding Studie mit Langerin und Con A unter Verwendung des C1 Chips, C1.1 mit immobilisierten Glykooligomer <b>12</b> , C1.2 mit immobilisiertem Glykooligomer <b>13</b> , C1.3 mit immobilisiertem Glykooligomer <b>7</b> , Referenzzelle mit immobilisiertem Glykooligomer <b>17</b> .	105
Tabelle 7: Reduced $IC_{50}$ Bindungsstudie: Inhibierung-Kompetitive Studien mit Con A ( $c = 0.55\mu M$ ) und dem SPR- C1.1 Chip, mit dem immobilisierten Glykooligomer <b>12</b> und den Glykooligomeren <b>7</b> und <b>9-17</b> ( $c = 0.75\mu M$ ) in Lösung. ....	112
Tabelle 8: Messdaten des ELISA Tests mit den monodisperse, sequenzkontrollierten Glykooligomeren <b>34-36</b> mit Hämagglutinin.....	114

## 6.5. Literaturverzeichnis

1. Klemm, D.; Heublein, B.; Fink, H.-P.; Bohn, A., Cellulose: faszinierendes Biopolymer und nachhaltiger Rohstoff. *Angewandte Chemie* **2005**, *117* (22), 3422-3458.
2. Becer, C. R., The Glycopolymer Code: Synthesis of Glycopolymers and Multivalent Carbohydrate–Lectin Interactions. *Macromolecular Rapid Communications* **2012**, *33* (9), 742-752.
3. Dwek, R. A., Glycobiology: Toward Understanding the Function of Sugars. *Chemical Reviews* **1996**, *96* (2), 683-720.
4. Werz, D. B.; Seeberger, P. H., Carbohydrates as the Next Frontier in Pharmaceutical Research. *Chemistry – A European Journal* **2005**, *11* (11), 3194-3206.
5. Cecioni, S.; Imberty, A.; Vidal, S., Glycomimetics versus Multivalent Glycoconjugates for the Design of High Affinity Lectin Ligands. *Chemical Reviews* **2015**, *115* (1), 525-561.
6. Kiessling, L. L.; Gestwicki, J. E.; Strong, L. E., Synthetic multivalent ligands in the exploration of cell-surface interactions. *Current Opinion in Chemical Biology* **2000**, *4* (6), 696-703.
7. Dam, T. K.; Roy, R.; Das, S. K.; Oscarson, S.; Brewer, C. F., Binding of Multivalent Carbohydrates to Concanavalin A and Dioclea grandiflora Lectin: THERMODYNAMIC ANALYSIS OF THE “MULTIVALENCY EFFECT”. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275* (19), 14223-14230.
8. Bertozzi, C. R.; Kiessling, L., L., Chemical Glycobiology. *Science* **2001**, *291* (5512), 2357-2364.
9. Sinnott, M., *Carbohydrate Chemistry and Biochemistry: Structure and Mechanism*. Royal Society of Chemistry: 2013.
10. Gabius, H.-J.; Siebert, H.-C.; André, S.; Jiménez-Barbero, J.; Rüdiger, H., Chemical Biology of the Sugar Code. *ChemBioChem* **2004**, *5* (6), 740-764.
11. Davis, B. G.; G. Davis, B., Recent developments in glycoconjugates. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1999**, (22), 3215.

12. Krois, D., *Oligosaccharide (Kohlenhydrate) Organisch-chemische Methoden*. 2017; p 61-73.
13. Hofmann, J.; Hahm, H. S.; Seeberger, P. H.; Pagel, K., Identification of carbohydrate anomers using ion mobility–mass spectrometry. *Nature* **2015**, *526*, 241.
14. Lee, Y. C.; Lee, R. T., Carbohydrate-Protein Interactions: Basis of Glycobiology. *Accounts of Chemical Research* **1995**, *28* (8), 321-327.
15. Drickamer, K.; Taylor, M. E., Biology of Animal Lectins. *Annual review of cell biology* **1993**, *9* (1), 237-264.
16. Varki, A., Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* **1993**, *3* (2), 97-130.
17. Houseman, B. T.; Mrksich, M., Model Systems for Studying Polyvalent Carbohydrate Binding Interactions. In *Host-Guest Chemistry: Mimetic Approaches to Study Carbohydrate Recognition*, Penadés, S., Ed. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2002; pp 1-44.
18. Ambrosi, M.; Cameron, N. R.; Davis, B. G., Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2005**, *3* (9), 1593-1608.
19. Papp, I.; Dervede, J.; Enders, S.; Haag, R., Modular synthesis of multivalent glycoarchitectures and their unique selectin binding behavior. *Chemical Communications* **2008**, (44), 5851-5853.
20. Gestwicki, J. E.; Cairo, C. W.; Strong, L. E.; Oetjen, K. A.; Kiessling, L. L., Influencing Receptor–Ligand Binding Mechanisms with Multivalent Ligand Architecture. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124* (50), 14922-14933.
21. Reynolds, M.; Pérez, S., Thermodynamics and chemical characterization of protein–carbohydrate interactions: The multivalency issue. *Comptes Rendus Chimie* **2011**, *14* (1), 74-95.
22. Lundquist, J. J.; Debenham, S. D.; Toone, E. J., Multivalency Effects in Protein–Carbohydrate Interaction: The Binding of the Shiga-like Toxin 1 Binding Subunit to Multivalent C-Linked Glycopeptides. *The Journal of Organic Chemistry* **2000**, *65* (24), 8245-8250.
23. Corbell, J. B.; Lundquist, J. J.; Toone, E. J., A comparison of biological and calorimetric analyses of multivalent glycodendrimer ligands for concanavalin A. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11* (1), 95-111.
24. Mann, D. A.; Kanai, M.; Maly, D. J.; Kiessling, L. L., Probing Low Affinity and Multivalent Interactions with Surface Plasmon Resonance: Ligands for Concanavalin A. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120* (41), 10575-10582.
25. Kanai, M.; Mortell, K. H.; Kiessling, L. L., Varying the Size of Multivalent Ligands: The Dependence of Concanavalin A Binding on Neoglycopolymer Length. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, *119* (41), 9931-9932.
26. Ladmiral, V.; Melia, E.; Haddleton, D. M., Synthetic glycopolymers: an overview. *European Polymer Journal* **2004**, *40* (3), 431-449.

27. Igde, S., Assessing the Influence of Different Structural Features on Multivalent Thermodynamics and Kinetics of Precision Glycomacromolecules. *Ph.D. Thesis* **2016**.
28. Reuter, J. D.; Myc, A.; Hayes, M. M.; Gan, Z.; Roy, R.; Qin, D.; Yin, R.; Piehler, L. T.; Esfand, R.; Tomalia, D. A.; Baker, J. R., Inhibition of Viral Adhesion and Infection by Sialic-Acid-Conjugated Dendritic Polymers. *Bioconjugate Chemistry* **1999**, *10* (2), 271-278.
29. Farzan, V. M.; Ulashchik, E. A.; Martynenko-Makaev, Y. V.; Kvach, M. V.; Aparin, I. O.; Brylev, V. A.; Prikazchikova, T. A.; Maklakova, S. Y.; Majouga, A. G.; Ustinov, A. V.; Shipulin, G. A.; Shmanaj, V. V.; Korshun, V. A.; Zatsepin, T. S., Automated Solid-Phase Click Synthesis of Oligonucleotide Conjugates: From Small Molecules to Diverse N-Acetylgalactosamine Clusters. *Bioconjugate Chemistry* **2017**, *28* (10), 2599-2607.
30. Quadir, M. A.; Haag, R., Biofunctional nanosystems based on dendritic polymers. *Journal of Controlled Release* **2012**, *161* (2), 484-495.
31. Bhatia, S.; Dimde, M.; Haag, R., Multivalent glycoconjugates as vaccines and potential drug candidates. *MedChemComm* **2014**, *5* (7), 862-878.
32. Salvadó, M.; Reina, J.; Rojo, J.; Castellón, S.; Boutureira, O., Topological Defects in Hyperbranched Glycopolymers Enhance Binding to Lectins. *Chemistry - A European Journal* **2017**, *23* (62), 15790-15794.
33. Bagul, R.; Hosseini, M.; Shiao, T.; Saadeh, N.; Roy, R., Heterolayered hybrid dendrimers with optimized sugar head groups for enhancing carbohydrate–protein interactions. *Polymer Chemistry* **2017**, *8* (35), 5354-5366.
34. Sletten, E. T.; Loka, R. S.; Yu, F.; Nguyen, H. M., Glycosidase Inhibition by Multivalent Presentation of Heparan Sulfate Saccharides on Bottlebrush Polymers. *Biomacromolecules* **2017**, *18* (10), 3387-3399.
35. Tanaka, T.; Zhou, Y.; Tamoto, C.; Kurebayashi, Y.; Takahashi, T.; Suzuki, T., An  $\alpha$ 2,3-Linked Sialylglycopolymer as a Multivalent Glycoligand Against Avian and Human Influenza Viruses  $\alpha$ 2,3-Linked Sialylglycopolymer. *Journal of Applied Glycoscience* **2017**, *64* (2), 43-48.
36. Xie, Y.; Peng, C.; Gao, Y.; Liu, X.; Liu, T.; Joy, A., Mannose-based graft polyesters with tunable binding affinity to concanavalin A. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2017**, *55* (23), 3908-3917.
37. Nagao, M.; Fujiwara, Y.; Matsubara, T.; Hoshino, Y.; Sato, T.; Miura, Y., Design of Glycopolymers Carrying Sialyl Oligosaccharides for Controlling the Interaction with the Influenza Virus. *Biomacromolecules* **2017**, *18* (12), 4385-4392.
38. Abdouni, Y.; Yilmaz, G.; Becer, C. R., Sequence and Architectural Control in Glycopolymer Synthesis. *Macromolecular Rapid Communications* **2017**, *38* (24), 1700212-n/a.
39. Jono, K.; Nagao, M.; Oh, T.; Sonoda, S.; Hoshino, Y.; Miura, Y., Controlling the lectin recognition of glycopolymers via distance arrangement of sugar blocks. *Chemical Communications* **2018**, *54* (1), 82-85.
40. Wu, L.; Zhang, Y.; Li, Z.; Yang, G.; Kochovski, Z.; Chen, G.; Jiang, M., "Sweet" Architecture-Dependent Uptake of Glycocalyx-Mimicking Nanoparticles Based on

- Biodegradable Aliphatic Polyesters by Macrophages. *Journal of the American Chemical Society* **2017**, *139* (41), 14684-14692.
41. Maierhofer, C.; Rohmer, K.; Wittmann, V., Probing multivalent carbohydrate–lectin interactions by an enzyme-linked lectin assay employing covalently immobilized carbohydrates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2007**, *15* (24), 7661-7676.
  42. Roy, R.; Kim, J., Amphiphilic-tert-Butylcalix[4]arene Scaffolds Containing Exposed Carbohydrate Dendrons. *Angewandte Chemie (International ed.)* **1999**, *38* (3), 369-372.
  43. Cakir, N.; Hizal, G.; Becer, C. R., Supramolecular glycopolymers with thermo-responsive self-assembly and lectin binding. *Polymer Chemistry* **2015**, *6* (37), 6623-6631.
  44. García López, J.; Hernández Mateo, F.; Isac García, J.; Kim, J.; Roy, R.; Santoyo González, F.; Vargas Berenguel, A., Synthesis of Per-Glycosylated  $\beta$ -Cyclodextrins Having Enhanced Lectin Binding Affinity. *Journal of organic chemistry* **1999**, *64* (2), 522-531.
  45. Qi, Z.; Bharate, P.; Lai, C.-H.; Ziem, B.; Böttcher, C.; Schulz, A.; Beckert, F.; Hatting, B.; Mülhaupt, R.; Seeberger, P. H.; Haag, R., Multivalency at Interfaces: Supramolecular Carbohydrate-Functionalized Graphene Derivatives for Bacterial Capture, Release, and Disinfection. *Nano Letters* **2015**, *15* (9), 6051-6057.
  46. Papp, I.; Sieben, C.; Sisson, A. L.; Kostka, J.; Böttcher, C.; Ludwig, K.; Herrmann, A.; Haag, R., Inhibition of Influenza Virus Activity by Multivalent Glycoarchitectures with Matched Sizes. *ChemBioChem* **2011**, *12* (6), 887-895.
  47. Vonnemann, J.; Sieben, C.; Wolff, C.; Ludwig, K.; Böttcher, C.; Herrmann, A.; Haag, R., Virus inhibition induced by polyvalent nanoparticles of different sizes. *Nanoscale* **2014**, *6* (4), 2353-2360.
  48. Dag, A.; Lu, H.; Stenzel, M., Controlling the morphology of glyco-nanoparticles in water using block copolymer mixtures: the effect on cellular uptake. *Polymer Chemistry* **2015**, *6* (45), 7812-7820.
  49. Bruehl, R. E.; Dasgupta, F.; Katsumoto, T. R.; Tan, J. H.; Bertozzi, C. R.; Spevak, W.; Ahn, D. J.; Rosen, S. D.; Nagy, J. O., Polymerized Liposome Assemblies: Bifunctional Macromolecular Selectin Inhibitors Mimicking Physiological Selectin Ligands. *Biochemistry* **2001**, *40* (20), 5964-5974.
  50. Schwefel, D.; Maierhofer, C.; Beck, J. G.; Seeberger, S.; Diederichs, K.; Möller, H. M.; Welte, W.; Wittmann, V., Structural Basis of Multivalent Binding to Wheat Germ Agglutinin. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132* (25), 8704-8719.
  51. Cairo, C. W.; Gestwicki, J. E.; Kanai, M.; Kiessling, L. L., Control of Multivalent Interactions by Binding Epitope Density. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124* (8), 1615-1619.
  52. Meng, X.-L.; Fang, Y.; Wan, L.-S.; Huang, X.-J.; Xu, Z.-K., Glycopolymer Brushes for the Affinity Adsorption of RCA120: Effects of Thickness, Grafting Density, and Epitope Density. *Langmuir* **2012**, *28* (38), 13616-13623.
  53. Park, H.; Rosenkrantz, R. R.; Elling, L.; Böker, A., Glycopolymer Brushes for Specific Lectin Binding by Controlled Multivalent Presentation of N-Acetylglucosamine Glycan Oligomers. *Macromolecular Rapid Communications* **2015**, *36* (1), 45-54.

54. Mortell, K. H.; Weatherman, R. V.; Kiessling, L. L., Recognition Specificity of Neoglycopolymers Prepared by Ring-Opening Metathesis Polymerization. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118* (9), 2297-2298.
55. Cecioni, S.; Praly, J.-P.; Matthews, S. E.; Wimmerová, M.; Imberty, A.; Vidal, S., Rational Design and Synthesis of Optimized Glycoclusters for Multivalent Lectin–Carbohydrate Interactions: Influence of the Linker Arm. *Chemistry – A European Journal* **2012**, *18* (20), 6250-6263.
56. Goyard, D.; Baldoneschi, V.; Varrot, A.; Fiore, M.; Imberty, A.; Richichi, B.; Renaudet, O.; Nativi, C., Multivalent Glycomimetics with Affinity and Selectivity toward Fucose-Binding Receptors from Emerging Pathogens. *Bioconjugate Chemistry* **2017**.
57. Baradel, N.; Fort, S.; Halila, S.; Badi, N.; Lutz, J.-F., Synthesis of Single-Chain Sugar Arrays. *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, *52* (8), 2335-2339.
58. Zhang, Q.; Collins, J.; Anastasaki, A.; Wallis, R.; Mitchell, D. A.; Becer, C. R.; Haddleton, D. M., Sequence-Controlled Multi-Block Glycopolymers to Inhibit DC-SIGN-gp120 Binding. *Angewandte Chemie* **2013**, *125* (16), 4531-4535.
59. Jimenez Blanco, J. L.; Ortiz Mellet, C.; Garcia Fernandez, J. M., Multivalency in heterogeneous glycoenvironments: hetero-glycoclusters, -glycopolymers and -glycoassemblies. *Chemical Society Reviews* **2013**, *42* (11), 4518-4531.
60. Ponader, D.; Maffre, P.; Aretz, J.; Pussak, D.; Ninnemann, N. M.; Schmidt, S.; Seeberger, P. H.; Rademacher, C.; Nienhaus, G. U.; Hartmann, L., Carbohydrate-Lectin Recognition of Sequence-Defined Heteromultivalent Glycooligomers. *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136* (5), 2008-2016.
61. Rosencrantz, R. R.; Nguyen, V. H.; Park, H.; Schulte, C.; Böker, A.; Schnakenberg, U.; Elling, L., Lectin binding studies on a glycopolymer brush flow-through biosensor by localized surface plasmon resonance. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2016**, *408* (20), 5633-5640.
62. Loka, R. S.; McConnell, M. S.; Nguyen, H. M., Studies of Highly-Ordered Heterodiantennary Mannose/Glucose-Functionalized Polymers and Concanavalin A Protein Interactions Using Isothermal Titration Calorimetry. *Biomacromolecules* **2015**, *16* (12), 4013-4021.
63. Xue, L.; Xiong, X.; Chen, K.; Luan, Y.; Chen, G.; Chen, H., Modular synthesis of glycopolymers with well-defined sugar units in the side chain via Ugi reaction and click chemistry: hetero vs. homo. *Polymer Chemistry* **2016**, *7* (25), 4263-4271.
64. Mammen, M.; Choi, S.-K.; Whitesides, G. M., Polyvalent Interactions in Biological Systems: Implications for Design and Use of Multivalent Ligands and Inhibitors. *Angewandte Chemie International Edition* **1998**, *37* (20), 2754-2794.
65. Bhatia, S.; Camacho, L. C.; Haag, R., Pathogen Inhibition by Multivalent Ligand Architectures. *Journal of the American Chemical Society* **2016**, *138* (28), 8654-8666.
66. Mammen, M.; Dahmann, G.; Whitesides, G., Effective Inhibitors of Hemagglutination by Influenza Virus Synthesized from Polymers Having Active Ester Groups. Insight into Mechanism of Inhibition. *Journal of medicinal chemistry* **1995**, *38* (21), 4179-4190.

67. Chen, Y.; Lord, M. S.; Piloni, A.; Stenzel, M. H., Correlation between Molecular Weight and Branch Structure of Glycopolymers Stars and Their Binding to Lectins. *Macromolecules* **2015**, *48* (2), 346-357.
68. Ting, S. R. S.; Granville, A. M.; Quémener, D.; Davis, T. P.; Stenzel, M. H.; Barner-Kowollik, C., RAFT Chemistry and Huisgen 1,3-Dipolar Cycloaddition: A Route to Block Copolymers of Vinyl Acetate and 6-O-Methacryloyl Mannose? *Australian Journal of Chemistry* **2007**, *60* (6), 405-409.
69. Xue, H.; Peng, L.; Dong, Y.; Zheng, Y.; Luan, Y.; Hu, X.; Chen, G.; Chen, H., Synthesis of star-glycopolymers by Cu(0)-mediated radical polymerisation in the absence and presence of oxygen. *RSC Advances* **2017**, *7* (14), 8484-8490.
70. Whitfield, R.; Anastasaki, A.; Truong, N. P.; Wilson, P.; Kempe, K.; Burns, J. A.; Davis, T. P.; Haddleton, D. M., Well-Defined PDMAEA Stars via Cu(0)-Mediated Reversible Deactivation Radical Polymerization. *Macromolecules* **2016**, *49* (23), 8914-8924.
71. Li, Y.; Cheng, Y.; Xu, T., Design, Synthesis and Potent Pharmaceutical Applications of Glycodendrimers: A Mini Review. *Current Drug Discovery Technologies* **2007**, *4* (4), 246-254.
72. Ponader, D.; Igde, S.; Wehle, M.; Märker, K.; Santer, M.; Bléger, D.; Hartmann, L., Photoswitchable precision glycooligomers and their lectin binding. *Beilstein journal of organic chemistry* **2014**, *10*, 1603-1612.
73. Ponader, D.; Wojcik, F.; Beceren-Braun, F.; Dervede, J.; Hartmann, L., Sequence-Defined Glycopolymer Segments Presenting Mannose: Synthesis and Lectin Binding Affinity. *Biomacromolecules* **2012**, *13* (6), 1845-1852.
74. Waldmann, M.; Jirmann, R.; Hoelscher, K.; Wienke, M.; Niemeyer, F. C.; Rehders, D.; Meyer, B., A Nanomolar Multivalent Ligand as Entry Inhibitor of the Hemagglutinin of Avian Influenza. *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136* (2), 783-788.
75. Lee, R. T.; Lee, Y. C., Preparation of cluster glycosides of N-acetylgalactosamine that have subnanomolar binding constants towards the mammalian hepatic Gal/GalNAc-specific receptor. *Glycoconjugate Journal* **1987**, *4* (4), 317-328.
76. Quesenberry, M. S.; Lee, R. T.; Lee, Y. C., Difference in the Binding Mode of Two Mannose-Binding Proteins: Demonstration of a Selective Minicuster Effect†. *Biochemistry* **1997**, *36* (9), 2724-2732.
77. Hangeland, J.; Levis, J.; Lee, Y.; Tso, P. O. P., Cell-Type Specific and Ligand Specific Enhancement of Cellular Uptake of Oligodeoxynucleoside Methylphosphonates Covalently Linked with a Neoglycopeptide, YEE(ah-GalNAc)<sub>3</sub>. *Bioconjugate chemistry* **1995**, *6* (6), 695-701.
78. Katajisto, J.; Karskela, T.; Heinonen, P.; Lönnberg, H., An Orthogonally Protected  $\alpha,\alpha$ -Bis(aminomethyl)- $\beta$ -alanine Building Block for the Construction of Glycoconjugates on a Solid Support. *The Journal of Organic Chemistry* **2002**, *67* (23), 7995-8001.
79. Katajisto, J.; Heinonen, P.; Lönnberg, H., Solid-Phase Synthesis of Oligonucleotide Glycoconjugates Bearing Three Different Glycosyl Groups: Orthogonally Protected Bis(hydroxymethyl)-N,N'-bis(3-hydroxypropyl)malondiamide Phosphoramidite as Key Building Block. *The Journal of Organic Chemistry* **2004**, *69* (22), 7609-7615.

80. Boyd, W. C.; Shapleigh, E., Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins). *Science* **1954**, *119* (3091), 419-419.
81. Rini, J. M., Lectin Structure. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **1995**, *24* (1), 551-577.
82. Sager, C.; Eriş, D.; Smieško, M.; Hevey, R.; Ernst, B., What contributes to an effective mannose recognition domain? *Beilstein journal of organic chemistry* **2017**, *13*, 2584-2595.
83. Fasting, C.; Schalley, C. A.; Weber, M.; Seitz, O.; Hecht, S.; Kokschi, B.; Dervedde, J.; Graf, C.; Knapp, E.-W.; Haag, R., Multivalenz als chemisches Organisations- und Wirkprinzip. *Angewandte Chemie* **2012**, *124* (42), 10622-10650.
84. Kiessling, L. L.; Young, T.; Gruber, T. D.; Mortell, K. H., Multivalency in Protein–Carbohydrate Recognition. In *Glycoscience: Chemistry and Chemical Biology*, Fraser-Reid, B. O.; Tatsuta, K.; Thiem, J., Eds. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2008; pp 2483-2523.
85. Schwarzenbach, G., Der Chelateffekt. *Helvetica Chimica Acta* **1952**, *35* (7), 2344-2359.
86. Pfeiffer, P.; Breith, E.; Lübke, E.; Tsumaki, T., Tricyclische orthokondensierte Nebervalenzringe. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1933**, *503* (1), 84-130.
87. Pfeiffer, P., Einfache Metallkomplexsalze mit höheren Diaminen. *The Science of Nature* **1948**, *35* (6), 190-191.
88. Dam, T. K.; Brewer, C. F., Effects of Clustered Epitopes in Multivalent Ligand–Receptor Interactions. *Biochemistry* **2008**, *47* (33), 8470-8476.
89. Lee, D.-W.; Kim, T.; Park, I.-S.; Huang, Z.; Lee, M., Multivalent Nanofibers of a Controlled Length: Regulation of Bacterial Cell Agglutination. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134* (36), 14722-14725.
90. Kramer, R. H.; Karpen, J. W., Spanning binding sites on allosteric proteins with polymer-linked ligand dimers. *Nature* **1998**, *395*, 710.
91. Gargano, J. M.; Ngo, T.; Kim, J. Y.; Acheson, D. W. K.; Lees, W. J., Multivalent Inhibition of AB5 Toxins. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123* (51), 12909-12910.
92. Weber, M.; Bujotzek, A.; Haag, R., Quantifying the rebinding effect in multivalent chemical ligand-receptor systems. *The Journal of Chemical Physics* **2012**, *137* (5), 054111.
93. Lutz, J.-F., Defining the Field of Sequence-Controlled Polymers. *Macromolecular Rapid Communications* **2017**, *38* (24), 1700582-n/a.
94. Lutz, J.-F.; Ouchi, M.; Liu, D. R.; Sawamoto, M., Sequence-Controlled Polymers. *Science* **2013**, *341* (6146).
95. Badi, N.; Lutz, J.-F., Sequence control in polymer synthesis. *Chemical Society Reviews* **2009**, *38* (12), 3383-3390.
96. Hartmann, L., Polymers for Control Freaks: Sequence-Defined Poly(amidoamine)s and Their Biomedical Applications. *Macromolecular Chemistry and Physics* **2011**, *212* (1), 8-13.

97. Mosca, S.; Wojcik, F.; Hartmann, L., Precise Positioning of Chiral Building Blocks in Monodisperse, Sequence-Defined Polyamides. *Macromolecular Rapid Communications* **2011**, *32* (2), 197-202.
98. Gerke, C.; Ebbesen, M. F.; Jansen, D.; Boden, S.; Freichel, T.; Hartmann, L., Sequence-Controlled Glycopolymers via Step-Growth Polymerization of Precision Glycomacromolecules for Lectin Receptor Clustering. *Biomacromolecules* **2017**, *18* (3), 787-796.
99. Freichel, T.; Eierhoff, S.; Snyder, N. L.; Hartmann, L., Toward Orthogonal Preparation of Sequence-Defined Monodisperse Heteromultivalent Glycomacromolecules on Solid Support Using Staudinger Ligation and Copper-Catalyzed Click Reactions. *The Journal of Organic Chemistry* **2017**, *82* (18), 9400-9409.
100. Baier, M.; Giesler, M.; Hartmann, L., Split-and-Combine Approach Towards Branched Precision Glycomacromolecules and Their Lectin Binding Behavior. *Chemistry – A European Journal*, n/a-n/a.
101. Igde, S.; Röblitz, S.; Müller, A.; Kolbe, K.; Boden, S.; Fessele, C.; Lindhorst, T. K.; Weber, M.; Hartmann, L., Linear Precision Glycomacromolecules with Varying Interligand Spacing and Linker Functionalities Binding to Concanavalin A and the Bacterial Lectin FimH. *Macromolecular Bioscience* **2017**, *17* (12), 1700198-n/a.
102. Joachim, I.; Rikker, S.; Hauck, D.; Ponader, D.; Boden, S.; Sommer, R.; Hartmann, L.; Titz, A., Development and optimization of a competitive binding assay for the galactophilic low affinity lectin LecA from *Pseudomonas aeruginosa*. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2016**, *14* (33), 7933-7948.
103. Ebbesen, M. F.; Gerke, C.; Hartwig, P.; Hartmann, L., Biodegradable poly(amidoamine)s with uniform degradation fragments via sequence-controlled macromonomers. *Polymer Chemistry* **2016**, *7* (46), 7086-7093.
104. Gerling-Driessen, U. I. M.; Mujkic-Ninnemann, N.; Ponader, D.; Schöne, D.; Hartmann, L.; Korsch, B.; Gerling-Driessen, U. I. M.; Schöne, D.; Korsch, B.; Ponader, D.; Mujkic-Ninnemann, N.; Hartmann, L., Exploiting Oligo(amido amine) Backbones for the Multivalent Presentation of Coiled-Coil Peptides. *Biomacromolecules* **2015**, *16* (8), 2394-2402.
105. Wojcik, F.; Lel, S.; O'Brien, A.; Seeberger, P.; Hartmann, L., Synthesis of homo- and heteromultivalent carbohydrate-functionalized oligo(amidoamines) using novel glyco-building blocks. *Beilstein journal of organic chemistry* **2013**, *9*, 2395-2403.
106. Wojcik, F.; O'Brien, A. G.; Götze, S.; Seeberger, P. H.; Hartmann, L., Synthesis of Carbohydrate-Functionalised Sequence-Defined Oligo(amidoamine)s by Photochemical Thiol-Ene Coupling in a Continuous Flow Reactor. *Chemistry – A European Journal* **2013**, *19* (9), 3090-3098.
107. Wojcik, F.; Mosca, S.; Hartmann, L., Solid-Phase Synthesis of Asymmetrically Branched Sequence-Defined Poly/Oligo(amidoamines). *The Journal of Organic Chemistry* **2012**, *77* (9), 4226-4234.
108. Merrifield, R. B., Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society* **1963**, *85* (14), 2149-2154.

109. Orain, D.; Ellard, J.; Bradley, M., Protecting Groups in Solid-Phase Organic Synthesis. *Journal of Combinatorial Chemistry* **2002**, *4* (1), 1-16.
110. Castro, B.; Dormoy, J.-R.; Dourtoglou, B.; Evin, G.; Selve, C.; Ziegler, J.-C., Peptide Coupling Reagents VI1. A Novel, Cheaper Preparation of Benzotriazoloxyltris[dimethylamino]phosphonium Hexafluorophosphate (BOP Reagent). *Synthesis* **1976**, *1976* (11), 751-752.
111. Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V., Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* **2005**, *61* (46), 10827-10852.
112. Chan, W.; White, P., *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*. OUP Oxford: 2000.
113. Coin, I.; Beyermann, M.; Bienert, M., Solid-phase peptide synthesis: from standard procedures to the synthesis of difficult sequences. *Nature Protocols* **2007**, *2* (12), 3247-3256.
114. Han, S.-Y.; Kim, Y.-A., Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis. *Tetrahedron* **2004**, *60* (11), 2447-2467.
115. König, W.; Geiger, R., Eine neue Methode zur Synthese von Peptiden: Aktivierung der Carboxylgruppe mit Dicyclohexylcarbodiimid unter Zusatz von 1-Hydroxy-benzotriazolen. *Chemische Berichte* **1970**, *103* (3), 788-798.
116. Valeur, E.; Bradley, M., Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chemical Society reviews* **2009**, *38* (2), 606-631.
117. Sheehan, J.; Hess, G., A New Method of Forming Peptide Bonds. *Journal of the American Chemical Society* **1955**, *77* (4), 1067-1068.
118. Coste, J.; Le-Nguyen, D.; Castro, B., PyBOP®: A new peptide coupling reagent devoid of toxic by-product. *Tetrahedron Letters* **1990**, *31* (2), 205-208.
119. Dourtoglou, V.; Ziegler, J.-C.; Gross, B., L'hexafluorophosphate de O-benzotriazolyl-N,N-tetramethyluronium: Un reactif de couplage peptidique nouveau et efficace. *Tetrahedron letters* **1978**, *19* (15), 1269-1272.
120. Dourtoglou, V.; Gross, B.; Lambropoulou, V.; Zioudrou, C., O-Benzotriazolyl-N,N,N,N'-tetramethyluronium Hexafluorophosphate as Coupling Reagent for the Synthesis of Peptides of Biological Interest. *Synthesis* **1984**, *1984* (07), 572-574.
121. Knorr, R.; Trzeciak, A.; Bannwarth, W.; Gillissen, D., New coupling reagents in peptide chemistry. *Tetrahedron letters* **1989**, *30* (15), 1927-1930.
122. Carpino, L., 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive. *Journal of the American Chemical Society* **1993**, *115* (10), 4397-4398.
123. Culf, A.; Ouellette, R., Solid-Phase Synthesis of N-Substituted Glycine Oligomers ( $\alpha$ -Peptoids) and Derivatives. *Molecules* **2010**, *15* (8), 5282-5335.
124. Früchtel, J. S.; Jung, G., Organic Chemistry on Solid Supports. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1996**, *35* (1), 17-42.
125. Vaino, A. R.; Janda, K. D., Solid-Phase Organic Synthesis: A Critical Understanding of the Resin. *Journal of Combinatorial Chemistry* **2000**, *2* (6), 579-596.
126. Czarnik, A., Solid-phase synthesis supports are like solvents. *Biotechnology and bioengineering* **1998**, *61* (1), 77-79.

127. Guillier, F.; Orain, D.; Bradley, M., Linkers and Cleavage Strategies in Solid-Phase Organic Synthesis and Combinatorial Chemistry. *Chemical Reviews* **2000**, *100* (6), 2091-2158.
128. Stover, C. K.; Pham, X. Q.; Erwin, A. L.; Mizoguchi, S. D.; Warren, P.; Hickey, M. J.; Brinkman, F. S. L.; Hufnagle, W. O.; Kowalik, D. J.; Lagrou, M.; Garber, R. L.; Goltry, L.; Tolentino, E.; Westbrook Wadman, S.; Yuan, Y.; Brody, L. L.; Coulter, S. N.; Folger, K. R.; Kas, A.; Larbig, K.; Lim, R.; Smith, K.; Spencer, D.; Wong, G. K. S.; Wu, Z.; Paulsen, I. T.; Reizer, J.; Saier, M. H.; Hancock, R. E. W.; Lory, S.; Olson, M. V., Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **2000**, *406* (6799), 959-964.
129. Seneci, P., *Solid-Phase Synthesis and Combinatorial Technologies*. Wiley: 2003.
130. Chatterjee, J.; Laufer, B.; Kessler, H., Synthesis of N-methylated cyclic peptides. *Nature Protocols* **2012**, *7* (3), 432-444.
131. Elduque, X.; Pedroso, E.; Grandas, A., Straightforward Synthesis of Cyclic and Bicyclic Peptides. *Organic Letters* **2013**, *15* (8), 2038-2041.
132. White, C.; Yudin, A., Contemporary strategies for peptide macrocyclization. *Nature Chemistry* **2011**, *3* (7), 509-524.
133. Hanna, C. C.; Kulkarni, S. S.; Watson, E. E.; Premdjee, B.; Payne, R. J., Solid-phase synthesis of peptide selenoesters via a side-chain anchoring strategy. *Chemical Communications* **2017**, *53* (39), 5424-5427.
134. Sanders, A. M.; Kale, T. S.; Katz, H. E.; Tovar, J. D., Solid-Phase Synthesis of Self-Assembling Multivalent  $\pi$ -Conjugated Peptides. *ACS Omega* **2017**, *2* (2), 409-419.
135. Seeberger, P., Automated oligosaccharide synthesis. *Chemical Society Reviews* **2008**, *37* (1), 19-28.
136. Seeberger, P.; Werz, D., Automated synthesis of oligosaccharides as a basis for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* **2005**, *4* (9), 751-763.
137. Hsu, C.-H.; Hung, S.-C.; Wu, C.-Y.; Wong, C.-H., Auf dem Weg zur automatisierten Oligosaccharid-Synthese. *Angewandte Chemie* **2011**, *123* (50), 12076-12129.
138. Beaucage, S. L.; Iyer, R. P., Advances in the Synthesis of Oligonucleotides by the Phosphoramidite Approach. *Tetrahedron* **1992**, *48* (12), 2223-2311.
139. Bannwarth, W., Solid-Phase Synthesis of Oligodeoxynucleotides containing phosphoramidate internucleotide linkages and their specific chemical cleavage. *Helvetica Chimica Acta* **1988**, *71* (6), 1517-1527.
140. Wittmann, V.; Seeberger, S., Combinatorial Solid-Phase Synthesis of Multivalent Cyclic Neoglycopeptides. *Angewandte Chemie (International ed.)* **2000**, *39* (23), 4348-4352.
141. Schuster, M.; Wang, P.; Paulson, J.; Wong, C.-H., Solid-Phase Chemical-Enzymic Synthesis of Glycopeptides and Oligosaccharides. *Journal of the American Chemical Society* **1994**, *116* (3), 1135-1136.
142. Baier, M.; Giesler, M.; Hartmann, L., Split-and-Combine Approach Towards Branched Precision Glycomacromolecules and Their Lectin Binding Behavior. *Chemistry - A European Journal* **2018**.

143. Hartmann, L.; Krause, E.; Antonietti, M.; Börner, H., Solid-Phase Supported Polymer Synthesis of Sequence-Defined, Multifunctional Poly(amidoamines). *Biomacromolecules* **2006**, *7* (4), 1239-1244.
144. Hartmann, L.; Häfele, S.; Peschka-Süss, R.; Antonietti, M.; Börner, H. G., Sequence Positioning of Disulfide Linkages to Program the Degradation of Monodisperse Poly(amidoamines). *Macromolecules* **2007**, *40* (22), 7771-7776.
145. Hartmann, L.; Häfele, S.; Peschka-Süss, R.; Antonietti, M.; Börner, H. G., Tailor-Made Poly(amidoamine)s for Controlled Complexation and Condensation of DNA. *Chemistry – A European Journal* **2008**, *14* (7), 2025-2033.
146. Pussak, D.; Ponader, D.; Mosca, S.; Pompe, T.; Hartmann, L.; Schmidt, S., Specific Adhesion of Carbohydrate Hydrogel Particles in Competition with Multivalent Inhibitors Evaluated by AFM. *Langmuir* **2014**, *30* (21), 6142-6150.
147. Ebbesen, M. F.; Itskalov, D.; Baier, M.; Hartmann, L., Cu Elimination from Cu-Coordinating Macromolecules. *ACS Macro Letters* **2017**, *6* (4), 399-403.
148. Mosca, S.; Dannehl, C.; Möglinger, U.; Brezesinski, G.; Hartmann, L.,  $\beta$ 3R3-Peptides: design and synthesis of novel peptidomimetics and their self-assembling properties at the air–water interface. *Organic & biomolecular chemistry* **2013**, *11* (33), 5399.
149. Itskalov, D., Synthesis of enzymatically degradable PEG derivatives via solid phase polymer synthesis. *Bachelorarbeit* **2016**, *Heinrich-Heine-Universität*.
150. Poretz, R. D.; Goldstein, I. J., Protein-carbohydrate interaction: On the mode of binding of aromatic moieties to concanavalin A, the phytohemagglutinin of the jack bean. *Biochemical Pharmacology* **1971**, *20* (10), 2727-2739.
151. Loontjens, F. G.; Van Wauwe, J. P.; De Gussem, R.; De Bruyne, C. K., Binding of para-substituted phenyl glycosides to concanavalin a. *Carbohydrate Research* **1973**, *30* (1), 51-62.
152. Farina, R. D.; Wilkins, R. G., Kinetics of interaction of some  $\alpha$ - and  $\beta$ -D-monosaccharides with concanavalin A. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1980**, *631* (3), 428-438.
153. Hudson, K. L.; Bartlett, G. J.; Diehl, R. C.; Agirre, J.; Gallagher, T.; Kiessling, L. L.; Woolfson, D. N., Carbohydrate–Aromatic Interactions in Proteins. *Journal of the American Chemical Society* **2015**, *137* (48), 15152-15160.
154. Bräse, S.; Gil, C.; Knepper, K.; Zimmermann, V., Organische Azide – explodierende Vielfalt bei einer einzigartigen Substanzklasse. *Angewandte Chemie* **2005**, *117* (33), 5320-5374.
155. Stevens, C.; Watanabe, R., Amino Acid Derivatives. I. Carboallyloxy Derivatives of  $\hat{\pm}$ -Amino Acids<sup>1,2</sup>. *Journal of the American Chemical Society* **1950**, *72* (2), 725-727.
156. Trost, B. M.; Van Vranken, D. L., Asymmetric Transition Metal-Catalyzed Allylic Alkylations. *Chemical Reviews* **1996**, *96* (1), 395-422.
157. Trost, B. M.; Crawley, M. L., Asymmetric Transition-Metal-Catalyzed Allylic Alkylations: Applications in Total Synthesis. *Chemical Reviews* **2003**, *103* (8), 2921-2944.

158. Tsuji, J.; Shimizu, I.; Minami, I.; Ohashi, Y.; Sugiura, T.; Takahashi, K., Allylic carbonates. Efficient allylating agents of carbonucleophiles in palladium-catalyzed reactions under neutral conditions. *Journal of organic chemistry* **1985**, *50* (9), 1523-1529.
159. Dangles, O.; Guibe, F.; Balavoine, G.; Lavielle, S.; Marquet, A., Selective cleavage of the allyl and (allyloxy)carbonyl groups through palladium-catalyzed hydrostannolysis with tributyltin hydride. Application to the selective protection-deprotection of amino acid derivatives and in peptide synthesis. *Journal of organic chemistry* **1987**, *52* (22), 4984-4993.
160. Garro Helion, F.; Merzouk, A.; Guibe, F., Mild and selective palladium(0)-catalyzed deallylation of allylic amines. Allylamine and diallylamine as very convenient ammonia equivalents for the synthesis of primary amines. *Journal of organic chemistry* **1993**, *58* (22), 6109-6113.
161. Gomez Martinez, P.; Dessolin, M.; Guibé, F.; Albericio, F., N $\alpha$ -Alloc temporary protection in solid-phase peptide synthesis. The use of amine–borane complexes as allyl group scavengers. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1999**, (20), 2871-2874.
162. Albericio, F., Orthogonal protecting groups for N $\alpha$ -amino and C-terminal carboxyl functions in solid-phase peptide synthesis. *Biopolymers* **2000**, *55* (2), 123-139.
163. Thieriet, N.; Alsina, J.; Giralt, E.; Guibé, F.; Albericio, F., Use of Alloc-amino acids in solid-phase peptide synthesis. Tandem deprotection-coupling reactions using neutral conditions. *Tetrahedron letters* **1997**, *38* (41), 7275-7278.
164. Song, A.; Wang, X.; Zhang, J.; Mařík, J.; Lebrilla, C.; Lam, K., Synthesis of hydrophilic and flexible linkers for peptide derivatization in solid phase. *Bioorganic and medicinal chemistry letters* **2004**, *14* (1), 161-165.
165. Nash, I. A.; Bycroft, B. W.; Chan, W. C., Dde — A selective primary amine protecting group: A facile solid phase synthetic approach to polyamine conjugates. *Tetrahedron Letters* **1996**, *37* (15), 2625-2628.
166. Hone, N. D.; Payne, L. J., Solid-phase synthesis of Agel 416; a novel approach to modified polyamines. *Tetrahedron Letters* **2000**, *41* (32), 6149-6152.
167. Kruger, R. G.; Dostal, P.; McCafferty, D. G., An economical and preparative orthogonal solid phase synthesis of fluorescein and rhodamine derivatized peptides: FRET substrates for the Staphylococcus aureus sortase SrtA transpeptidase reaction. *Chemical Communications* **2002**, (18), 2092-2093.
168. Fischer, R.; Mader, O.; Jung, G.; Brock, R., Extending the Applicability of Carboxyfluorescein in Solid-Phase Synthesis. *Bioconjugate chemistry* **2003**, *14* (3), 653-660.
169. Gopalsamy, A.; Yang, H.; Ellingboe, J. W.; Kees, K. L.; Yoon, J.; Murrills, R., Parallel solid-phase synthesis of vitronectin receptor ( $\alpha\beta$ 3) inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2000**, *10* (15), 1715-1718.
170. Bycroft, B.; Chan, W.; Chhabra, S.; Hone, N., A novel lysine-protecting procedure for continuous flow solid phase synthesis of branched peptides. *Journal of the Chemical Society. Chemical communications* **1993**, (9), 778.

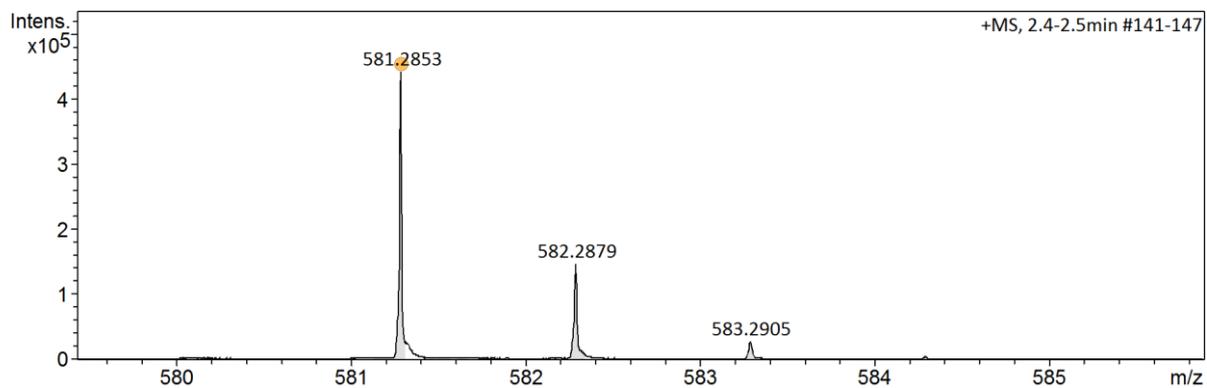
171. Lin, F. L.; Hoyt, H. M.; van Halbeek, H.; Bergman, R. G.; Bertozzi, C. R., Mechanistic Investigation of the Staudinger Ligation. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127* (8), 2686-2695.
172. Kim, H.; Cho, J. K.; Aimoto, S.; Lee, Y.-S., Solid-Phase Staudinger Ligation from a Novel Core-Shell-Type Resin: A Tool for Facile Condensation of Small Peptide Fragments. *Organic Letters* **2006**, *8* (6), 1149-1151.
173. Malkinson, J. P.; Falconer, R. A.; Toth, I., Synthesis of C-Terminal Glycopeptides from Resin-Bound Glycosyl Azides via a Modified Staudinger Reaction. *The Journal of Organic Chemistry* **2000**, *65* (17), 5249-5252.
174. Tang, Z.; Pelletier, J. C., Preparation of amides from acids and resin bound azides: Suppression of intramolecular lactam formation. *Tetrahedron Letters* **1998**, *39* (27), 4773-4776.
175. Jain, S.; Reiser, O., Immobilization of Cobalt(II) Schiff Base Complexes on Polystyrene Resin and a Study of Their Catalytic Activity for the Aerobic Oxidation of Alcohols. *ChemSusChem* **2008**, *1* (6), 534-541.
176. Nilsson, B.; Hondal, R.; Soellner, M.; Raines, R., Protein Assembly by Orthogonal Chemical Ligation Methods. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125* (18), 5268-5269.
177. Jain, S.; Sain, B., An Efficient Approach for Immobilizing the Oxo-Vanadium Schiff Base onto Polymer Supports using Staudinger Ligation. *Advanced synthesis & catalysis* **2008**, *350* (10), 1479-1483.
178. Valladeau, J.; Ravel, O.; Dezutter Dambuyant, C.; Moore, K.; Kleijmeer, M.; Liu, Y.; Duvert Frances, V.; Vincent, C.; Schmitt, D.; Davoust, J.; Caux, C.; Lebecque, S.; Saeland, S., Langerin, a Novel C-Type Lectin Specific to Langerhans Cells, Is an Endocytic Receptor that Induces the Formation of Birbeck Granules. *Immunity* **2000**, *12* (1), 71-81.
179. Zhao, J.; Liu, X.; Kao, C.; Zhang, E.; Li, Q.; Zhang, F.; Linhardt, R., Kinetic and Structural Studies of Interactions between Glycosaminoglycans and Langerin. *Biochemistry* **2016**, *55* (32), 4552-4559.
180. de Witte, L.; Nabatov, A.; Pion, M.; Fluitsma, D.; de Jong, M. A. W. P.; de Gruijl, T.; Piguet, V.; van Kooyk, Y.; Geijtenbeek, T. B. H., Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells. *Nature Medicine* **2007**, *13* (3), 367-371.
181. Cambi, A.; Koopman, M.; Figdor, C., How C-type lectins detect pathogens. *Cellular microbiology* **2005**, *7* (4), 481-488.
182. Feinberg, H.; Taylor, M.; Razi, N.; McBride, R.; Knirel, Y.; Graham, S.; Drickamer, K.; Weis, W., Structural Basis for Langerin Recognition of Diverse Pathogen and Mammalian Glycans through a Single Binding Site. *Journal of Molecular Biology* **2011**, *405* (4), 1027-1039.
183. Feinberg, H.; Powlesland, A. S.; Taylor, M. E.; Weis, W. I., Trimeric Structure of Langerin. *Journal of Biological Chemistry* **2010**, *285* (17), 13285-13293.
184. Figdor, C.; van Kooyk, Y.; Adema, G., C-TYPE LECTIN RECEPTORS ON DENDRITIC CELLS AND LANGERHANS CELLS. *Nature Reviews. Immunology* **2002**, *2* (2), 77-84.

185. Wamhoff, E.-C.; Hanske, J.; Schnirch, L.; Aretz, J.; Grube, M.; Varón Silva, D.; Rademacher, C., 19F NMR-Guided Design of Glycomimetic Langerin Ligands. *ACS Chemical Biology* **2016**, *11* (9), 2407-2413.
186. van Dalen, R.; Rumpret, M.; Fuchsberger, F. F.; van Teijlingen, N. H.; Hanske, J.; Rademacher, C.; Geijtenbeek, T. B. H.; Van Strijp, J. A. G.; Weidenmaier, C.; Peschel, A.; van Sorge, N. M., Wall teichoic acid is a pathogen-associated molecular pattern of Staphylococcus aureus that is recognized by langerin (CD207) on skin Langerhans cells. *bioRxiv* **2017**.
187. Hanske, J.; Wawrzinek, R.; Geissner, A.; Wamhoff, E.-C.; Sellrie, K.; Schmidt, H.; Seeberger, P.; Rademacher, C., Calcium-Independent Activation of an Allosteric Network in Langerin by Heparin Oligosaccharides. *ChemBioChem* **2017**, *18* (13), 1183-1187.
188. Hanske, J.; Schulze, J.; Aretz, J.; McBride, R.; Loll, B.; Schmidt, H.; Knirel, Y.; Rabsch, W.; Wahl, M. C.; Paulson, J. C.; Rademacher, C., Bacterial Polysaccharide Specificity of the Pattern Recognition Receptor Langerin Is Highly Species-dependent. *Journal of Biological Chemistry* **2017**, *292* (3), 862-871.
189. Hanske, J.; Aleksić, S.; Ballaschk, M.; Jurk, M.; Shanina, E.; Beerbaum, M.; Schmieder, P.; Keller, B. G.; Rademacher, C., Intradomain Allosteric Network Modulates Calcium Affinity of the C-Type Lectin Receptor Langerin. *Journal of the American Chemical Society* **2016**, *138* (37), 12176-12186.
190. Hunter, C. A.; Anderson, H. L., Was ist Kooperativität? *Angewandte Chemie* **2009**, *121* (41), 7624-7636.
191. García-Moreno, M. I.; Ortega-Caballero, F.; Rísquez-Cuadro, R.; Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J. M., The Impact of Heteromultivalency in Lectin Recognition and Glycosidase Inhibition: An Integrated Mechanistic Study. *Chemistry – A European Journal* **2017**, *23* (26), 6295-6304.
192. Blanco, J. L. J.; Jiménez Blanco, J.; Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J., Multivalency in heterogeneous glycoenvironments: hetero-glycoclusters, -glycopolymers and -glycoassemblies. *Chemical Society reviews* **2013**, *42* (11), 4518-4531.
193. Sumner, J. B., THE GLOBULINS OF THE JACK BEAN, CANAVALLIA ENSIFORMIS: Preliminary Paper. *Journal of Biological Chemistry* **1919**, *37* (1), 137-142.
194. Lis, H.; Sharon, N., Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. *Chemical Reviews* **1998**, *98* (2), 637-674.
195. Mangold, S.; Cloninger, M., Binding of monomeric and dimeric Concanavalin A to mannose-functionalized dendrimers. *Organic & biomolecular chemistry* **2006**, *4* (12), 2458.
196. Mandal, D.; Brewer, C. F., Differences in the binding affinities of dimeric concanavalin A (including acetyl and succinyl derivatives) and tetrameric concanavalin A with large oligomannose-type glycopeptides. *Biochemistry* **1993**, *32* (19), 5116-5120.

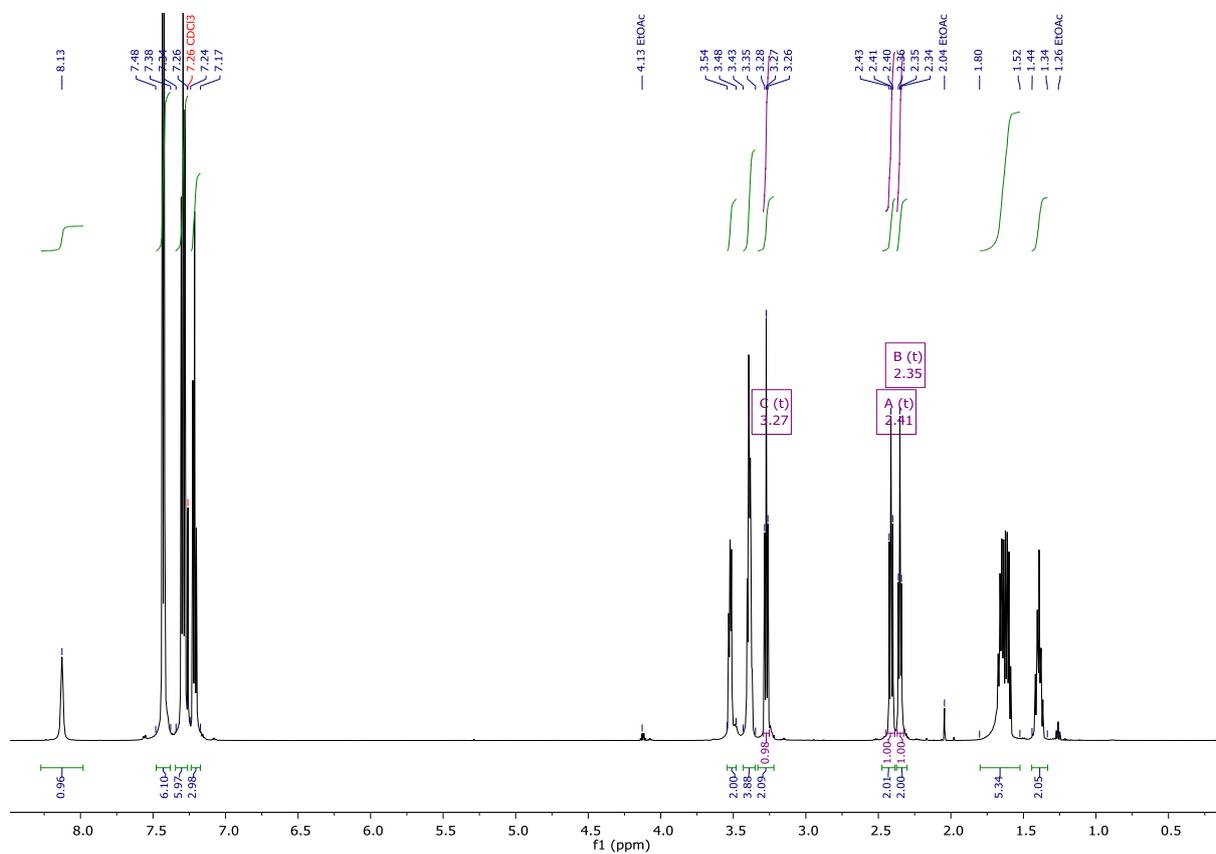
197. Brewer, C. F.; Brown, R. D.; Koenig, S. H., Metal Ion Binding and Conformational Transitions in Concanavalin A: A Structure-Function Study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* **1983**, *1* (4), 961-997.
198. Meier, M.; Bider, M. D.; Malashkevich, V. N.; Spiess, M.; Burkhard, P., Crystal Structure of the Carbohydrate Recognition Domain of the H1 Subunit of the Asialoglycoprotein Receptor. *Journal of Molecular Biology* **2000**, *300* (4), 857-865.
199. Khorev, O.; Stokmaier, D.; Schwardt, O.; Cutting, B.; Ernst, B., Trivalent, Gal/GalNAc-containing ligands designed for the asialoglycoprotein receptor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2008**, *16* (9), 5216-5231.
200. Baenziger, J.; Fiete, D., Galactose and N-acetylgalactosamine-specific endocytosis of glycopeptides by isolated rat hepatocytes. *Cell* **1980**, *22* (2), 611-620.
201. Baenziger, J. U.; Maynard, Y., Human hepatic lectin. Physicochemical properties and specificity. *Journal of Biological Chemistry* **1980**, *255* (10), 4607-4613.
202. Massarelli, I.; Chiellini, F.; Chiellini, E.; Bianucci, A. M., Three-Dimensional Models of the Oligomeric Human Asialoglycoprotein Receptor (ASGP-R). *International Journal of Molecular Sciences* **2010**, *11* (10), 3867.
203. Huang, X.; Leroux, J.-C.; Castagner, B., Well-Defined Multivalent Ligands for Hepatocytes Targeting via Asialoglycoprotein Receptor. *Bioconjugate chemistry* **2017**, *28* (2), 283-295.
204. Lee, Y. C.; Townsend, R. R.; Hardy, M. R.; Lönngrén, J.; Arnarp, J.; Haraldsson, M.; Lönn, H., Binding of synthetic oligosaccharides to the hepatic Gal/GalNAc lectin. Dependence on fine structural features. *Journal of Biological Chemistry* **1983**, *258* (1), 199-202.
205. Connolly, D. T.; Townsend, R. R.; Kawaguchi, K.; Bell, W. R.; Lee, Y. C., Binding and endocytosis of cluster glycosides by rabbit hepatocytes. Evidence for a short-circuit pathway that does not lead to degradation. *Journal of biological chemistry* **1982**, *257* (2), 939-945.
206. Steffens, R. C., Synthesis of highly branched precision glycomacromolecules bearing N-Acetylgalactosamine targeting ASGPR. *Heinrich-Heine-Universität* **2016**.
207. Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*. Elsevier Science: 2013.
208. Statistisches Bundesamt, <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.html> Zugriff am: 20.02.2018, 10:21 Uhr.
209. Dummer, R., *Physikalische Therapiemaßnahmen in der Dermatologie*. Steinkopff: 2006.
210. Garbe, C.; Dummer, R.; Kaufmann, R.; Tilgen, W., *Dermatologische Onkologie*. Springer Berlin Heidelberg: 2013.
211. Zenkevich, E.; Sagun, E.; Knyuksho, V.; Shulga, A.; Mironov, A.; Efremova, O.; Bonnett, R.; Songca, S. P.; Kassem, M., Photophysical and photochemical properties of potential porphyrin and chlorin photosensitizers for PDT. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **1996**, *33* (2), 171-180.

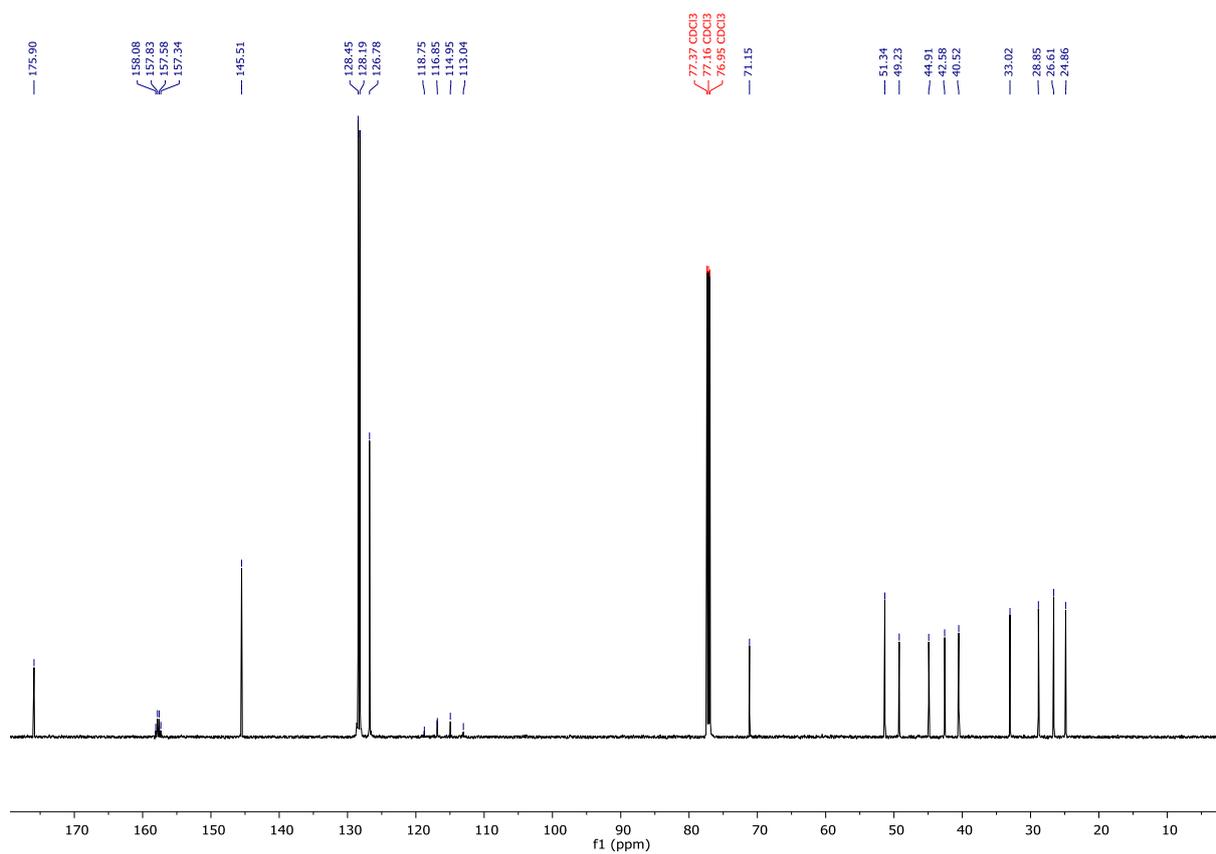
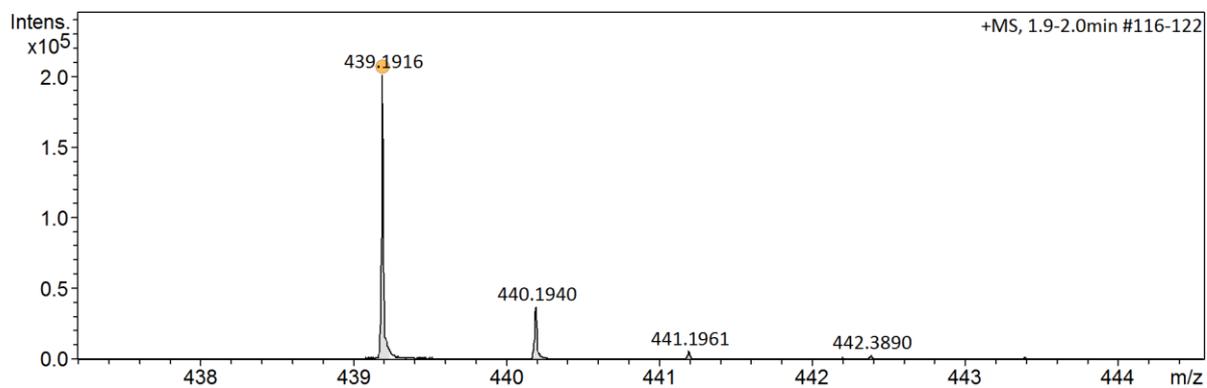
212. Guleria, M.; Kumar, C.; Das, T.; Amirdhanayagam, J.; Sharma, R.; Sarma, H. D.; Dash, A., Studies towards elucidating the potential of 5,10,15,20-tetrakis(p-carboxymethyleneoxyphenyl)porphyrin as a theranostic agent for applications in PET and PDT. *MedChemComm* **2018**.
213. Mair, C. M.; Ludwig, K.; Herrmann, A.; Sieben, C., Receptor binding and pH stability — How influenza A virus hemagglutinin affects host-specific virus infection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2014**, *1838* (4), 1153-1168.
214. Institut, R. K., <https://influenza.rki.de/Saisonberichte/2016.pdf> Zugriff am **20.02.2018, 15.42Uhr**.
215. Hüttl, C.; Hettrich, C.; Miller, R.; Paulke, B.-R.; Henklein, P.; Rawel, H.; Bier, F., Self-assembled peptide amphiphiles function as multivalent binder with increased hemagglutinin affinity. *BMC Biotechnology* **2013**, *13* (1), 51.
216. Peng, W.; de Vries, R. P.; Grant, O. C.; Thompson, A. J.; McBride, R.; Tsogtbaatar, B.; Lee, P. S.; Razi, N.; Wilson, I. A.; Woods, R. J.; Paulson, J. C., Recent H3N2 Viruses Have Evolved Specificity for Extended, Branched Human-type Receptors, Conferring Potential for Increased Avidity. *Cell Host & Microbe* **2017**, *21* (1), 23-34.
217. Carlescu, I.; Osborn, H. M. I.; Desbrieres, J.; Scutaru, D.; Popa, M., Synthesis of poly(aspartimide)-based bio-glycoconjugates. *Carbohydrate Research* **2010**, *345* (1), 33-40.
218. Kocienski, P. J., *Protecting Groups*. Georg Thieme Verlag: 2005.
219. Engvall, E.; Perlmann, P., Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* **1971**, *8* (9), 871-874.
220. Chan-Seng, D.; Lutz, J.-F., Primary Structure Control of Oligomers Based on Natural and Synthetic Building Blocks. *ACS Macro Letters* **2014**, *3* (3), 291-294.
221. Su, Z.; Yeagley, A. A.; Su, R.; Peng, L.; Melander, C., Structural Studies on 4,5-Disubstituted 2-Aminoimidazole-Based Biofilm Modulators that Suppress Bacterial Resistance to  $\beta$ -Lactams. *ChemMedChem* **2012**, *7* (11), 2030-2039.
222. Neumann, J.; Thiem, J., Synthesis of Amino-Bridged Oligosaccharide Mimetics. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *2010* (5), 900-908.
223. Klaffke, W., Synthesis of GDP-3-acetamido-3-deoxy- $\alpha$ -d-mannose and GDP-3-azido-3-deoxy- $\alpha$ -d-mannose. *Carbohydr. Res.* **1995**, *266* (2), 285-292.

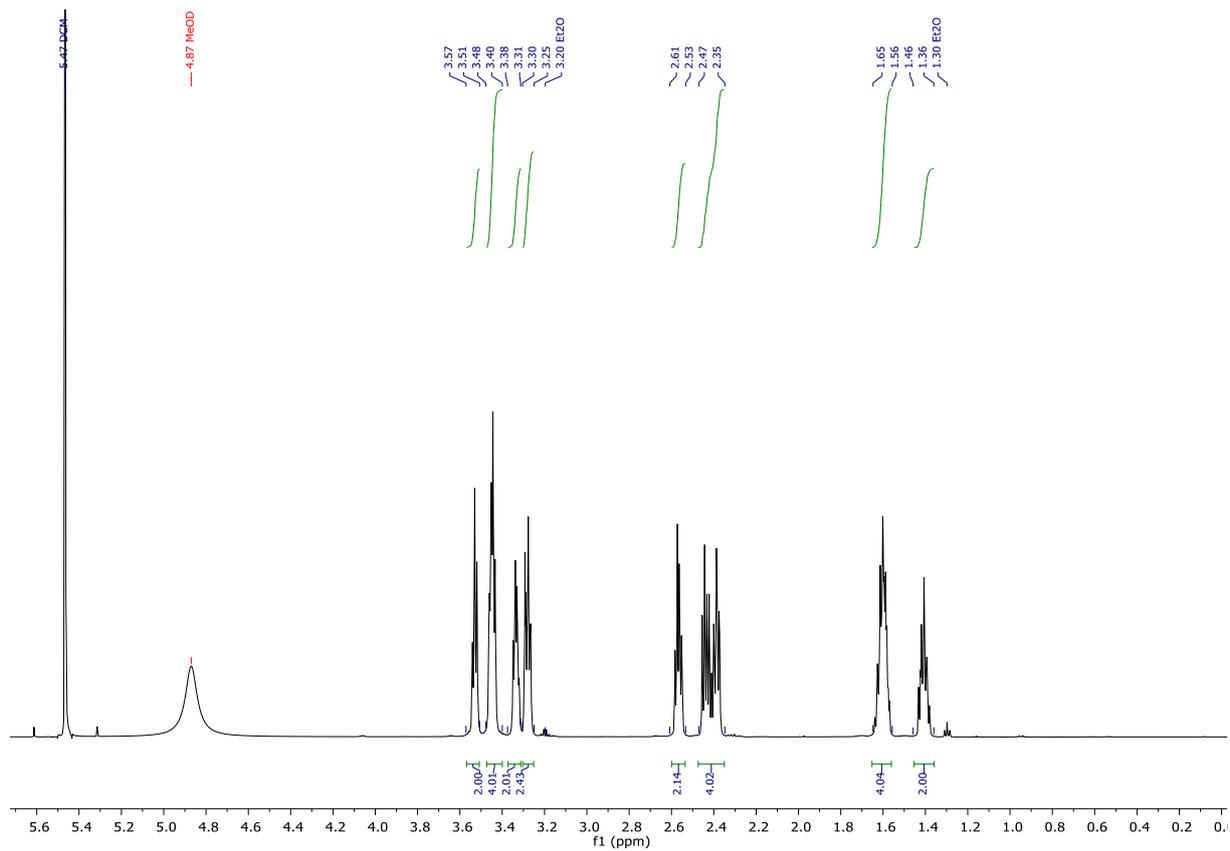
## 7. Appendix



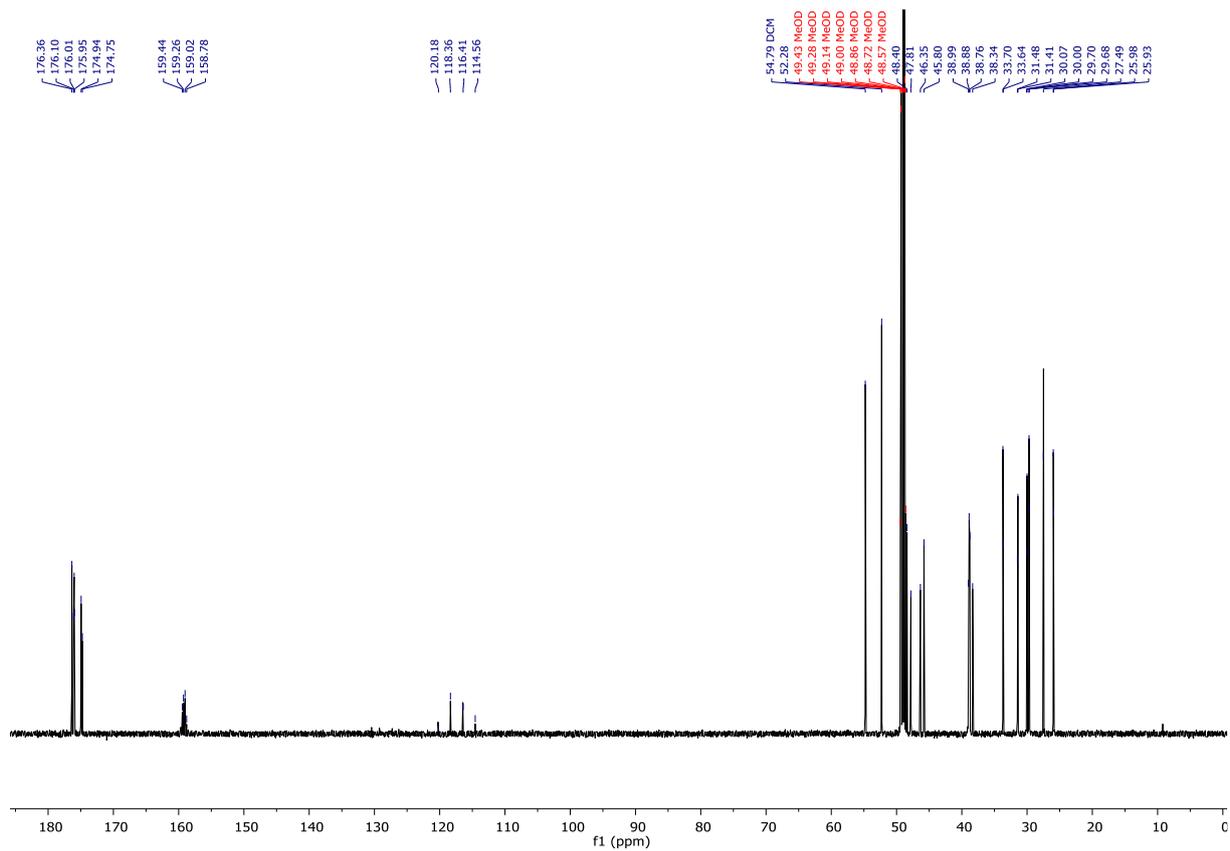
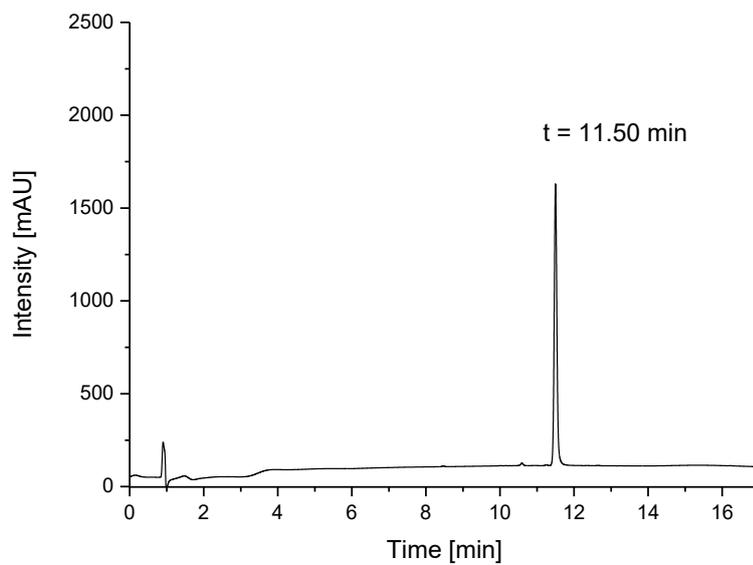
Appendix 1: HR-MS (ESI+ Q TOF) von 1.

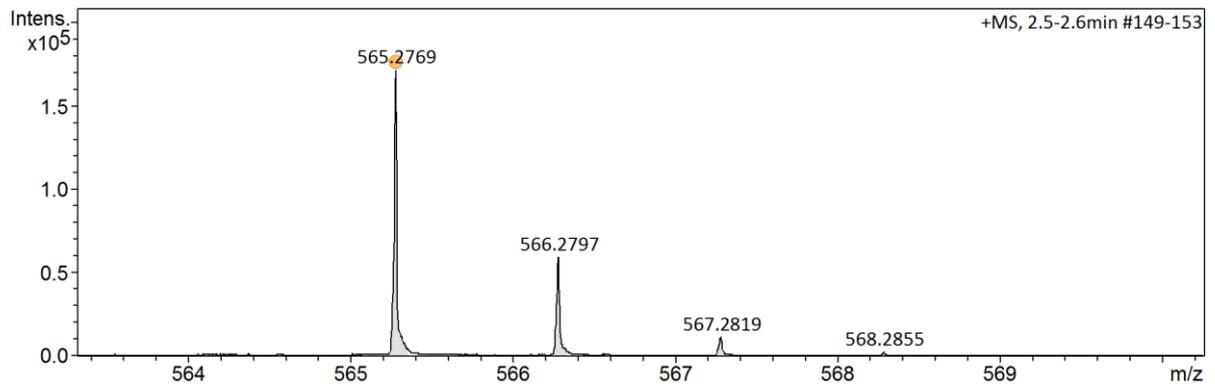
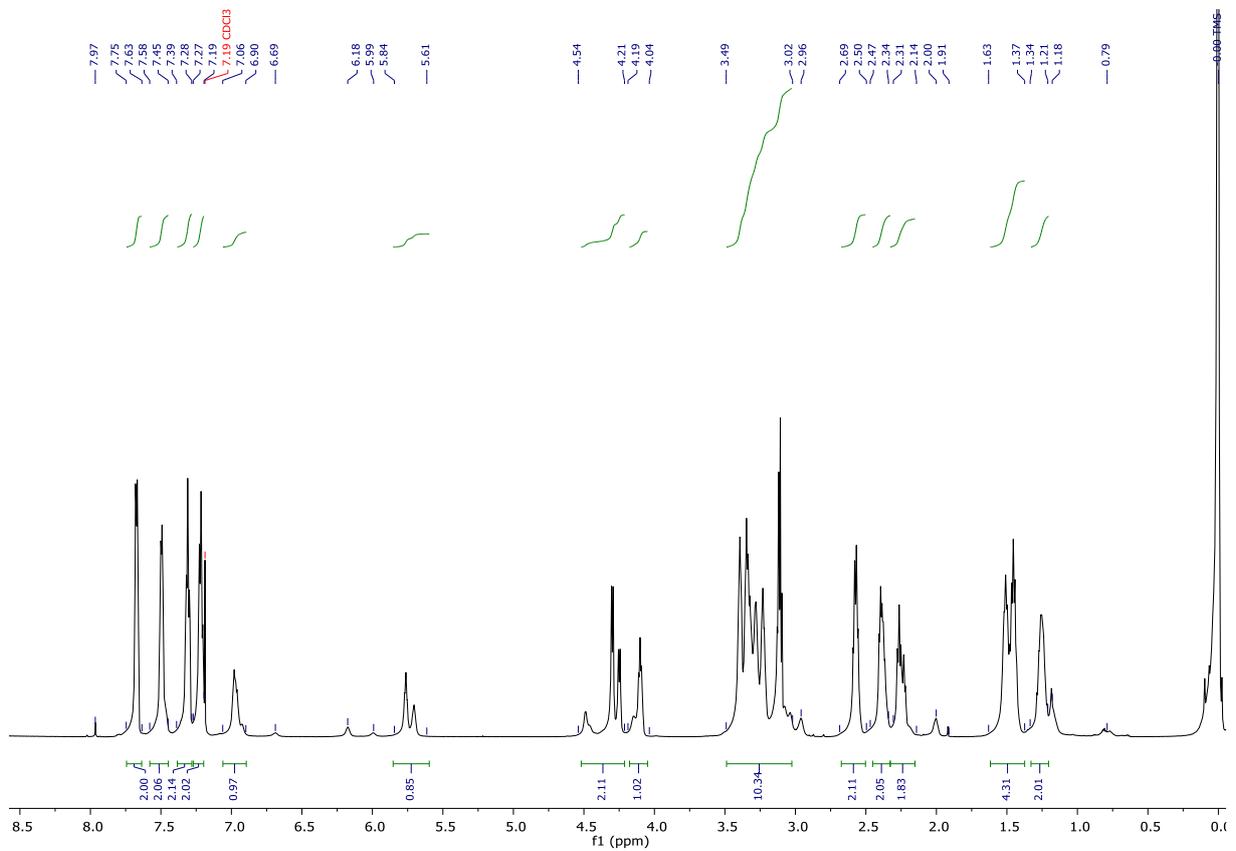
Appendix 2:  $^1\text{H-NMR}$  von 1 in  $\text{CDCl}_3$ , 600MHz.

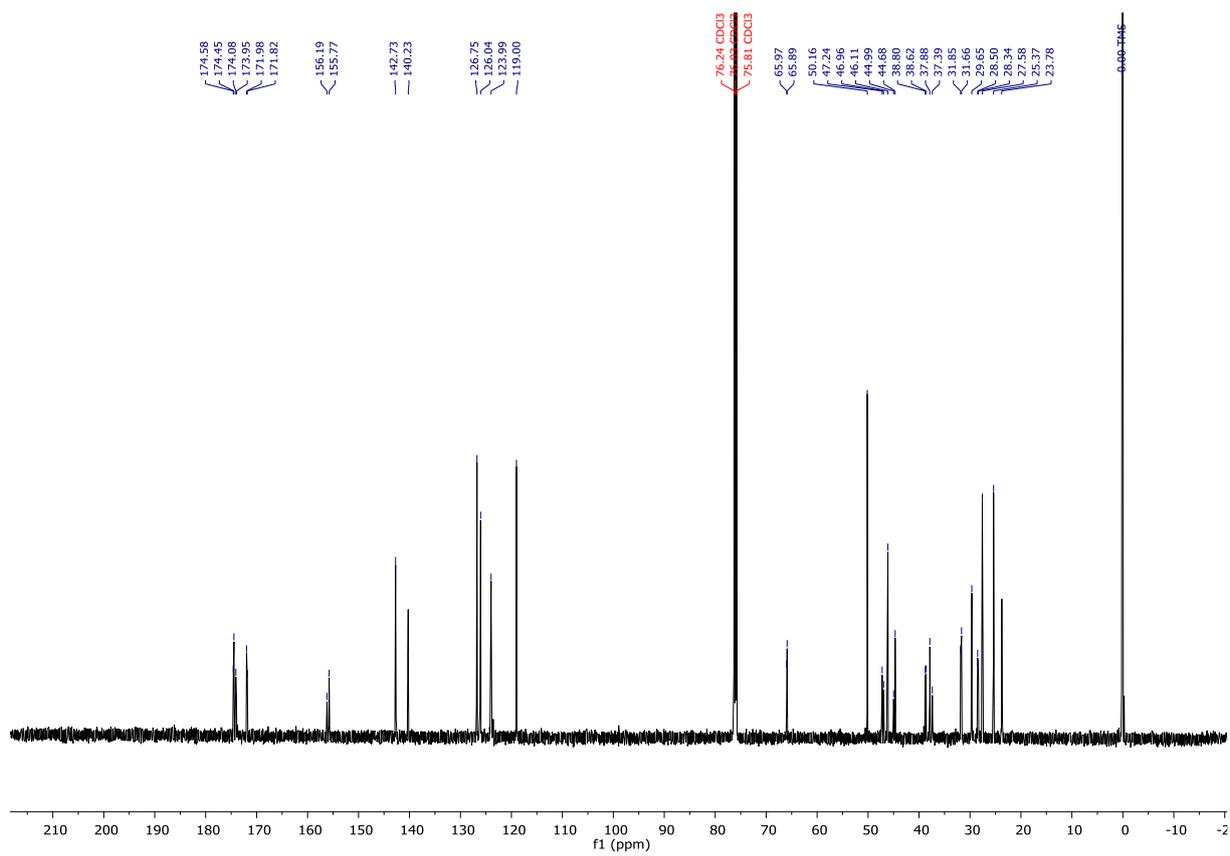
Appendix 3:  $^{13}\text{C-NMR}$  von **1** in  $\text{CDCl}_3$ , 600MHz.Appendix 4: HR-MS (ESI<sup>+</sup> Q TOF) von **2**.



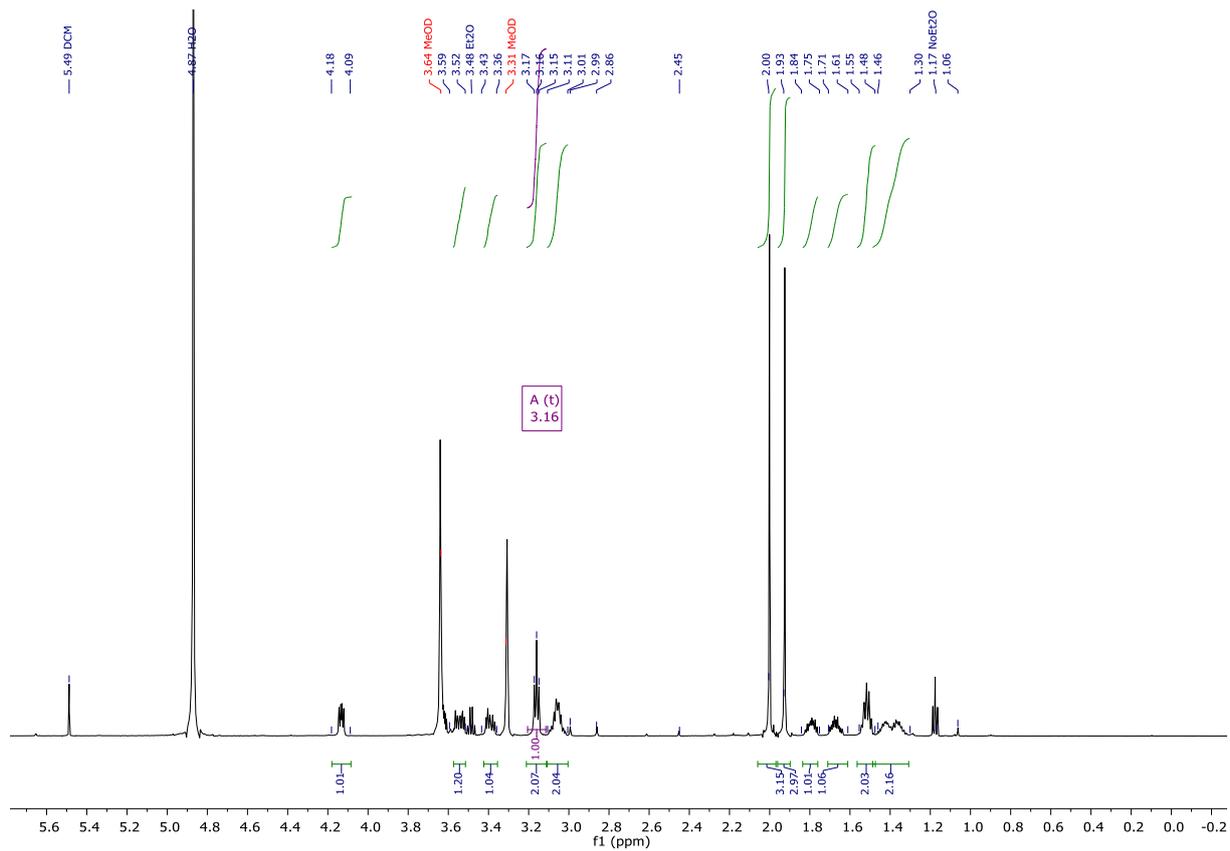
Appendix 5:  $^1\text{H-NMR}$  von **2** in  $\text{MeOD}$ , 600MHz.

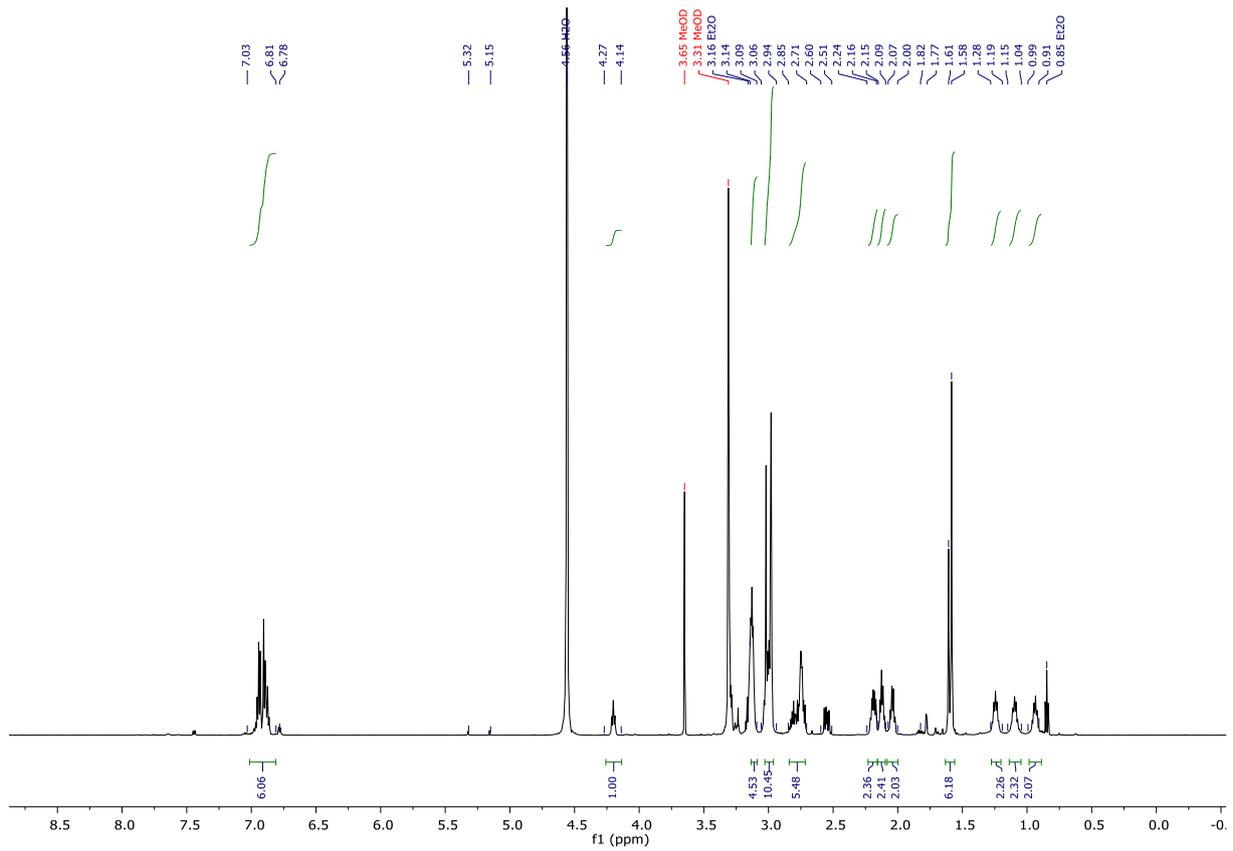
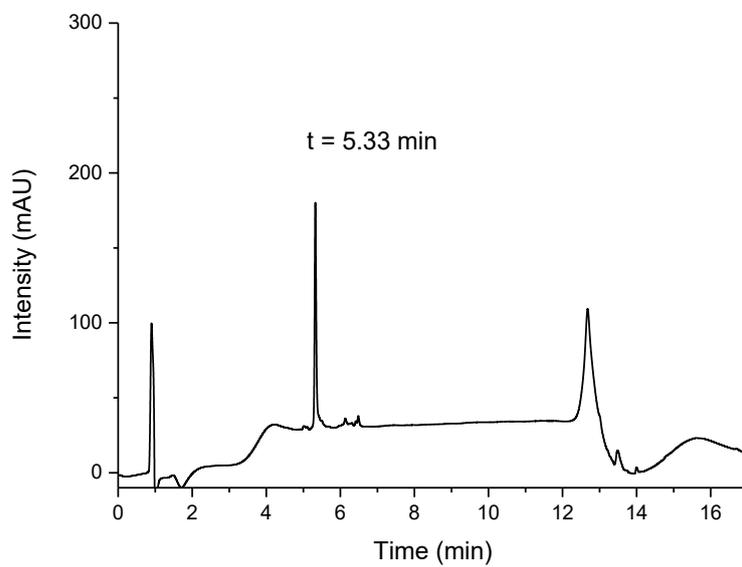
Appendix 6:  $^{13}\text{C}$ -NMR von **2** in MeOD, 600MHz.Appendix 7: Chromatogramm von **3** (5%/95% zu 95%/5% AcN/H<sub>2</sub>O in 17 min bei 25°C mit C<sub>18</sub> RP Säule).

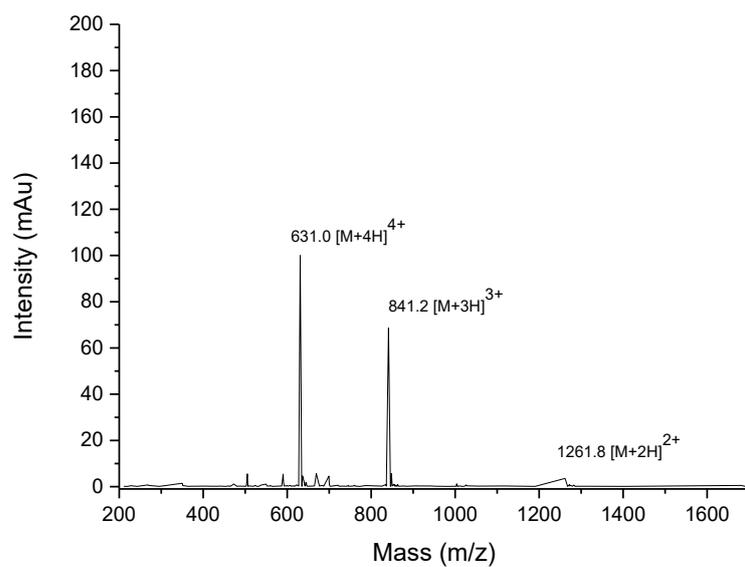
Appendix 8: HR-MS (ESI+ Q TOF) von **3**.Appendix 9: <sup>1</sup>H-NMR von **3** in CDCl<sub>3</sub>, 600MHz.



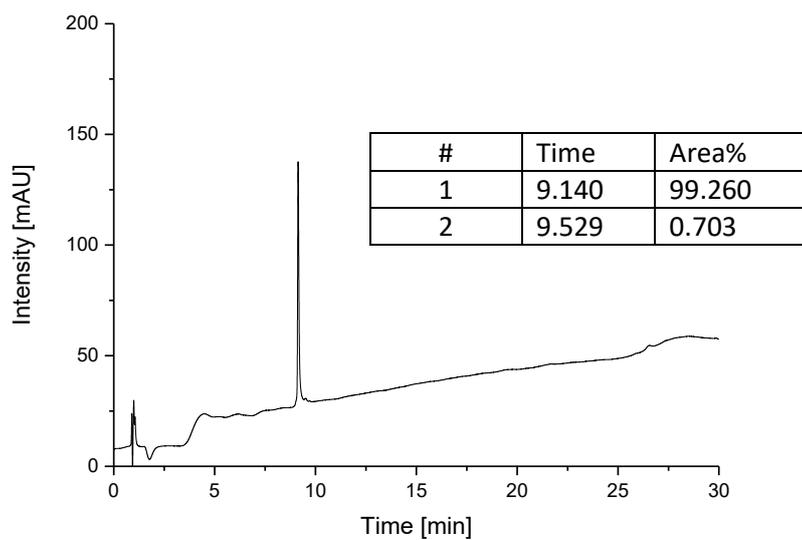
Appendix 10:  $^{13}\text{C}$ -NMR von **3** in  $\text{CDCl}_3$ , 600MHz.

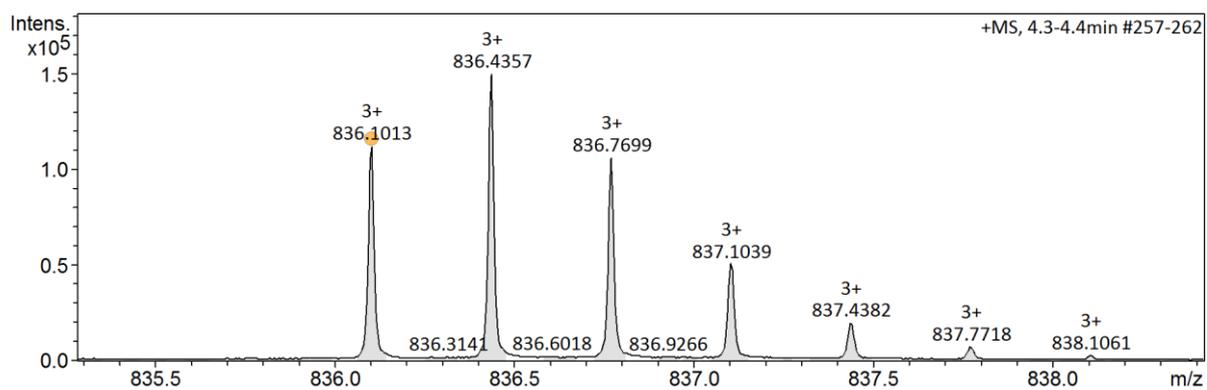
Appendix 11:  $^1\text{H-NMR}$  von **4** in MeOD, 600MHz.

Appendix 12:  $^1\text{H-NMR}$  von **5** in MeOD, 600MHz.Appendix 13: Chromatogramm von **6** (5%/95% zu 95%/5% AcN/H<sub>2</sub>O in 17 min bei 25°C mit C18 RP Säule).

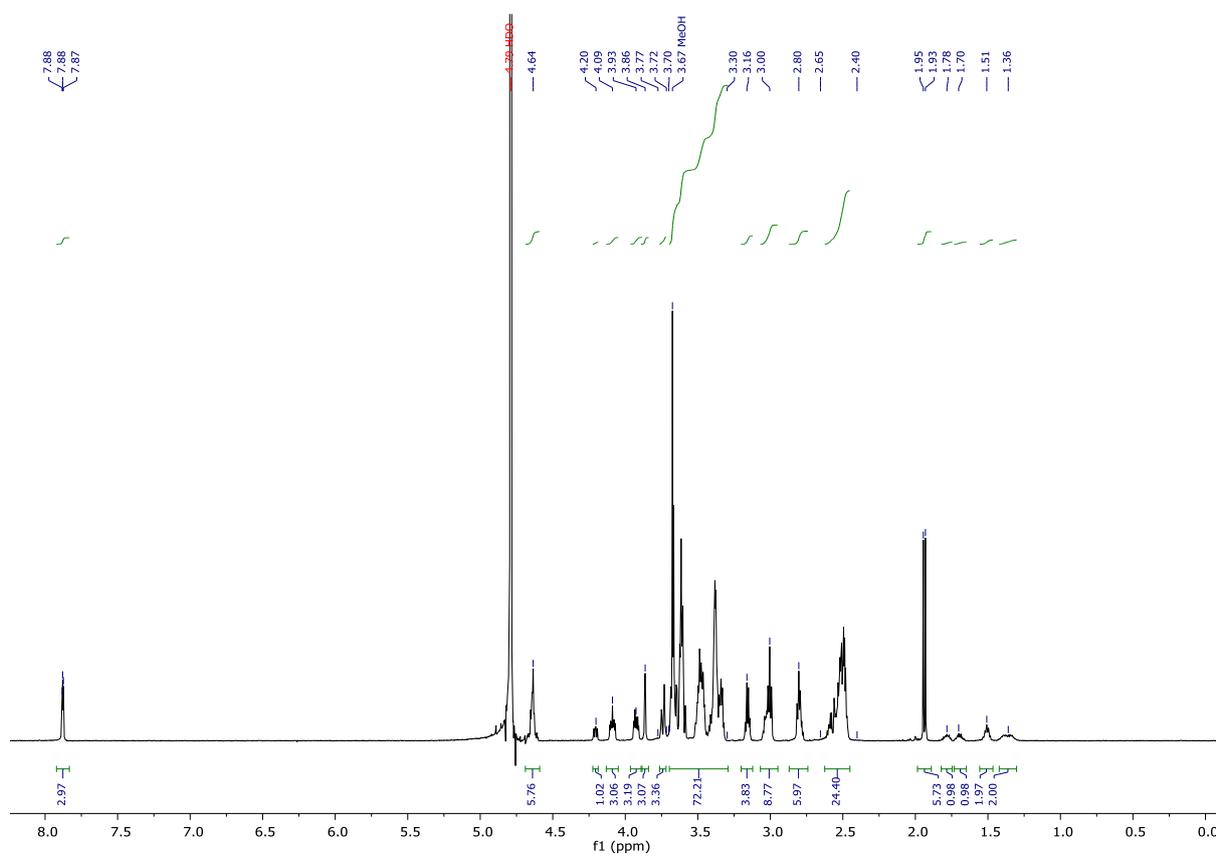


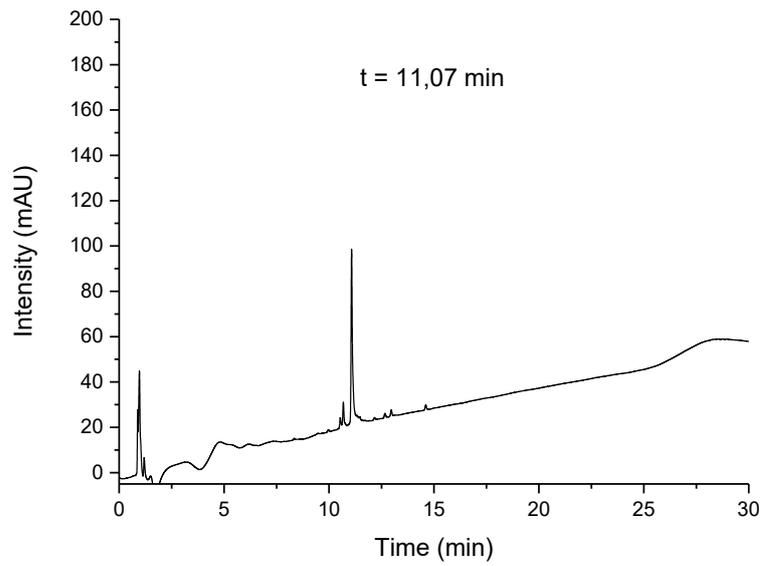
Appendix 14: ESI von 6.

Appendix 15: Chromatogramm von 7 (5%/95% zu 50%/50% AcN/H<sub>2</sub>O in 30 min bei 25°C mit C18 RP Säule).

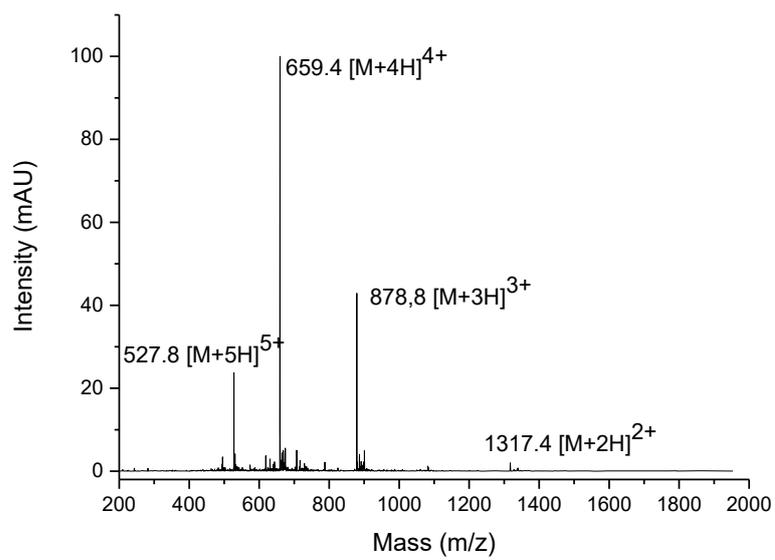


Appendix 16: HR-MS (ESI+ Q TOF) von 7.

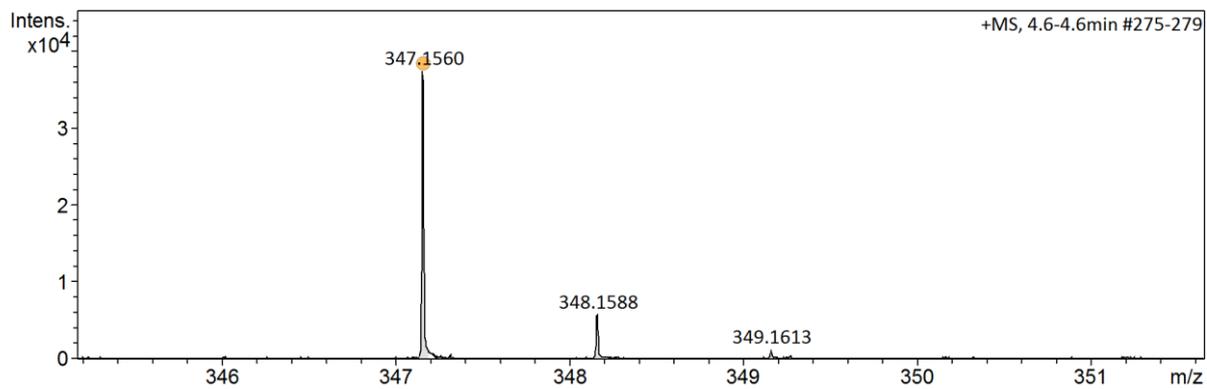
Appendix 17: <sup>1</sup>H-NMR von 7 in D<sub>2</sub>O, 600MHz.



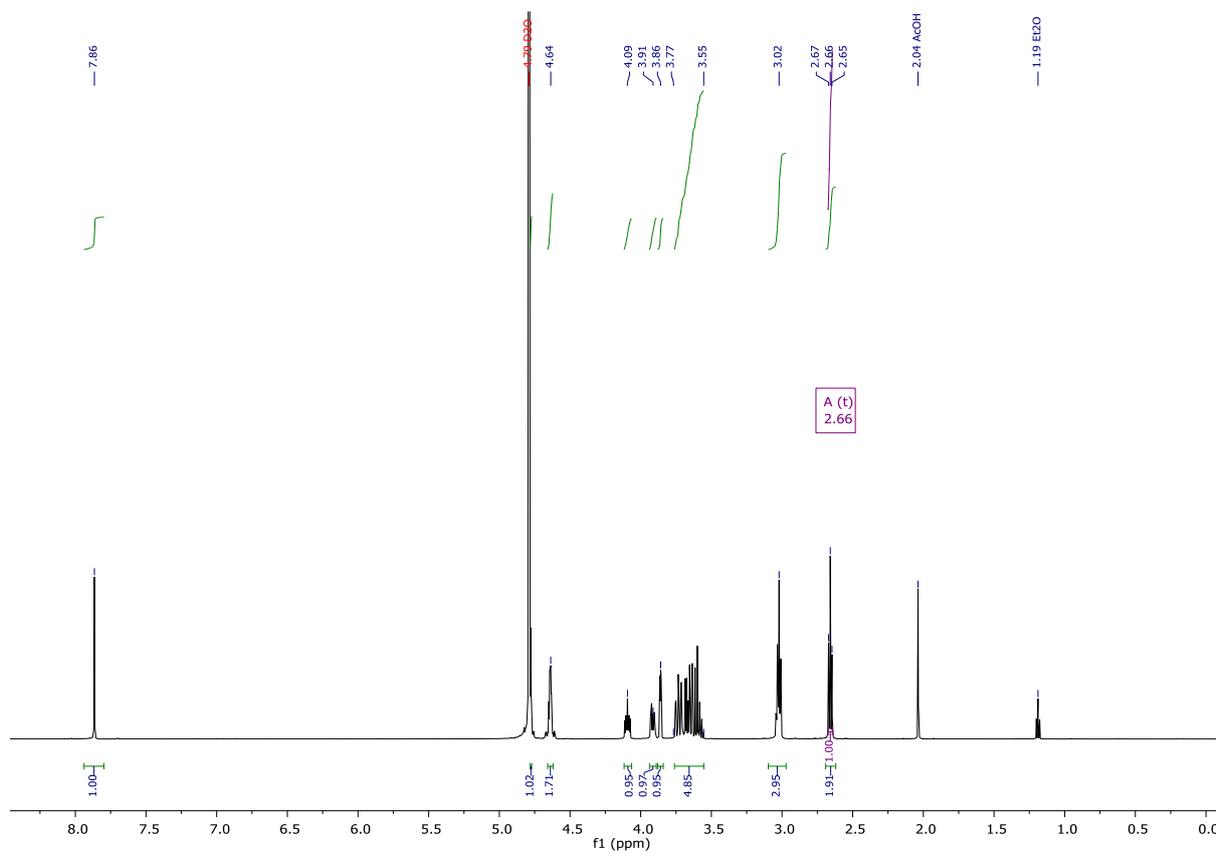
Appendix 18: Chromatogramm von **8** (5%/95% zu 50%/50% AcN/H<sub>2</sub>O in 30 min bei 25°C mit C18 RP Säule).

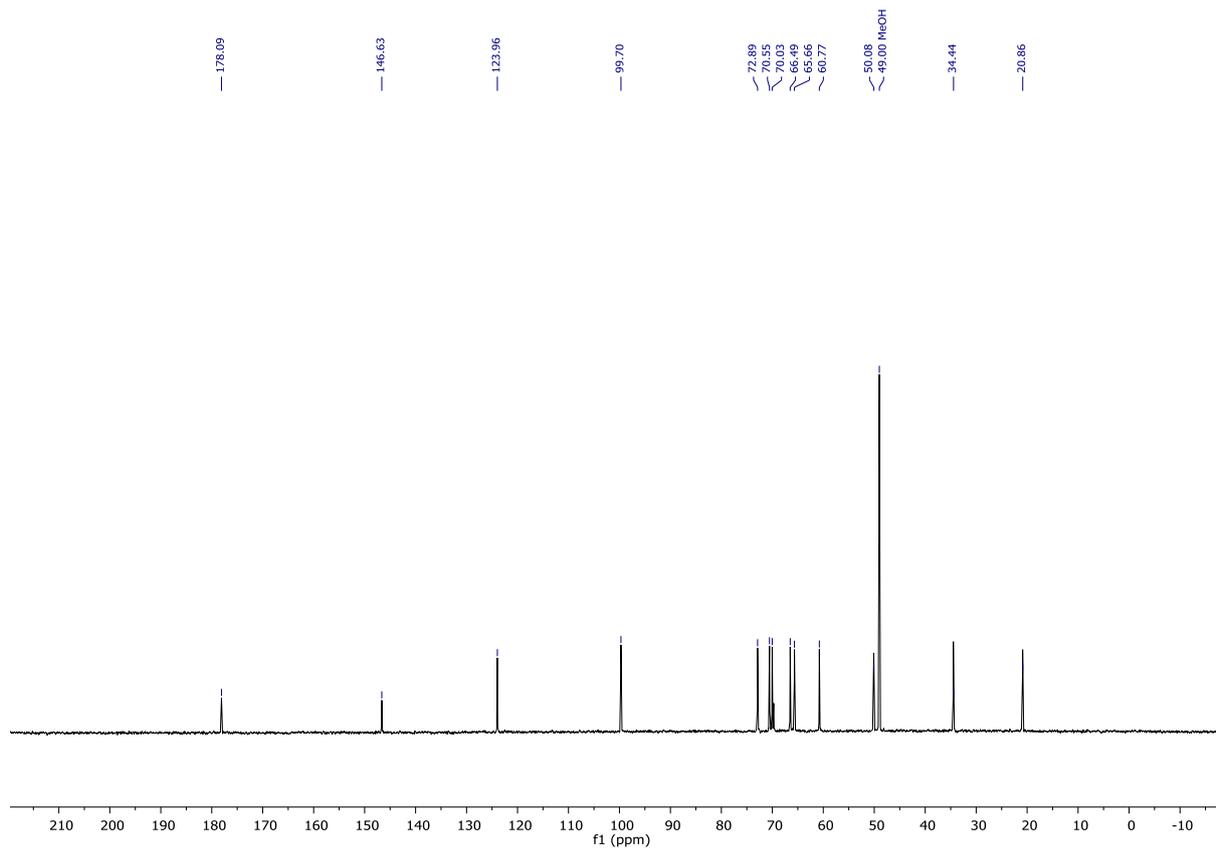
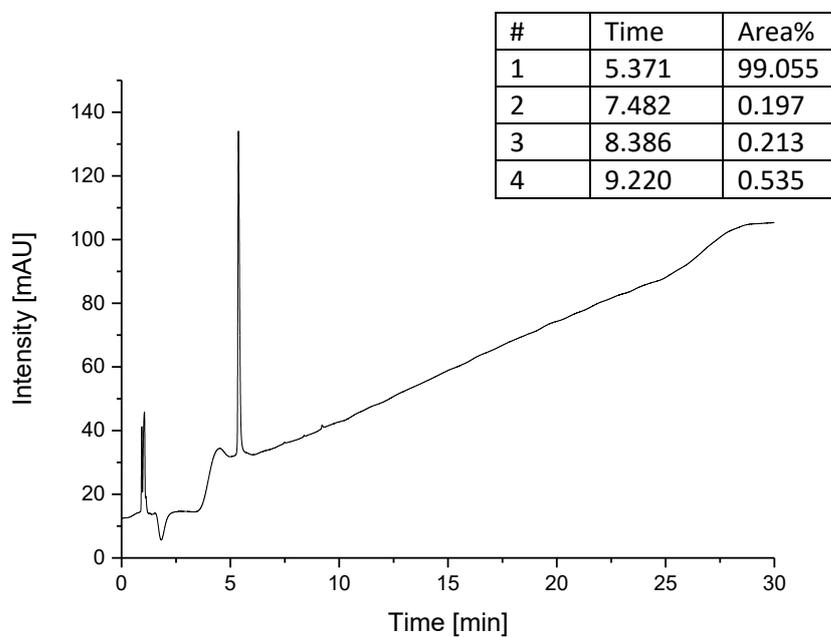


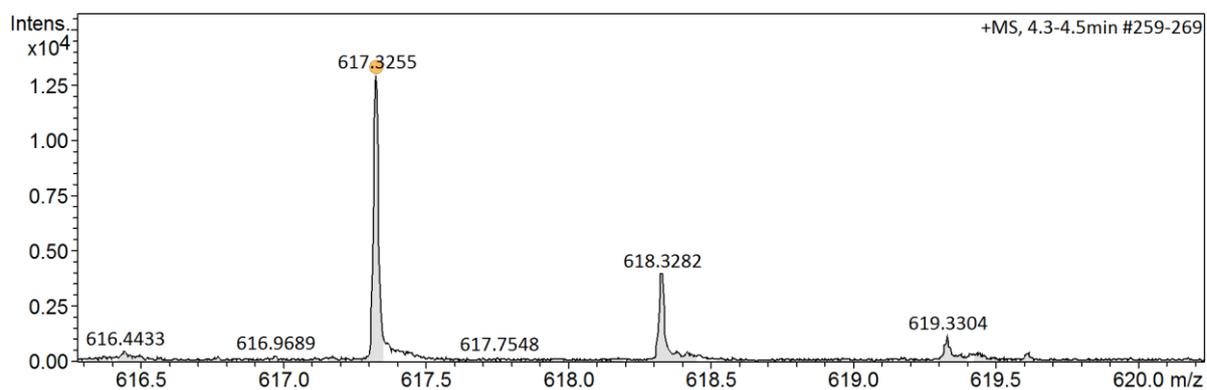
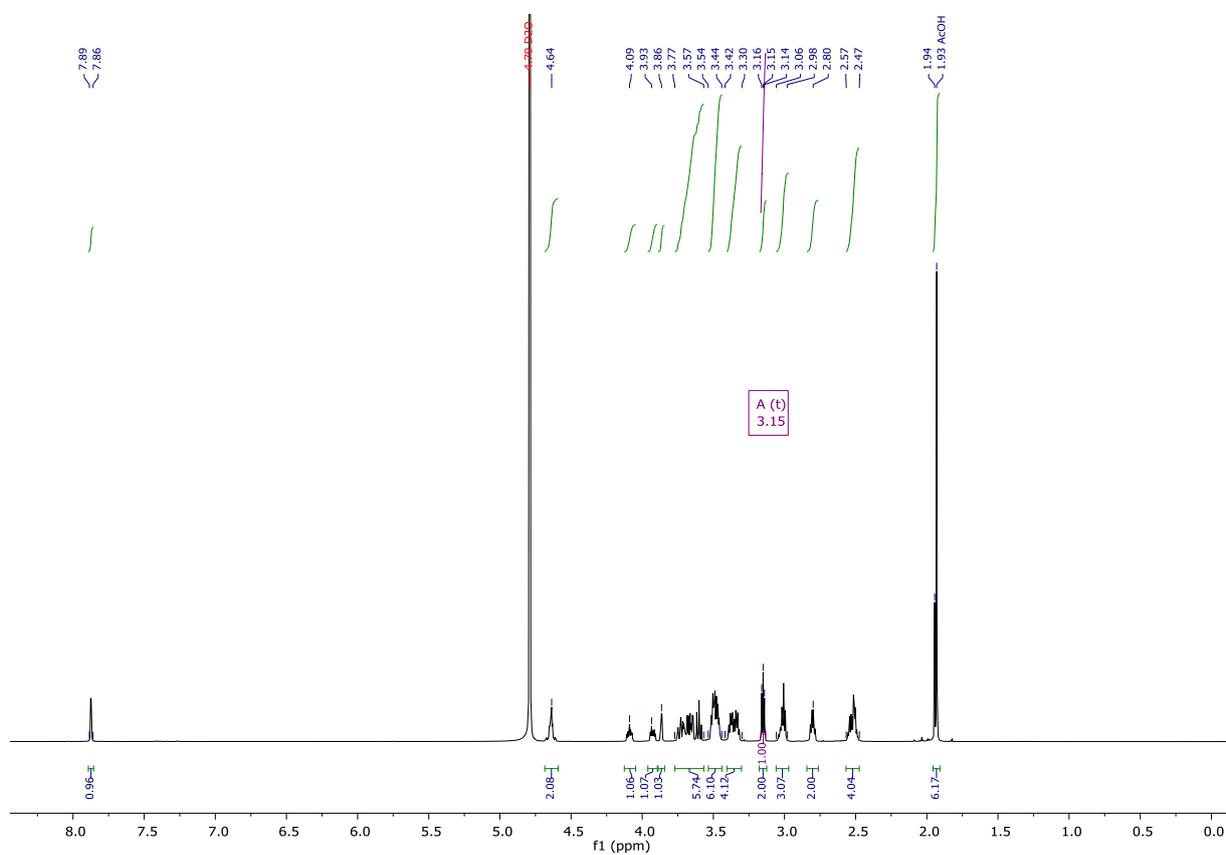
Appendix 19: ESI von **8**.

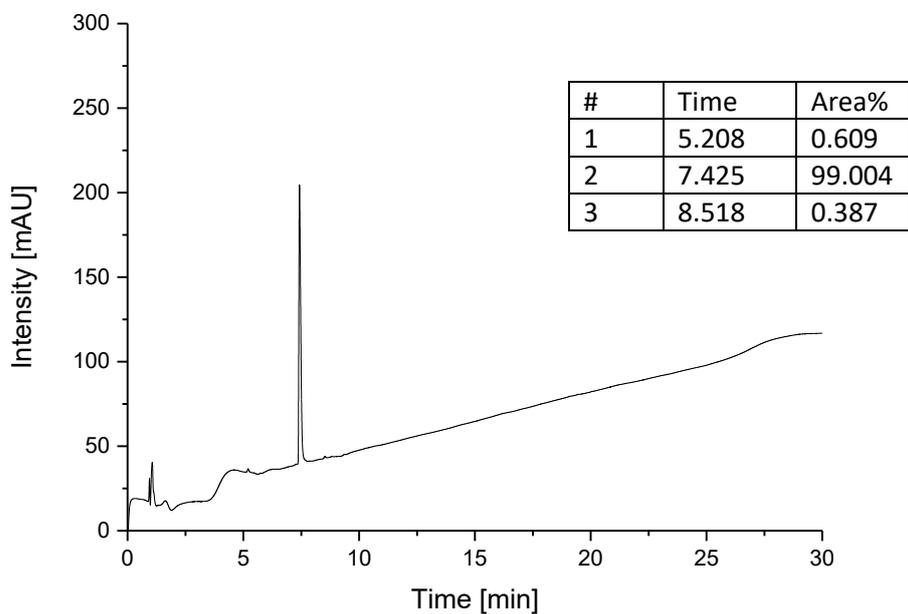


Appendix 20: HR-MS (ESI+ Q TOF) von 9

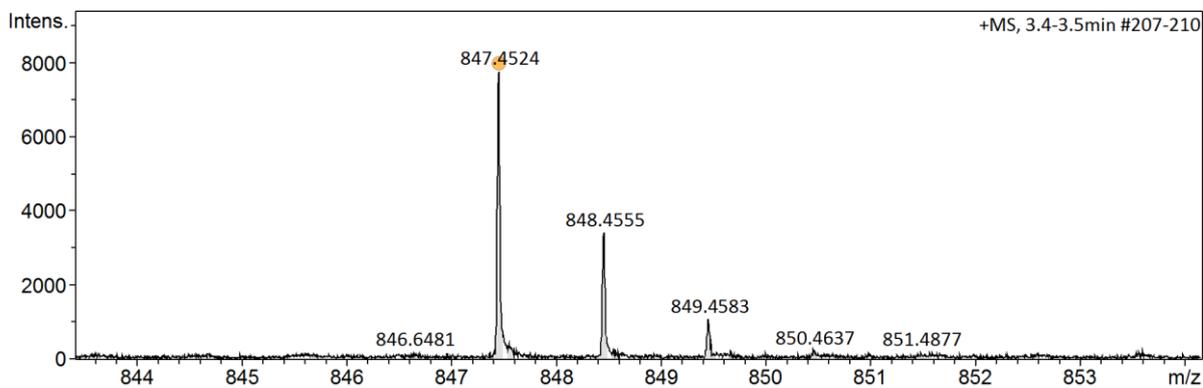
Appendix 21: <sup>1</sup>H-NMR von 9 in D<sub>2</sub>O, 600MHz.

Appendix 22:  $^{13}\text{C}$ -NMR von **9** in MeOD, 600MHz.Appendix 23: Chromatogramm von **10** (5%/95% zu 50%/50% AcN/H<sub>2</sub>O in 30 min bei 25°C mit C18 RP Säule).

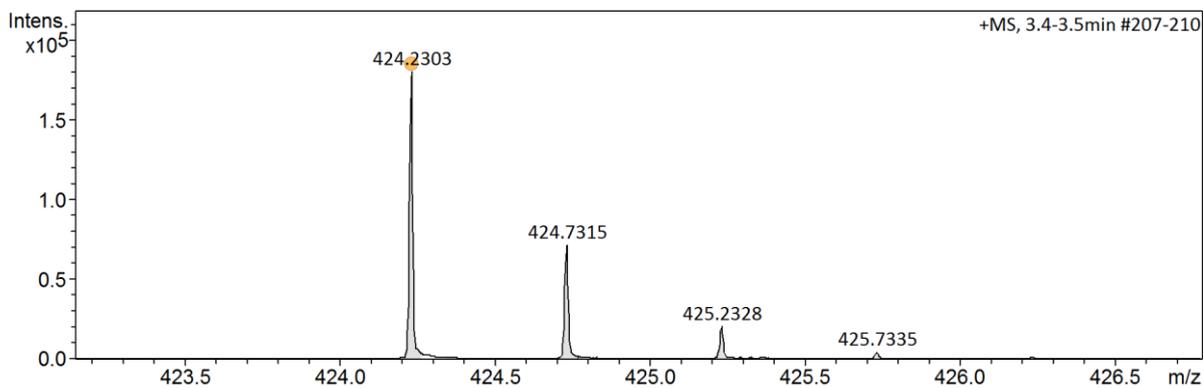
Appendix 24: HR-MS (ESI<sup>+</sup> Q TOF) von **10**.Appendix 25: <sup>1</sup>H-NMR von **10** in D<sub>2</sub>O, 600MHz.



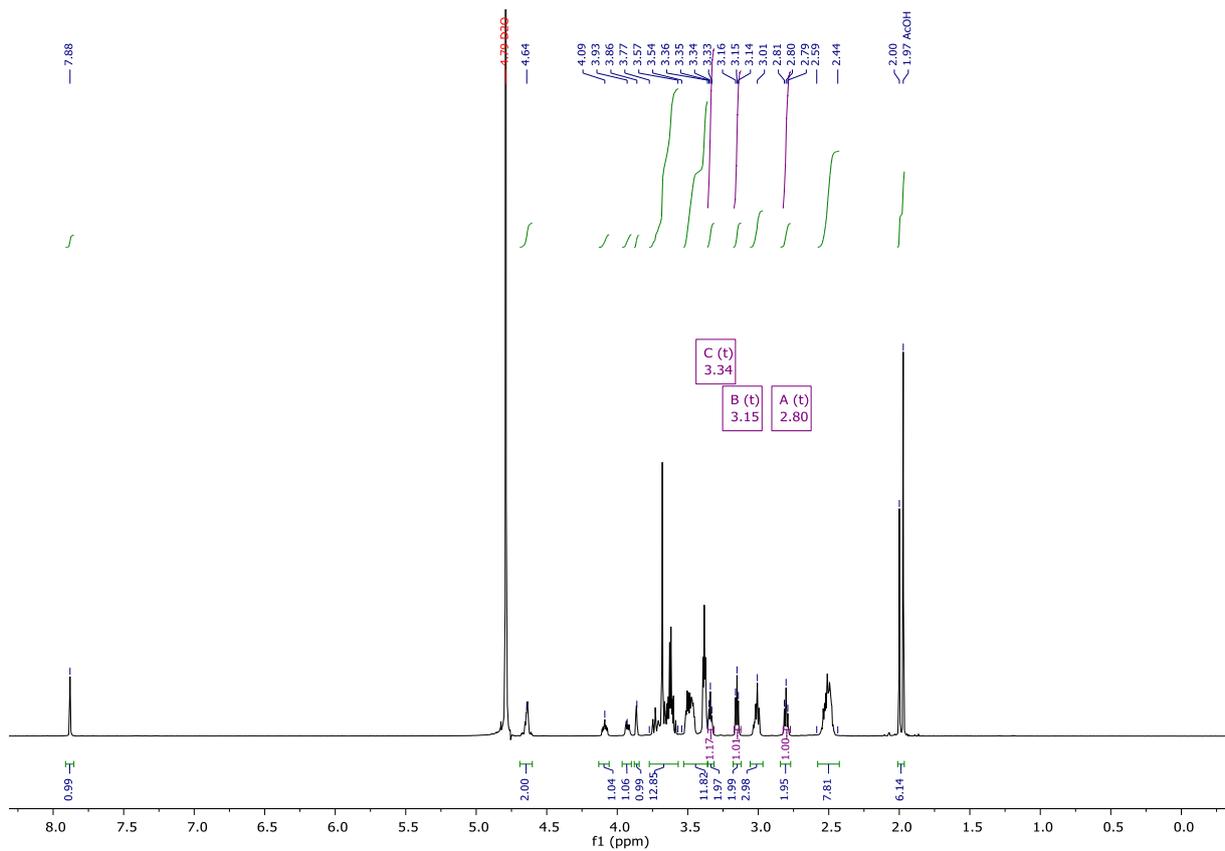
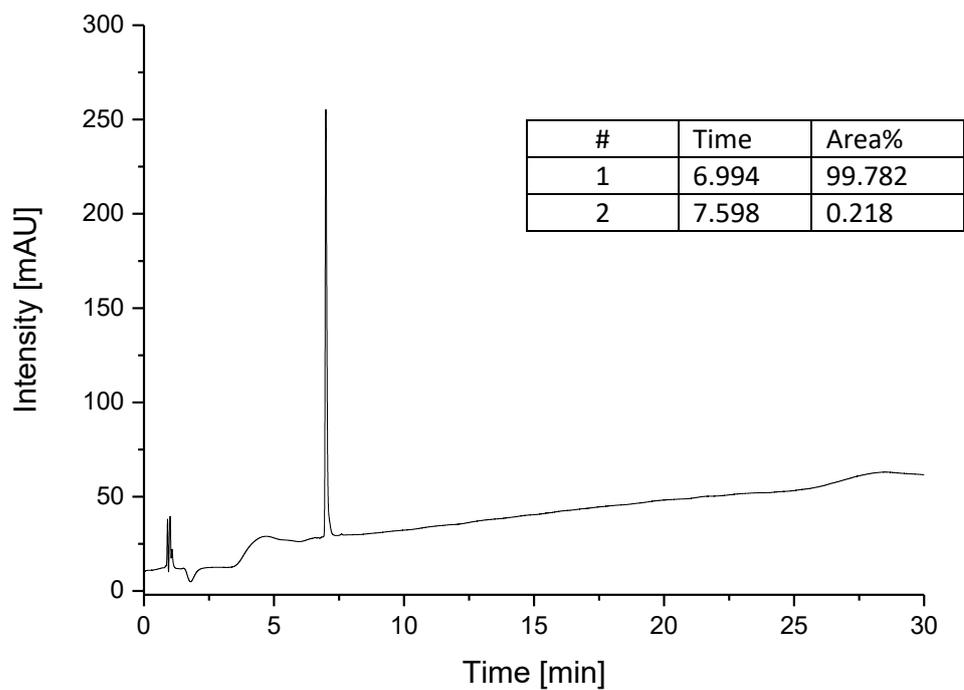
Appendix 26: Chromatogramm von **11** (5%/95% zu 50%/50% AcN/H<sub>2</sub>O in 30 min bei 25°C mit C18 RP Säule).

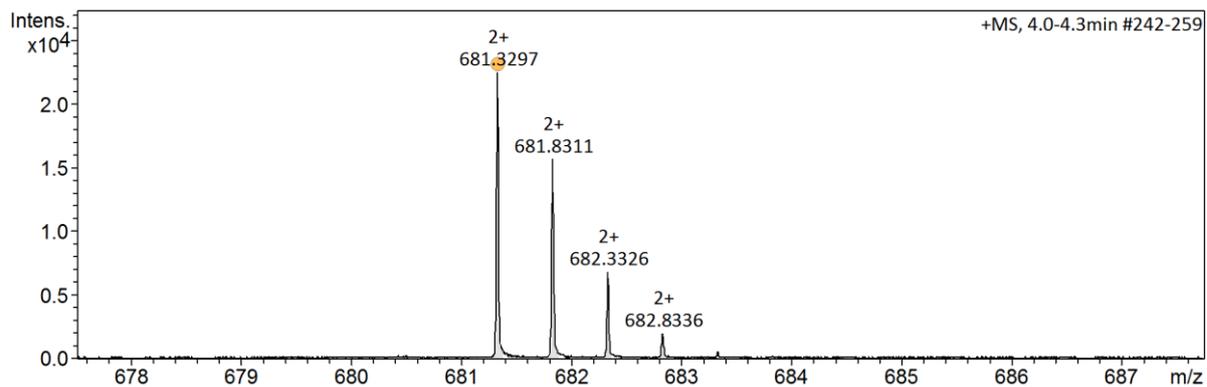
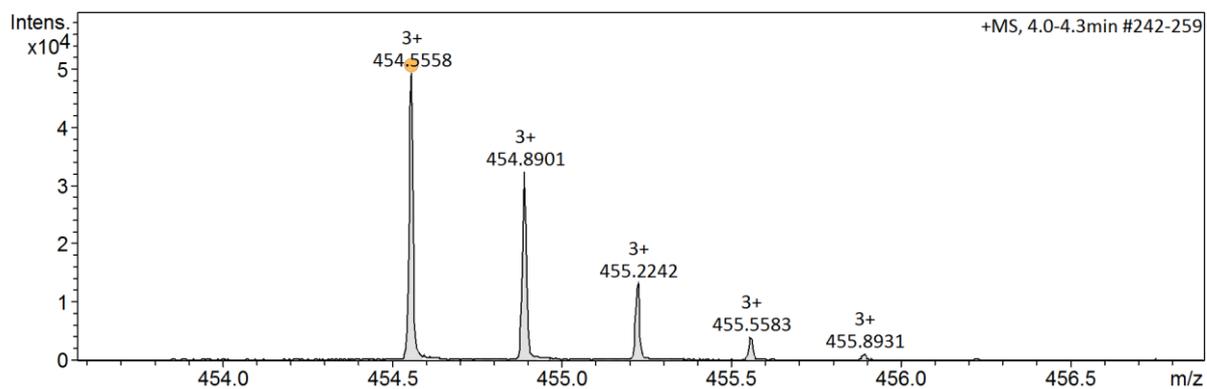


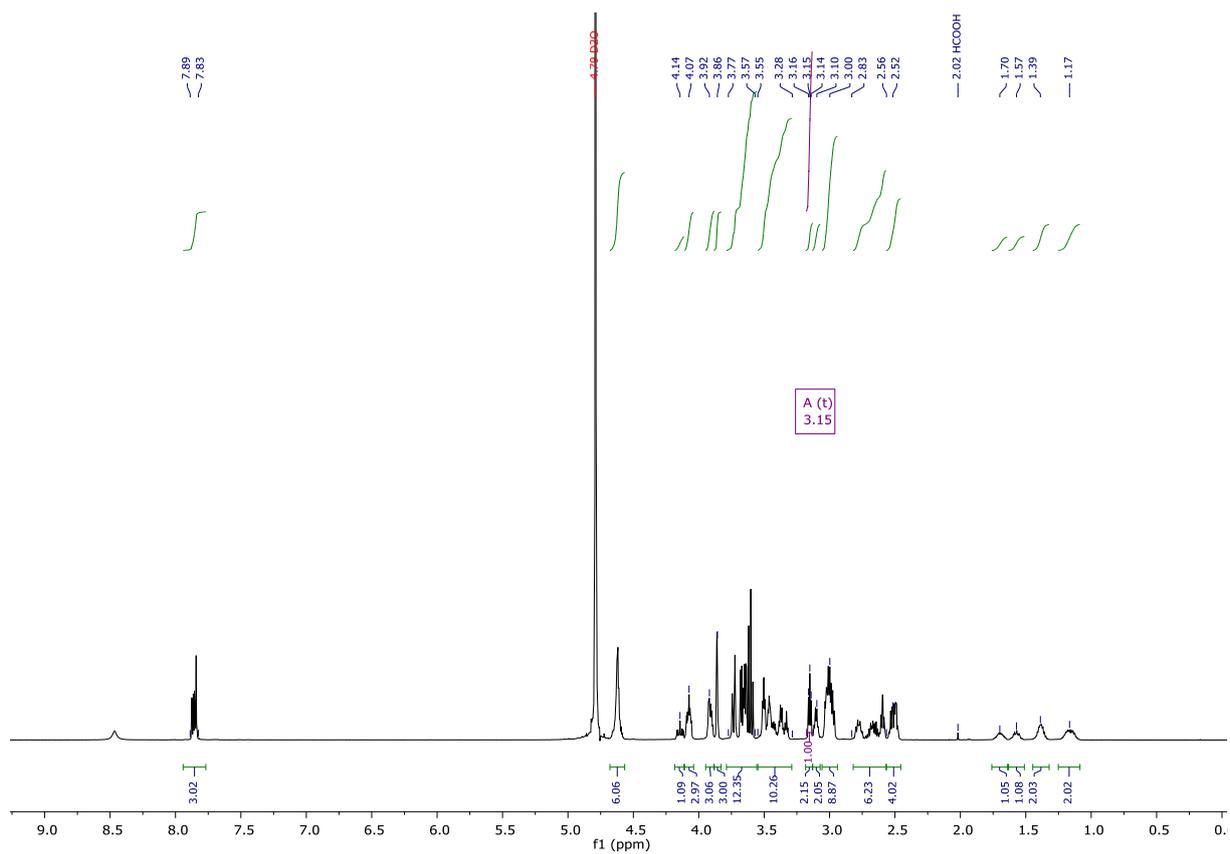
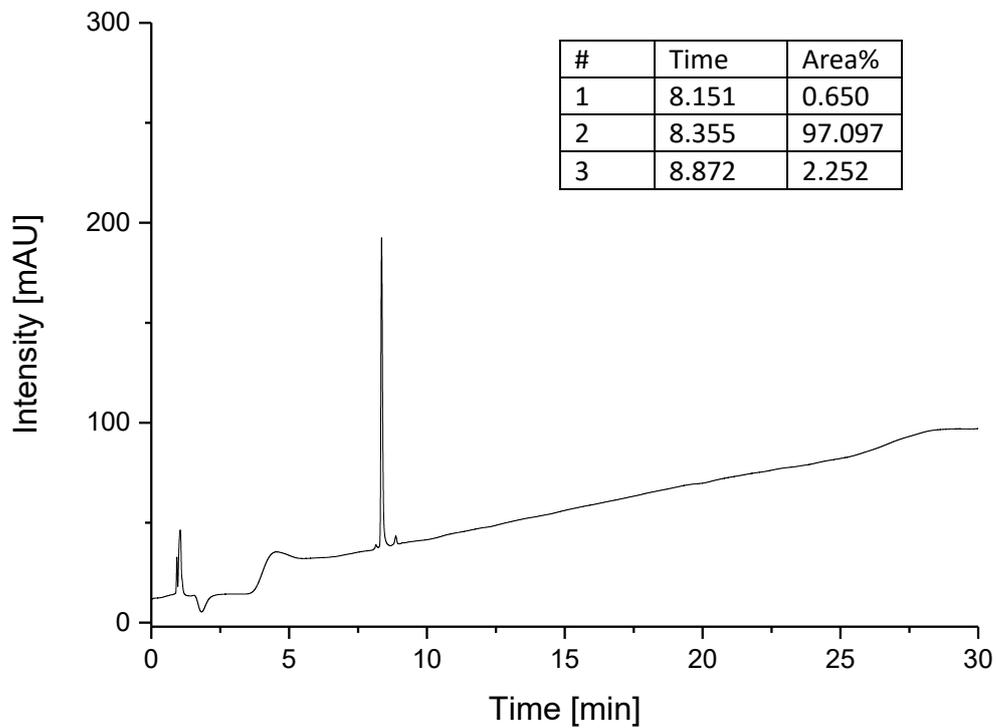
Appendix 27: HR-MS (ESI<sup>+</sup> Q TOF) von **11** [M+H]<sup>+</sup>.

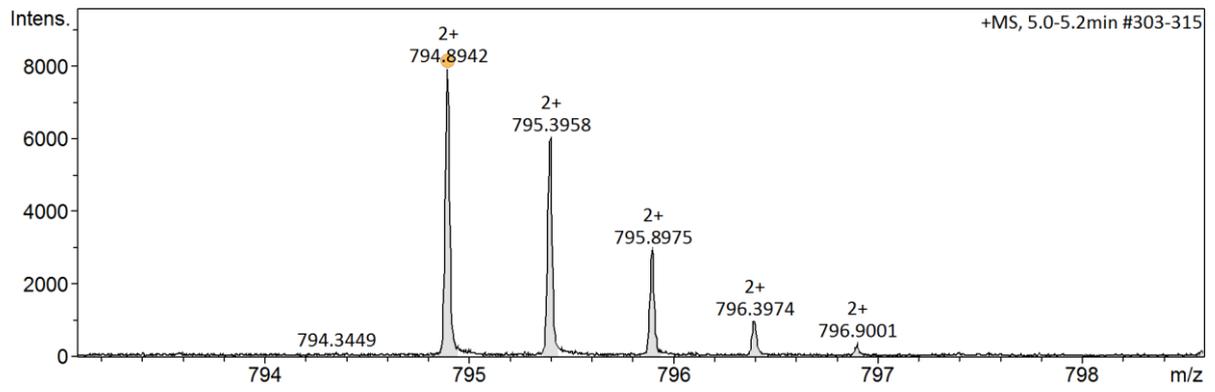
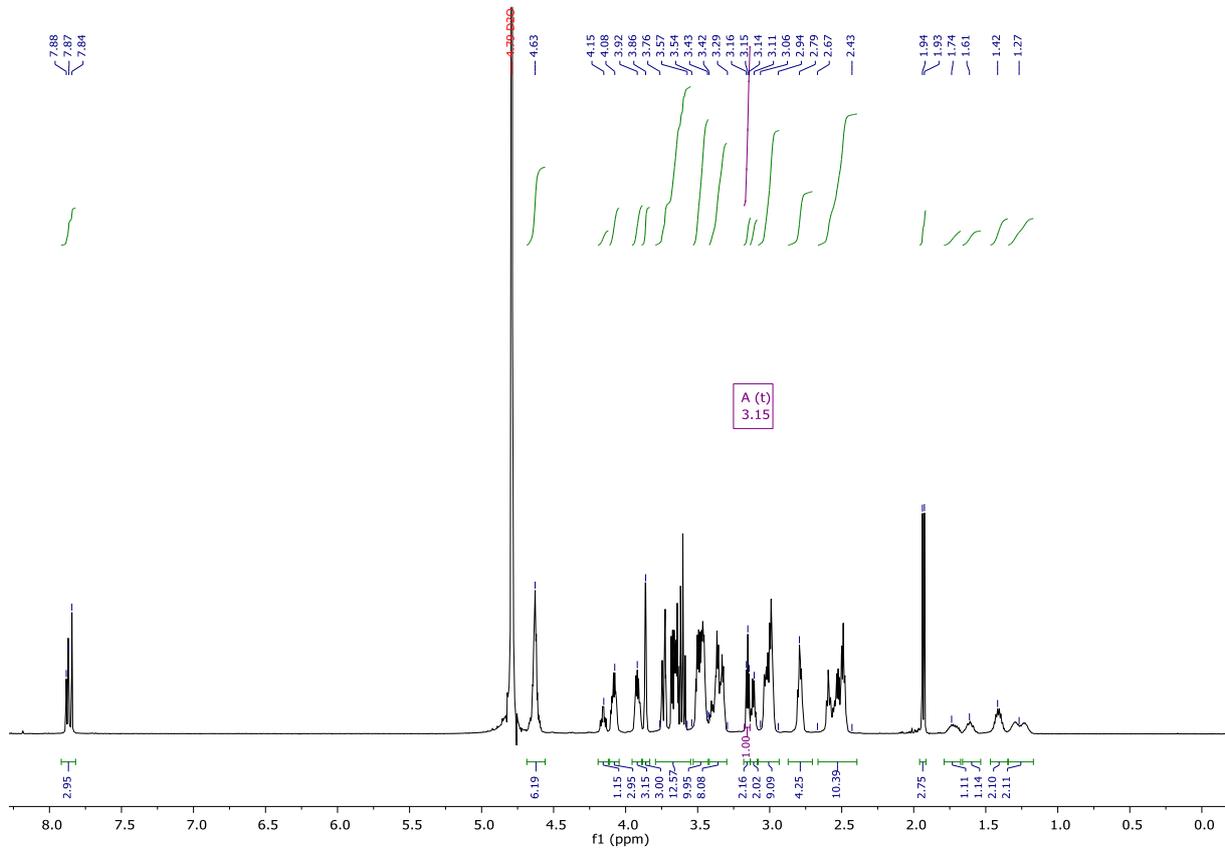


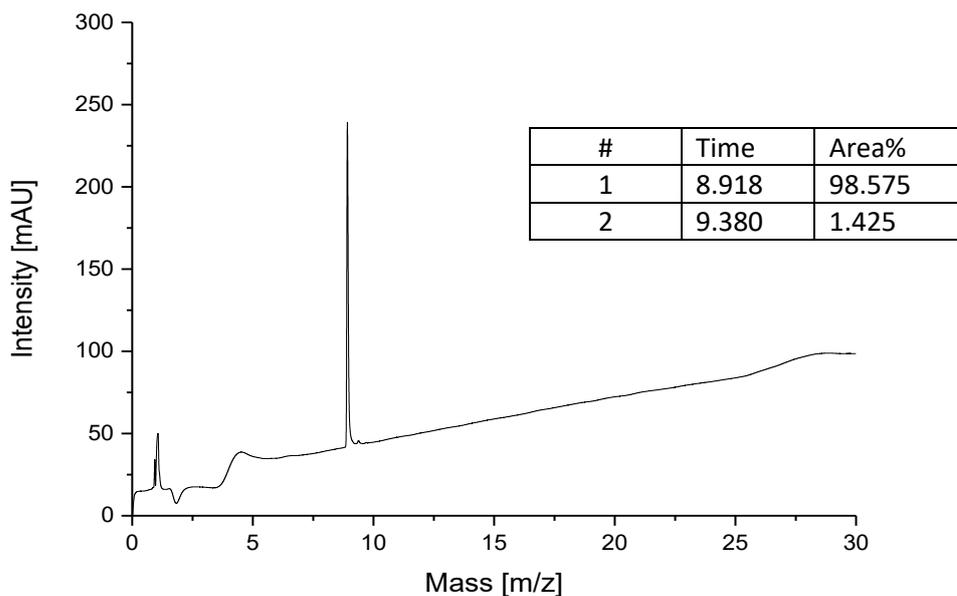
Appendix 28: HR-MS (ESI<sup>+</sup> Q TOF) von **11** [M+2H]<sup>2+</sup>.

Appendix 29:  $^1\text{H-NMR}$  von **11** in  $\text{D}_2\text{O}$ , 600MHz.Appendix 30: Chromatogramm von **12** (5%/95% zu 50%/50% AcN/ $\text{H}_2\text{O}$  in 30 min bei 25°C mit C18 RP Säule).

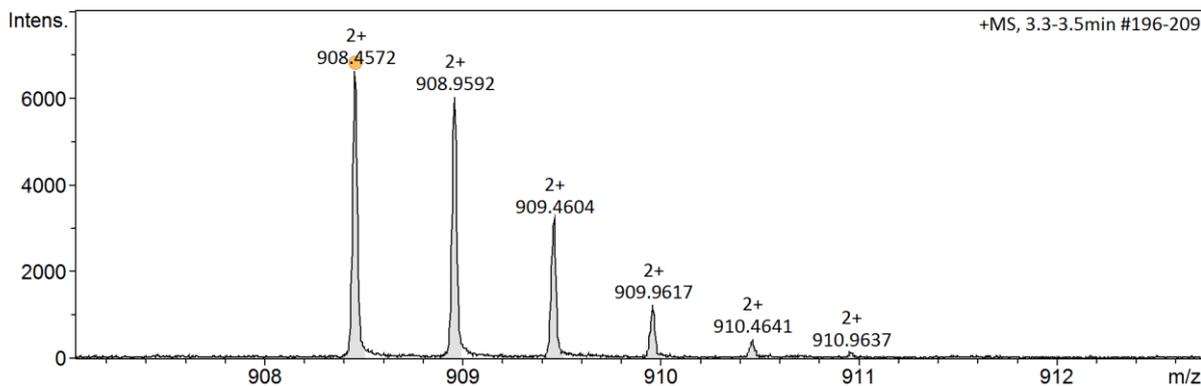
Appendix 31: HR-MS (ESI+ Q TOF) von **12**  $[M+2H]^{2+}$ .Appendix 32: HR-MS (ESI+ Q TOF) von **12**  $[M+3H]^{3+}$ .

Appendix 33:  $^1\text{H-NMR}$  von **12** in  $\text{D}_2\text{O}$ , 600MHz.Appendix 34: Chromatogramm von **13** (5%/95% zu 50%/50% AcN/ $\text{H}_2\text{O}$  in 30 min bei 25°C mit C18 RP Säule).

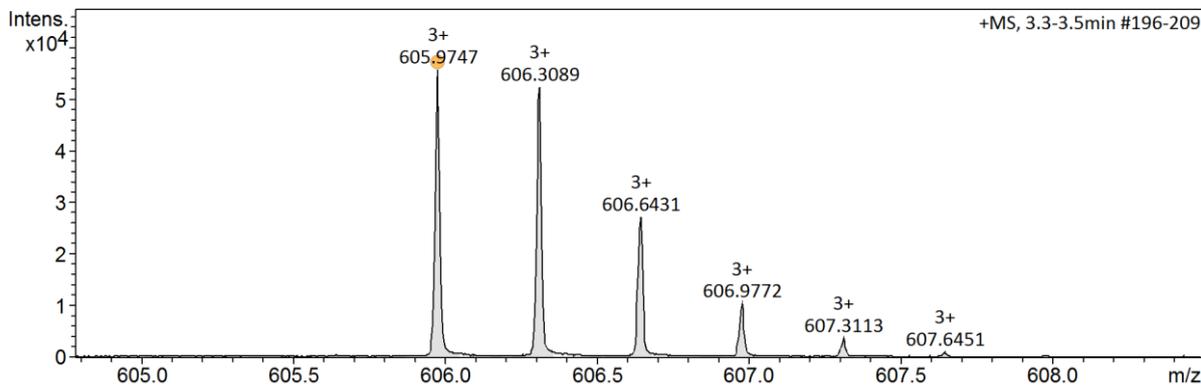
Appendix 35: HR-MS (ESI+ Q TOF) von **13**  $[M+2H]^{2+}$ .Appendix 36:  $^1\text{H-NMR}$  von **13** in  $\text{D}_2\text{O}$ , 600MHz.



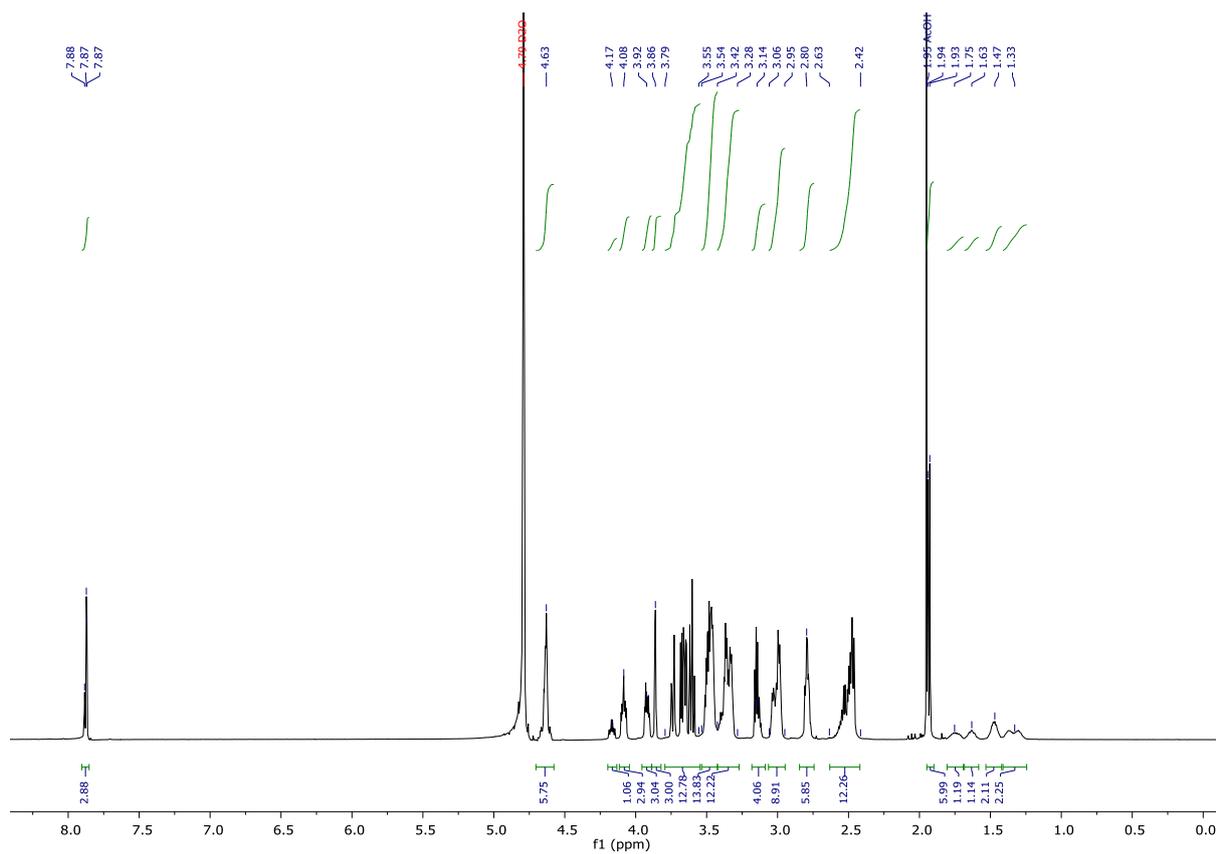
Appendix 37: Chromatogramm von **14** (5%/95% zu 50%/50% AcN/H<sub>2</sub>O in 30 min bei 25°C mit C18 RP Säule).

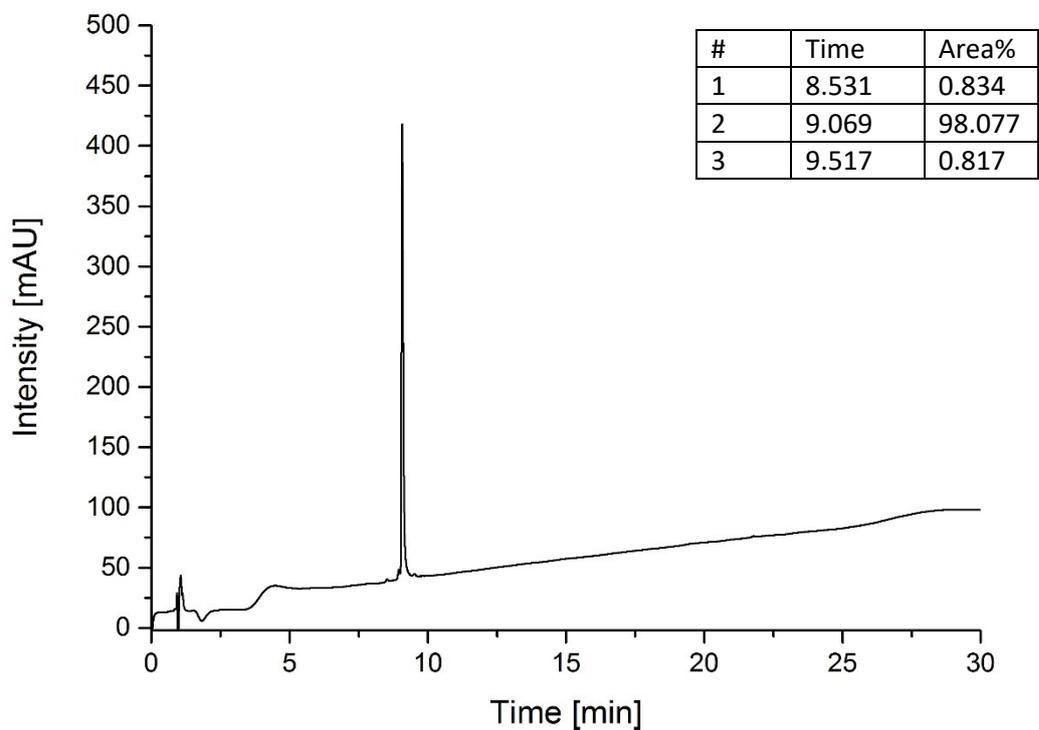


Appendix 38: HR-MS (ESI+ Q TOF) von **14** [M+2H]<sup>2+</sup>.

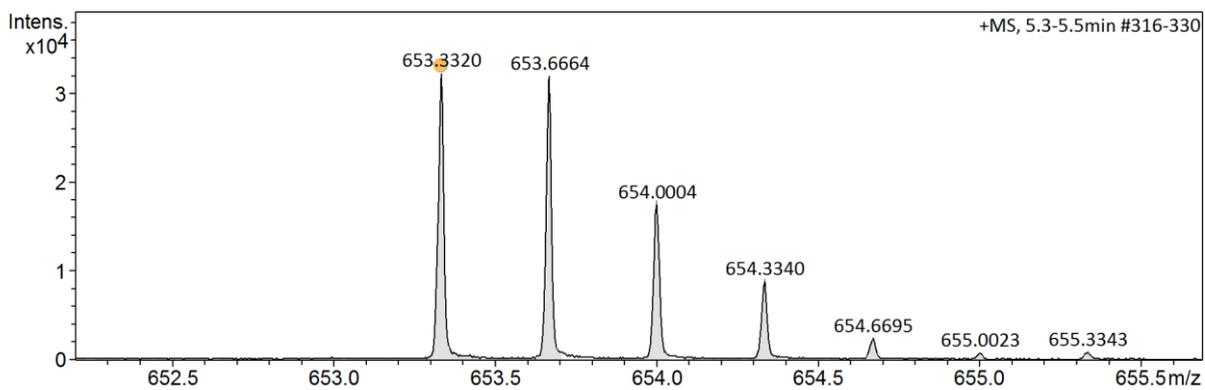


Appendix 39: HR-MS (ESI+ Q TOF) von **14** [M+3H]<sup>3+</sup>.

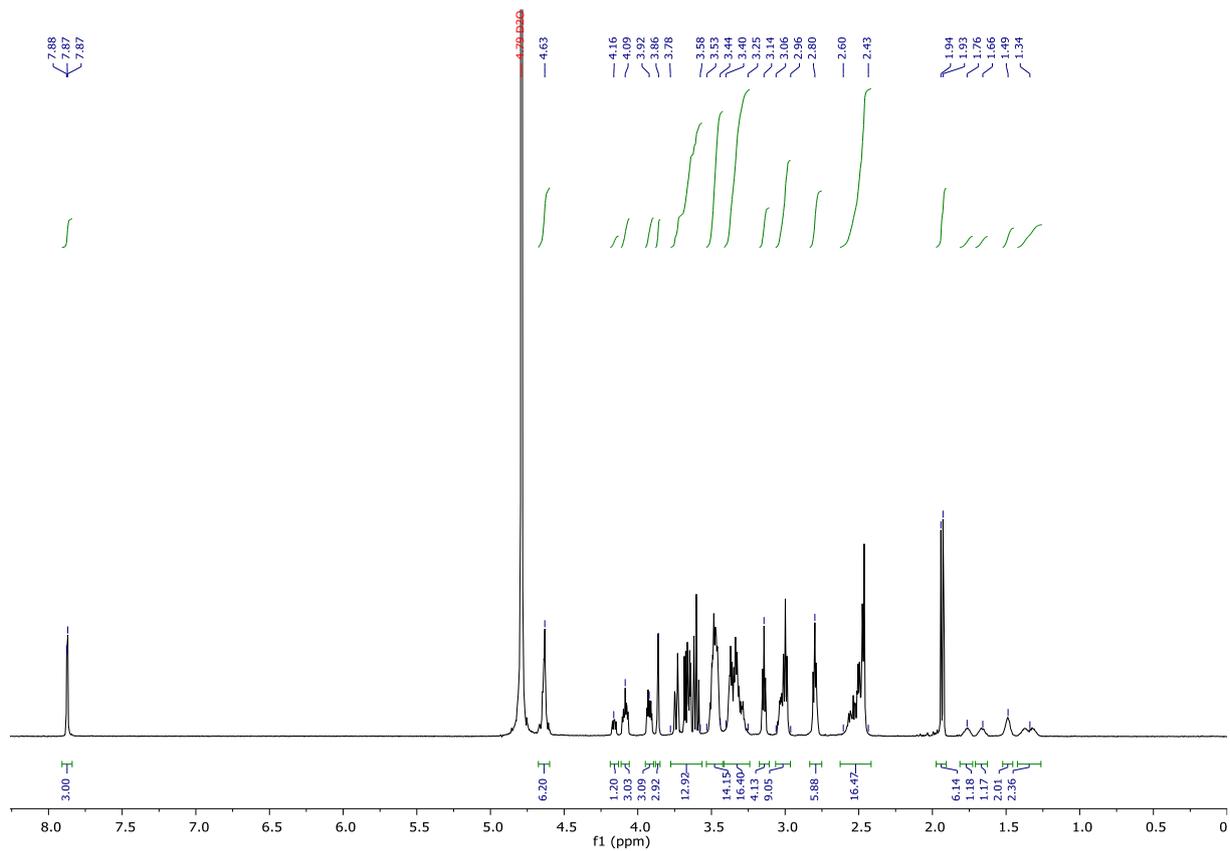
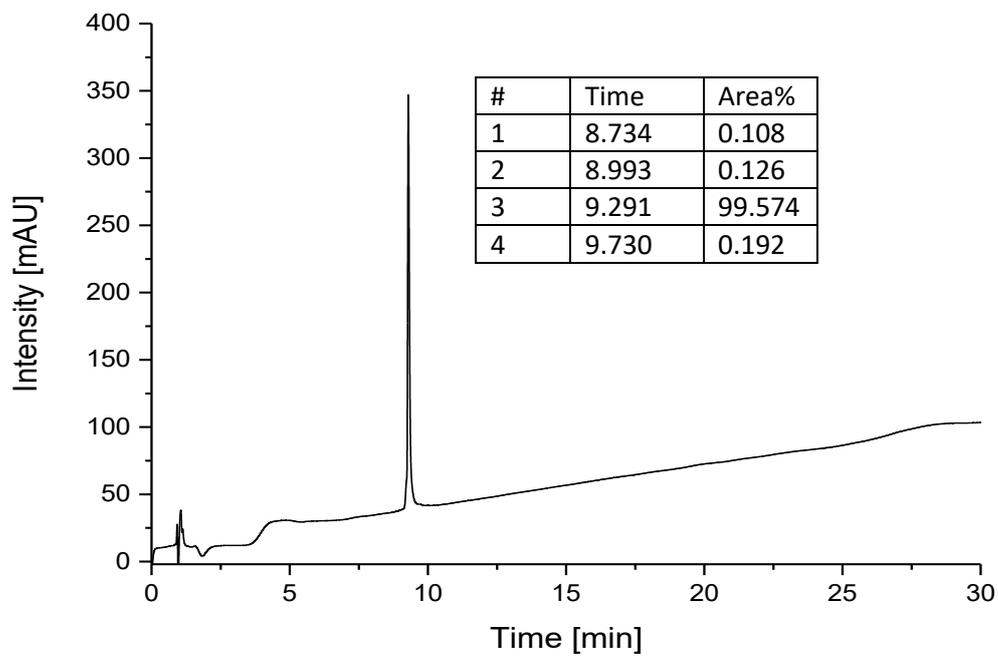
Appendix 40:  $^1\text{H-NMR}$  von **14** in  $\text{D}_2\text{O}$ , 600MHz.

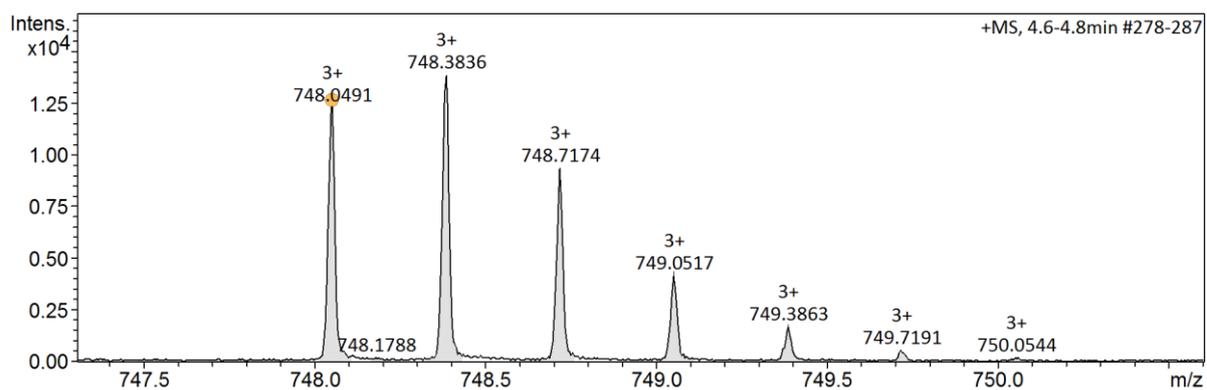
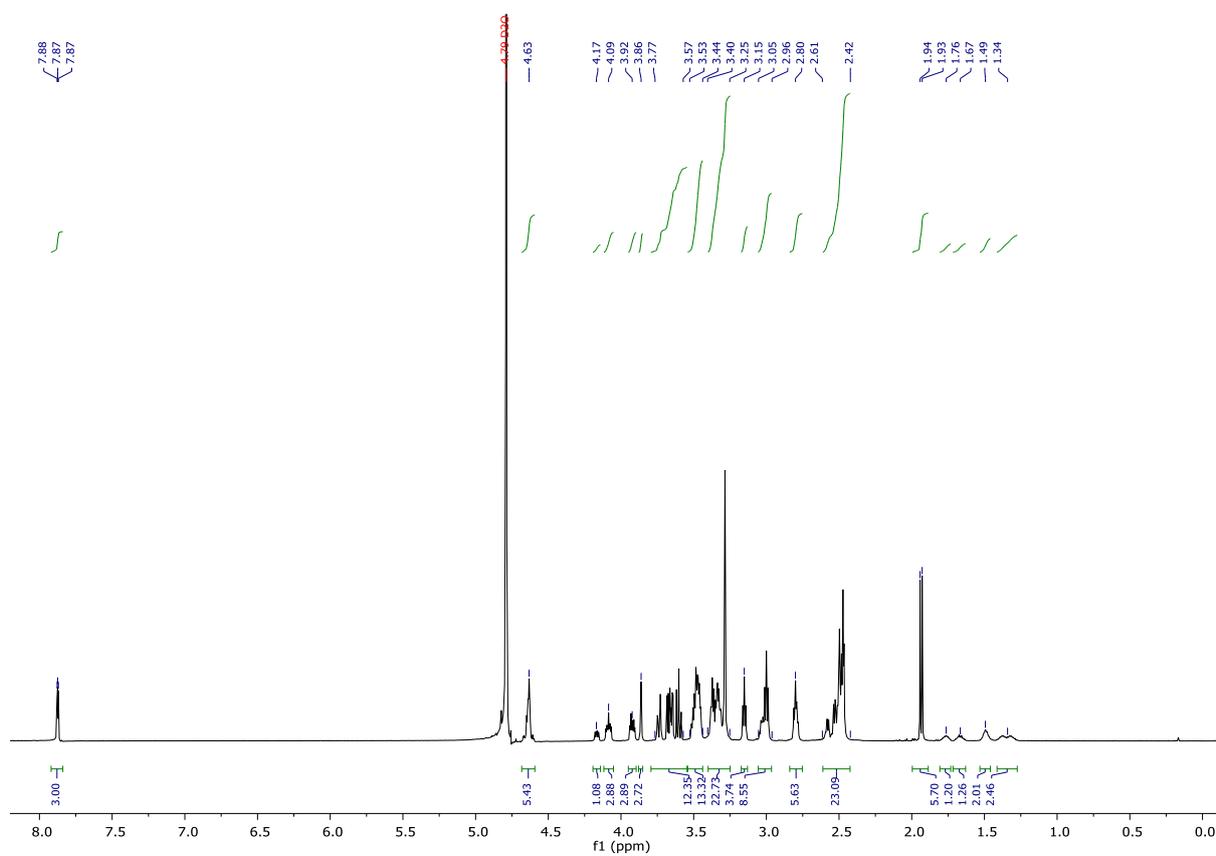


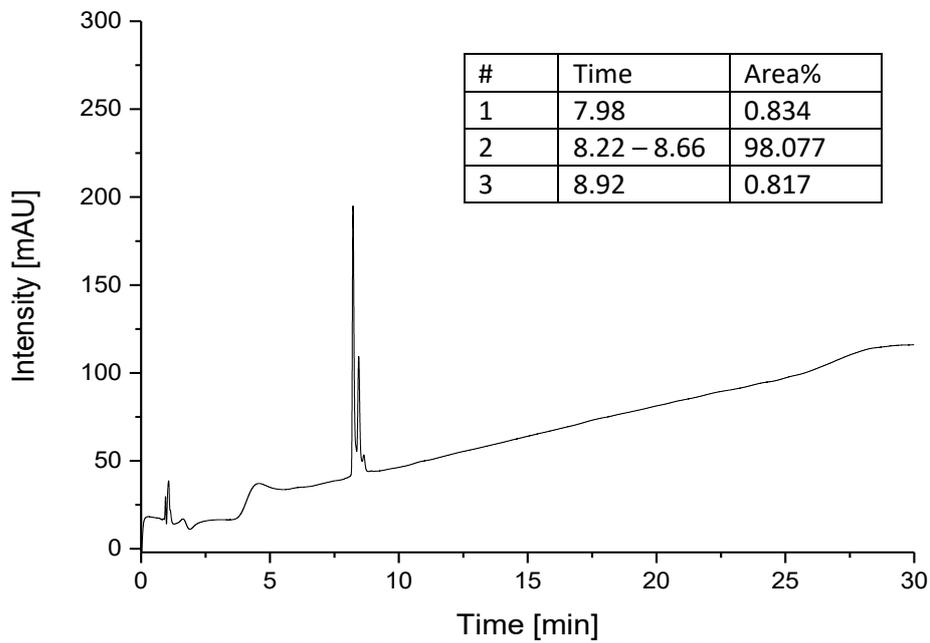
Appendix 41: Chromatogramm von **15** (5%/95% zu 50%/50% AcN/H<sub>2</sub>O in 30 min bei 25°C mit C18 RP Säule).



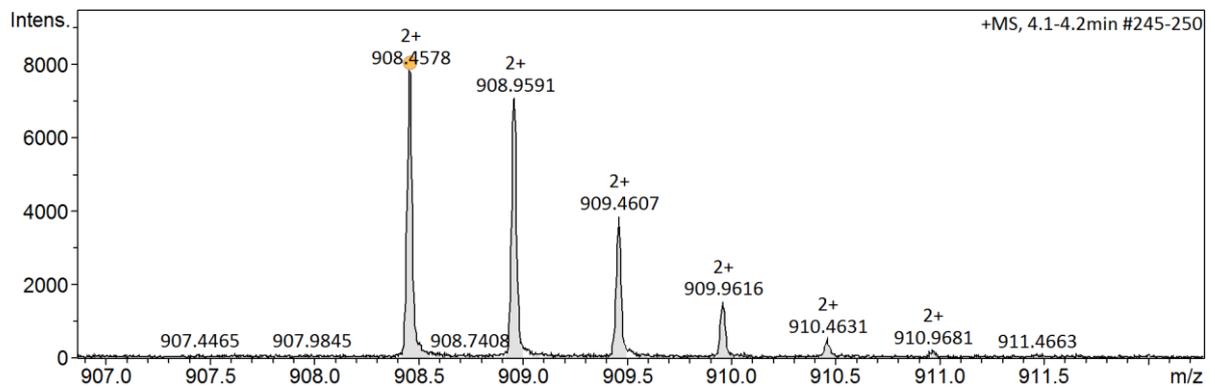
Appendix 42: HR-MS (ESI<sup>+</sup> Q TOF) von **15** [M+3H]<sup>3+</sup>.

Appendix 43:  $^1\text{H-NMR}$  von **15** in  $\text{D}_2\text{O}$ , 600MHz.Appendix 44: Chromatogramm von **16** (5%/95% zu 50%/50% AcN/ $\text{H}_2\text{O}$  in 30 min bei 25°C mit C18 RP Säule).

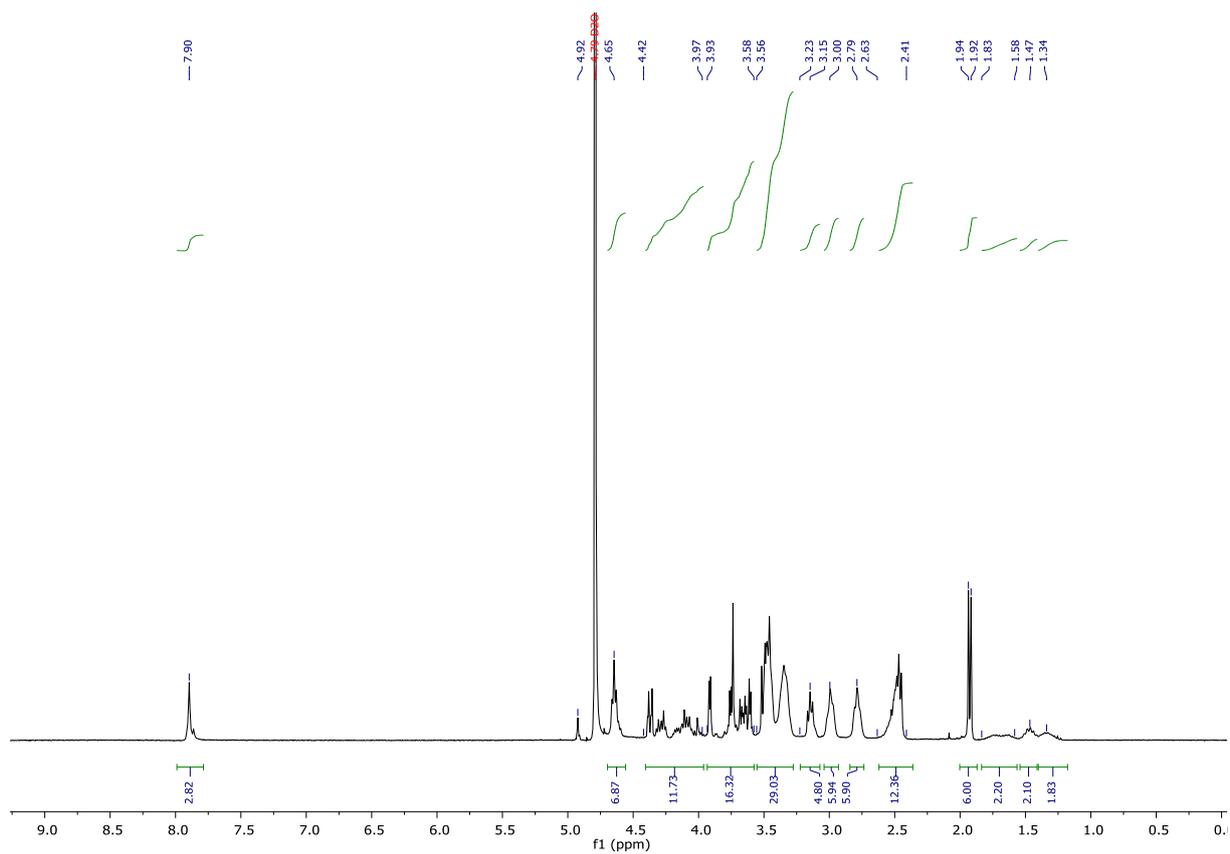
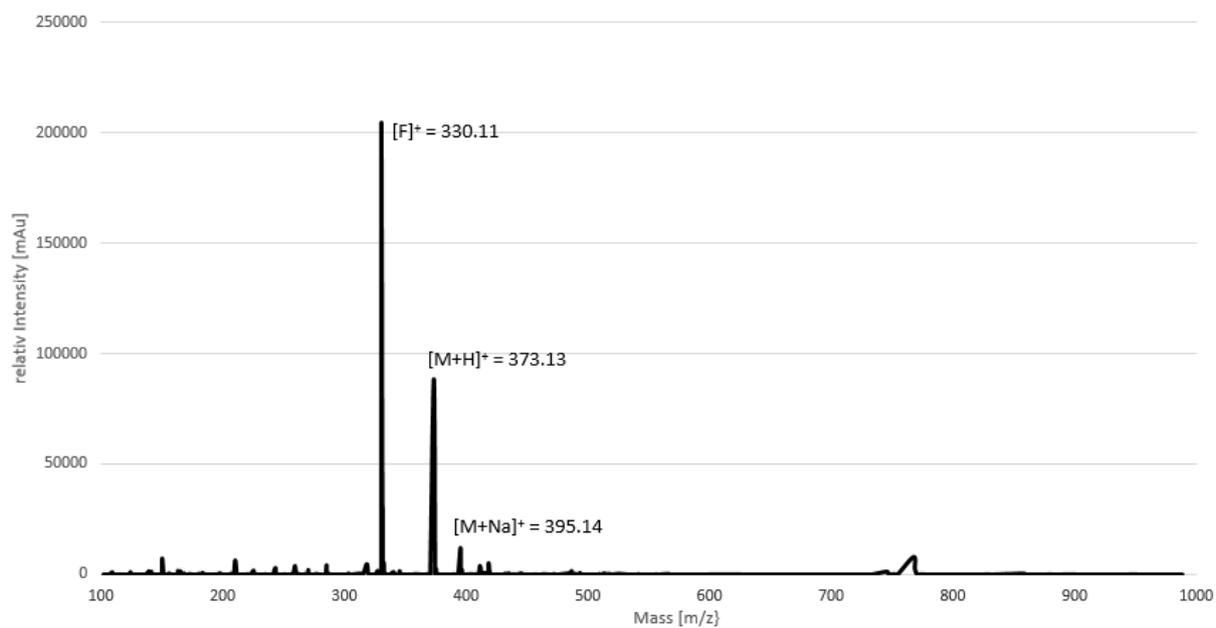
Appendix 45: HR-MS (ESI+ Q TOF) von **16** [M+3H]<sup>3+</sup>.Appendix 46: <sup>1</sup>H-NMR von **16** in D<sub>2</sub>O, 600MHz.

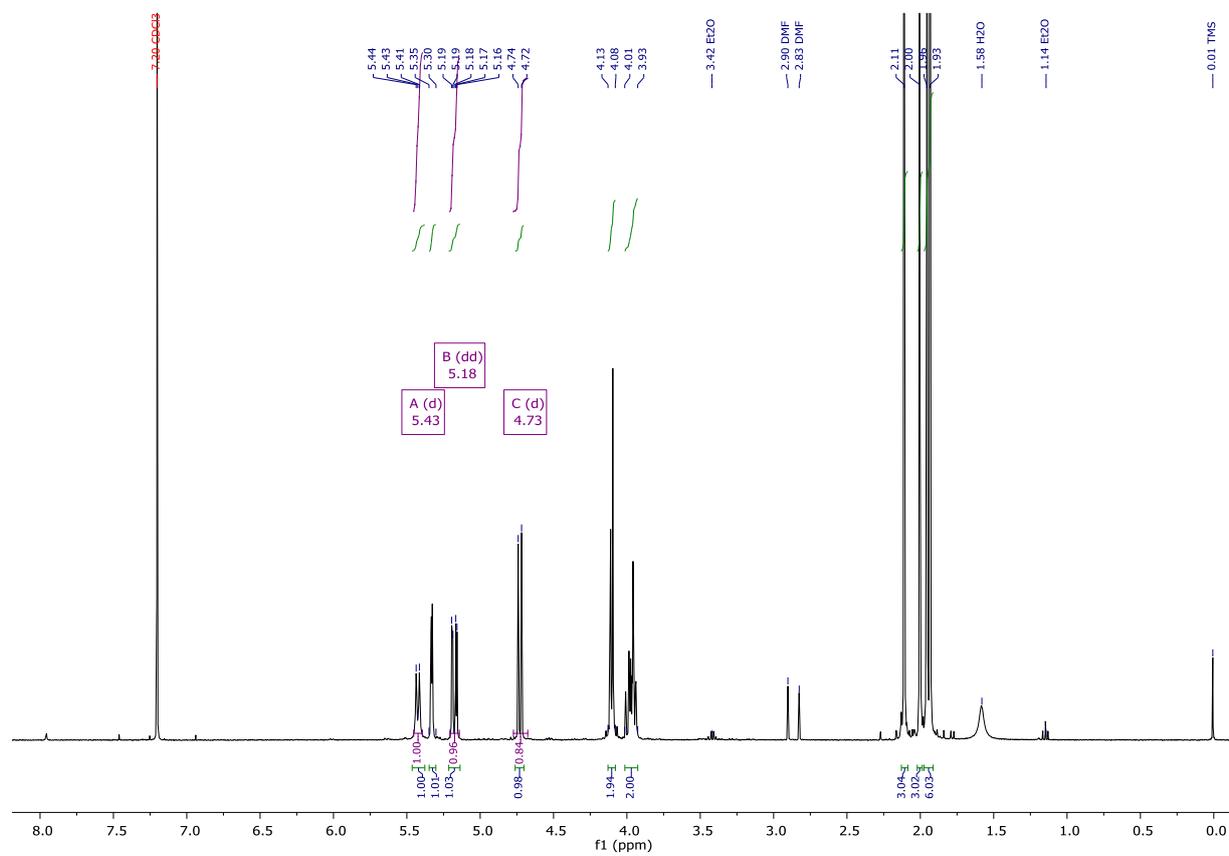


Appendix 47: Chromatogramm von **17** (5%/95% zu 50%/50% AcN/H<sub>2</sub>O in 30 min bei 25°C mit C18 RP Säule).

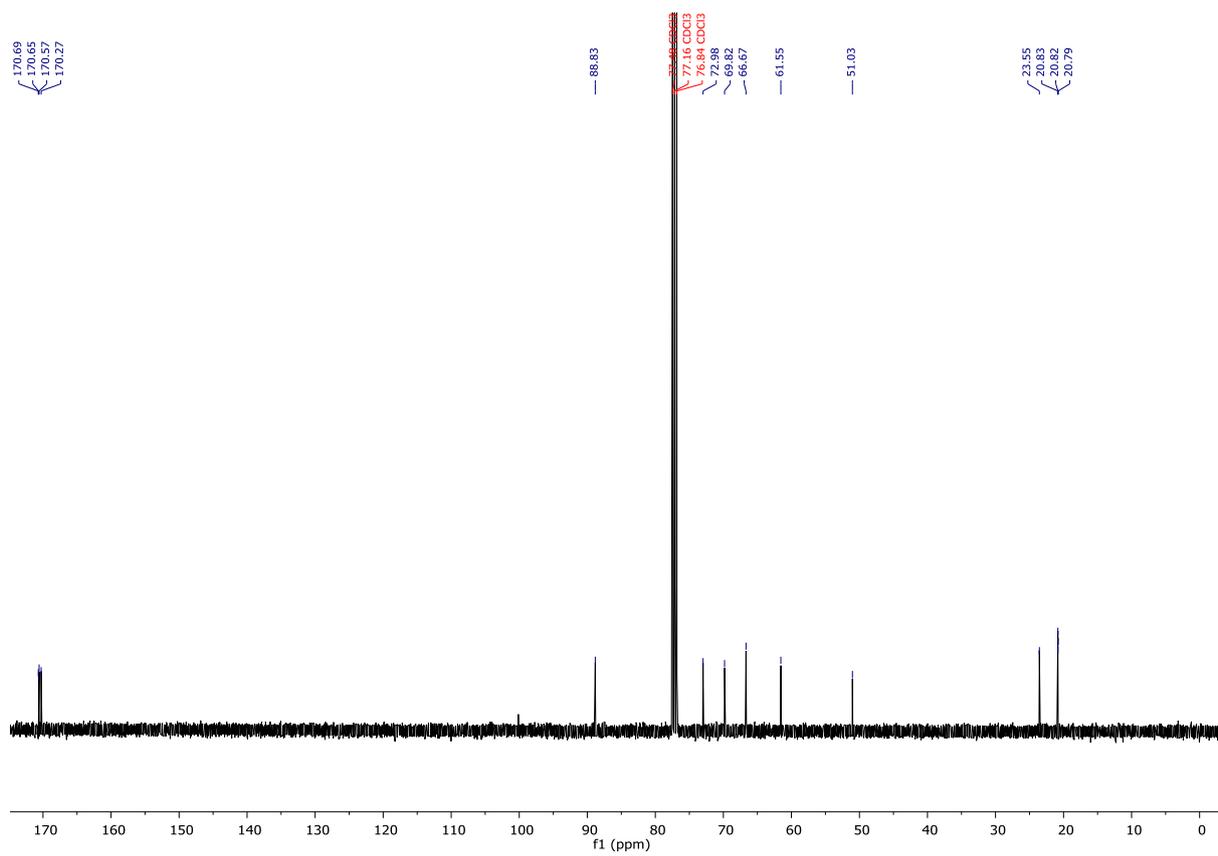


Appendix 48: HR-MS (ESI+ Q TOF) von **17** [ $M+3H$ ]<sup>3+</sup>.

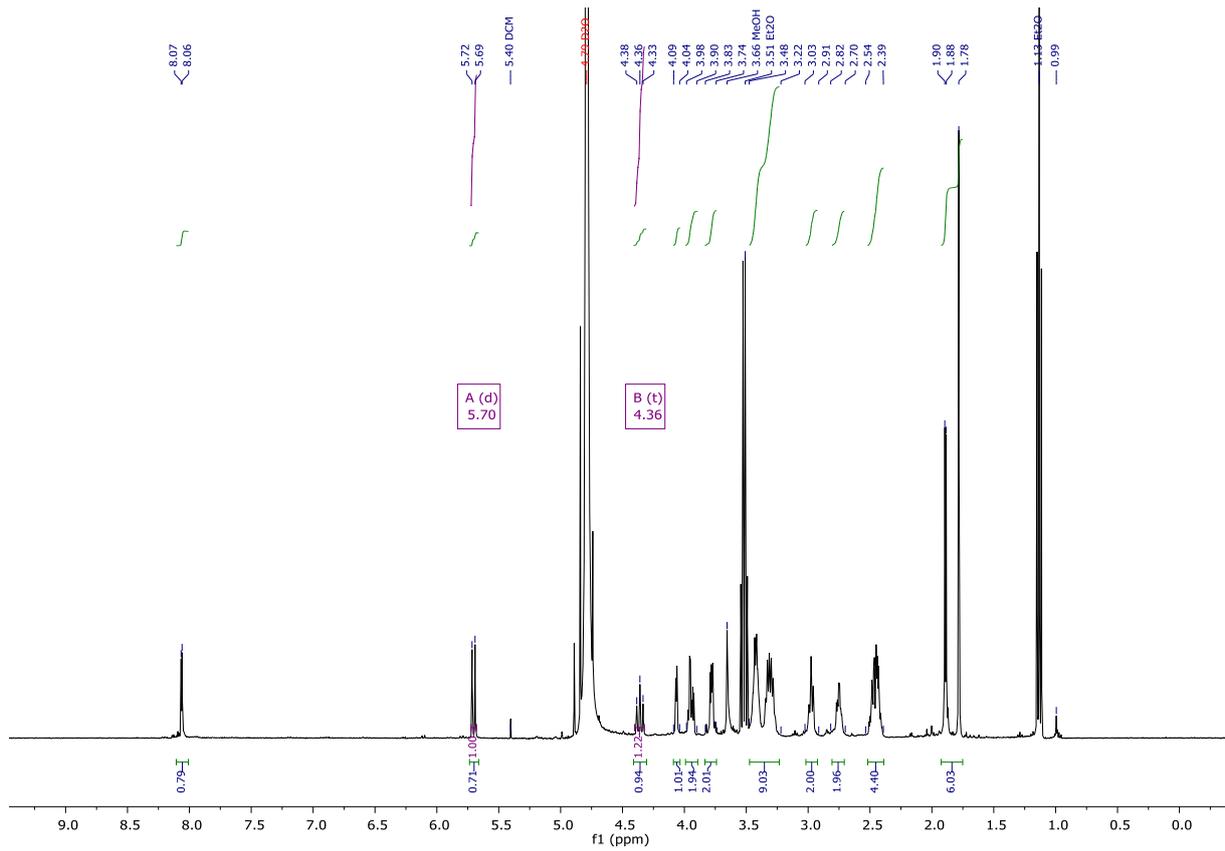
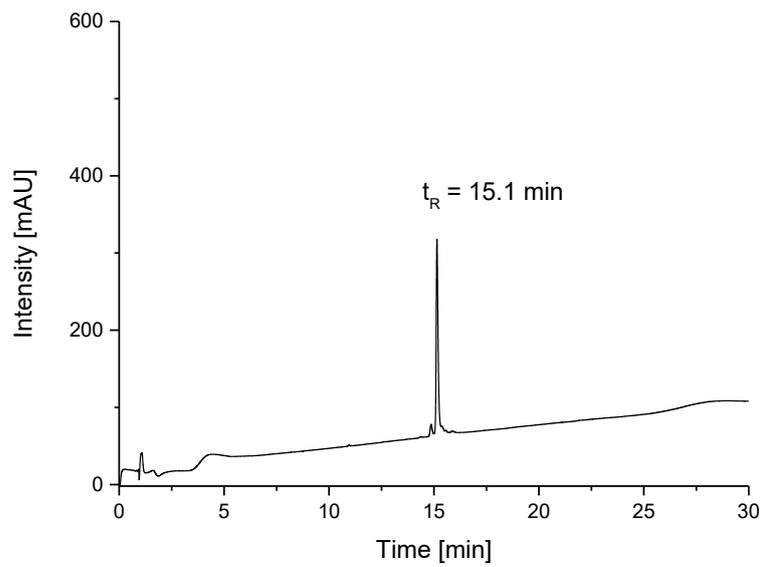
Appendix 49:  $^1\text{H-NMR}$  von **17** in  $\text{D}_2\text{O}$ , 600MHz.Appendix 50: HR-MS (ESI+ Q TOF) von **20**  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

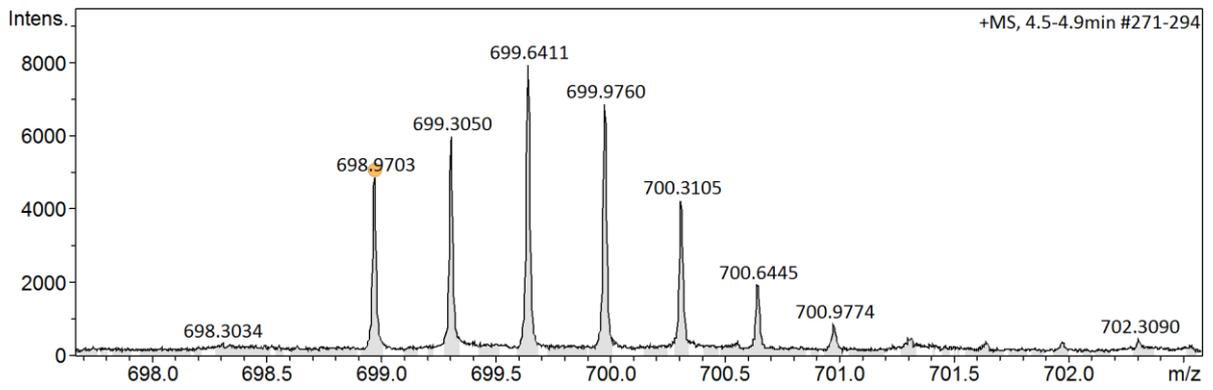
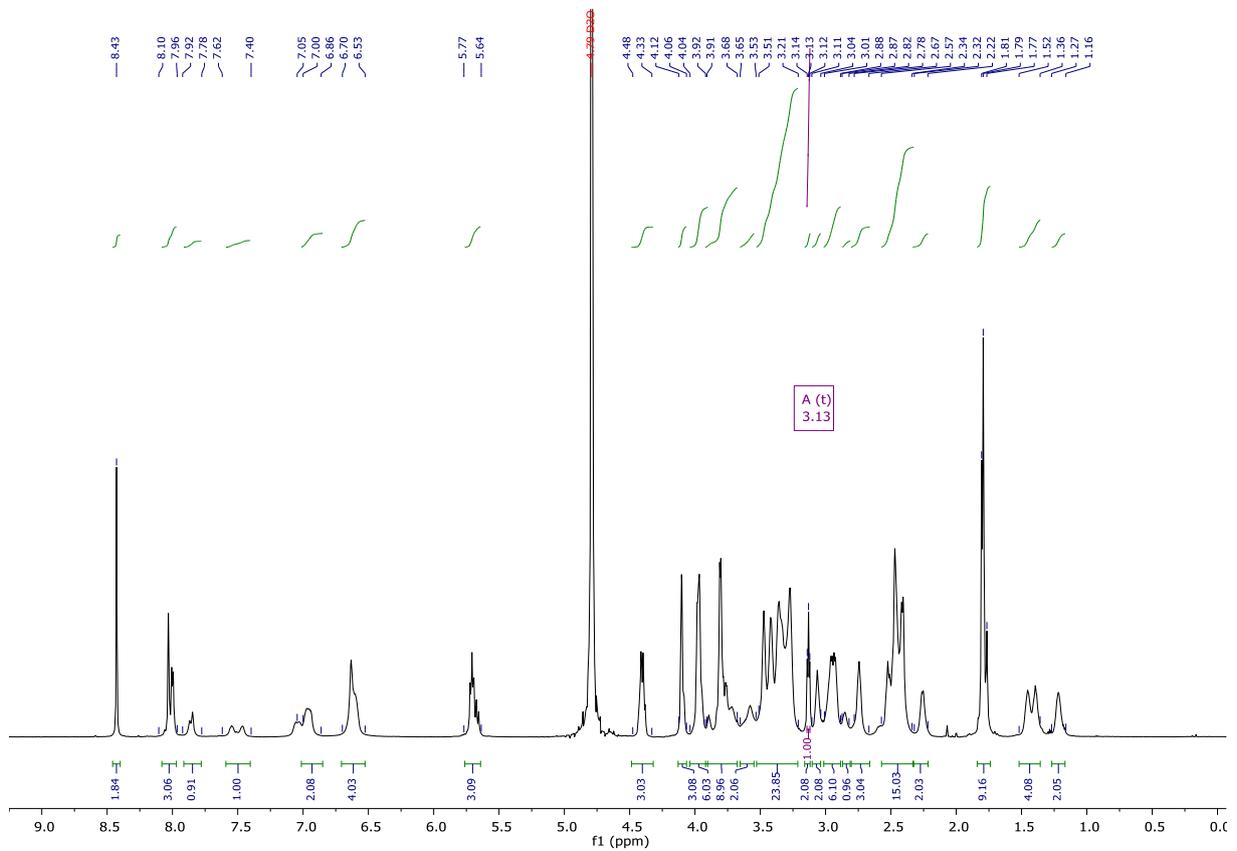


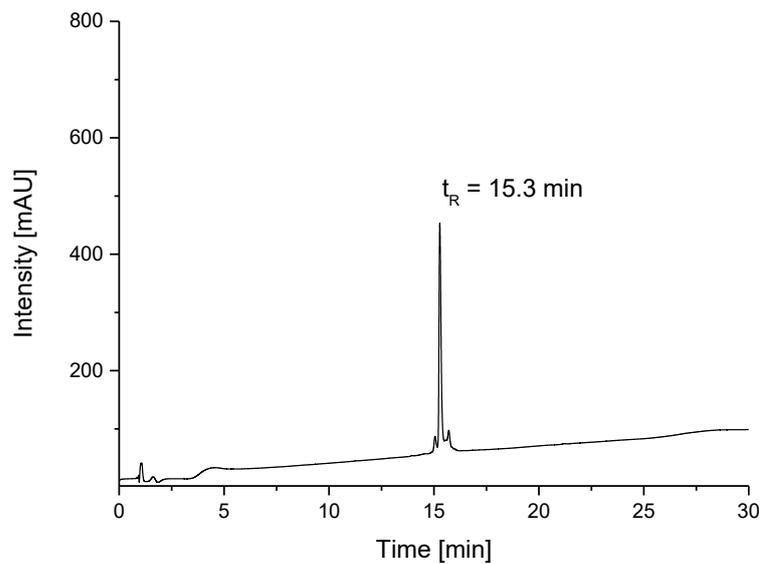
Appendix 51: <sup>1</sup>H-NMR von **20** in CDCl<sub>3</sub>, 600MHz.



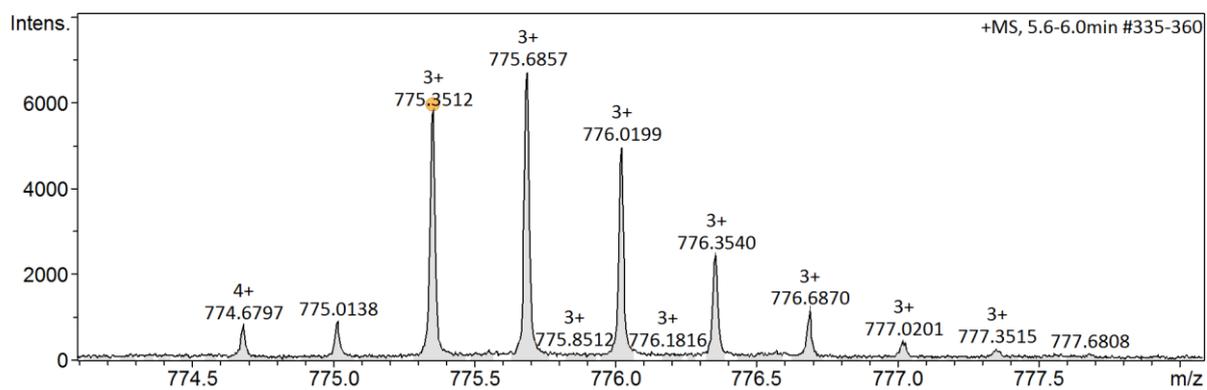
Appendix 52: <sup>13</sup>C-NMR von **20** in CDCl<sub>3</sub>, 600MHz

Appendix 53:  $^1\text{H-NMR}$  von **21** in  $\text{D}_2\text{O}$ , 600MHz.Appendix 54: Chromatogramm von **22** (5%/95% zu 50%/50% AcN/ $\text{H}_2\text{O}$  in 30 min bei  $25^\circ\text{C}$  mit C18 RP Säule).

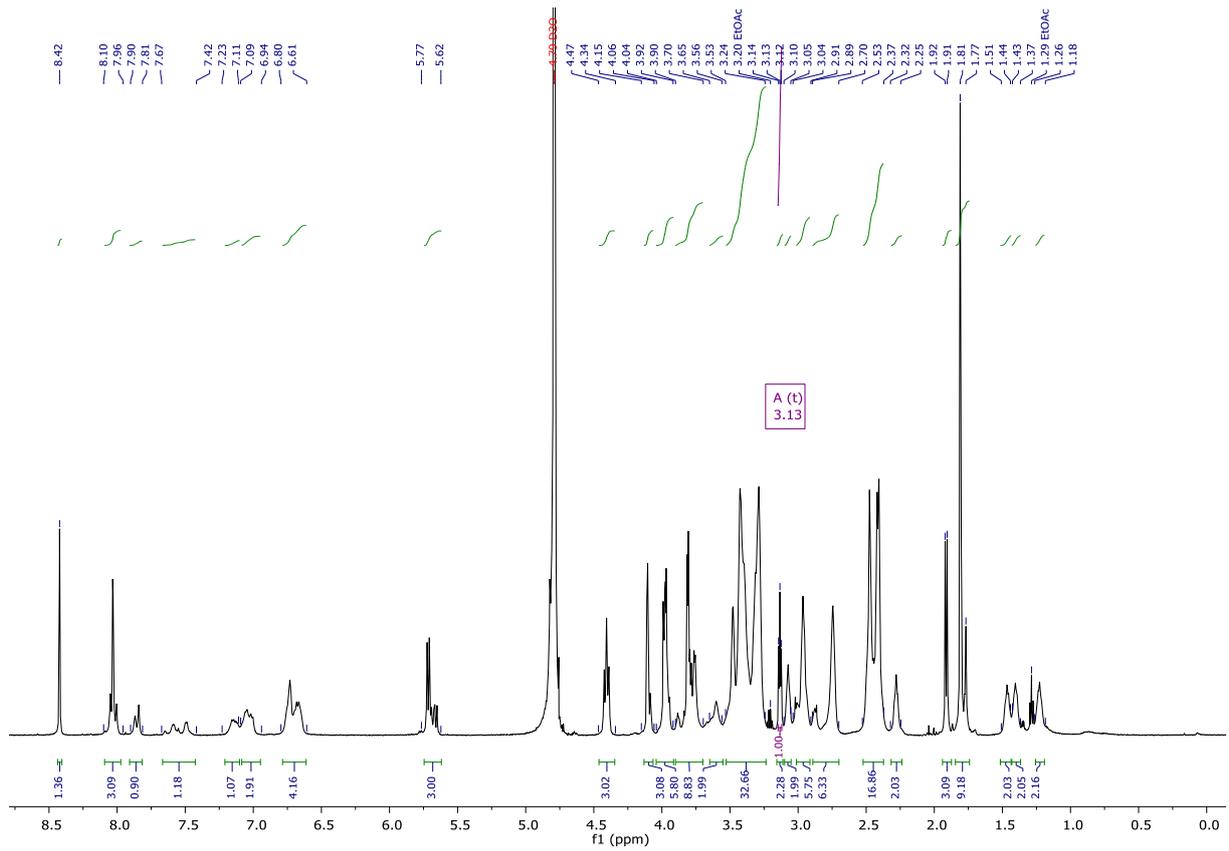
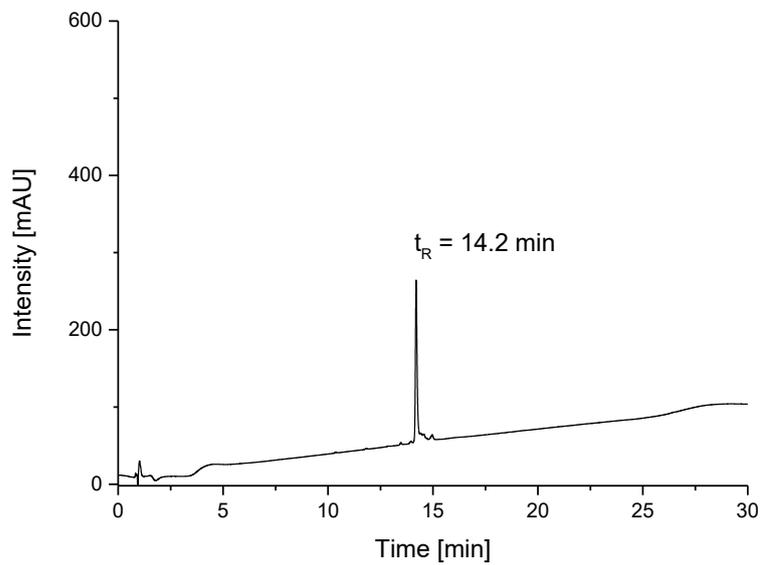
Appendix 55: HR-MS (ESI+ Q TOF) von **22**  $[M+3H]^{3+}$ .Appendix 56:  $^1\text{H-NMR}$  von **22** in  $\text{D}_2\text{O}$ , 600MHz.

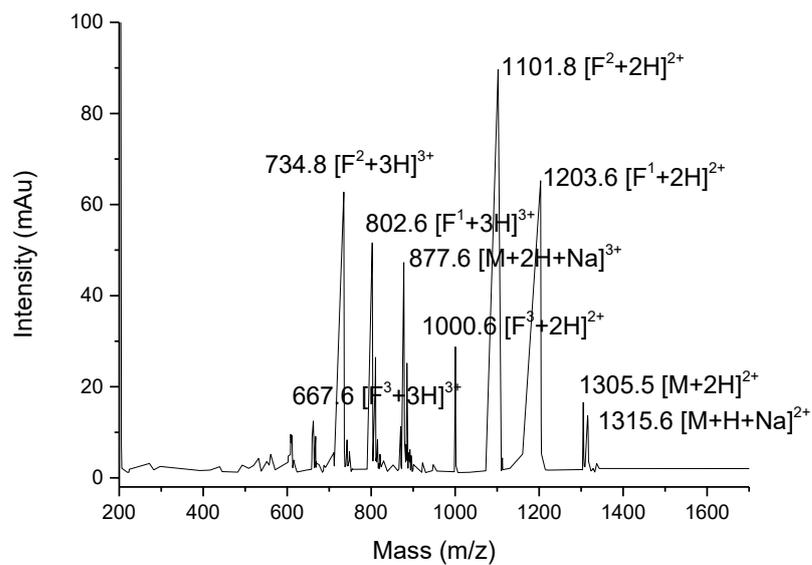


Appendix 57: Chromatogramm von **23** (5%/95% zu 50%/50% AcN/H<sub>2</sub>O in 30 min bei 25°C mit C18 RP Säule).

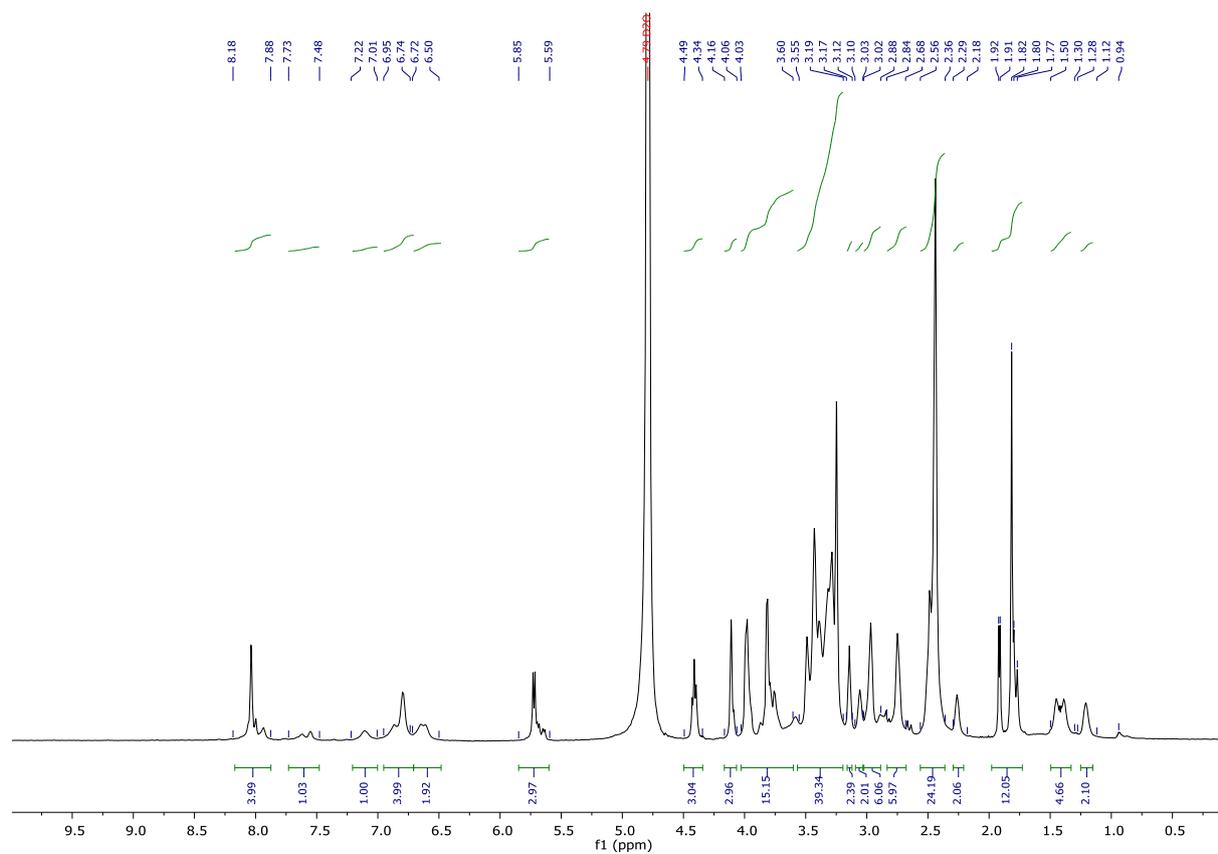


Appendix 58: HR-MS (ESI<sup>+</sup> Q TOF) von **23** [ $M+3H$ ]<sup>3+</sup>.

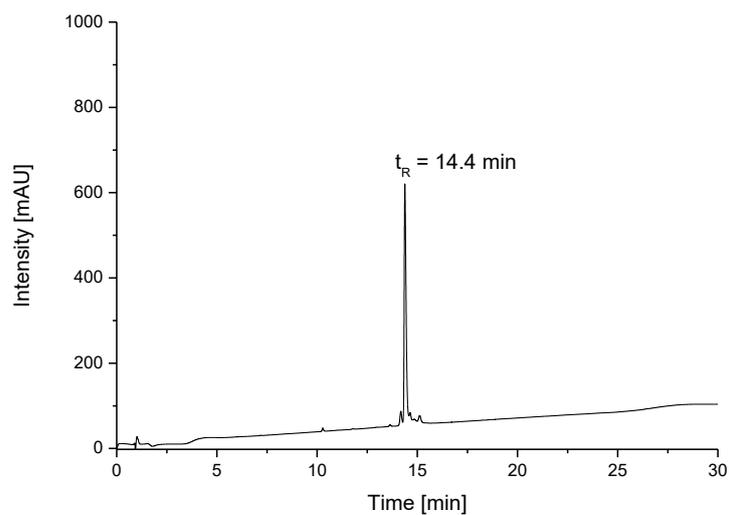
Appendix 59:  $^1\text{H-NMR}$  von **23** in  $\text{D}_2\text{O}$ , 600MHz.Appendix 60: Chromatogramm von **24** (5%/95% zu 50%/50% AcN/ $\text{H}_2\text{O}$  in 30 min bei 25°C mit C18 RP Säule).



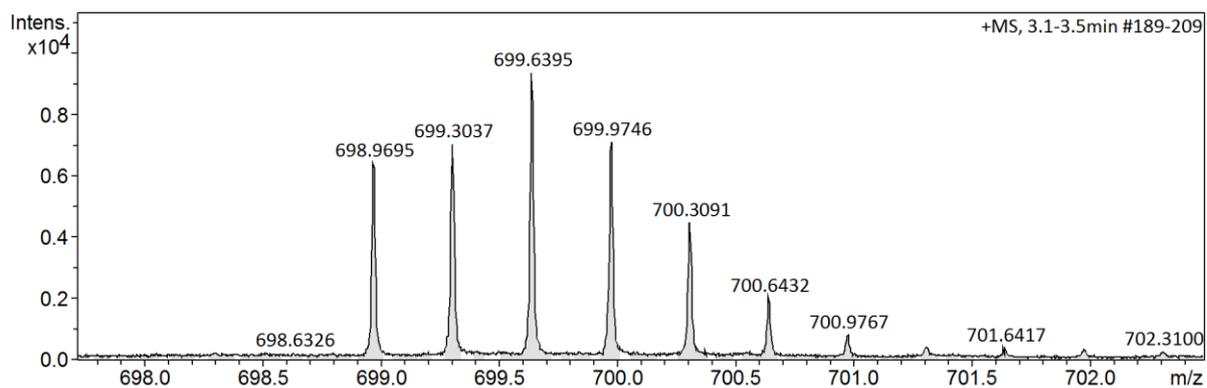
Appendix 61: ESI von **24** (F<sup>1</sup>= Fragment minus 1Kohlenhydratmolekül, F<sup>2</sup>= Fragment minus 2 Kohlenhydratmoleküle, F<sup>3</sup>= Fragment minus 3 Kohlenhydratmoleküle).



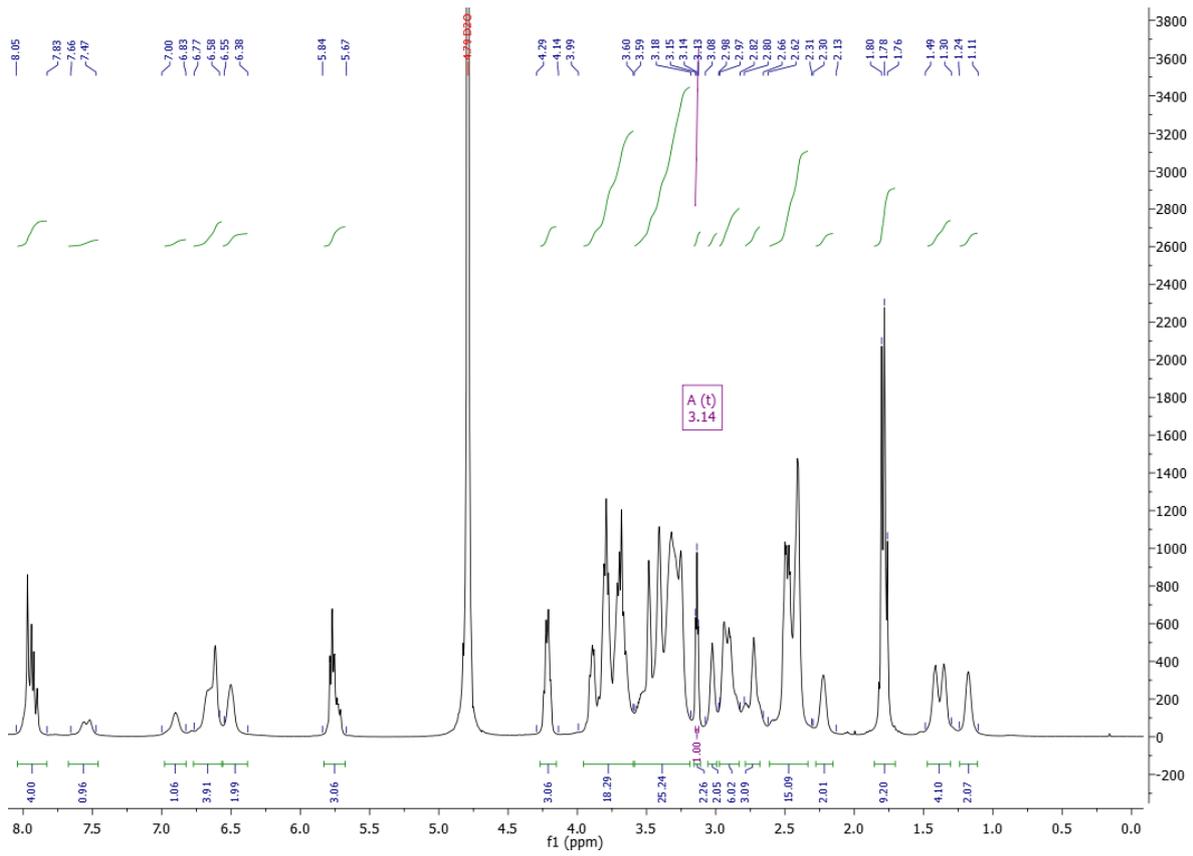
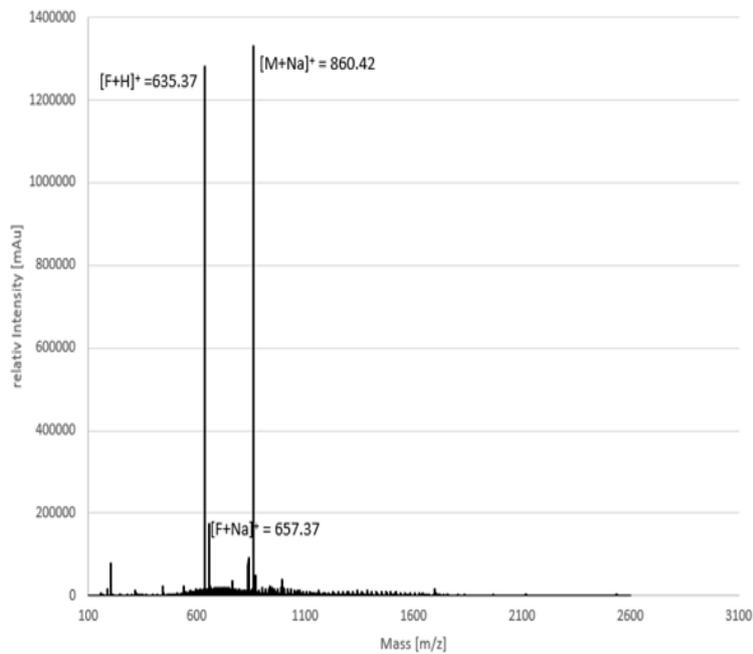
Appendix 62: <sup>1</sup>H-NMR von **24** in D<sub>2</sub>O, 600MHz.

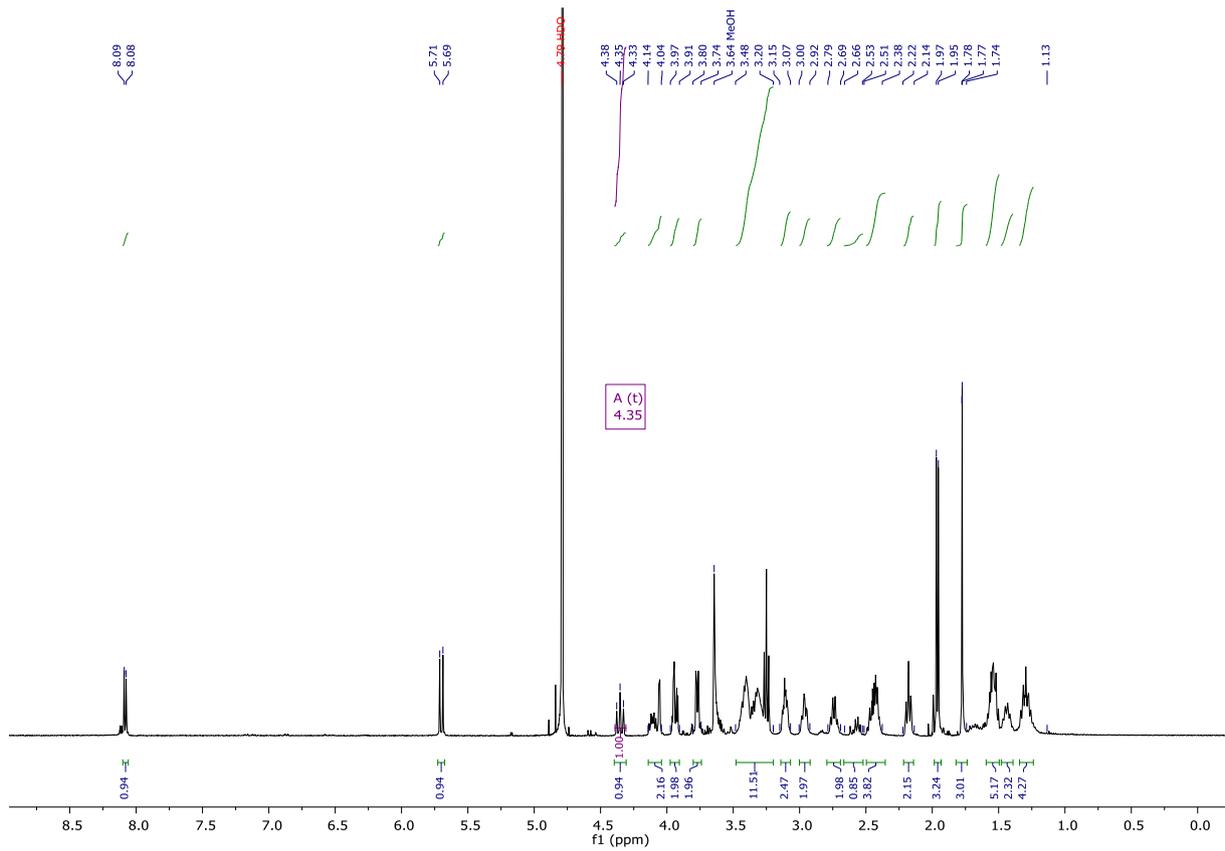
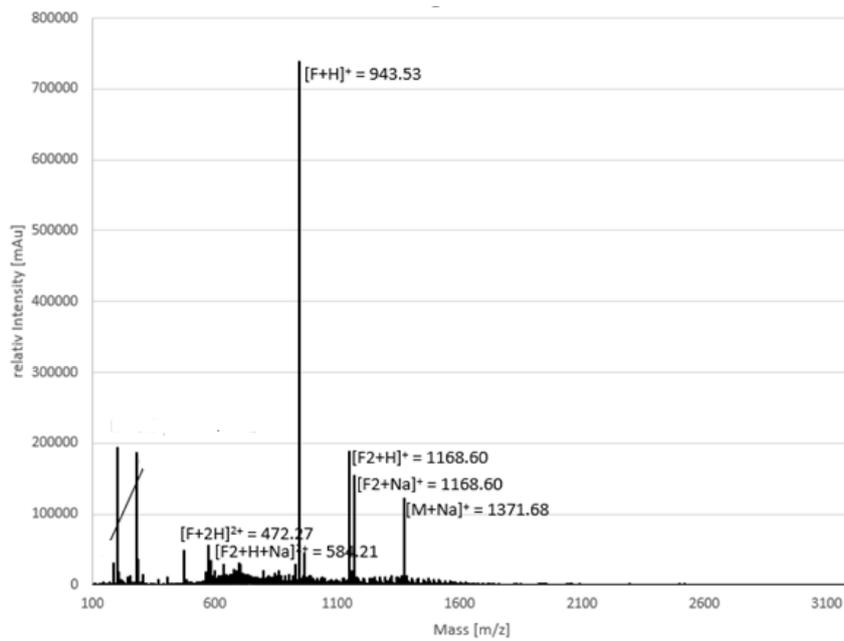


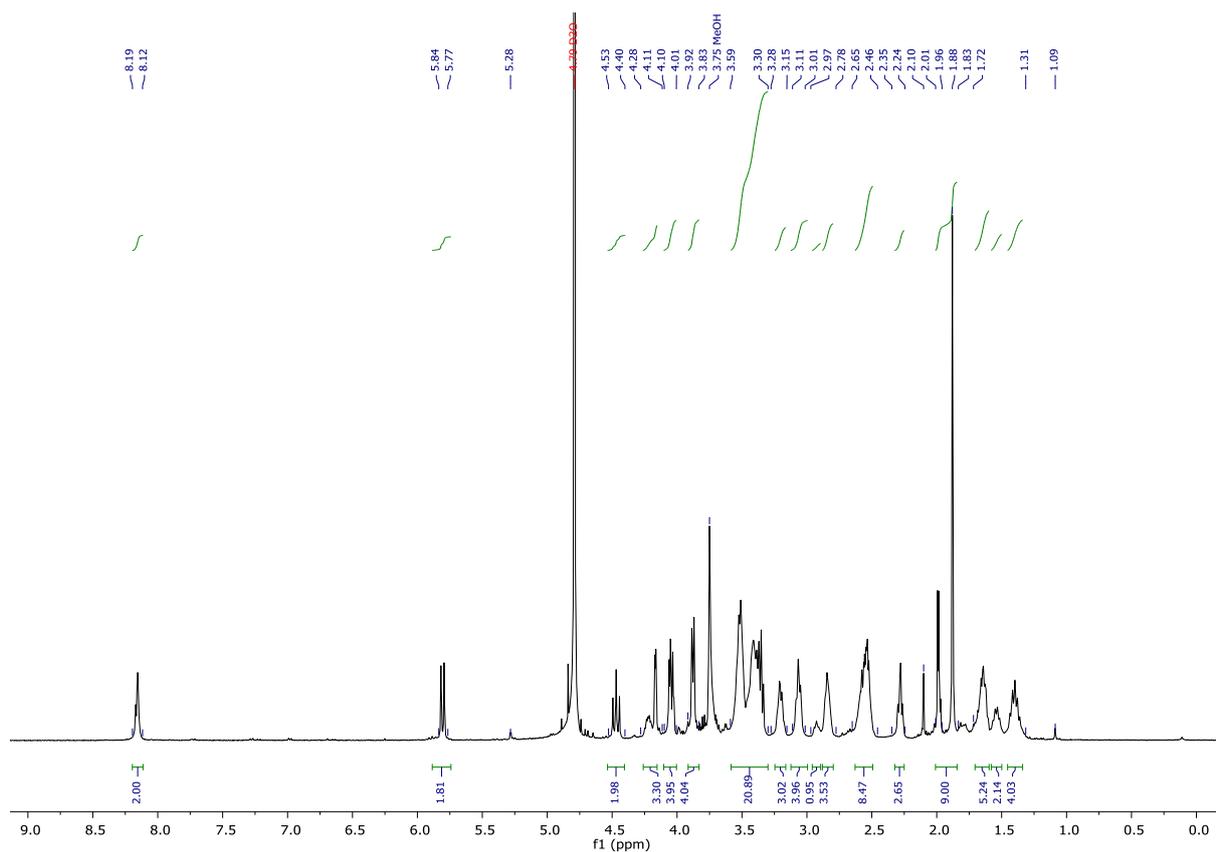
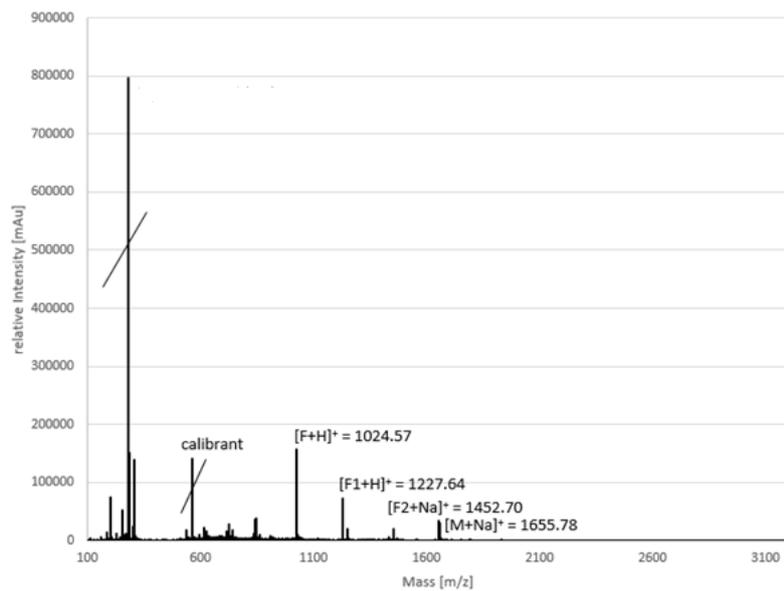
Appendix 63: Chromatogramm von **25** (5%/95% zu 50%/50% AcN/H<sub>2</sub>O in 30 min bei 25°C mit C18 RP Säule).

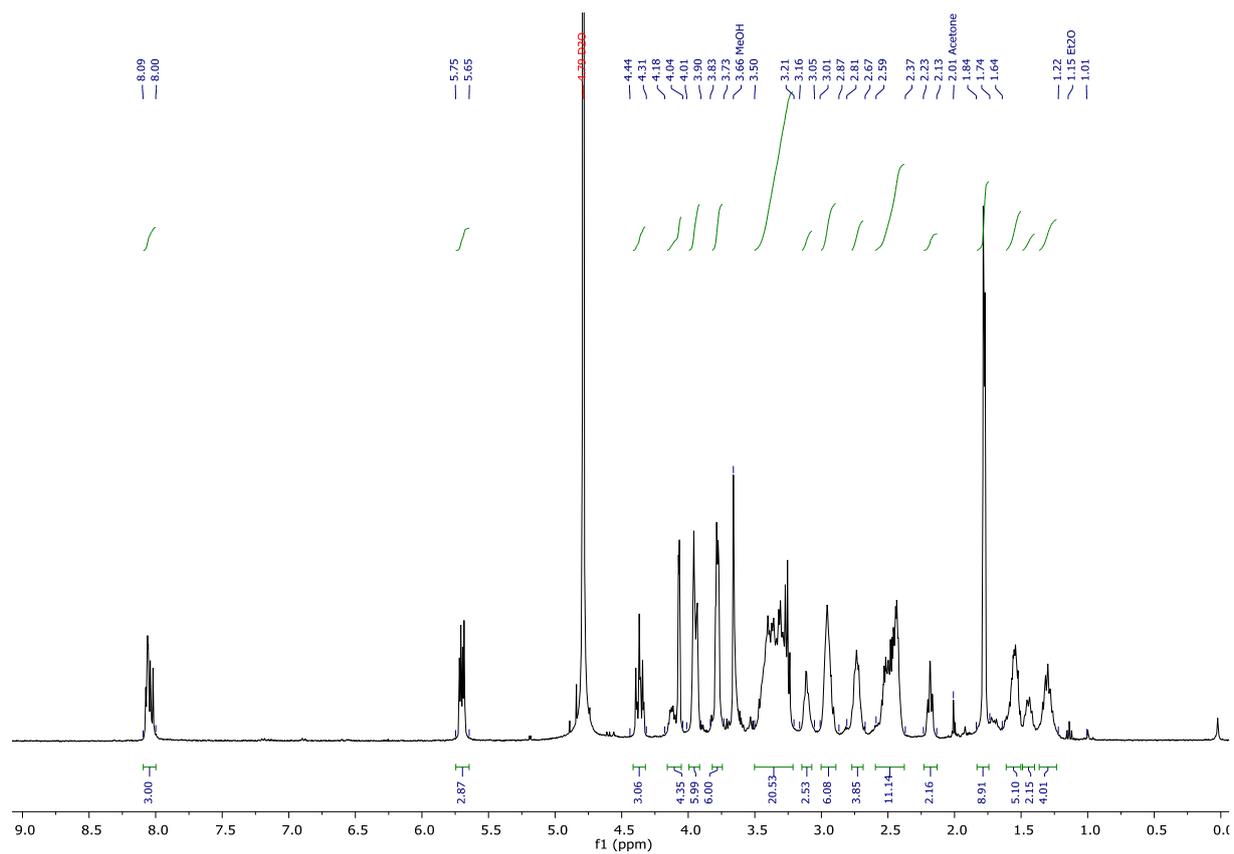


Appendix 64: HR-MS (ESI<sup>+</sup> Q TOF) von **25** [M+3H]<sup>3+</sup>.

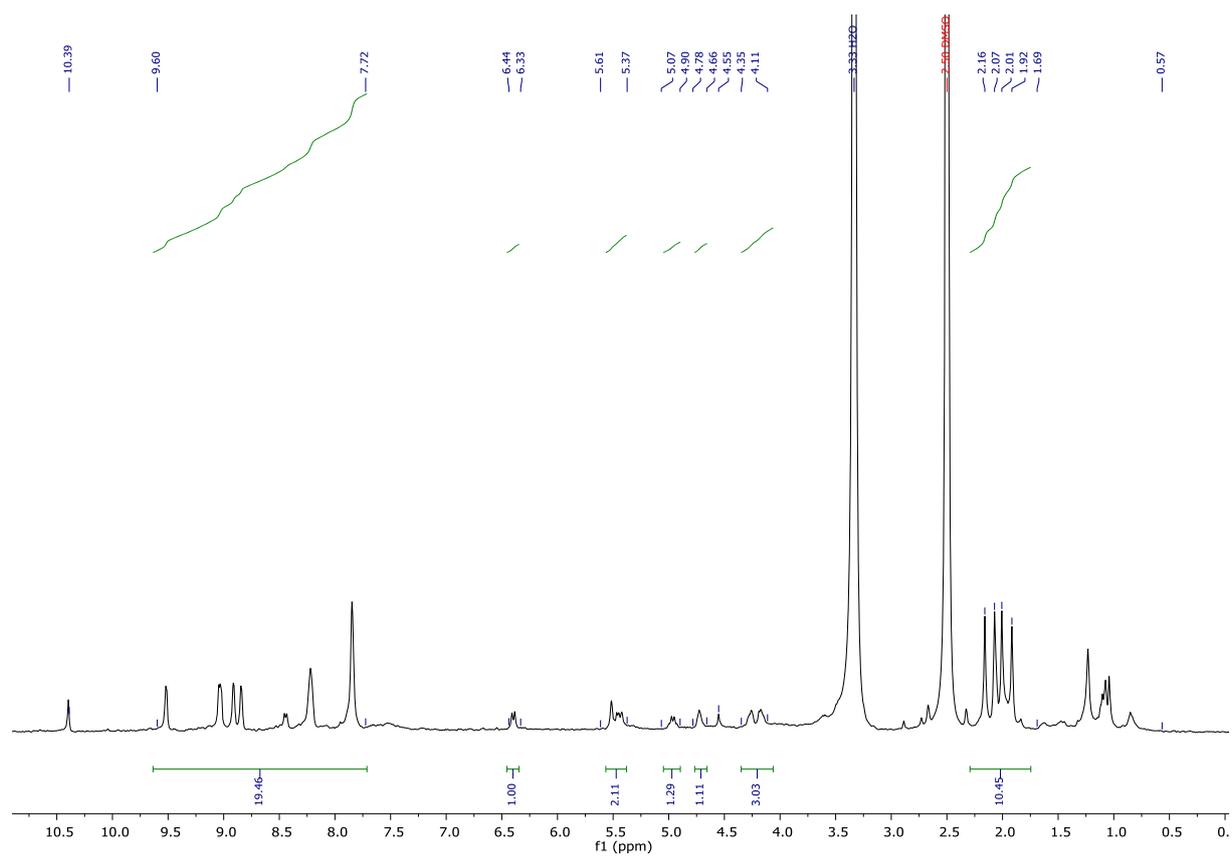
Appendix 65:  $^1\text{H-NMR}$  von **25** in  $\text{D}_2\text{O}$ , 600MHz.Appendix 66: HR-MS (ESI<sup>+</sup> Q TOF) von **26**  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

Appendix 67:  $^1\text{H-NMR}$  von **26** in  $\text{D}_2\text{O}$ , 600MHz.Appendix 68: HR-MS (ESI $^+$  Q TOF) von **27** [M+Na] $^+$ .

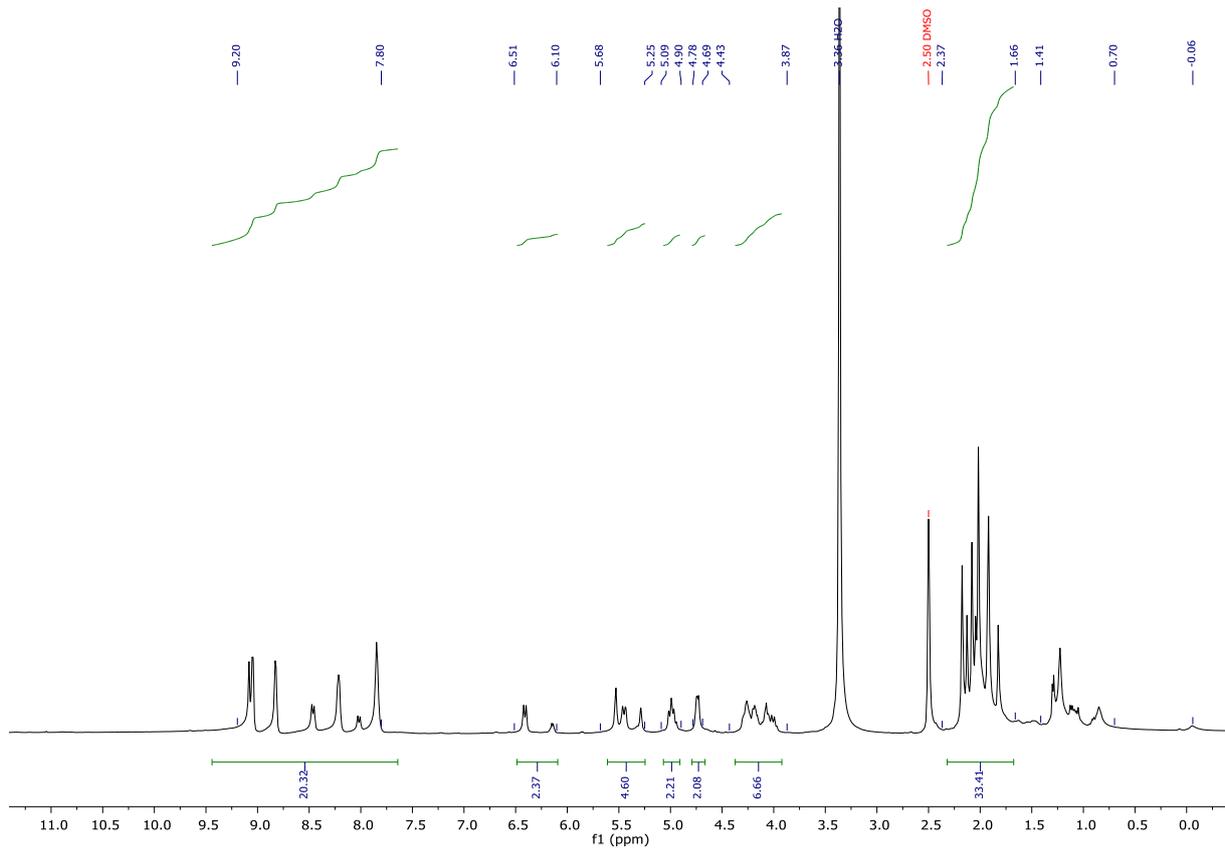
Appendix 69:  $^1\text{H-NMR}$  von **27** in  $\text{D}_2\text{O}$ , 600MHz.Appendix 70: HR-MS (ESI+ Q TOF) von **28**  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .



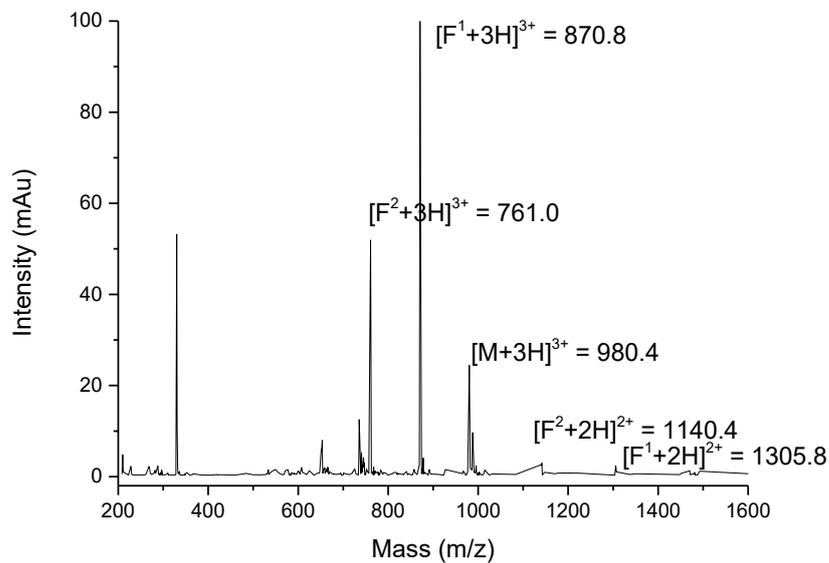
Appendix 71:  $^1\text{H-NMR}$  von **28** in  $\text{D}_2\text{O}$ , 600MHz.



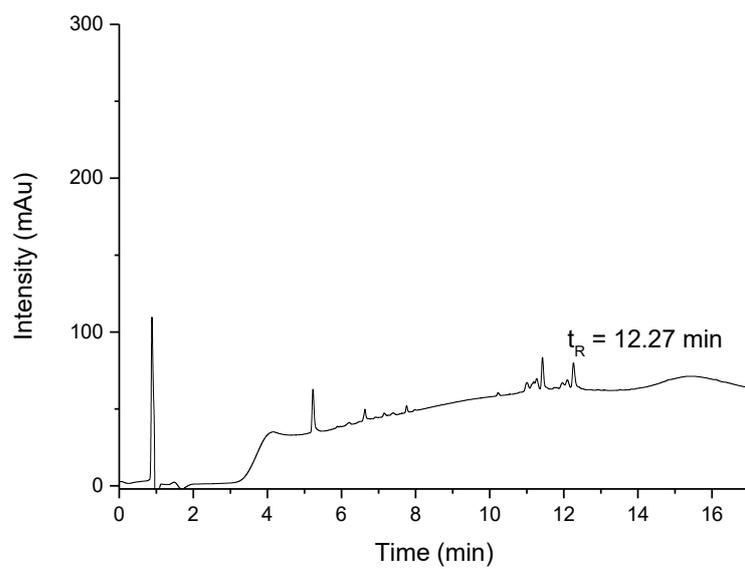
Appendix 72:  $^1\text{H-NMR}$  von **29** in DMSO, 400MHz.



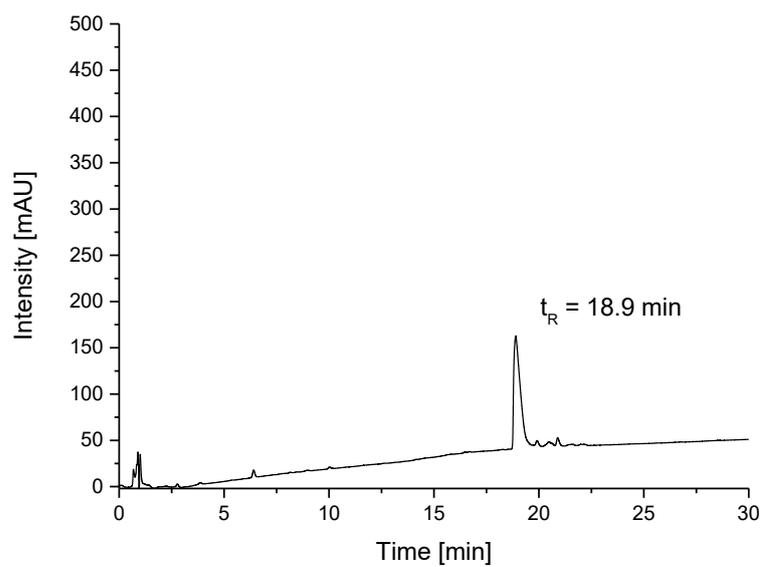
Appendix 73:  $^1\text{H-NMR}$  von **30** in DMSO, 400MHz.



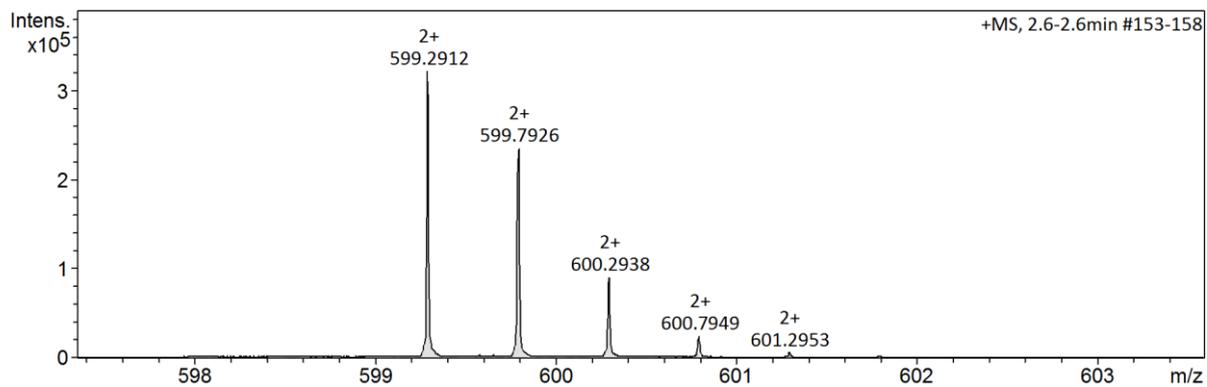
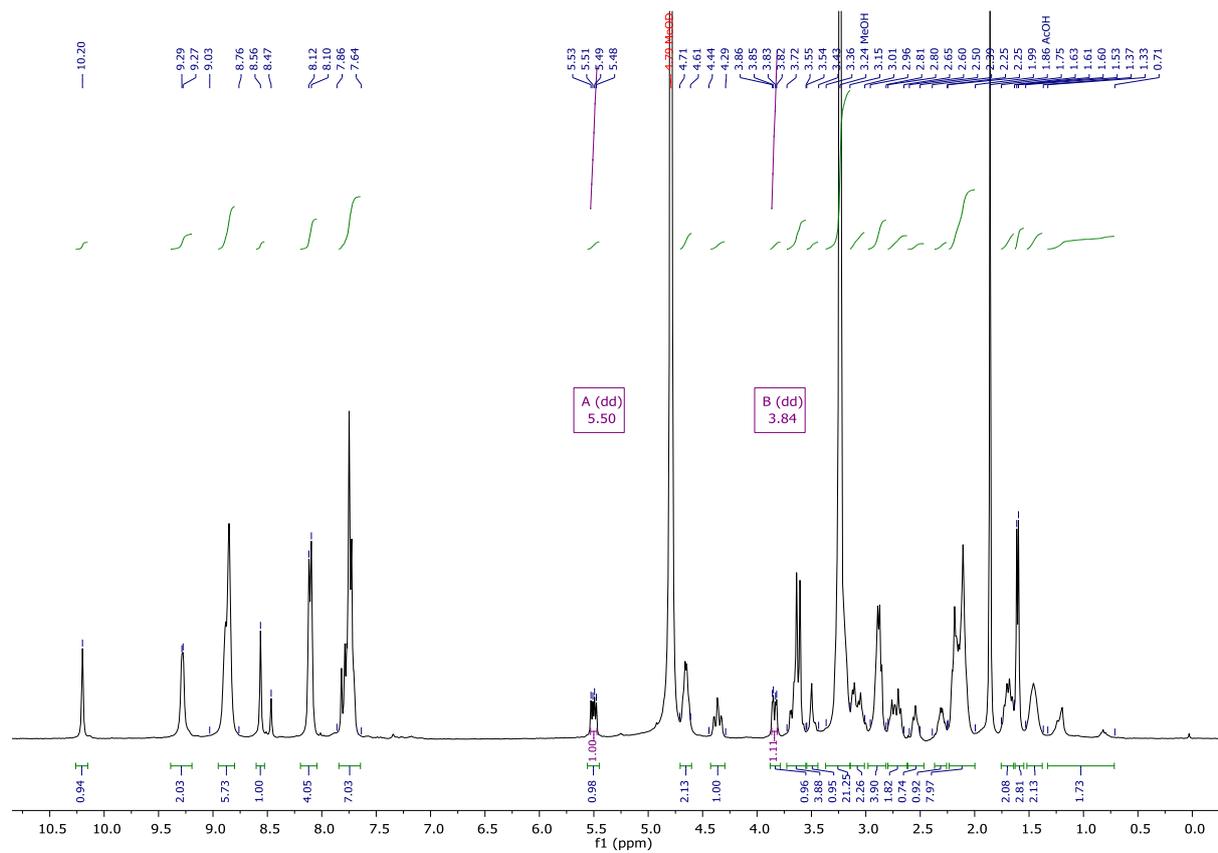
Appendix 74: ESI von **31** ( $F^1$ = Fragment minus 1 Kohlenhydratmolekül,  $F^2$ = Fragment minus 2 Kohlenhydratmoleküle,  $F^3$ = Fragment minus 3 Kohlenhydratmoleküle).

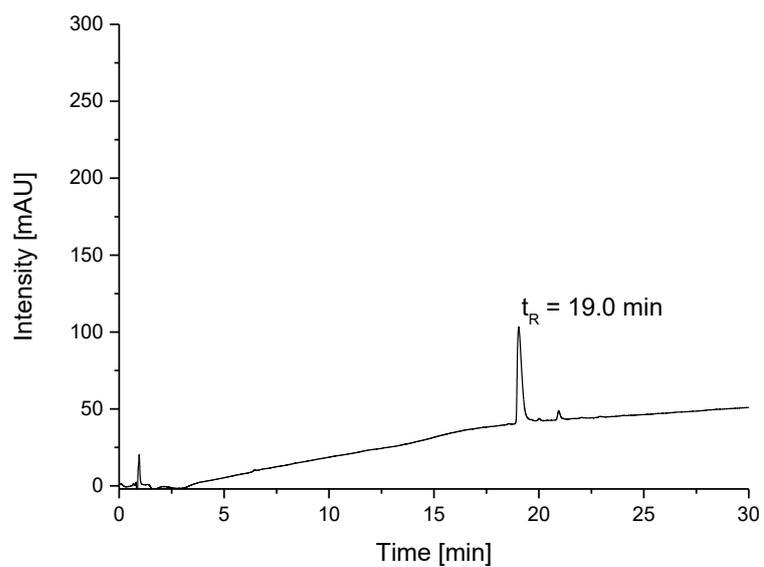


Appendix 75: Chromatogramm von **31** (5%/95% zu 95%/5% AcN/H<sub>2</sub>O in 17 min bei 25°C mit C18 RP Säule).

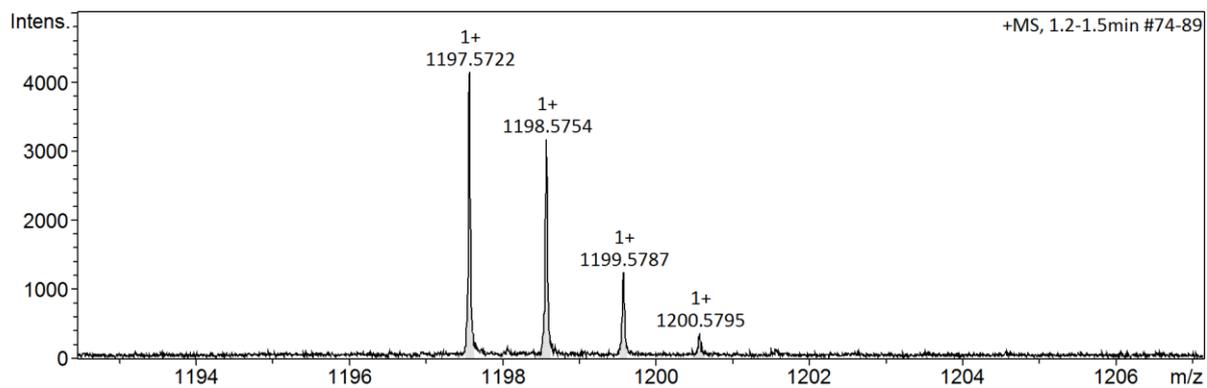


Appendix 76: Chromatogramm von **32** (5%/95% zu 50%/50% AcN/H<sub>2</sub>O in 30 min bei 25°C mit C18 RP Säule).

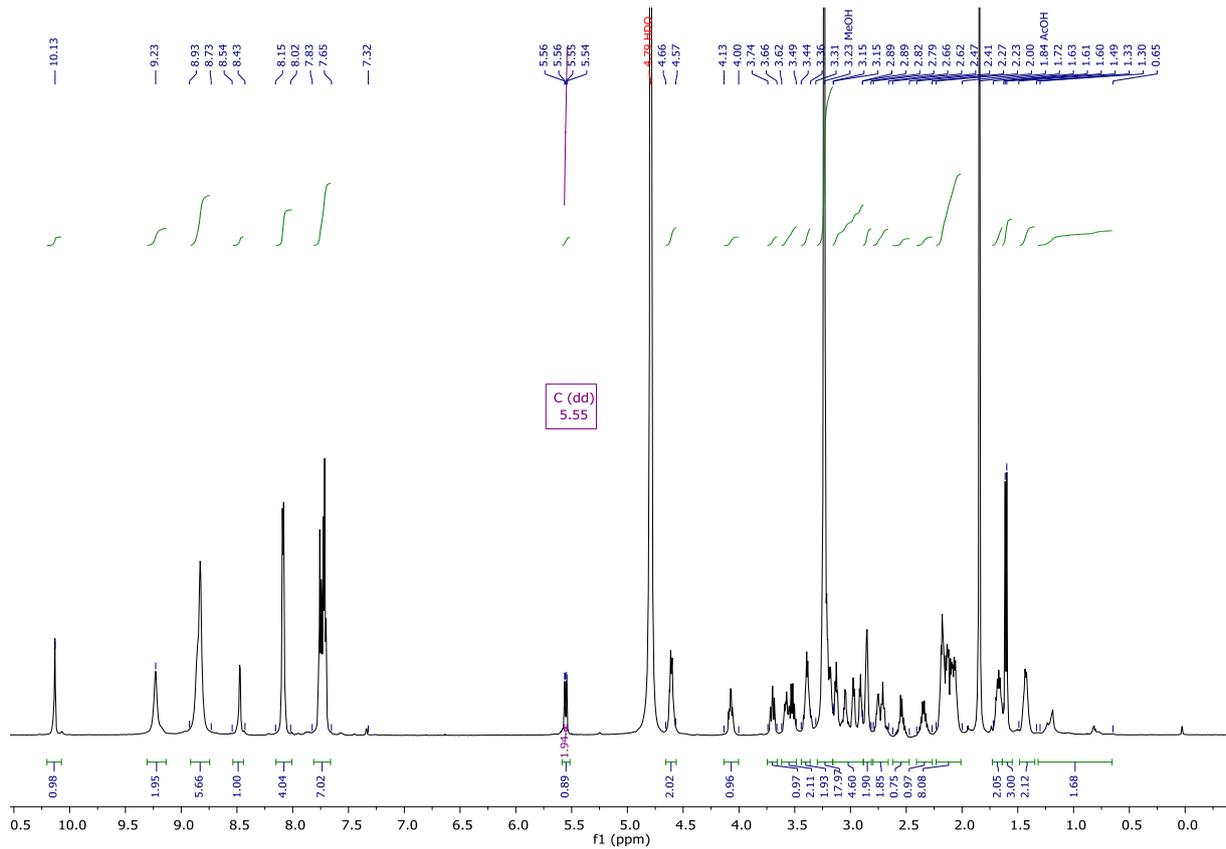
Appendix 77: HR-MS (ESI+ Q TOF) von **32**  $[M+2H]^{2+}$ .Appendix 78:  $^1\text{H-NMR}$  von **32** in MeOH, 600MHz.



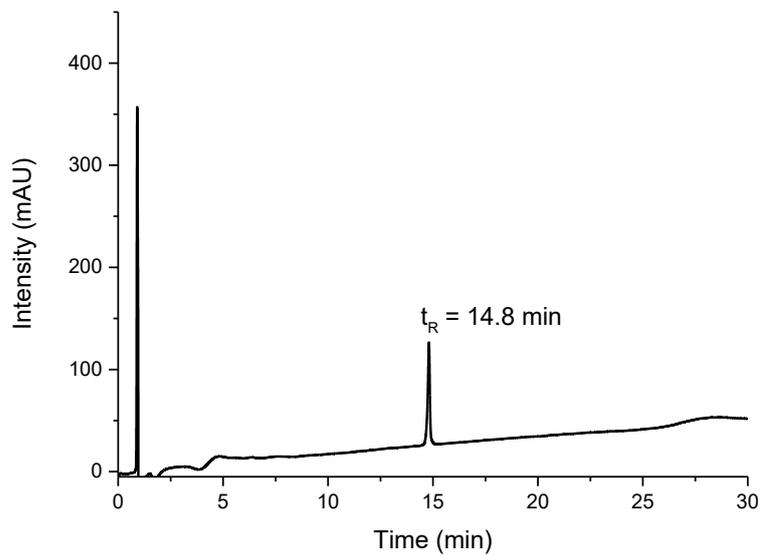
Appendix 79: Chromatogramm von **33** (5%/95% zu 50%/50% AcN/H<sub>2</sub>O in 30 min bei 25°C mit C18 RP Säule).



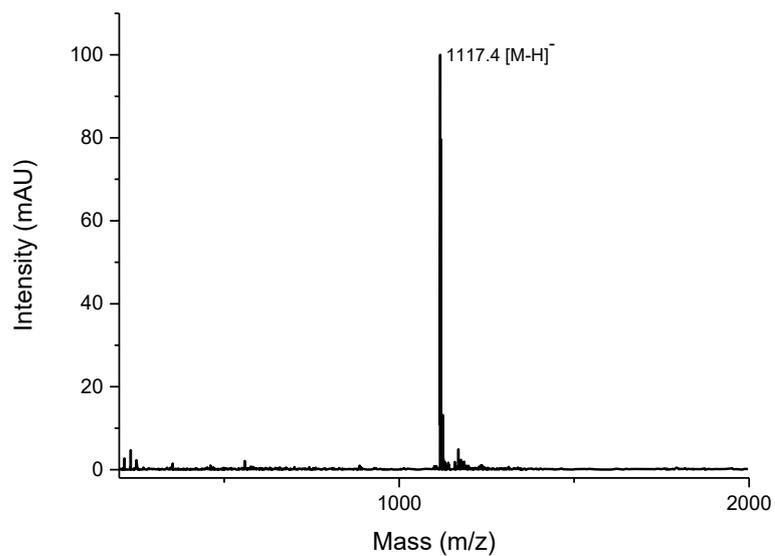
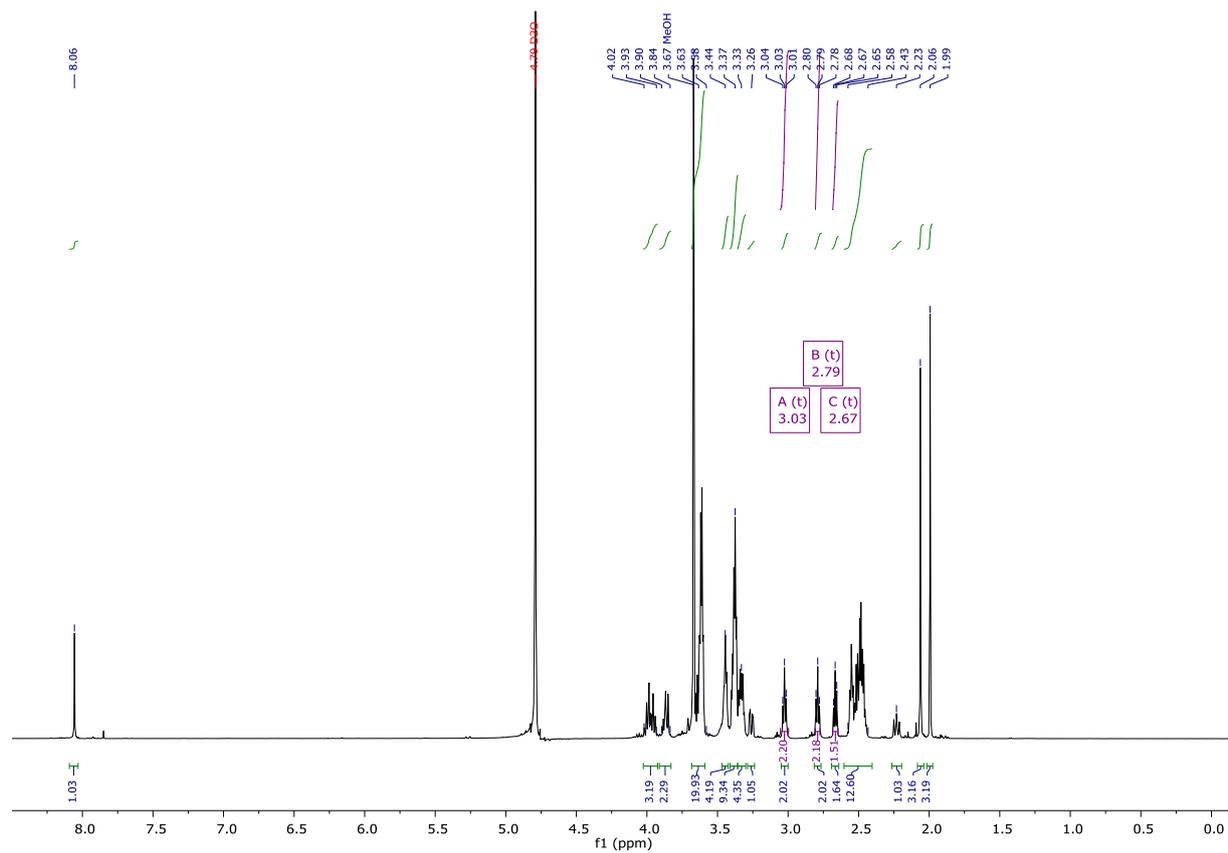
Appendix 80: HR-MS (ESI<sup>+</sup> Q TOF) von **33** [M+H]<sup>+</sup>.

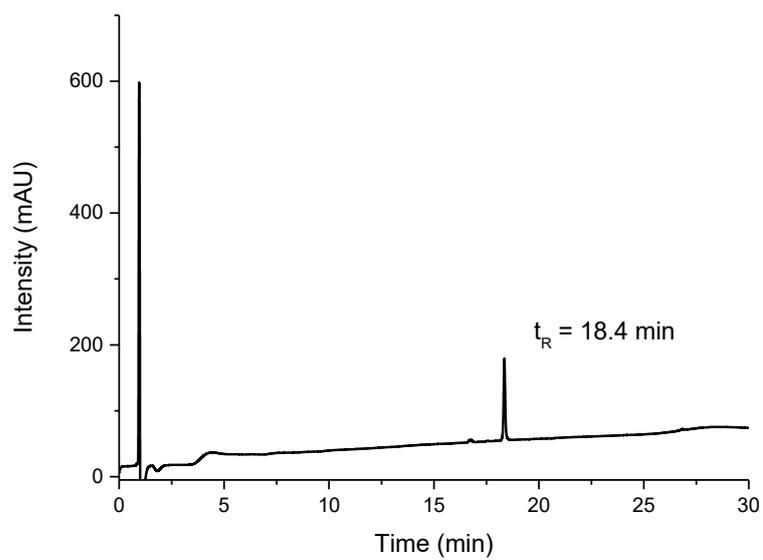


Appendix 81:  $^1\text{H-NMR}$  von **33** in MeOH, 600MHz.

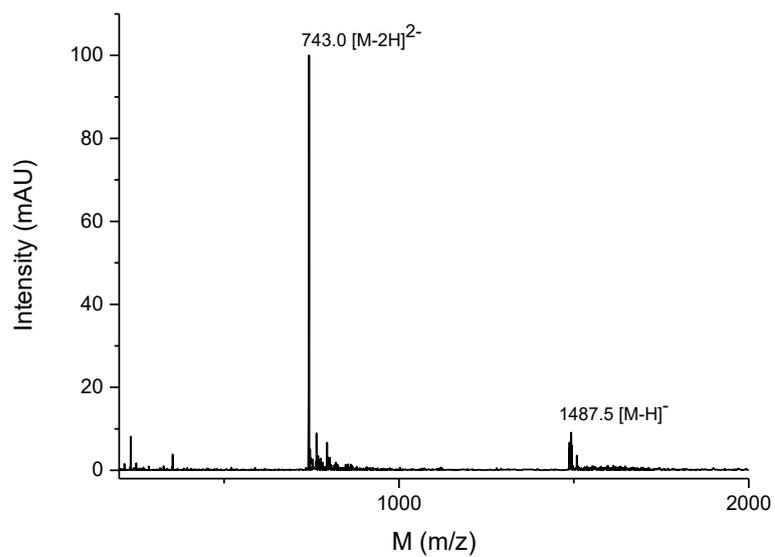


Appendix 82: Chromatogramm von **34** (acetylierte Kohlenhydrate) (5%/95% zu 50%/50% AcN/H<sub>2</sub>O in 30 min bei 25°C mit C18 RP Säule).

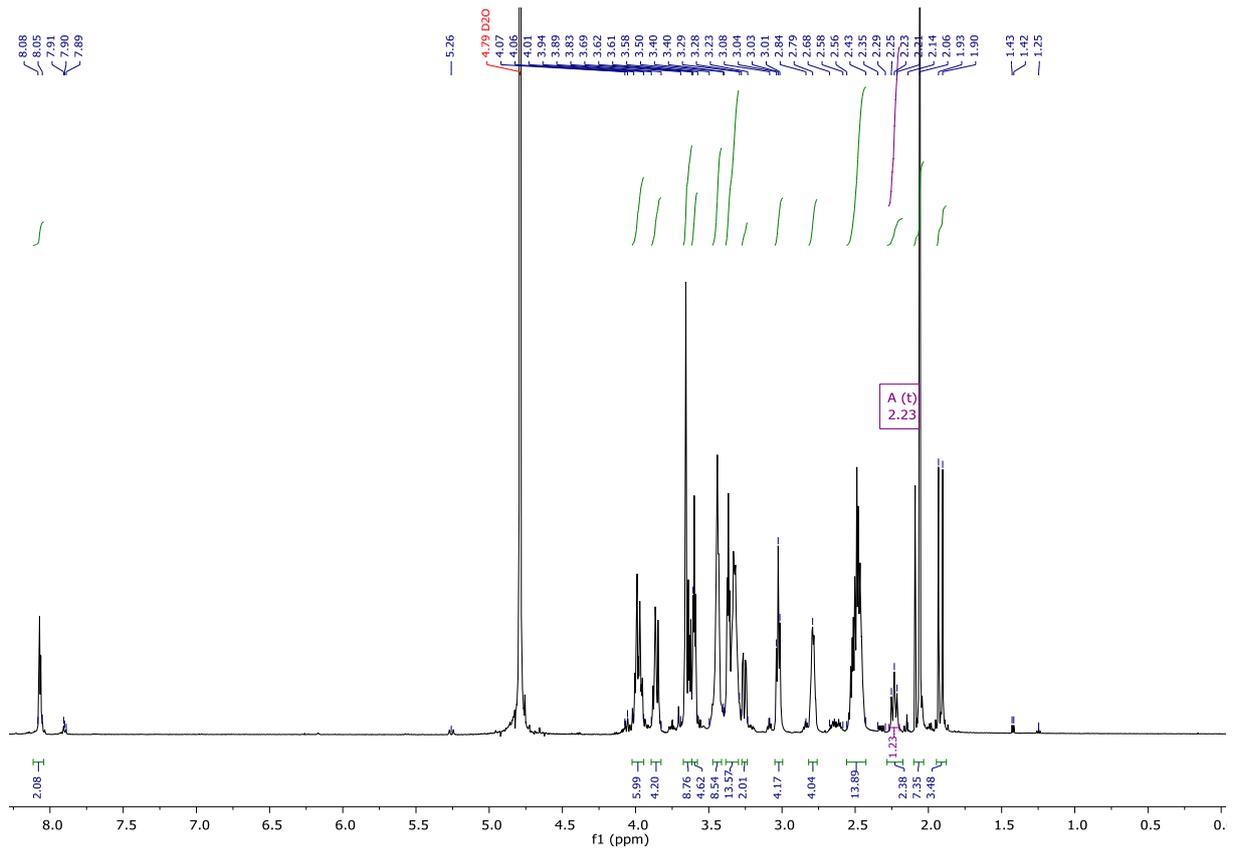
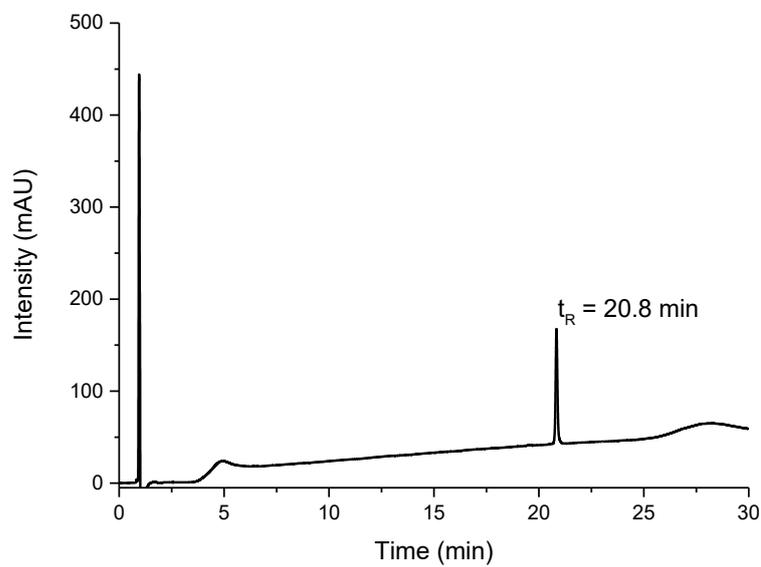
Appendix 83: HR-MS (ESI-Q TOF) von **34**  $[M-H]^-$ .Appendix 84:  $^1H$ -NMR von **34** in  $D_2O$ , 600MHz.

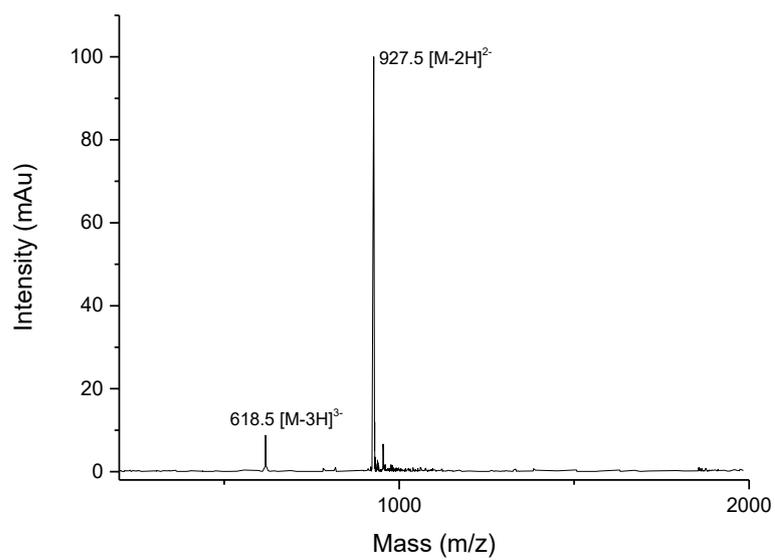
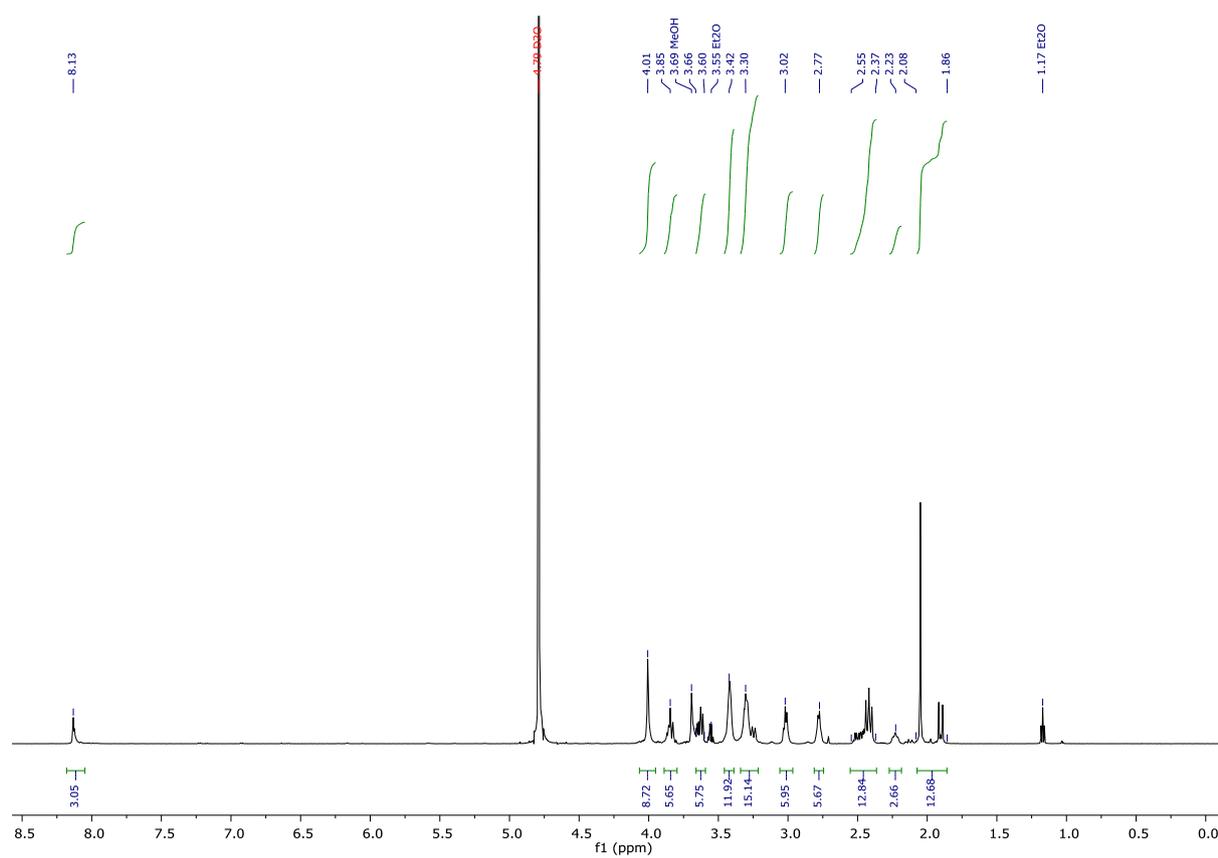


Appendix 85: Chromatogramm von **35** (acetylierte Kohlenhydrate) (5%/95% zu 50%/50% AcN/H<sub>2</sub>O in 30 min bei 25°C mit C18 RP Säule).



Appendix 86: HR-MS (ESI-Q TOF) von **35** [M-H]<sup>-</sup>.

Appendix 87:  $^1\text{H-NMR}$  von **35** in  $\text{D}_2\text{O}$ , 600MHz.Appendix 88: Chromatogramm von **36** (acetylierte Kohlenhydrate) 5%/95% zu 50%/50% AcN/ $\text{H}_2\text{O}$  in 30 min bei 25°C mit C18 RP Säule).

Appendix 89: HR-MS (ESI-Q TOF) von **36** [M-2H]<sup>2+</sup>.Appendix 90: <sup>1</sup>H-NMR von **36** in D<sub>2</sub>O, 600MHz.